



**HAL**  
open science

# Etude de l'absorption intestinale de la carboxyméthyllisine alimentaire et de la glycation endogène induite par le glucose chez *Caenorhabditis elegans* : vers de nouvelles perspectives de recherche

Constance Dubois

## ► To cite this version:

Constance Dubois. Etude de l'absorption intestinale de la carboxyméthyllisine alimentaire et de la glycation endogène induite par le glucose chez *Caenorhabditis elegans* : vers de nouvelles perspectives de recherche. Santé. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS016 . tel-04123853

**HAL Id: tel-04123853**

**<https://theses.hal.science/tel-04123853>**

Submitted on 9 Jun 2023

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

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

Thèse de Doctorat de  
**L'Université de Lille**

*Ecole Doctorale Biologie – Santé de Lille EDBSL*

**Etude de l'absorption intestinale de la carboxyméthyllysine  
alimentaire et de la glycation endogène induite  
par le glucose chez *Cænorhabditis elegans* :**  
*vers de nouvelles perspectives de recherche*

*Thèse présentée et soutenue à Lille le 27 avril 2022 par :*

**Constance DUBOIS**

*Pour obtenir le grade de :*  
**Docteur en Biochimie et Biologie Moléculaire**

*Sous la direction de :*  
**M<sup>me</sup> Chantal FRADIN**, Maître de conférences – *Université de Lille*

**Composition du jury :**

**Rapporteurs :**

**M. Philippe GILLERY**, Professeur, Praticien hospitalier - *Université de Reims*

**M. Grégoire MICHAUX**, Directeur de recherche - *Université de Rennes*

**Examinatrices :**

**M<sup>me</sup> Christelle BONOD**, Maître de conférences - *Université de Lyon*

**M<sup>me</sup> Colette DISSOUS**, Directrice de recherche émérite - *Université de Lille*

**Membre invité :**

**M. Eric BOULANGER**, Professeur, Praticien hospitalier - *Université de Lille*

*A mon étoile là-haut*

# Résumé

L'histoire de l'humanité a été marquée par différentes périodes dont certaines ont eu un rôle essentiel dans l'évolution de l'alimentation. La sédentarisation et l'apparition de régimes déséquilibrés comme le régime occidental, ont favorisé l'incidence de maladies chroniques dont l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. L'ultra-transformation des aliments, typique du régime occidental, exacerbe la modification des nutriments et la formation de composés comme les produits terminaux de glycation avancée ou *advanced glycation end-products* (AGE). Les AGE sont formés par une liaison non-enzymatique entre des sucres réducteurs et les fonctions amines libres des protéines, suivie de différentes étapes réactionnelles composant la réaction de Maillard ou glycation. Cette modification des protéines peut également être catalysée dans l'organisme par différentes perturbations biologiques associées au régime occidental comme l'excès de glucose, l'inflammation et l'oxydation.

L'impact des AGE sur la santé a fait l'objet de nombreuses études sans qu'aucun processus physiopathologique consensuel ne soit mis en évidence. Par exemple, les voies d'absorption intestinale identifiées pour les AGE alimentaires ne sont pas compatibles avec certains mécanismes physiopathologiques décrits. En ce qui concerne les AGE endogènes, aucune étude n'a, à ce jour, permis de déterminer si les AGE sont la cause et/ou la conséquence des complications des maladies chroniques. Nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation d'un organisme « simple » comme le nématode *Cænorhabditis elegans* pourrait permettre de détecter certains mécanismes difficilement identifiables dans un modèle animal plus complexe. Nous avons donc initié un travail sur *C. elegans* pour 1- évaluer la digestion intestinale et l'absorption des AGE alimentaires et 2- analyser la formation d'AGE endogènes en condition riche en glucose. Nous avons principalement travaillé sur la N $\epsilon$ -carboxyméthyllysine (CML), un des AGE exogènes et endogènes les plus étudiés.



Pour le premier objectif, nous avons nourri les vers avec des protéines glyquées : protéines alimentaires (bactéries) ou supplément protéique. Pour le second objectif, les vers ont été nourris avec un régime riche en glucose. Différentes techniques immunologiques ont permis la quantification relative et la détection de la CML dans les vers. L'expression relative des gènes codant divers processus biologiques (réponse à différents stress, métabolisme du glucose et digestion intestinale) a été déterminée. L'oxydation des protéines endogènes a été vérifiée. Le développement physiologique et la longévité des vers ont été analysés.

Nos résultats ont mis en évidence :

- une nouvelle voie d'absorption intestinale de la CML alimentaire, l'endocytose. Concernant la physiologie des vers et la réponse à différents stress, les résultats dépendent de la nature des protéines glyquées.
- une association entre alimentation riche en glucose, augmentation des marqueurs oxydants, formation de CML endogène et réduction de la longévité des vers. L'activation d'une des voies métaboliques du glucose (voie des polyols) et la génération d'un précurseur de glycation (glyoxal) favoriseraient la glycation endogène.

Des études complémentaires sont nécessaires mais nos résultats montrent que *C. elegans* est certainement un modèle pertinent pour 1- mieux caractériser les mécanismes physiopathologiques des AGE et 2- développer des approches préventives et thérapeutiques contre la glycation.

# Abstract

The evolutionary history of hominins has been marked by different dietary periods. Sedentary lifestyle and the emergence of unhealthy diets such as the western diet have favored the incidence of chronic diseases such as obesity, type 2 diabetes and cardiovascular diseases. Ultra-processed foods, typical of the western diet, are highly altered and contain several modified nutrients such as advanced glycation end-products (AGEs). AGEs are formed by the Maillard reaction or glycation, which is a chemical reaction between reducing sugars on free amino groups of proteins. This modification of proteins can also be catalyzed in the body by various biological dysfunctions associated with the western diet such as hyperglycaemia, inflammation and oxidation.

The impact of dietary AGEs on human health has been discussed in many studies but, to date, no consensual pathophysiological process has been demonstrated. The intestinal absorption pathways, which have so far been described for dietary AGEs, are not compatible with certain pathophysiological processes identified. Concerning endogenous AGEs, to our knowledge, no study has been able to determine whether AGEs are the cause and/or consequence of chronic disease complications. We hypothesized that the use of a “simple” organism such as the nematode *Cænorhabditis elegans* might allow the detection of mechanisms that are difficult to identify in a more complex animal model. We therefore initiated a project on *C. elegans* to 1- evaluate intestinal digestion and absorption of dietary AGEs and 2- analyze the formation of endogenous AGEs in glucose-rich conditions. We mainly studied N $\epsilon$ -carboxymethyllysine (CML), one of the most studied exogenous and endogenous AGEs.

For the first objective, we fed the worms with glycated proteins: dietary proteins (bacteria) or protein supplement. For the second objective, the worms were grown in a glucose-rich diet. Different immunological techniques allowed the relative quantification and detection of CML in worms. The relative expression of genes coding for various biological processes (response to different stresses, glucose metabolism and intestinal digestion) was determined. The oxidation of endogenous proteins was detected. The physiological development and lifespan of the worms were analyzed.

Our results revealed:

- a new route of intestinal absorption of dietary CML, endocytosis. Regarding the physiology of the worms and the response to different stresses, the results depend on the nature of the glycated proteins.
- an association between glucose-rich diet, increased oxidative markers, endogenous CML formation and reduced worm lifespan. The activation of one of the glucose metabolic pathways (polyol pathway) and the generation of a glycation precursor (glyoxal) would promote endogenous glycation.

Further studies are necessary but our results show that *C. elegans* is certainly a relevant model to 1- better characterize the pathophysiological mechanisms of AGEs and 2- develop preventive and therapeutic approaches against glycation.

# Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le **Pr. Eric BOULANGER**, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Merci d'être venu à ma rencontre dans un restaurant du Vieux-Lille afin de m'inciter à retenter le concours de l'école doctorale. Cette belle aventure n'aurait pas vu le jour sans ce moment.

Je remercie vivement le **Pr. Philippe GILLERY**, d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je suis très reconnaissante pour le temps que vous m'avez consacré, en amont de la soutenance, afin de me permettre de corriger certains points du manuscrit.

Je souhaite également remercier le **Dr. Grégoire MICHAUX**, d'avoir accepté de participer à ce jury en tant que rapporteur. Merci d'avoir accepté de présider le jury de thèse.

J'adresse mes remerciements au **Dr. Christelle BONOD** qui a accepté de juger ce travail de thèse en qualité d'examinatrice.

Je remercie chaleureusement le **Pr. Colette DISSOUS**, pour sa participation au sein de mon jury de comité de suivi de thèse, et d'avoir accepté de finaliser cette belle aventure en tant qu'examinatrice.

Je ne doute pas que vos expertises d'horizons variés mèneront à de riches discussions le jour de la soutenance.

Enfin, je remercie tout particulièrement le **Dr. Chantal FRADIN** pour son encadrement et son investissement durant cette thèse. Ces résultats et ce manuscrit n'auraient tout simplement pas existé sans votre aide. J'ai admiré, et admire toujours, votre rigueur et savoir scientifiques (et votre mémoire !). J'ai beaucoup appris à vos côtés et le dire ainsi est un euphémisme. Je m'estime très chanceuse d'avoir pu bénéficier de vos connaissances. J'espère que vous pensez, tout comme moi, que notre duo a été efficace. Merci pour tout.

Voici l'heure des remerciements, ceux qu'on rédige le cœur léger car la soutenance est passée. C'est contradictoire, mais j'aimerais tant vivre et revivre encore cette journée !

**Fred**, je te remercie pour ces nombreuses discussions intéressantes, tes conseils très pertinents qui ont permis une belle évolution du projet. Je suis certaine que tu finiras par changer d'avis sur le duel protéines alimentaires *versus* supplément protéique !

**Mike**, cela a toujours été un plaisir pour moi de partager une bière avec toi. Ton flegme légendaire me manquera !

J'ai eu la chance d'avoir une équipe de choc à mon arrivée, avec qui le courant est extrêmement bien passé. Vous m'avez accueilli comme si j'avais toujours été là. Vos départs ont laissé un grand vide, merci pour tous ces moments les garçons.

**Axel**, premier parti, et certainement celui que je vais être le plus amené à cotôyer ... Ca n'aurait pas pu tomber sur qqn d'autre ... ? Plus sérieusement, merci d'avoir été là quand j'en avais besoin cher beau-frère. J'attends toujours mes chocolats et mon argile.

**Charles**, mon acolyte de choc au labo. J'ai adoré apprendre et travailler à tes côtés. Merci pour ta patience et ta pédagogie, mais également pour les discussions sur tout et rien. Victor et moi te souhaitons, du fond du cœur (et du crâne), d'être le plus heureux possible.

**Thibault**, aaah mon p'tit Thibault, Thibolte du Thibbor.. Celui qui m'a supporté dans son bureau (ou que j'ai supporté, va savoir ?). Aussi fort en sciences qu'en sieste impromptue. Roi des blagues minables. On en a passé du temps ensemble, à se conseiller mutuellement, à échanger sur des sujets divers et variés. Et puis tu as réussi à me motiver à aller à la salle régulièrement, ce qui n'était pas une mince affaire. Je ne compterai pas les fois où j'y suis allée après ton départ, tu risquerais d'être déçu. Je te souhaite une très belle continuation, autant scientifique que personnelle. J'espère que tu me placeras dans tes remerciements quand tu auras le prix Nobel.

**Florian**, THE joueur de baby-foot. Même si, pour toi, je n'étais qu'une « morue », cela fut un plaisir de partager des moments avec toi au labo. Je te souhaite tout le meilleur avec ta petite puce et dans ta nouvelle vie professionnelle.

Par ailleurs, petite dédicace au baby-foot, qui a connu ma magnifique montée de compétences : des roulettes aux rattaches de l'enfer (dixit **Florian** et **Charles**).

**Solenne**, si j'ai pu remettre le pied à l'étrier, c'est bien grâce à toi. Je te souhaite tout le meilleur, ainsi qu'à ta famille. Plein de gratouilles à Jango !

**Matheus**, je te laisse enfin le bureau. Continue de représenter dignement l'équipe avec les prochains « ma thèse en 180 secondes ». Bon courage pour la fin de ta thèse (tu es le prochain sur la liste !), je te souhaite plein de beaux résultats !

Enfin, je remercie les stagiaires qui m'ont accompagné, et qui ont grandement participé aux résultats présentés : Shuting, Imane, Stéphane, Etienne .. Je vous souhaite tout le meilleur.

Je remercie également Sabine, et le personnel technique, qui ont un rôle non négligeable dans la vie du laboratoire !

Petite pensée également à ceux qui ont été dans le même bateau pendant ces dernières années : Norhane, Ludivine, Guillaume, ... Bon courage pour la dernière ligne droite !

**Eva**, ma chouquette. Je te remercie d'avoir été là du début à la fin. Nos discussions, autour d'un thé ou d'une bière (ou même d'une coupe de champagne, selon les circonstances) me manqueront. Je suis certaine que nous garderons cette jolie amitié que nous avons construits durant ces quelques années. Je te souhaite tout le bonheur, tu le mérites.

-----  
**Diane**, reine des bébés porcs et des baleineaux gras. Déesse des plis et de la CLAAAAAAAAASSE. Je te remercie d'avoir toujours été là, et de m'avoir remonté le moral en visio quand j'en avais besoin. Notre amitié qui dure depuis toutes ces années vaut de l'or, et je te remercie pour le nouveau rôle, ô combien important, que tu m'as attribué il y a quelques semaines. Ta petite famille pourra toujours compter sur Tatouce.

**Maman**, tu es sans doute LA personne qui n'a jamais cessé de croire en moi. Je ne compte pas les soirs où je t'appelais au bout du rouleau (surtout ces derniers mois) et tu as toujours su trouver les mots pour me redonner de la motivation. Ton amour et ta confiance m'ont toujours porté, et je sais que ça ne changera jamais. Merci pour ta présence à chaque moment de ma vie.

**Papa**, tu m'as aidé avant ma thèse et tu m'as motivé afin que je ne lâche rien. C'est à mon tour de t'aider un peu plus ces derniers temps et je suis heureuse de pouvoir être là pour toi. « La vie a plus d'imagination que n'en contient nos rêves ».

**Dadou**, oh mon Dadou, tu es le plus beau des ... ? Tu connais la suite. Merci d'avoir toujours cru en moi depuis toutes ces années. En espérant que le Mac Do' ne soit pas la prochaine étape ... !

**Ma petite sœur**, le 27 avril est à présent une date qui nous lie toutes les deux. Quand l'une devient docteur, l'autre devient majeure ! Notre relation est très importante pour moi. Merci pour ta présence.

On félicite souvent la personne qui soutient, mais on oublie trop souvent la (pauvre) personne qui vit avec ...

**Thibaud**, s'il y a bien une personne à remercier ici, c'est toi. Je te remercie du fond du cœur d'avoir tout rendu si simple. Malgré la quantité de travail, mon stress (et tu sais à quel point il y en a eu !), tu as toujours fait en sorte de m'épauler et de m'aider au mieux possible. La bienveillance est le maître mot de notre relation et je sais que j'ai eu beaucoup de chance de pouvoir me reposer sur toi dès que j'en ressentais le besoin (c'est-à-dire tout le temps ?). Si j'ai pu finir cette thèse, c'est assurément grâce à toi. Merci pour ces week end voyages, soirées surprise et autres moments plus simples où tu m'as forcé à sortir la tête de l'eau. Merci pour ton soutien, merci d'être là pour moi. J'ai hâte de découvrir la suite de nos aventures. Je t'aime très fort ma doudouille.

**Globule et Houmous**, mes deux petits bébés. J'ai eu une chance énorme d'avoir été votre maman pendant plus de 3 ans. Vos bêtises, léchouilles et cracotages me manquent chaque jour un peu plus.

# Sommaire

Résumé .....	3
Abstract .....	5
Remerciements.....	7
Sommaire.....	11
Liste des figures .....	14
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations .....	16
Généralités .....	19
I. Régime alimentaire occidental et glycation avancée .....	19
A. Régime alimentaire occidental et santé.....	19
1. Origines et spécificités du régime alimentaire occidental .....	19
2. Maladies chroniques associées au régime alimentaire occidental .....	22
i. Obésité.....	22
ii. Diabète sucré .....	25
iii. Maladies cardiovasculaires .....	26
iv. Autres maladies .....	27
3. Pertinence et limites des études épidémiologiques nutritionnelles .....	28
4. Prévention.....	29
B. Impacts biologiques du régime alimentaire occidental .....	31
1. Inflammation.....	31
2. Stress oxydant .....	32
i. Voies métaboliques.....	33
ii. Peroxydation lipidique.....	34
3. Perturbation de l'homéostasie intestinale .....	35
4. Dyslipoprotéïnémie.....	37
5. Hyperglycémie.....	38
i. Voie des polyols .....	41
ii. Voie des hexosamines.....	43
iii. Voie d'activation de la protéine kinase C .....	45
iv. Voie de formation des produits terminaux de glycation avancée .....	45
C. Réaction de Maillard ou glycation.....	46
1. Découverte de la réaction de Maillard .....	46
2. Etapes réactionelles .....	47
i. Phase précoce .....	48
ii. Phase de propagation .....	48
iii. Phases avancée et finale .....	49
3. Les produits terminaux de glycation .....	49
4. Méthodes de dosage des AGE .....	51
i. Méthodes de chimie analytique .....	52
ii. Méthodes immunochimiques .....	52



iii.	Méthodes de mesure directe.....	53
5.	Facteurs favorisant la glycation.....	53
i.	Glycation des aliments .....	53
•	Température et durée de chauffage.....	53
•	Pression, pH et disponibilité en eau.....	54
•	Composition de l'aliment .....	54
ii.	Glycation endogène .....	55
II.	Effets physiopathologiques de la glycation endogène et alimentaire .....	56
A.	Glycation endogène .....	56
1.	Etudes cliniques.....	56
i.	Diabète.....	56
ii.	Maladies cardiovasculaires .....	57
iii.	Maladies rénales chroniques .....	57
iv.	Maladies liées au vieillissement .....	58
•	Maladie d'Alzheimer .....	58
•	Sarcopénie et dynapénie .....	58
•	Ostéoporose.....	59
•	Cataracte .....	59
2.	Mécanismes pathologiques de la glycation des protéines.....	59
i.	Modification structurale et fonctionnelle des protéines .....	59
ii.	Interaction des AGE avec les récepteurs <i>scavenger</i> et activation de signaux inflammatoires .....	61
•	RAGE/SR-J1 .....	62
•	CD36/SR-B2 .....	66
•	LOX-1/SR-E1 .....	68
•	Complexe AGE-R.....	69
3.	Mécanismes de défense cellulaire.....	74
i.	Élimination des AGE par le système de dégradation cellulaire.....	74
ii.	Endocytose des AGE par des récepteurs.....	74
iii.	Élimination des AGE par le RAGE soluble/SR-J1.1.....	75
iv.	Élimination des produits intermédiaires de la glycation.....	75
v.	Élimination des produits dicarbonylés.....	76
•	Système glyoxalase .....	76
•	DJ-1 .....	77
•	Aldocétoréductase .....	77
•	Aldéhyde déshydrogénase.....	78
4.	Stratégies pour limiter la glycation et ses effets physiopathologiques.....	78
B.	Glycation exogène .....	80
1.	Métabolisme des AGE alimentaires.....	80
i.	Digestion .....	80
ii.	Dégradation par le microbiote .....	81
iii.	Absorption des AGE.....	81

iv. Accumulation dans les organes .....	83
2. Effets santé des AGE exogènes .....	85
i. Impact des AGE alimentaires sur l'homéostasie intestinale.....	85
ii. Etudes cliniques.....	86
iii. Etudes expérimentales.....	94
III. Modèles expérimentaux pour l'étude de la glycation .....	99
A. Modèles vertébrés.....	99
1. Mammifères.....	99
2. Poisson zèbre .....	102
B. Modèles invertébrés.....	103
1. Drosophile.....	103
2. <i>Cænorhabditis elegans</i> .....	104
C. Modèles <i>in vitro</i> .....	105
D. Micro-organismes .....	105
E. Perspectives d'études .....	110
Hypothèses de travail .....	111
Travaux personnels .....	114
I. Digestion et absorption intestinale des AGE alimentaires.....	114
II. Induction de la glycation endogène en condition riche en glucose .....	142
Discussion.....	175
I. Evaluation de la digestion intestinale et de l'absorption des AGE alimentaires .	176
II. Induction de CML endogène par un régime riche en glucose .....	182
III. Perspectives .....	185
IV. Conclusion.....	187
Références.....	188
Annexe I Résultats complémentaires .....	218
Annexe II Article original collaboratif et revues.....	227

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Comparaison des caractéristiques d'un régime considéré comme sain, comme le régime méditerranéen, et le régime occidental .....	20
<b>Figure 2</b> : Prévalence de l'obésité parmi les adultes en 2016.....	23
<b>Figure 3</b> : Prévalence du diabète chez les adultes (20-79 ans) en 2016.....	25
<b>Figure 4</b> : Prévalence des maladies cardiovasculaires en 2015.....	27
<b>Figure 5</b> : Phases générales de la peroxydation lipidique. ....	35
<b>Figure 6</b> : Voies métaboliques induites par les acides gras et le glucose participant à la génération d'espèces réactives de l'oxygène .....	40
<b>Figure 7</b> : Phase initiale de la glycation .....	47
<b>Figure 8</b> : Formation des produits terminaux de glycation avancée (AGE - <i>advanced-glycation end-products</i> ) à partir du produit d'Amadori ou de Heyns.....	49
<b>Figure 9</b> : Structures des principaux produits terminaux de glycation avancée (AGE - <i>advanced glycation end-products</i> ).....	51
<b>Figure 10</b> : Structure du récepteur aux produits terminaux de glycation avancée (AGE - <i>advanced glycation end-products</i> ), ou RAGE.....	63
<b>Figure 11</b> : Voies de signalisation induites suite à l'activation de plusieurs récepteurs <i>scavenger</i> .....	65
<b>Figure 12</b> : Structure du CD36.....	67
<b>Figure 13</b> : Structure du LOX-1.....	69
<b>Figure 14</b> : Détoxification du méthylglyoxal et du glyoxal par le système glyoxalase et DJ-1/PARK7.....	76
<b>Figure 15</b> : Voies d'absorption intestinales démontrées et potentielles des AGE alimentaires.....	82
<b>Figure 16</b> : Métabolisme supposé des AGE alimentaires.....	84
<b>Figure 17</b> : Mécanisme potentiel de l'activation de 4 voies métaboliques de dommages cellulaires et tissulaires en condition d'hyperglycémie. ....	142
<b>Figure 18</b> : : Schéma simplifié de différentes voies métaboliques du glucose chez <i>Cænorhabditis elegans</i> .....	144

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Classification des récepteurs des AGE membranaires regroupant les principales cellules qui les expriment, leurs ligands et leurs principales fonctions. ....	71
<b>Tableau 2 :</b> Liste non exhaustive des études cliniques analysant l'impact d'un régime riche ou pauvre en produits terminaux de glycation avancée (AGE - <i>advanced glycation end-products</i> ), entre 2010 et 2020. ....	88
<b>Tableau 3 :</b> Liste non exhaustive des études expérimentales analysant l'impact d'un régime riche ou pauvre en produits terminaux de glycation avancée (AGE - <i>advanced glycation end-products</i> ) sur différents modèles murins.....	95
<b>Tableau 4 :</b> Avantages, inconvénients et axes de recherche dans le cadre de la glycation des principaux modèles expérimentaux.....	107

# Liste des abréviations

- acétyl-CoA** : acétyl-coenzyme A  
**AG** : acide gras  
**AGE** : *advanced glycation end-products*  
**AGE-R** : *AGE-receptor*  
**AKR** : *aldo-keto reductase*  
**ALDH** : *aldehyde dehydrogenase*  
**ATP** : adénosine triphosphate  
**AVC** : accident vasculaire cérébral
- BSA** : *bovine serum albumin*
- CD36** : *cluster of differentiation 36*  
**CL/SM-SM** : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem  
**CML** : N $\epsilon$ -carboxyméthyllysine
- DAMP** : *damage-associated molecular pattern*  
**DHAP** : dihydroxyacétone phosphate  
**DT2** : diabète de type 2
- ELISA** : *enzyme linked immuno sorbent assay*  
**ERO** : espèces réactives de l'oxygène
- FEEL** : *fasciclin epidermal growth factor (EGF)-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor*  
**FGT-1** : *facilitated glucose transporter-1*
- G3P** : glucose-3-phosphate  
**GAPDH** : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
**GLO1** : glyoxalase 1  
**GLO2** : glyoxalase 2  
**GLO3** : glyoxalase 3  
**GLOD-4** : *glyoxalase domain-containing protein-4*  
**GLUT** : *glucose transporter*  
**GO** : glyoxal
- HbA<sub>1c</sub>** : hémoglobine glyquée  
**HDL** : *high density lipoprotein*
- HDL-cholestérol** : cholestérol associé aux HDL  
**HMGB1** : *high mobility group box 1*
- ICAM-1** : *intercellular adhesion molecule-1*  
**IL** : interleukine  
**IMC** : indice de masse corporelle
- LDL** : *low density lipoprotein*  
**LOX-1** : *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*  
**sLOX-1** : *soluble LOX-1*  
**LPS** : lipopolysaccharide
- Mac-1** : *macrophage antigen-1*  
**MAPK** : *mitogen-activated protein kinase*  
**MCP-1** : *monocyte chemoattractant protein-1*  
**MD-2** : *macrophage-derived myeloid protein-2*  
**MGO** : méthylglyoxal  
**MICI** : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
**mTORC2** : *mechanistic target of rapamycin complex 2*  
**MSR1** : *macrophage scavenger receptor type 1*
- NADH** : nicotinamide adénine dinucléotide  
**NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**NF- $\kappa$ B** : *nuclear factor-kappa B*
- OMS** : organisation mondiale de la santé  
**OST-48** : *oligosaccharyl transferase 48 kDa subunit*
- PAMP** : *pathogen-associated molecular pattern*  
**PARK7** : *parkinsonism associated deglycase 7*  
**PEPT-1** : *peptide transporter-1*

**PI3K** : *phosphoinositide 3-kinase*  
**PKC** : protéine kinase C  
**PNNS** : programme national nutrition  
santé  
**PRR** : *pattern recognition receptors*

**RAGE** : récepteur aux AGE  
**sRAGE** : *soluble RAGE*

**SCAV** : *scavenger*  
**SODH** : sorbitol déshydrogénase  
**SR** : *scavenger receptor*

**TLR4** : *toll-like receptor 4*  
**TLR9** : *toll-like receptor 9*  
**TMAO** : triméthylamine-N-oxyde  
**TNF- $\alpha$**  : *tumor necrosis factor- $\alpha$*

**UPR** : *unfolded protein response*

**VCAM-1** : *vascular cell adhesion  
molecule-1*  
**VEGF** : *vascular endothelial growth  
factor*

**3-DG** : 3-désoxyglucosone  
 **$\alpha$ -DC** :  $\alpha$ -dicarbonylé



# Généralités

## I. Régime alimentaire occidental et glycation avancée

### A. Régime alimentaire occidental et santé

#### 1. *Origines et spécificités du régime alimentaire occidental*

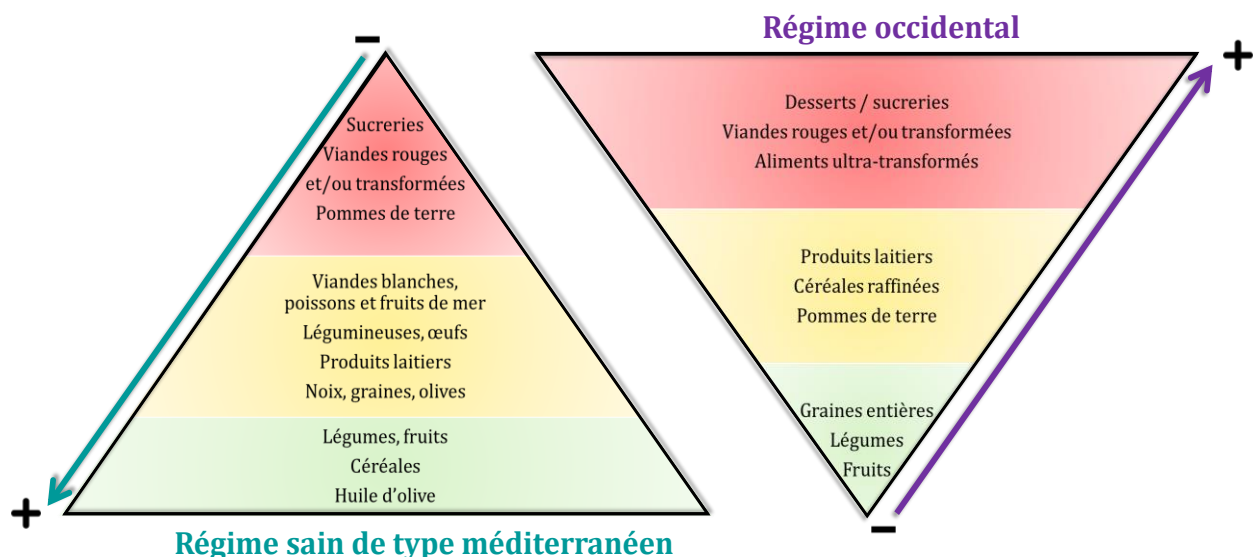
L'histoire de l'humanité a été marquée par différentes périodes dont certaines ont eu un rôle essentiel dans l'évolution de l'alimentation. La sédentarisation de certaines populations humaines commença au Néolithique, dernière période de la préhistoire. Ce changement de mode de vie fut accompagné du développement de l'agriculture et de l'élevage, en complément de la chasse, de la pêche et de la cueillette. La domestication d'animaux et la culture de végétaux a favorisé la consommation 1- de viandes d'animaux domestiqués, plus grasses que celles d'animaux sauvages, 2- de céréales, riches en glucides, comme l'amidon, 3- de produits laitiers (lait, fromage...) riches en lactose mais également, pour certains, en matières grasses. Parallèlement, les premiers aliments transformés comme le pain, la bière et le vin firent leur apparition<sup>1</sup>.

A partir du XVIII<sup>ème</sup> siècle, de nouvelles techniques de production et de transformation des aliments ont été adoptées suite à la révolution industrielle ou de manière plus juste, l'industrialisation de certains pays occidentaux. Ces évolutions techniques ont favorisé l'agriculture intensive couplée à la préparation (conditionnement et conservation) ou à la fabrication des aliments. L'évolution des moyens de transport a, quant à elle, permis les échanges commerciaux et l'offre diversifiée d'aliments frais ou transformés aux populations. Depuis, les consommateurs ont la possibilité de choisir leurs aliments en fonction de leur appétence. Les industriels l'ont bien compris et différents composés peuvent être ajoutés aux aliments lors de leur transformation. Ces composés sont des colorants, des exhausteurs de goût, des conservateurs et d'autres additifs alimentaires de synthèse ou d'origine naturelle (sirop de glucose, protéine de lait, arômes, amidon de maïs, ...). Ils servent à restaurer, imiter, ou exacerber le goût, la couleur et la texture d'un produit brut tout en prolongeant sa conservation. La classification NOVA, créée au Brésil, illustre les différents types de transformation que peuvent subir les aliments<sup>2</sup>. Elle groupe en effet les aliments en fonction de leur niveau de



transformation : 1- aliments bruts ou peu transformés, principalement par des procédés thermiques ou physiques simples ; 2- ingrédients culinaires transformés comme le beurre, les huiles et le sel qui sont ajoutés en faible quantité, par rapport à la quantité des aliments principaux, dans les préparations culinaires 3- aliments transformés, principalement les préparations artisanales ou industrielles à base de produits du groupe 1, conditionnées avec des produits du groupe 2 selon différentes méthodes de conservation ou de cuisson voire de fermentation (pains) et 4- produits alimentaires et boissons ultra-transformés, principalement les préparations industrielles contenant essentiellement des produits dérivés d'aliments et d'additifs alimentaires ; ce groupe contient peu ou aucun aliment du groupe 1 intact.

Un nouveau mode d'alimentation, contenant des quantités non négligeables de produits du groupe 4 (pizzas, biscuits, ...), a débuté en Amérique du Nord avant de s'implanter dans les autres pays industrialisés, principalement occidentaux ; il est désigné sous le terme *western diet* ou régime occidental. Ce régime comprend également une consommation fréquente de viandes rouges et de produits laitiers (crème fraîche, fromage...) au détriment de produits bruts comme les fruits, les légumes et les graines (Figure 1).



**Figure 1** : Comparaison des caractéristiques d'un régime considéré comme sain, comme le régime méditerranéen (à gauche), et le régime occidental (à droite). Les aliments à la base du triangle sont les plus consommés. Modifié d'après Guilleminault *et al.*<sup>3</sup>

Au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, l'évolution de la plupart des sociétés occidentales, notamment l'augmentation de l'industrialisation et de l'urbanisation ainsi que du salariat,

a significativement modifié les pratiques alimentaires. Le développement des industries agroalimentaires et de la culture intensive, ainsi que l'apparition de la grande distribution (supermarchés et hypermarchés) ont favorisé la commercialisation d'une grande variété de produits transformés. Ces derniers ont du succès car ils minimisent le temps de préparation des repas, ils ont pour la plupart un effet orexigène, ils se conservent et leur coût peut être raisonnable. La plupart de ces préparations est en effet accessible à toutes les catégories socio-économiques<sup>4</sup>. Dès 1960, la majorité des dépenses alimentaires des foyers français était destinée à des produits transformés<sup>5</sup>. L'augmentation du salariat, en particulier féminin, a favorisé le recours aux préparations culinaires chez soi ou au restaurant. C'est ainsi que les enseignes de restauration rapide ont envahi les villes à travers le monde depuis le milieu du XX<sup>ème</sup> siècle<sup>6</sup>. Ce type d'enseigne, qui propose principalement des aliments transformés, a vu le jour aux Etats-Unis, pays d'origine du régime occidental. De 2008 à 2012, 79.1% des adultes américains sondés mangeaient dans ce type de restaurant au moins une fois par semaine, et 23,4% d'entre eux y mangeaient plus de 3 fois par semaine<sup>7</sup>. La publicité et le *marketing* aident à promouvoir ces nouveaux modes de consommation.

Le régime occidental n'est pas un régime équilibré ; d'une part, il apporte des quantités trop importantes de certains nutriments et d'autre part, il ne couvre pas les besoins nutritionnels journaliers de l'organisme. Par exemple, le raffinage prévient l'altération de l'aliment mais engendre une perte importante de ses vitamines et minéraux<sup>8</sup>. Pour résumer, ce régime entraîne la modification de caractéristiques nutritionnelles fondamentales: 1- élévation de la glycémie, 2- augmentation de la consommation d'acides gras (AG) saturés au détriment des AG polyinsaturés, 3- baisse de l'apport en protéines au profit des glucides et du gras, 4- déficit de l'apport en micronutriments provenant principalement de la consommation de fruits, de légumes et de poissons qui est remplacée dans le régime occidental, par celle de céréales, de produits laitiers et de produits raffinés, 5- déséquilibre de la balance acido-basique avec augmentation de l'acidité produite par la consommation des produits laitiers, des céréales et des œufs au détriment des légumes et des fruits frais, 6- déséquilibre du rapport sodium/potassium suite à l'ajout de sel dans la plupart des aliments transformés et 7- une réduction de l'apport en fibres<sup>1,4,9</sup>. Ces déséquilibres nutritionnels entraînent plusieurs répercussions possibles sur la santé dont la sévérité dépend en grande partie de la fréquence à laquelle un tel régime est suivi. Les pays en développement ont également

subi une transition nutritionnelle, rendant leurs populations sensibles aux maladies associées à l'augmentation des apports énergétiques, notamment en lipides et en sucres simples.

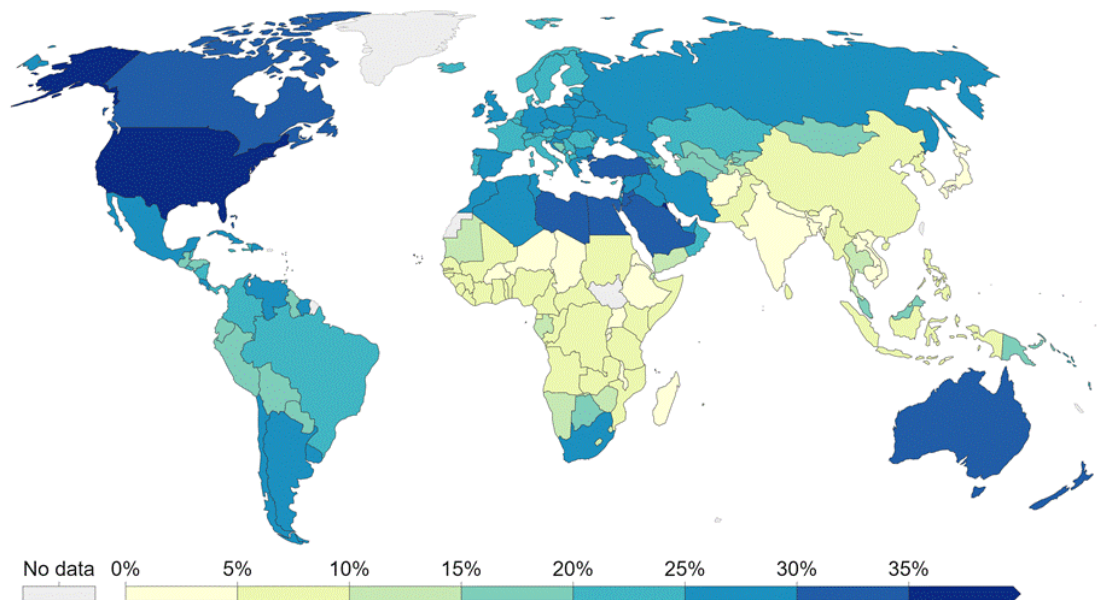
## *2. Maladies chroniques associées au régime alimentaire occidental*

Le développement socio-économique des pays industrialisés a favorisé l'augmentation du niveau de vie, l'accès à la nourriture, les progrès scientifiques et la mise en œuvre de stratégies de santé publique. Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle jusqu'à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, la découverte de la pénicilline, puis d'autres antibiotiques, et de la vaccination ainsi qu'une amélioration des conditions sanitaires ont permis de lutter efficacement contre les maladies infectieuses. L'espérance de vie des populations augmente alors, entraînant leur vieillissement, qui est, à son tour, le facteur responsable de l'augmentation de la fréquence de maladies chroniques associées à l'âge. Certains ont avancé l'hypothèse que seul le vieillissement des populations était à l'origine de ces maladies chroniques, un phénomène donc inéluctable, alors que d'autres ont émis l'hypothèse que le manque d'adaptation génétique des civilisations à leurs nouveaux styles de vie notamment alimentaires était la principale cause. Même si ces arguments sont pertinents, il est indéniable que d'autres facteurs sont à prendre en compte. D'une part, l'âge n'est pas la seule cause de certaines maladies chroniques dont l'incidence augmente maintenant aussi chez les personnes plus jeunes, et d'autre part, le retour aux modes alimentaires primaires améliore, seulement en partie, les constantes métaboliques des personnes malades. Différents facteurs de prédisposition à ces maladies chroniques ont été identifiés dont la sédentarisation, le tabagisme, la consommation excessive d'alcool et un régime alimentaire déséquilibré comme le régime occidental.

### *i. Obésité*

Au cours de l'histoire, les Hommes ont évolué avec des conditions nutritionnelles incertaines, dont des épisodes de famine, responsables de dénutrition et de taux de mortalité élevés. L'accumulation de graisses et la prise de poids ont pendant longtemps été des signes de bonne santé et de prospérité. En 2000, Gardner et Halweil firent le constat que 1- plus de la moitié de la population mondiale souffrait toujours de malnutrition mais 2- pour la première fois dans l'histoire, le nombre de personnes présentant une surcharge pondérale rattrapait le nombre de personnes dénutries<sup>10</sup>.

Parmi les personnes en surcharge pondérale (personnes présentant un indice de masse corporelle ou IMC  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>), le tiers est obèse (IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>). Depuis, les chiffres n'ont malheureusement pas baissé. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 13% de la population mondiale en 2016 était obèse (**Figure 2**).



**Figure 2** : Prévalence de l'obésité (indice de masse corporelle supérieur ou égal à 30 kg/m<sup>2</sup>) parmi les adultes en 2016<sup>11</sup>.

L'épidémie d'obésité a débuté aux Etats-Unis où la prévalence de cette maladie chez les adultes est passée de 15 à 33% entre 1980 et 2004<sup>12</sup>. Elle s'est étendue aux autres pays industrialisés avant de toucher les pays en développement. Le déséquilibre de la balance énergétique est un des principaux déterminants de l'obésité. Le régime occidental contribue à ce déséquilibre avec la consommation d'aliments favorisant la prise de poids : viandes rouges, céréales raffinées, sucreries et produits laitiers gras<sup>13-15</sup>. Ce n'est pas les aliments en eux-mêmes qui posent problèmes mais plutôt leur proportion consommée quotidiennement. En effet, les apports énergétiques trop élevés favorisent le développement de la masse grasseuse, d'autant plus si ces apports sont plus élevés que les dépenses d'énergie. Le manque d'activité physique est d'ailleurs un des facteurs de ce déséquilibre nutritionnel. Plusieurs études ont également mis en évidence une association entre la consommation d'aliments ultra-transformés et l'obésité<sup>16-18</sup>. Certains aliments ultra-transformés sont riches en glucides simples et graisses comme certains produits de grignotage et les sucreries, les rendant très caloriques. La structure de ces aliments est souvent visqueuse ou semi-solide voire liquide comparée à la structure solide

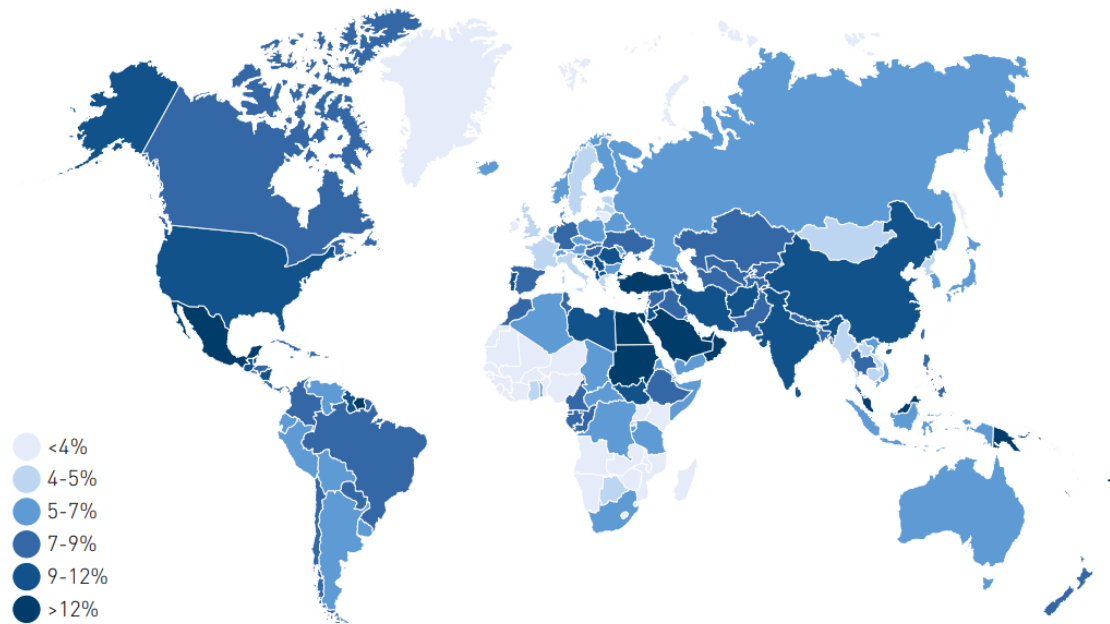
des aliments bruts. Ces matrices reconstituées sont moins satiétogènes que les produits bruts même cuits<sup>19</sup>. De même, ces matrices sont plus facilement digérées, augmentant la proportion de nutriments absorbés par rapport aux aliments bruts ou peu transformés. Enfin, les processus de transformation des aliments peuvent entraîner des modifications des nutriments dont la perte de vitamines et favoriser la synthèse de composés toxiques favorisant un dérèglement métabolique. L'alimentation n'est pas le seul facteur déclencheur de l'obésité. La prédisposition génétique et des facteurs environnementaux et sociaux ont également des rôles majeurs<sup>20</sup>.

L'OMS alerte sur le fait que « *la plupart de la population mondiale vit dans des pays où le surpoids et l'obésité font davantage de morts que l'insuffisance pondérale* »<sup>21</sup>. Ce sont des facteurs de risque pour d'autres maladies chroniques dont les maladies cardiovasculaires, le diabète, les troubles musculo-squelettiques et certains cancers<sup>22-25</sup>. L'obésité, qui est également considérée depuis 1997 comme une maladie chronique, est le cinquième risque de décès au niveau mondial<sup>26</sup>. L'augmentation de l'IMC est en effet associée à différentes anomalies biologiques comme celles du syndrome métabolique. D'ailleurs, un des facteurs de ce syndrome est l'augmentation de la masse viscérale (mesure du tour de taille) qui est un meilleur marqueur que l'IMC. Depuis 1993, on sait qu'il est dangereux pour la santé d'avoir une mauvaise répartition des graisses, que le poids soit normal ou augmenté<sup>27</sup>. L'obésité androïde ou abdominale est un facteur de risque indépendant de complications métaboliques et cardiovasculaires. Elle comprend l'augmentation du tissu adipeux abdominal sous-cutané, mais également dans 2 cas sur 3, l'augmentation du tissu adipeux viscéral intra-abdominal<sup>27</sup>. Des sujets ayant une IMC inférieure à 25 kg/m<sup>2</sup>, et présentant ce tissu adipeux viscéral, peuvent ainsi être exposés malgré tout aux risques métaboliques et cardiovasculaires de l'obésité<sup>28,29</sup>.

L'hypertension, la concentration élevée de triglycérides plasmatique, la concentration faible de cholestérol plasmatique associé aux lipoprotéines à haute densité (HDL-cholestérol) et la glycémie à jeun élevée sont les 4 autres facteurs de risque du syndrome métabolique. La présence d'au moins 2 d'entre eux, en plus de l'obésité androïde, valide le diagnostic du syndrome métabolique<sup>30</sup>. L'obésité et le syndrome métabolique sont des facteurs de risque du diabète de type 2 (DT2) et des maladies vasculaires (maladies cardiaques et accident vasculaire cérébral - AVC) avec un lien de causalité démontré<sup>31-34</sup>. Plus de 40% des sujets obèses ont le DT2<sup>35</sup>.

## ii. Diabète sucré

Depuis 1965, il y a une augmentation du nombre de cas de diabète dans différents pays. L'OMS et la fédération internationale du diabète ont alerté sur le fait que le nombre de personnes atteintes de diabète a quadruplé au niveau mondial entre 1980 et 2014<sup>36</sup> et qu'en 2030, cette pathologie devrait toucher 10.2% de la population mondiale<sup>37</sup> (**Figure 3**).



**Figure 3** : Prévalence du diabète chez les adultes (20-79 ans) en 2016 (atlas du diabète - fédération internationale du diabète, huitième édition, 2017).

Cette pathologie, qui est définie par une hyperglycémie chronique à jeun (glycémie supérieure ou égale à 7,0 mmol/L, soit 1,26 g/L<sup>38</sup>), se présente sous différentes formes cliniques et physiopathologiques avec trouble de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline<sup>39</sup>. Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par une déficience soit de l'action de l'insuline (insulinorésistance), soit de la sécrétion d'insuline par les cellules endocrines, soit des deux<sup>40</sup>. Le DT2 représente la forme la plus fréquente avec plus de 85% des nombres de cas de diabète<sup>34</sup>.

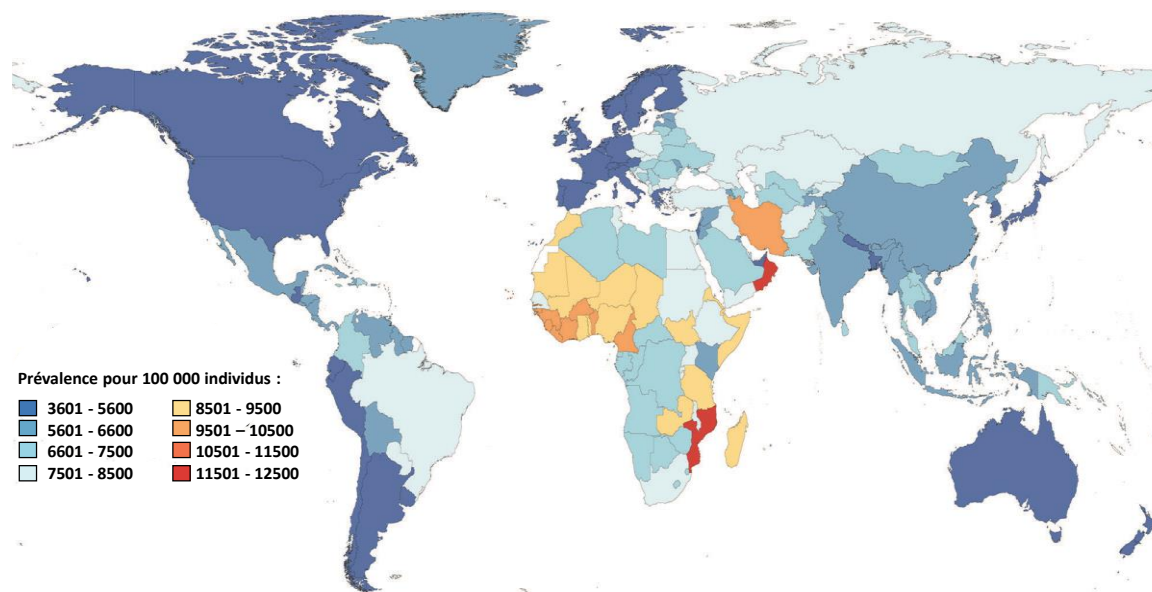
Le DT2 fait partie des maladies dont la fréquence augmente avec l'âge ; l'âge n'étant pas le facteur de risque principal. L'augmentation de son incidence est donc en partie liée au vieillissement de la population et à l'espérance de vie prolongée des diabétiques, même si l'impact de ces 2 facteurs commence à se stabiliser. Le DT2 est d'origine multifactorielle avec une prédisposition génétique, particulièrement en Asie<sup>41,42</sup>, qui doit souvent être

associé à d'autres causes liées principalement aux déséquilibres nutritionnels et à la sédentarité qui participent de plus en plus à la propagation de cette maladie. Le tabac est un autre facteur environnemental favorisant le DT2. Comme pour toute maladie métabolique, un régime déséquilibré, comme le régime occidental, peut prédisposer à cette maladie ou en tout cas favoriser ses graves complications. La consommation de graisse animale, surtout les AG saturés, retrouvée dans la viande rouge et la viande transformée (charcuteries ...) et les produits laitiers, (beurre, fromage, ...), est un facteur de risque du DT2<sup>43-46</sup>. Comme ces produits apportent du glucose à des personnes qui ont du mal à réguler sa concentration, ils entraînent une hyperglycémie persistante qui est responsable de différentes complications de cette maladie<sup>47,48</sup>. Ce problème est d'autant plus important que 10 à 30% des sujets diabétiques ne sont pas diagnostiqués donc traités; ces personnes ont par conséquent un risque élevé de développer une hyperglycémie persistante et ses complications<sup>49,50</sup>. Certaines complications diabétiques sont des pathologies métaboliques aiguës (acidocétose, syndrome d'hyperglycémie hyperosmolaire, ...) qui sont rares et font l'objet d'urgences médicales. Les complications chroniques sont plus fréquentes. Elles peuvent être : 1- microvasculaires comme la néphropathie, la neuropathie et la rétinopathie, et 2- macrovasculaires comme l'AVC ou l'infarctus du myocarde. Les sujets atteints de DT2 sont donc prédisposés aux maladies cardiovasculaires, qui sont la principale cause de mortalité liée au diabète<sup>51</sup>.

### *iii. Maladies cardiovasculaires*

Les maladies cardiovasculaires regroupent diverses pathologies qui affectent le cœur et l'ensemble des vaisseaux sanguins, dont l'athérosclérose, les troubles du rythme cardiaque, l'hypertension artérielle, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque et les AVC. Elles représentent la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité dans le monde et notamment en France, où les femmes sont plus touchées que les hommes<sup>52,53</sup> (**Figure 4**).





**Figure 4 :** Prévalence des maladies cardiovasculaires en 2015. Modifié d'après Roth *et al.*<sup>52</sup>

Elles partagent les mêmes facteurs de risque que l'obésité et le DT2<sup>54</sup>. Les principaux facteurs de risques des cardiopathies et des AVC, sont une mauvaise alimentation, un manque d'activité physique, le tabagisme et la consommation excessive d'alcool<sup>55</sup>.

En ce qui concerne l'alimentation, plusieurs études ont montré une association entre un régime déséquilibré et un taux élevé de décès causés par une maladie cardiovasculaire<sup>56-58</sup>. Les produits laitiers riches en matières grasses, les viandes rouges et les produits transformés contiennent des concentrations élevées de nutriments qui favorisent l'hypertension artérielle et la dyslipoprotéinémie, plus particulièrement l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie<sup>59-61</sup>. Ces nutriments sont le sel et les autres composés, tels que le nitrate, ajoutés lors de la transformation des aliments ainsi que les AG saturés<sup>62-65</sup>. Ces effets sont bien souvent associés à une consommation trop faible en fibres. La sédentarité et le tabagisme favorisent également la dyslipoprotéinémie et l'hypertension artérielle<sup>66-69</sup>.

#### ***iv. Autres maladies***

Une alimentation déséquilibrée, comme le régime occidental, associée bien souvent à la sédentarité, est un facteur de risque, reconnu ou suspecté, de nombreuses autres maladies dont quelques exemples sont cités de manière non exhaustive dans ce paragraphe. Par exemple, la consommation de viandes rouges et de viandes transformées, et d'aliments hypercaloriques, est un facteur de risque reconnu du cancer colorectal<sup>70-72</sup>.



Dans les pays à revenus élevés, le surpoids et l'obésité, l'alcool et le tabagisme sont des causes majeures de cancers<sup>73</sup>.

Le suivi d'un régime riche en viandes rouges et viandes transformées mais pauvre en fibres favorise la survenue de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupant notamment la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse<sup>74-76</sup>. D'autres facteurs de risque sont suspectés pour ces pathologies comme une prédisposition héréditaire et /ou génétique, les contaminants environnementaux ou encore le tabagisme, mais une alimentation déséquilibrée est actuellement le facteur de risque commun entre les différentes pathologies chroniques digestives<sup>77</sup>.

Comme le DT2 et certaines maladies cardiovasculaires, la maladie rénale chronique est une maladie dont la fréquence augmente avec l'âge. Cette maladie présente une diminution du débit de filtration glomérulaire et/ou des lésions rénales<sup>78</sup>. Le phosphate présent dans les aliments industriels comme les plats préparés et les viandes transformées sont des facteurs de risque suspectés, notamment chez les sujets diabétiques<sup>79,80</sup>.

Le régime occidental est suspecté d'être impliqué dans différentes maladies liées à l'âge (l'âge étant le principal facteur de risque de ces maladies) comme l'ostéoporose. La densité minérale des os semble être altérée par l'excès de sodium et de précurseurs acides apportés par les viandes rouges, les viandes transformées, les fromages et les œufs<sup>81,82</sup>. La consommation de ces aliments augmente également le risque de la maladie d'Alzheimer qui inclut également les sucres raffinés comme facteurs favorisants<sup>83</sup>. Différentes études expérimentales ont confirmé que les régimes trop gras et/ou trop sucrés augmentaient les biomarqueurs de la maladie : marqueurs neuroinflammatoires, peptides amyloïdes et protéines Tau totales et hyperphosphorylées<sup>83,84</sup>.

La sédentarité est aussi un facteur de risque commun de ces maladies<sup>85-87</sup>

### *3. Pertinence et limites des études épidémiologiques nutritionnelles*

Les études épidémiologiques sont indispensables pour évaluer les associations entre des facteurs alimentaires et le développement de pathologies. Il est cependant nécessaire de connaître les limites de chaque étude afin d'interpréter les résultats de manière pertinente.

Le questionnaire de fréquence alimentaire constitue l'un des biais les plus fréquents dans ce type d'étude. Il permet le recueil d'informations concernant les habitudes alimentaires des sujets sur des périodes variables, allant de quelques mois à un an<sup>88</sup>. Il fait donc appel à la mémoire des participants et à leur honnêteté. Les questions qui le composent ne sont pas toujours identiques entre les études et certaines informations importantes comme la taille des portions peuvent parfois manquer<sup>89</sup>. L'utilisation d'un questionnaire universel comporterait tout de même des biais, car les habitudes alimentaires, et donc les aliments renseignés, sont fortement variables d'une région du monde à une autre et évoluent au fil des années. Le choix des items alimentaires du questionnaire est déterminant pour sa pertinence.

La méta-analyse est utilisée lorsque plusieurs études ont traité la même question avec une méthodologie comparable. La sélection des études se fait selon des critères d'inclusion et d'exclusion rigoureusement définis en amont. Cependant, les protocoles des études retenues ont forcément des différences (taille de l'échantillon, durée de l'expérience, ...) qu'il est important d'exclure grâce à des tests biostatistiques adaptés. La fiabilité du résultat de la méta-analyse dépendra en partie de cette méthode d'analyse<sup>90</sup>. Cette étude permet non seulement d'augmenter la puissance statistique, mais également d'émettre une analyse critique et quantitative d'un nombre important de résultats.

Les études épidémiologiques nutritionnelles sont des outils indispensables afin d'orienter les prises de position de la part des autorités de santé publique et de définir au mieux les campagnes de prévention alimentaire.

#### *4. Prévention*

L'augmentation impressionnante de l'obésité et des maladies chroniques démontre l'influence de l'alimentation sur la santé. La prise de conscience de l'évolution récente de l'alimentation et de ses conséquences sur la santé a incité les politiques à prendre des mesures avec plus ou moins d'efficacité et de succès. Par exemple en France, le premier Programme National Nutrition Santé (PNNS) a été lancé en 2001 avec la diffusion de messages nutritionnels. A partir de 2007, chaque publicité de l'industrie agro-alimentaire incluait un message du PNNS. Cette stratégie préventive a eu le mérite de faire passer des messages. En effet, qui ne connaît pas le slogan « manger au moins 5 fruits et légumes par jour » ? En revanche, certains peuvent lui reprocher de ne pas apporter de

solutions aux familles à budget réduit et/ou qui manquent de temps pour optimiser les repas en intégrant les recommandations. Cependant, la grande distribution et les circuits courts permettent de plus en plus d'avoir accès à des produits sains pour tout budget. Le changement de comportement alimentaire est certainement le plus difficile à réaliser. C'est pour cela que depuis 2018, un programme sanitaire, co-présidé par les agences régionales de santé, les recteurs d'académie et le comité régional du service sanitaire, a été mis en place. Ce programme inclut l'initiation des étudiants de santé à la prévention et la promotion de la santé auprès de publics divers et à la lutte contre les inégalités territoriales et sociales en santé auprès des publics les plus fragiles. Il faudra attendre quelques années pour connaître l'impact de ces programmes de prévention.

Il y a tout de même déjà une certaine prise de conscience d'une partie de la population des mauvaises habitudes alimentaires. Ceci se traduit par un intérêt grandissant pour certains régimes alimentaires dont le régime méditerranéen qui est souvent comparé au régime occidental. Il fait partie des régimes considérés comme sains, qui privilégient la consommation de fruits, légumes, céréales et viandes pas ou peu transformés. Ce régime est associé à une baisse de l'incidence des maladies cardiovasculaires et de DT2<sup>91-93</sup>. Cependant, la surconsommation de produits du régime méditerranéen associée à un manque d'activité physique ne prévient pas ces maladies. En effet, la non-consommation de viandes, par exemple lors du suivi de régimes végétarien ou *vegan*, ne suffit pas à éliminer tout risque de développement de maladies chroniques. La surconsommation de certains produits végétaux (céréales raffinées, boissons sucrées...) est suffisante afin d'augmenter le risque de maladie coronarienne chez des sujets végétariens<sup>94</sup>. De la même façon, tous les aliments ultra-transformés ne sont pas mauvais pour la santé, surtout si leur consommation reste modérée. Il est donc important que les consommateurs puissent identifier facilement les caractéristiques nutritionnelles des aliments bruts, transformés ou ultra-transformés. Plusieurs mesures ont alors été instaurées afin d'apporter ces informations aux consommateurs<sup>95</sup>. La première de ces mesures a été l'affichage des caractéristiques nutritionnelles sur les aliments préemballés : valeur énergétique pour 100g et pourcentage de protéines, de glucides simples et totaux et lipides totaux et d'AG saturés. Ces informations peuvent être peu compréhensibles pour certains. Des classifications plus facilement interprétables par les consommateurs ont été développées. La classification brésilienne NOVA est la pionnière pour la classification des produits en fonction de leur transformation (cf. I.A.1 Origines et

spécificités du régime alimentaire occidental]). Elle a été beaucoup utilisée pour les études épidémiologiques mais elle n'informe pas sur l'équilibre ou le déséquilibre nutritionnel des aliments. La classification Siga a repris les 4 groupes de la classification NOVA et elle contient des critères supplémentaires d'évaluation. L'indice Siga prend en compte 1- la quantité de gras, sucres et sels, 2- le degré de transformation de tous les ingrédients, 3- la présence d'additifs et leurs risques<sup>96</sup>. Ces critères permettent de prendre en compte l'effet matrice, influant l'absorption des nutriments. En France, la classification Nutri-score classe la valeur nutritionnelle de l'aliment selon 5 groupes (A à E). Cette classification ne tient pas compte, entre autres, du mode de préparation de l'aliment, de la taille de sa portion et de son degré de transformation<sup>97</sup>.

## **B. Impacts biologiques du régime alimentaire occidental**

### *1. Inflammation*

Il est maintenant admis que la régulation métabolique est étroitement liée aux réponses immunitaires tissulaires et systémiques, le bon fonctionnement de l'un dépendant de celui de l'autre<sup>98</sup>. Le bon équilibre entre ces deux processus est défini comme un mécanisme homéostatique majeur qui est nommé homéostasie immuno-métabolique<sup>99</sup>. Toute perturbation de cette dernière prédispose à des troubles métaboliques chroniques. Le déséquilibre de la balance énergétique (calories consommées vs calories dépensées) induit par un régime alimentaire trop riche, notamment en sucres et en graisses, comme le régime occidental, associé à un mode de vie sédentaire, a un impact majeur sur la régulation métabolique, entraînant notamment dyslipoprotéinémie et hyperglycémie (cf. I.B.4 Dyslipoprotéinémie, I.B.5 Hyperglycémie).

Le développement de la plupart des maladies chroniques dont le régime occidental et la sédentarité sont des facteurs de risque, s'accompagne d'une inflammation à bas bruit, suggérant un lien entre régime occidental et altération de l'homéostasie immuno-métabolique<sup>100,101</sup>. Différentes études ont montré que certains nutriments et autres métabolites alimentaires peuvent induire une réponse inflammatoire<sup>102-105</sup>. Un indice inflammatoire alimentaire a d'ailleurs été proposé pour montrer l'impact de l'alimentation sur l'inflammation. Cet indice classe les aliments et d'autres paramètres nutritionnels, comme l'apport énergétique, en fonction de leurs effets pro- ou anti-

inflammatoires. Pour chaque composé alimentaire, cet indice est calculé à partir de données cliniques et expérimentales (études *in vivo* et *in vitro*)<sup>106</sup>.

Plusieurs ingrédients du régime occidental peuvent induire des réponses inflammatoires. Sans surprise, les AG saturés, le cholestérol, les sucres simples et les céréales raffinées ont un indice inflammatoire alimentaire élevé<sup>106</sup>. Des études expérimentales ont confirmé l'implication de ces composés dans le développement des réactions inflammatoires de certaines pathologies<sup>107-110</sup>. Par exemple, lors du développement de l'athérosclérose, l'excès de cholestérol forme des cristaux qui induisent l'activation de l'inflammasome après phagocytose par les macrophages<sup>111,112</sup>. Les LDL oxydées participent d'ailleurs à cette activation<sup>113,114</sup>. L'hyperglycémie a également un rôle majeur dans l'inflammation induite lors de différentes complications diabétiques (cf. I.B.5 Hyperglycémie). A l'inverse, différents composants de régimes équilibrés comme le régime méditerranéen, ont un indice inflammatoire alimentaire faible comme les fibres et les AG polyinsaturés dont les AG oméga-3<sup>106</sup>. Les AG oméga-3 se caractérisent par la présence de la première double liaison sur le troisième carbone de leur chaîne carbonnée. Les effets anti-inflammatoires de ces ingrédients ont été confirmés dans de nombreuses études expérimentales<sup>115-118</sup>.

Plusieurs essais cliniques réalisés chez des sujets sains ou pathologiques ont mis en évidence une association entre consommation de nutriments majoritaires du régime occidental (glucose, cholestérol, AG saturés) et augmentation de biomarqueurs inflammatoires sériques<sup>102-105</sup>. A l'inverse, la consommation de produits majoritaires du régime méditerranéen (AG oméga-3, fibres et différents composés polyphénoliques) diminue la concentration sérique de ces biomarqueurs ainsi que celle de biomarqueurs du stress oxydant<sup>119-124</sup>. Ce résultat n'est pas surprenant puisque l'inflammation et le stress oxydant sont deux réactions étroitement liées.

## ***2. Stress oxydant***

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites en permanence par le métabolisme cellulaire. Un régime déséquilibré comme le régime occidental, qui entraîne une perturbation de l'homéostasie métabolique, peut également perturber l'équilibre oxydation/réponse anti-oxydante.

### *i. Voies métaboliques*

Le glucose et le fructose et les AG, apportés en excès par le régime occidental, peuvent induire un stress oxydant *via* une sur-activation de la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>125-127</sup>. En effet, les deux sucres simples sont dégradés en pyruvate par la glycolyse (cf. I.B.5 Hyperglycémie). Ce dernier est transformé en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) qui est utilisé dans le cycle de l'acide citrique. L'acétyl-CoA est également synthétisé à partir d'AG par la  $\beta$ -oxydation mitochondriale.

Le cycle de l'acide citrique permet la synthèse des coenzymes nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et flavine adénine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>) qui sont nécessaires aux réactions enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'excès de ces coenzymes augmente la respiration mitochondriale, induisant une augmentation de la "fuite" spontanée de protons de la chaîne de transport d'électrons<sup>128</sup>. Cette fuite, qui se produit principalement au niveau de l'ubiquinone et des complexes I et III, entraîne la production du radical superoxyde, puis d'autres ERO dans la matrice mitochondriale et le cytoplasme<sup>128</sup>. Si la production d'ERO est trop importante par rapport aux défenses anti-oxydantes, ils favorisent l'oxydation des molécules environnantes comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Des conséquences diverses découlent de ce stress oxydant : 1- une dysfonction mitochondriale, 2- la modification de différentes molécules (protéines, lipides, sucres, ...), 3- la perte de fonction de protéines si l'oxydation cible un site fonctionnel, voire leur agrégation et 4-une activation de voies pro-inflammatoires *via* l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*). Les molécules exprimées peuvent induire des mécanismes bénéfiques (autophagie, réponse anti-oxydante, ...) ou délétères (inflammation, prolifération cellulaire...) pour la cellule, selon la quantité d'ERO et son environnement<sup>129</sup>. Les enzymes métaboliques mitochondriales ou cytoplasmiques peuvent être partiellement inactivées par l'oxydation. C'est le cas de la glycéraldéhyde-3 phosphate-déshydrogénase (GAPDH) qui est une enzyme glycolytique (cf I.B.5 Hyperglycémie). Son inactivation partielle inhibe la glycolyse et donc diminue l'activité de la chaîne mitochondriale. L'accumulation des produits intermédiaires de la glycolyse active ses voies alternes qui induisent la formation d'ERO, maintenant l'environnement oxydant<sup>130,131</sup>.

Les voies oxydantes et pro-inflammatoires s'entretiennent mutuellement et peuvent rapidement former un cercle vicieux, induisant des environnements favorables

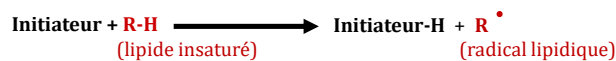
au développement de conditions pathologiques. Si les états inflammatoires et oxydants perdurent ou deviennent trop importants, les processus d'apoptose ou de nécrose peuvent être induits<sup>132,133</sup>.

## ii. Peroxydation lipidique

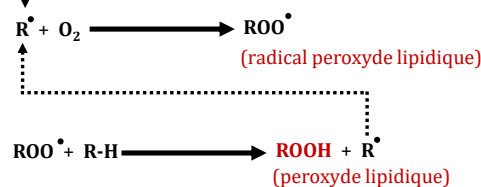
La modification des lipides membranaires (phospholipides, cholestérol et glycolipides) peut perturber la fluidité membranaire et provoquer la rupture de la membrane plasmique.

En raison de leurs nombreuses doubles liaisons, les AG polyinsaturés sont particulièrement sensibles à la peroxydation lipidique, un mécanisme d'oxydation par voie radicalaire. En présence d'initiateurs radicalaires comme les radicaux hydroxyles ( $\text{HO}\cdot$ ), les AG insaturés peuvent être transformés en radicaux libres ( $\text{AG}\cdot$ ) hautement réactifs. Après cette étape d'initiation, les  $\text{AG}\cdot$  réagissent avec de nombreuses molécules, notamment d'autres AG insaturés, entretenant ainsi une réaction radicalaire en chaîne (

### Phase d'initiation



### Phase de propagation



### Phase finale

Recombinaison de deux radicaux libres

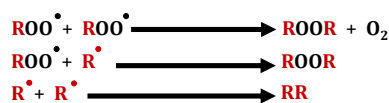
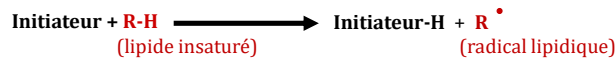
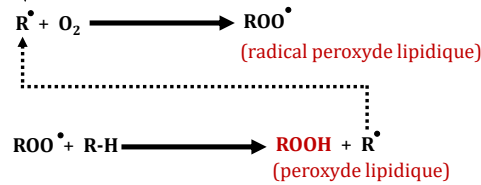


Figure 5).

### Phase d'initiation

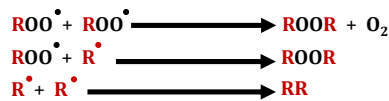


### Phase de propagation



### Phase finale

Recombinaison de deux radicaux libres



**Figure 5** : Phases générales de la peroxydation lipidique.

Cette phase de propagation est caractérisée par la formation d'une multitude de produits de dégradation tels que des aldéhydes insaturés comme le 4-hydroxy-2-nonénal (4-HNE), des céto-aldéhydes comme le 4-oxo-nonenal, puis des dialdéhydes comme les malondialdéhyde, méthylglyoxal (MGO) et glyoxal (GO)<sup>134</sup>. Ces molécules peuvent réagir avec des biomolécules et former des produits avancés de lipoxydation, dont certains sont mutagènes<sup>135</sup>. La peroxydation lipidique prend fin lorsque deux espèces radicalaires réagissent entre elles, ou lorsqu'il n'y a plus d'AG polyinsaturés disponibles<sup>134</sup>.

### 3. Perturbation de l'homéostasie intestinale

L'eubiose, définie par un microbiote équilibré dans la répartition des espèces microbiennes et principalement bactériennes, est essentielle pour assurer 1- la digestion des substrats alimentaires et endogènes, l'aide au transit intestinal et la synthèse des micronutriments, 2- le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et la protection contre des agents pathogènes, et 3- la stimulation du système immunitaire<sup>136</sup>. La composition du microbiote étant en partie dépendante de l'alimentation, il n'est pas étonnant que le régime occidental puisse favoriser la croissance de certaines espèces bactériennes par rapport à d'autres. En effet, le régime occidental module le développement de deux phylums constituant 90% du microbiote, les Bactéroïdètes et les Firmicutes<sup>137,138</sup>. L'excès de protéines animales augmente le ratio Firmicutes/Bactéroïdètes<sup>139</sup>. Un déséquilibre important dans la répartition de ces micro-



organismes est appelé dysbiose<sup>140,141</sup>. Elle a été mise en évidence chez des patients atteints de différentes maladies chroniques comme le DT2 et le syndrome du côlon irritable<sup>142,143</sup>. De plus en plus d'études émettent l'hypothèse que la dysbiose participe à la physiopathologie des maladies chroniques, mais il est compliqué de déterminer si elle en est la cause ou la conséquence<sup>144,145</sup>.

La dysbiose favorise la présence de certains métabolites microbiens qui sont moins bénéfiques pour la santé. Par exemple, le triméthylamine-N-oxyde (TMAO), produit par les Firmicutes, est issu de la métabolisation de molécules spécifiques aux produits animaux, comme la phosphatidylcholine<sup>146</sup>. Lorsque le TMAO est présent en excès, il possède des propriétés pro-inflammatoire, pro-thrombotique et pro-athérogène<sup>147,148</sup>, favorisant ainsi le développement de certaines pathologies.

Certains métabolites comme le butyrate sont impliqués dans le maintien de la perméabilité de la barrière intestinale, notamment au niveau du côlon. Cet AG à chaîne courte a des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique de certaines cellules épithéliales du côlon, les colonocytes<sup>149,150</sup>, et sur l'homéostasie intestinale : maintien de l'anaérobiose et donc de l'eubiose<sup>151</sup>, contrôle de l'inflammation<sup>152-154</sup> et induction de l'expression de mucines, glycoprotéines du mucus qui protègent l'épithélium, et de protéines de jonctions serrées entre les cellules intestinales limitant la perméabilité de l'épithélium<sup>155-157</sup>. Comme pour tous les AG à chaîne courte qui proviennent de la fermentation des fibres<sup>158,159</sup>, la production de butyrate est moins élevée après consommation d'aliments pauvres en fibres comme ceux du régime occidental. L'altération de la barrière intestinale qui en résulte est accentuée par la formation de métabolites issus du cholestérol qui réduisent le nombre de cellules en Goblet, cellules sécrétrices de mucus<sup>160</sup>. Le stress oxydant induit, entre autres, par l'excès de sucres et de lipides (cf. I.B.4 Dyslipylipoprotéïnémie, I.B.5 Hyperglycémie) peut perturber l'expression et la distribution des protéines des jonctions serrées des entérocytes, favorisant la perméabilité intestinale<sup>161,162</sup>.

Une des conséquences de l'hyperperméabilité intestinale est l'endotoxémie métabolique. Cette dernière est définie par le passage de molécules microbiennes (dont le lipopolysaccharide - LPS) dans la circulation. Le LPS est un composant majeur de la paroi des bactéries à gram négatif et interagit avec des récepteurs exprimés, entre autres, par des cellules myéloïdes comme les macrophages et les cellules dendritiques : un des

récepteurs de reconnaissance de forme (PRR - *pattern recognition receptors*), les récepteurs *macrophage scavenger receptor types 1 and 2* (MSR1 et MSR2)<sup>163</sup>, le récepteur de type *toll4* (*toll-like receptor 4* - TLR4)<sup>164</sup> et le facteur de différenciation myéloïde-2 (*macrophage-derived myeloid protein-2*, MD-2) qui est une molécule auxiliaire du TLR4<sup>165,166</sup>. Après fixation du LPS, le complexe TLR4/MD-2 induit des voies de signalisation pro-inflammatoires<sup>146,167</sup>. L'inflammation peut amplifier la perméabilité de l'épithélium intestinal et elle peut s'étendre aux tissus environnants, générant l'inflammation systémique<sup>101,168</sup>.

Le LPS se fixe également à un autre PRR, qui est un des récepteurs aux produits terminaux de glycation avancée (*advanced glycation end-product* - AGE) : RAGE (récepteur aux AGE)<sup>169</sup>. Les effets de l'interaction du LPS avec ce récepteur multi-ligands ont été très peu étudiés. Le rôle possible de RAGE dans les processus inflammatoires induits par le LPS n'a donc pas été démontré.

#### 4. *Dyslipoprotéïnémie*

La distribution des lipoprotéines dépend de la nature et de la proportion des AG. Les lipoprotéines à faible densité (LDL – *low density lipoprotein*) et lipoprotéines à très faible densité sont responsables du transport du cholestérol, du foie vers les cellules. Elles distribuent donc l'excès de cholestérol aux différents organes tandis que les lipoprotéines de haute densité (HDL – *high density lipoprotein*) capturent les molécules de cholestérol déposées dans les tissus et les transportent dans le foie pour qu'elles soient éliminées. L'accumulation de cholestérol peut être causée par une dérégulation des concentrations de LDL et HDL. Or, les produits laitiers riches en matière grasse (beurre et fromages), les viandes et les charcuteries qui contiennent beaucoup d'AG saturés favorisent la production de LDL<sup>170</sup>. Les AG saturés comme l'acide palmitique peuvent activer le TLR4<sup>171</sup> et induire différentes voies pro-inflammatoires<sup>167,172</sup>. L'interaction AG saturés/TLR4 favorise également le développement des résistances à l'insuline et à la leptine, hormone responsable de la satiété, associées aux troubles métaboliques<sup>173</sup>. Comme pour le LPS, l'association TLR4/MD-2 favorise la signalisation médiée par les AG saturés.

Les triglycérides sont synthétisés à partir du glucose *via* la lipogénèse (cf. I.B.2 Stress oxydant). L'excès de glucose entraîne donc l'hypertriglycéridémie. Cet excès de triglycérides induit une forte concentration de LDL plus petites et plus denses, qui sont

fortement athérogènes. Une fois oxydées, ces lipoprotéines peuvent activer l'inflammasome NLRP3<sup>174</sup>. L'accumulation des LDL oxydées suite à leur internalisation *via* différents récepteurs piègeurs (plus communément appelés par leur nom anglais, récepteurs *scavenger*; ce terme sera utilisé dans le manuscrit) comme le *cluster of differentiation* 36 (CD36) et MSR1, entraîne la transformation spumeuse des macrophages, favorisant l'athérosclérose<sup>175,176</sup>.

Contrairement au régime occidental, le régime méditerranéen est riche en AG oméga-3, nutriment à indice inflammatoire faible (cf. I.B.1 Inflammation), dont la consommation peut améliorer les marqueurs de dyslipoprotéïnémie. Elle est, en effet, associée à une diminution de la concentration de triglycérides et une augmentation de la concentration de HDL-cholestérol<sup>177</sup>. La consommation de poissons, principale source d'AG oméga-3, diminue d'ailleurs le risque d'AVC et de maladies cardiovasculaires<sup>178-181</sup>.

### 5. Hyperglycémie

La charge glycémique d'un aliment reflète sa capacité à élever la glycémie en fonction de la quantité consommée. Le régime occidental comprend des aliments qui ont des charges glycémiques élevées et qui sont consommés fréquemment comme les céréales raffinées de type flocon de maïs, les donuts, les pains blancs et les sucreries<sup>182</sup>. L'hyperglycémie, causée entre autres par la consommation de ces aliments, peut être régulée par l'insuline. En effet, cette hormone permet de réguler la distribution du glucose dans les organes insulino-dépendants ainsi que son stockage dans le foie, les muscles et les reins sous forme de glycogène. Ce mécanisme permet de réduire l'hyperglycémie postprandiale. Cependant, une hyperglycémie persistante, comme dans le cas du DT2, peut entraîner un épuisement des cellules  $\beta$  du pancréas et un arrêt de la production d'insuline<sup>183</sup>, augmentant le risque de diverses complications angiopathiques. Les mécanismes impliqués dans ces processus physiopathologiques ne sont pas complètement décrits mais ils seraient principalement la conséquence de la génération d'environnements oxydants et inflammatoires<sup>184,185</sup>. Michael Brownlee a émis une hypothèse sur l'implication de 4 voies métaboliques du glucose qui induiraient les

dommages cellulaires et tissulaires favorisés par l'hyperglycémie persistante<sup>131</sup> (

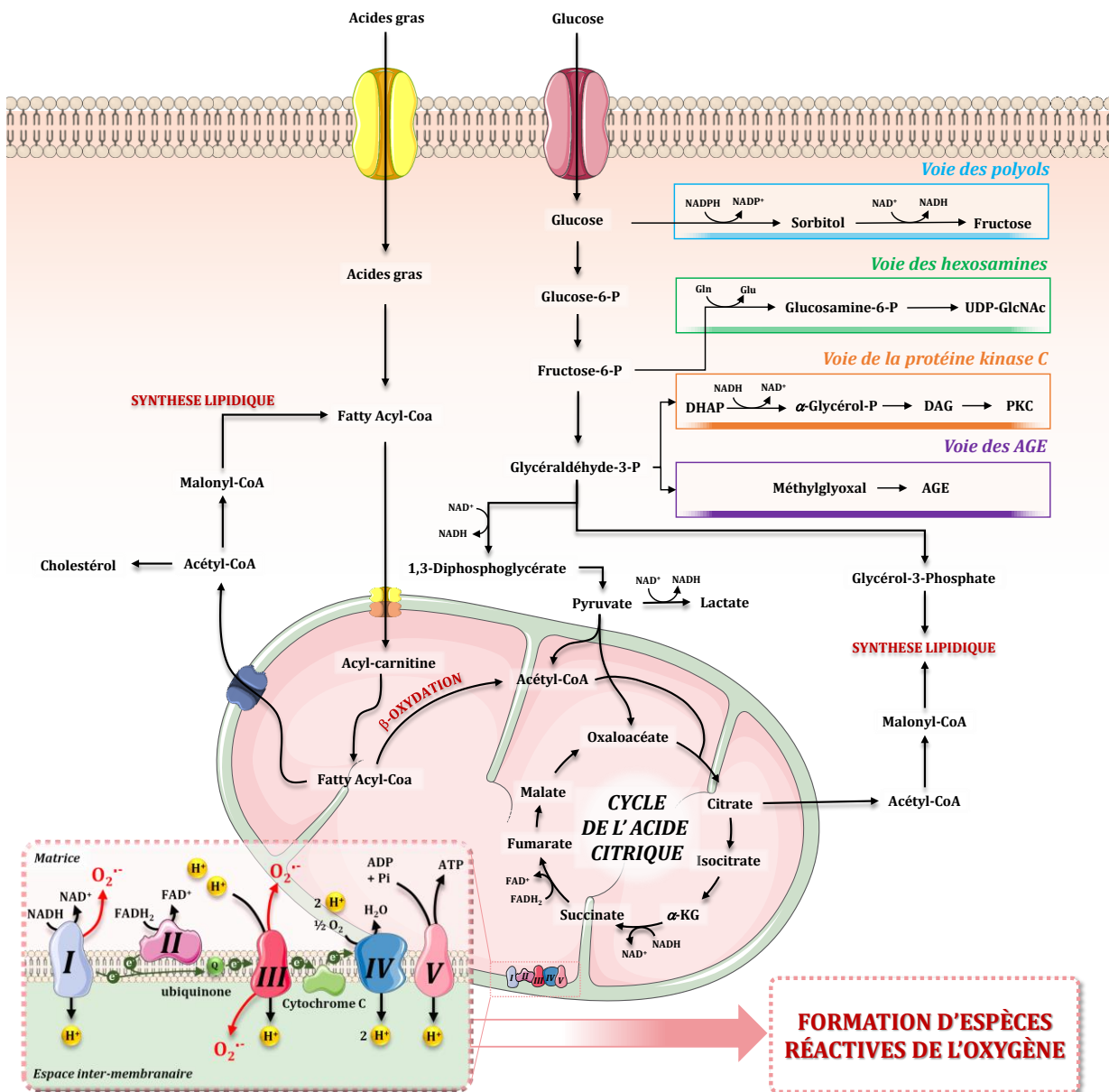
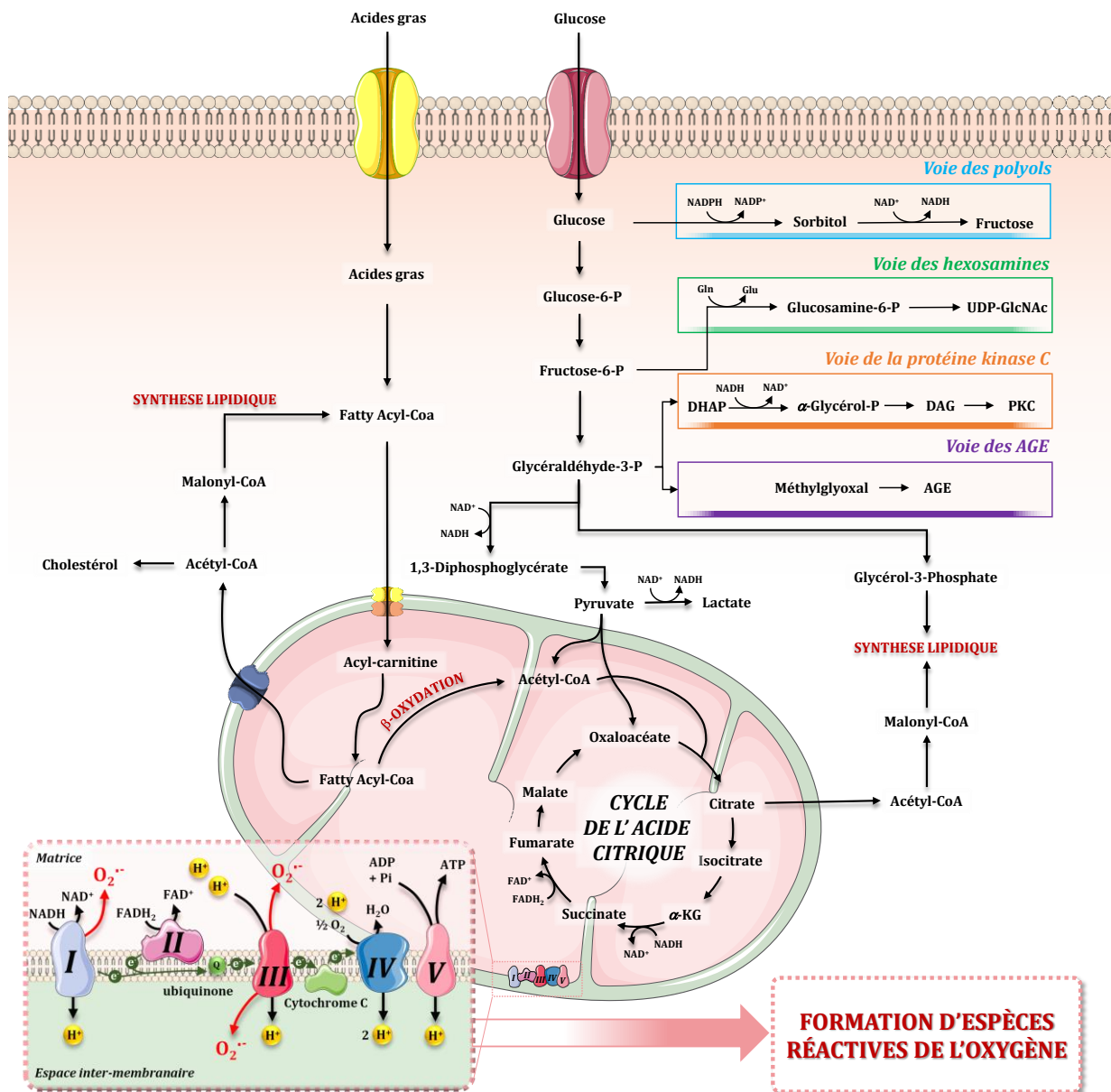


Figure 6).



**Figure 6 :** Voies métaboliques induites par les acides gras et le glucose participant à la génération d'espèces réactives de l'oxygène.<sup>131,186-189</sup>. En condition physiologique, le glucose stimule les voies de la glycolyse, du cycle de l'acide citrique, et stimule modérément la chaîne respiratoire mitochondriale (encadré en bas à gauche). La formation d'espèces réactives de l'oxygène produites par cette dernière est donc faible. En revanche, lors d'hyperglycémie postprandiale ou chronique (régime occidental, diabète de type 2, ...), les produits intermédiaires de la glycolyse accumulés activent la voie des polyols, des hexosamines, de la protéine kinase C, et de formation des produits terminaux de glycation avancée (AGE - *advanced glycation end-products*). Ces voies instaurent des environnements oxydants et inflammatoires. L'accumulation de glycérol-3-phosphate stimule la synthèse lipidique. CoA : coenzyme A ; ATP : adénosine triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; DHAP : dihydroxyacétone phosphate ; FAD<sup>+</sup>/FADH<sub>2</sub> : flavine adénine dinucléotide ; Glycérol-P : glycérol-phosphate ; Glucose-6-P : glucose-6-phosphate ; Glucosamine-6-P : glucosamine-6-phosphate ; NAD<sup>+</sup>/NADH : nicotinamide adénine dinucléotide ; NADP<sup>+</sup>/NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; UDP-GlcNAc : uridine diphosphate N-acétylglucosamine

L'excès de glucose dans les organes induit, dans un premier temps, la suractivation de la glycolyse<sup>131</sup> qui est favorisée par l'inhibition partielle de la GAPDH oxydée (cf. I.B.2 Stress oxydant). Le glucose, et les produits intermédiaires de la glycolyse qui s'accumulent, sont métabolisés par des voies annexes<sup>190</sup>. Certaines de ces voies vont générer la production d'ERO et de signaux inflammatoires.

### *i. Voie des polyols*

L'enzyme intervenant lors de la première étape de la voie des polyols est l'aldose réductase. Elle possède plusieurs ligands, dont le glucose pour qui elle a une affinité assez faible. Ce n'est donc qu'en condition riche en glucose que la voie des polyols est activée (

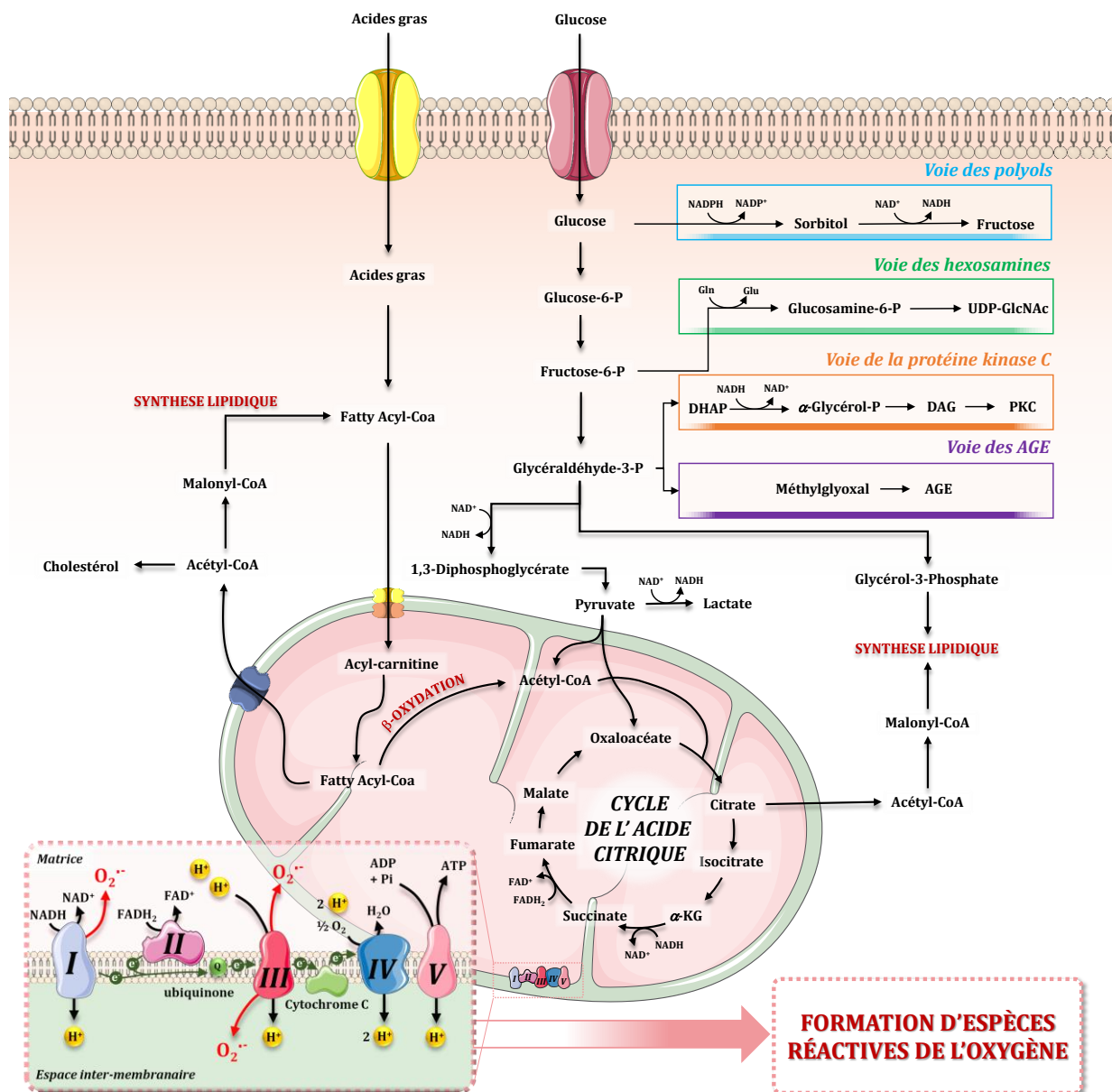


Figure 6).

L'aldose réductase utilise le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) comme coenzyme. Ce dernier est un cofacteur d'oxydoréduction nécessaire à la réduction du disulfure de glutathion en glutathion réduit. La diminution de la quantité de NADPH limite la disponibilité du glutathion réduit, favorisant l'accumulation d'ERO et le stress oxydant. Différentes études ont montré que l'administration d'inhibiteurs de l'aldose réductase diminuait la concentration sanguine de biomarqueurs du stress oxydant, notamment chez les sujets diabétiques<sup>191-193</sup>. Le sorbitol, produit intermédiaire de la voie des polyols, est suspecté par certains d'induire un stress osmotique qui favoriserait l'inflammation, la formation d'ERO, une perte d'eau intracellulaire et un réarrangement membranaire<sup>194</sup>. Ce stress osmotique participerait aux complications vasculaires chez les sujets diabétiques, notamment dans les reins. L'administration d'inhibiteurs de l'aldose réductase n'a pas permis de confirmer l'implication du sorbitol dans les complications diabétiques. Par contre, l'inhibition de la formation de fructose, après métabolisation du sorbitol par les sorbitol déshydrogénases, serait plus efficace pour prévenir ces complications. La conversion du sorbitol en fructose nécessite la réduction du NAD<sup>+</sup> en NADH. L'accumulation de NADH active la protéine kinase C (PKC) et inhibe la GAPDH, augmentant la quantité de produits intermédiaires de la glycolyse<sup>195,196</sup> (cf. I.B.5.iii Voie d'activation de la protéine kinase C).

Le fructose, produit final de la voie des polyols, peut intervenir dans différents processus :

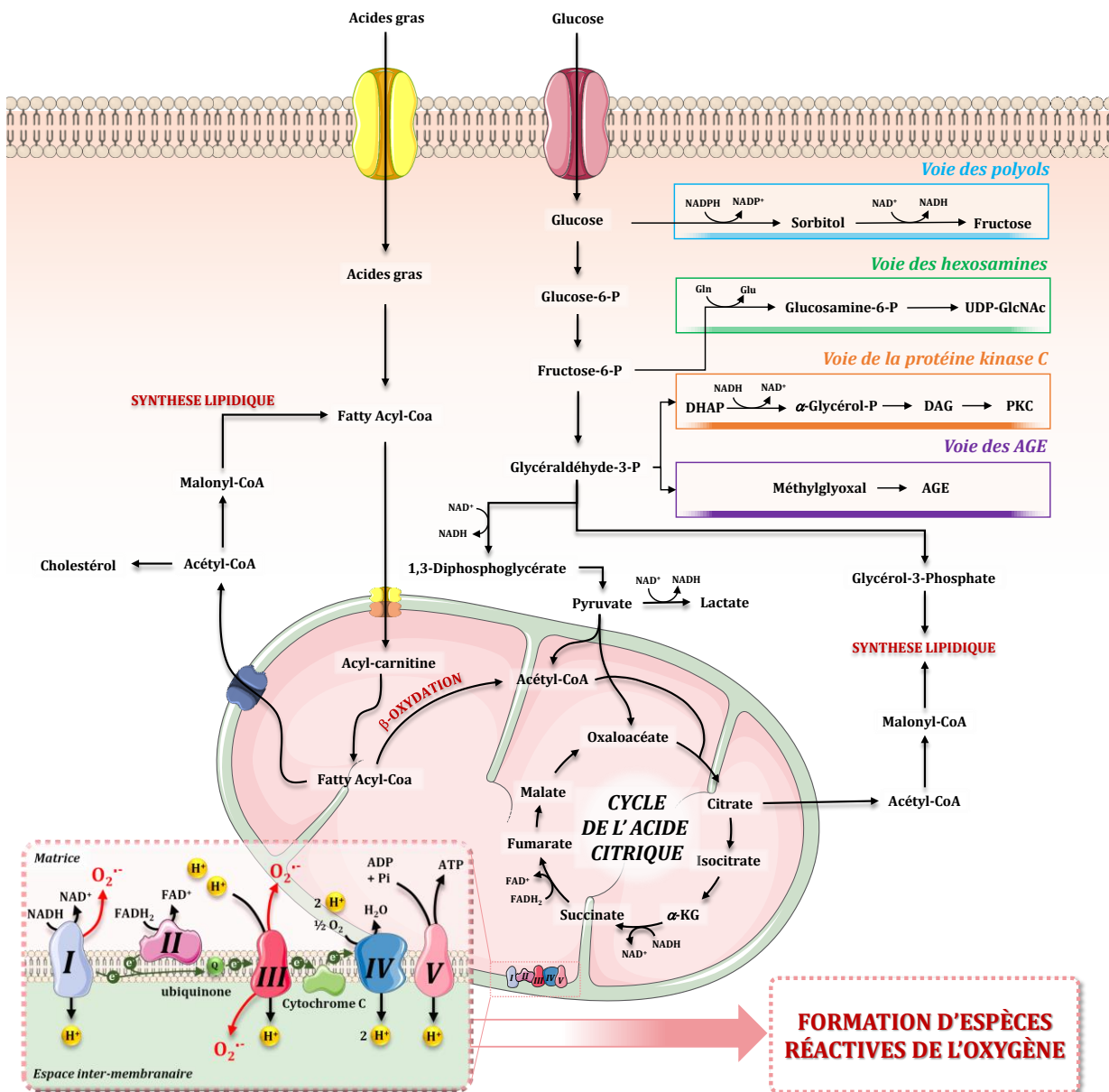
- la glycolyse, la lipogenèse (cf. I.B.4 Dyslipoprotéinémie) et le cycle de l'acide citrique, ce qui favorise la stimulation de la chaîne respiratoire mitochondriale, avec la formation d'ERO associée
- La formation d'acide urique<sup>197</sup>. Brièvement, la fructokinase, première enzyme de la fructolyse, utilise l'ATP. Cette déplétion en ATP favorise l'activité de l'adénosine monophosphate désaminase, enzyme participant au métabolisme des purines et à la formation d'acide urique. L'excès d'acide urique favorise la production d'ERO (via la NADPH oxydase...) et l'expression d'acteurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  - *tumor necrosis factor- $\alpha$* , interleukine (IL) -6, MCP-1 - *monocyte chemoattractant protein-1*...) <sup>198</sup>.

#### **ii. Voie des hexosamines**

Le fructose-6-phosphate, produit intermédiaire de la glycolyse, est un substrat de la voie des hexosamines. Cette voie produit l'uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc). L'enzyme O-GlcNAc transférase permet le transfert de l'UDP-GlcNAc sur



les résidus sérines et thréonines (



**Figure 6).** Cette modification post-traductionnelle est appelée O-GlcNacylation. Elle intervient dans divers processus biologiques en régulant la signalisation cellulaire et la transcription<sup>199</sup>. La O-GlcNacylation est suspectée d'intervenir dans les complications vasculaires liées au DT2 via l'activation de plusieurs facteurs de transcription dont SP-1 (*specificity protein-1*) qui induit l'expression du facteur de croissance TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*)<sup>199,200</sup>. Ces molécules sont impliquées dans l'oxydation, l'inflammation et la fibrose<sup>131</sup>. Par exemple, l'accumulation de collagènes, laminines, fibronectines au niveau du rein de sujets atteints de DT2, est

associée à une suractivation de la voie du TGF- $\beta$ <sup>201</sup>. Cette dernière stimule la production d'ERO, notamment en activant la NADPH oxydase, et perturbe les défenses anti-oxydantes en inhibant la synthèse du glutathion<sup>202</sup>.

### ***iii. Voie d'activation de la protéine kinase C***

Le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) est un intermédiaire de la glycolyse, qui est transformé en 1,3-diphosphoglycérate par la GAPDH qui est partiellement inhibée par le stress oxydant généré, entre autres, par la respiration mitochondriale et les voies des polyols et des hexosamines. Cette inhibition induit l'accumulation de G3P qui est isomérisé en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) par la triose-phosphate isomérase. Comme la formation de son précurseur (fructose 1,6-bisphosphate) est irréversible, le G3P, comme le DHAP, est produit en grande quantité lors d'excès de glucose chronique. Les trioses phosphate favorisent la formation de diacylglycérol par un mécanisme dépendant du NADPH<sup>131</sup>. Le diacylglycérol est un co-facteur de la PKC. L'activation de cette voie est associée à une augmentation de l'expression de TGF- $\beta$ , à la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et à l'activation de la NADPH oxydase. Un environnement inflammatoire, oxydant et fibrosant est généré par cette voie. Différentes études expérimentales ont confirmé le rôle de l'activation de la PKC dans différentes complications diabétiques, principalement les néphropathie et rétinopathie<sup>204-207</sup>.

### ***iv. Voie de formation des produits terminaux de glycation avancée***

Les trioses phosphate, DHAP et le G3P, décrits dans le paragraphe précédent, peuvent former du MGO après clivage non enzymatique<sup>208</sup>. La majeure partie du MGO intracellulaire serait d'ailleurs générée par cette voie<sup>208</sup>. Ce produit réagit avec les groupements aminés libres des protéines afin de former des AGE. La synthèse des AGE est favorisée par différentes conditions pathologiques (DT2 et insuffisance rénale, ...). L'hémoglobine glyquée HbA<sub>1c</sub> est d'ailleurs un marqueur de suivi du diabète<sup>209</sup>. Les AGE favoriseraient les complications de ces différentes pathologies. La glycation peut modifier la structure et la fonction des protéines<sup>210</sup>. Les AGE formés peuvent interagir avec des récepteurs et activer différents signaux inflammatoires et oxydants<sup>211</sup>.

La glycation comprend plusieurs voies de synthèse des AGE. La transformation et l'ultra-transformation des aliments favorisent la glycation<sup>212</sup>. Les AGE peuvent donc être

considérés comme des produits alimentaires ou endogènes associés aux régimes déséquilibrés de type régime occidental.

La synthèse et les effets santé des AGE alimentaires et endogènes sont décrits dans la section et le chapitre suivants.

## **C. Réaction de Maillard ou glycation**

### *1. Découverte de la réaction de Maillard*

En 1908, le chimiste britannique Arthur Robert Ling publia un article sur le maltage, une étape essentielle de la production de bière. Il s'intéressa particulièrement aux étapes de touraillage et de torrification qui sont indispensables pour le développement des arômes et la coloration du moût. Il décrivit l'apparition de pigments bruns après chauffage de protéines d'orge avec des sucres simples (maltose ou glucose) à 120-140 °C (températures de séchage des grains d'orge lors du touraillage) puis aux températures plus élevées de torrification (180-220°C)<sup>213</sup>. Il émit l'hypothèse qu'à 120-140°C, des corps de type glucosamine seraient formés puis ces derniers seraient décomposés aux températures plus élevées, formant des pigments bruns. Quatre ans plus tard, le médecin et chimiste français Louis-Camille Maillard confirma que ce brunissement provenait d'une réaction entre un sucre et une fonction amine. Il observa effectivement cette pigmentation lorsqu'il chauffa à de fortes températures une solution de glycine en présence de glucose<sup>214</sup>. Sans pouvoir en décrire les différentes étapes, il émit 2 hypothèses sur cette réaction :

- elle participerait aux modifications des nutriments au cours de la cuisson des aliments
- elle induirait une modification post-traductionnelle des protéines endogènes chez les patients diabétiques qui présentent une hyperglycémie chronique

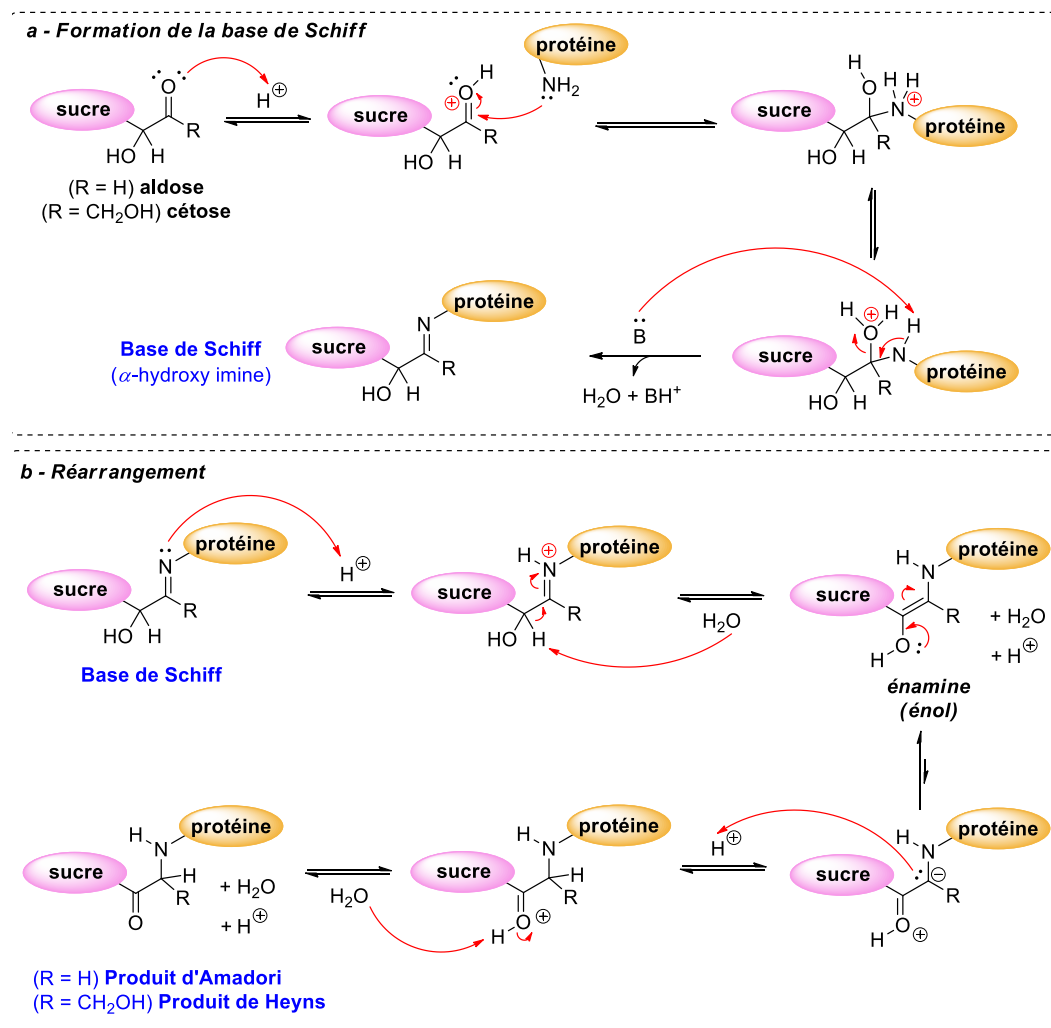
Ces 2 hypothèses furent validées plus tard.

C'est finalement le chimiste américain John Hodge qui identifia, en 1953, les différentes étapes réactionnelles de ce processus<sup>215</sup> qui fut nommé plus tard réaction de Maillard en hommage au scientifique qui en comprit l'importance au niveau alimentaire et *in vivo*. Le nom de Ling aurait certainement mérité d'être associé à cette réaction.

La réaction de Maillard permet la transformation thermique des aliments et, à plus basse température (37°C), la modification post-traductionnelle et non-enzymatique des protéines *in vivo*. Initiée par l'addition d'un sucre à une protéine, cette modification fut d'abord nommée « glycosylation non enzymatique ». Le terme « glycation » a ensuite été employé pour distinguer clairement cette réaction chimique de la glycosylation enzymatique et il est couramment utilisé à la place de « réaction de Maillard », quelle que soit l'origine de cette réaction, exogène ou endogène. C'est d'ailleurs le terme « glycation » qui sera employé dans ce mémoire.

## 2. Etapes réactionnelles

La glycation est une succession de réactions chimiques, pouvant se décomposer en trois phases principales (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) (Figure 8).



**Figure 7** : Phase initiale de la glycation. La glycation est initiée par la réaction entre un sucre réducteur et la fonction amine libre d'un peptide ou d'une protéine. La base de Schiff formée subit un « réarrangement » qui est une succession de deux tautoméries. Les

produits d'Amadori et de Heyns sont ainsi formés<sup>216</sup>

### *i. Phase précoce*

La première étape est initiée par la réaction entre la fonction amine libre d'un acide aminé, d'un peptide ou d'une protéine, de certains lipides (dont la phosphotidyléthanolamine) ou de bases de l'ADN, et le groupement carbonyle d'un sucre réducteur (glucose, fructose...). Les fonctions amines libres des peptides ou protéines sont présentes sur les acides aminés contenant plusieurs fonctions amines libres (lysine et arginine) ou l'acide aminé de leur extrémité N-terminale. Suite à cette première étape, une imine instable, appelée base de Schiff, est formée<sup>217</sup>.

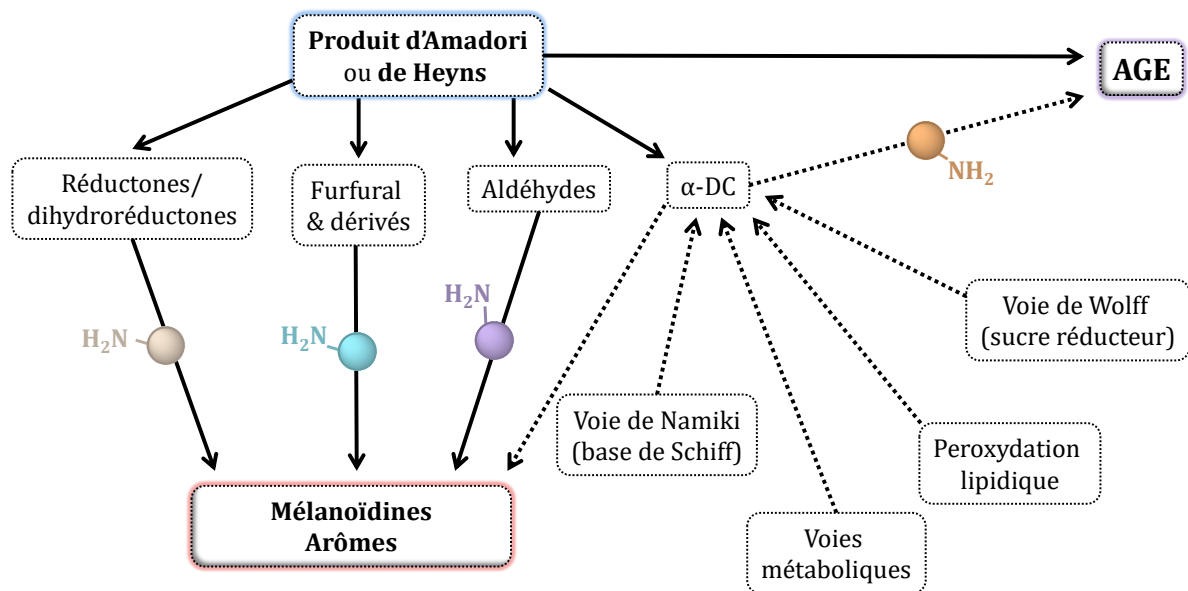
L'étape suivante est une succession de deux tautoméries communément appelée « réarrangement ». En fonction de l'extrémité réductrice du sucre, aldéhyde (ex : glucose) ou cétone (ex : fructose), la base de Schiff est respectivement transformée en 1-amino-1-désoxy-2-cétose, aussi appelé produit d'Amadori ou en 2-amino-2-désoxyaldose ou produit de Heyns<sup>215</sup>. Ces deux produits sont plus stables que la base de Schiff (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

### *ii. Phase de propagation*

La réorganisation des produits d'Amadori ou de Heyns entraîne la formation de produits carbonylés qui peuvent être regroupés en 4 classes : les réductones et dihydroréductones, le furfural et ses dérivés, les aldéhydes linéaires et les produits dicarbonylés ( $\alpha$ -DC). Les produits carbonylés sont des molécules très réactives qui se lient aux amines libres des peptides ou des protéines, de certains lipides ou de bases de l'ADN pour former des produits terminaux de glycation. L'oxydation ou la fragmentation oxydative des précurseurs (sucres réducteurs) ou de la base de Schiff entraîne également la formation des produits carbonylés (**Figure 8**)<sup>211</sup>.

### iii. Phases avancée et finale

Le produit d'Amadori ou de Heyns est dégradé par un ensemble complexe de réactions, notamment des déshydratations, des fragmentations, la dégradation de Strecker et des liaisons croisées<sup>216</sup>. Ces réactions dépendent de différents paramètres comme la température, le pH et le taux d'oxygène (**Figure 8**).



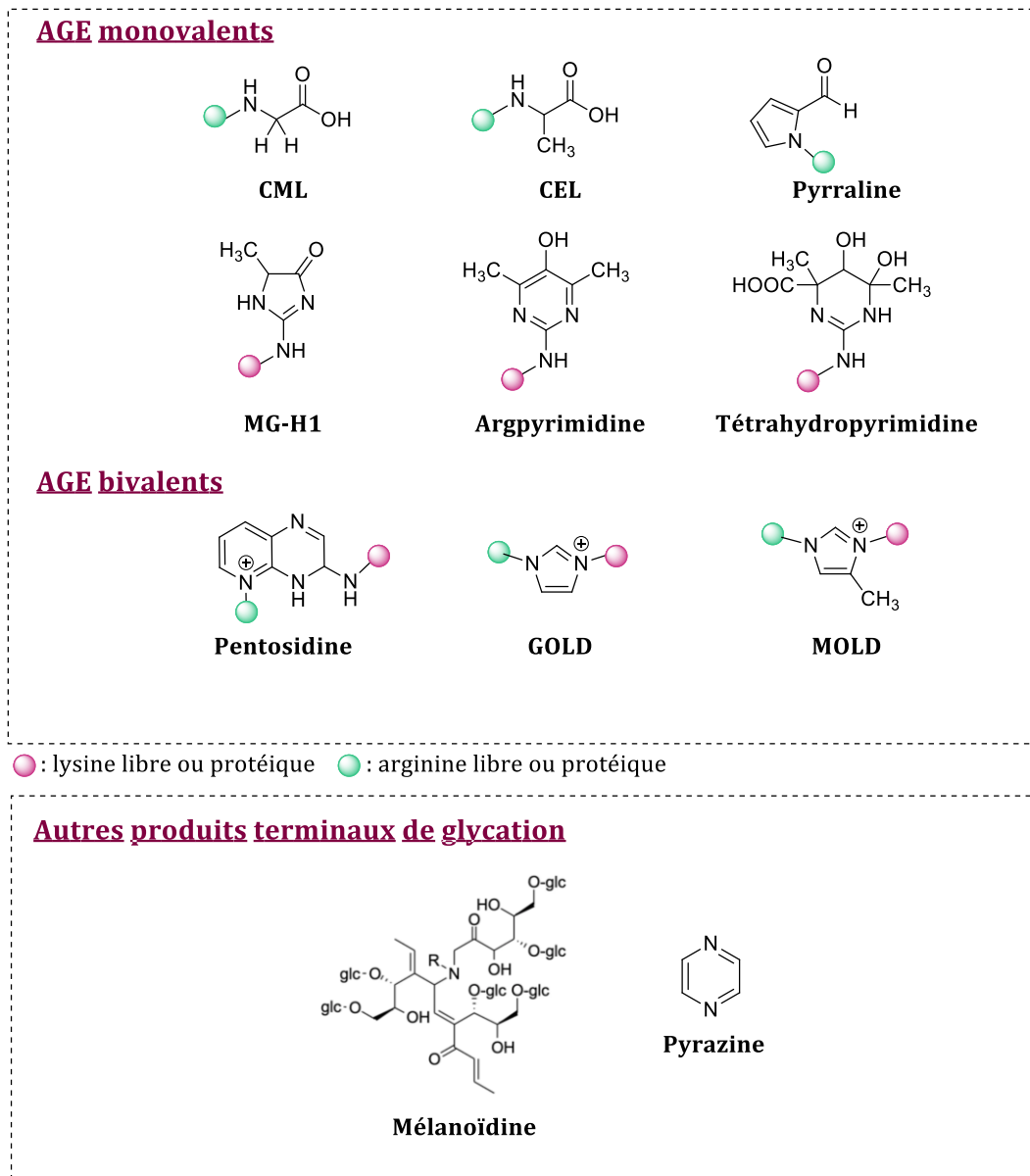
**Figure 8 :** Formation des produits terminaux de glycation avancée (AGE - *advanced-glycation end-products*) à partir du produit d'Amadori ou de Heyns. Ces produits subissent des réactions complexes aboutissant à la formation de produits carbonylés réactifs (réductones et dihydroréductones, furfural et dérivés de furfural, aldéhydes, produits dicarbonylés -  $\alpha$ -DC, ...). Les  $\alpha$ -DC peuvent également provenir, entre autres, de l'oxydation du sucre réducteur (voie de Wolff), de la dégradation de la base de Schiff (voie de Namiki), de différentes voies métaboliques dont la glycolyse et de la peroxydation lipidique. L'ensemble de ces produits carbonylés réactifs réagissent ensuite avec d'autres amines libres, et forment des mélanoïdines, des arômes, .... La réaction des  $\alpha$ -DC avec une amine libre peut également former des AGE. Enfin, les AGE peuvent provenir de la dégradation du produit d'Amadori ou de Heyns, sans intervention d' $\alpha$ -DC<sup>218</sup>.

### 3. Les produits terminaux de glycation

Depuis la découverte de la glycation, plusieurs produits terminaux de glycation ont été découverts et caractérisés. Certains sont formés au cours de la transformation des aliments comme 1- les mélanoïdines, fameux pigments bruns décrits par A.R. Ling, qui sont considérées comme bénéfiques pour l'organisme puisqu'elles ont des propriétés anti-oxydantes et anti-microbiennes<sup>219</sup> et 2- les produits volatiles odorants comme les pyrazines qui confèrent des odeurs appréciées par les consommateurs comme les odeurs de torréfaction et de viande rôtie. Presque 120 ans après sa découverte, la glycation est

d'ailleurs considérée comme l'une des réactions chimiques principales des aliments pendant leur transformation et leur stockage<sup>220,221</sup>.

D'autres ont été découverts dans l'organisme. Ils sont formés à plus basse température que les mélanoidines et les produits volatiles odorants. Ce sont les AGE. Ils proviennent principalement de la réaction entre des sucres réducteurs et des amines libres de protéines, de certains lipides ou bases de l'ADN. Des acides aminés d'une même protéine ou des acides aminés provenant de protéines différentes peuvent être liés par des AGE impliquant des liaisons croisées. Les  $\alpha$ -DC, issus entre autres de la peroxydation lipidique, peuvent également former des AGE après réaction avec des amines libres<sup>222</sup>. Certains AGE comme la N $\epsilon$ -carboxyméthyllysine (CML) sont également formés lors de la transformation des aliments. En raison de la grande diversité de leurs précurseurs, les AGE forment une famille complexe et hétérogène de molécules (**Figure 9**).



**Figure 9 :** Structures des principaux produits terminaux de glycation avancée (AGE - *advanced glycation end-products*). Les AGE peuvent se former sur une amine libre (AGE monovalent), ou entre deux acides aminés (AGE bivalent) de la même protéine ou de deux protéines, induisant alors un pontage. Les autres produits terminaux de glycation regroupent essentiellement des mélanoïdines et des produits volatiles odorants (ex : pyrazine, ...). La structure de mélanoïdine contenant des résidus de glucose est donnée à titre indicatif<sup>223</sup>. Les ronds verts et roses représentent respectivement les lysines et les arginines. CML : Nε-carboxyméthyllysine ; CEL : Nε-carboxyéthyllysine ; GOLD : *glyoxal-lysine dimer* ; MOLD : *methylglyoxal-lysine dimer* ; MG-H1 : *methylglyoxal-derived hydroimidazolone H1*.

#### 4. Méthodes de dosage des AGE

La caractérisation des AGE a permis de développer différentes méthodes d'analyse afin de doser ces produits dans les matrices alimentaires ou dans les tissus et fluides biologiques.



### ***i. Méthodes de chimie analytique***

Ces méthodes peuvent être divisées en deux groupes 1- la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et 2- la chromatographie en phase liquide qui peut être couplée à différents détecteurs : UV, fluorescence, spectrométrie de masse en tandem ...<sup>224</sup> La première est la plus simple d'utilisation mais elle permet principalement le dosage de la CML et de la Nε-carboxyéthyllysine (CEL). La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL/SM-SM) est considérée comme la technique de référence pour le dosage des AGE les plus communément étudiés. Elle peut être utilisée pour analyser une multitude de matrices alimentaires (viandes, boissons, céréales...) et biologiques (organes, sang, urine...) <sup>224-228</sup>. Ces techniques sont très sensibles, répétables et reproductibles. Elles permettent de déterminer la concentration des AGE dans les échantillons, ce qui facilite la comparaison entre les études. Cependant, la préparation des échantillons pour les solubiliser varie en fonction de la nature de l'AGE et de la nature de la matrice, pouvant rendre ce processus complexe avec la perte possible de produit. Les équipements peuvent être très coûteux selon la technique chromatographique utilisée et seuls des utilisateurs formés peuvent les faire fonctionner.

### ***ii. Méthodes immunochimiques***

Elles nécessitent l'utilisation d'anticorps qui ont des spécificités plus ou moins larges. Certains d'entre eux, dits « anti-AGE », reconnaissent plusieurs AGE. D'autres anticorps ciblent des AGE particuliers (CML...), ou un type d'AGE (AGE dérivés du MGO...), ils permettent donc une analyse plus spécifique. La technique ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) est plus sensible que le *dot-blot* (technique de transfert de molécules sur membrane). Les résultats obtenus par ces deux méthodes sont semi-quantitatifs (des unités arbitraires de produits ou des quantités relatives sont mesurées) et dépendent de la sensibilité et de la spécificité des anticorps<sup>229</sup>. L'utilisation possible d'une gamme étalon avec la méthode ELISA permet d'avoir des résultats quantitatifs ; ce qui est le cas pour la plupart des kits commerciaux dont l'acquisition peut être onéreuse. Le développement d'ELISA *maison* quantitatif peut être laborieux. Le dot blot est plus simple et plus rapide à mettre en place. Ces deux méthodes permettent de cribler rapidement un grand nombre d'échantillons mais elles requièrent une bonne solubilité des échantillons. Il a d'ailleurs été montré que certaines matrices alimentaires ne sont pas

compatibles avec ces méthodes de dosage<sup>230</sup>. Les anticorps permettent également la réalisation des analyses qualitatives comme le *western blot* ou l'immunohistochimie.

### ***iii. Méthodes de mesure directe***

L'AGE *reader* est un dispositif non invasif mesurant la fluorescence à la surface du derme de l'Homme, causée entre autres par des AGE impliquant des liaisons croisées. En estimant la quantité d'AGE dans la peau, l'appareil donne une estimation instantanée du risque cardiovasculaire dont certaines études valident la pertinence<sup>231</sup>. Cette mesure serait également un bon marqueur du risque péri-opératoire des patients subissant une chirurgie cardiaque<sup>232</sup>. Les AGE fluorescents, comme la pentosidine et l'argpyrimidine<sup>224</sup>, solubilisés de différentes matrices peuvent être mesurés aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 300 à 420 nm et 350 à 600 nm respectivement<sup>224</sup>.

Des bases de données contenant les quantités d'AGE de différents aliments et boissons ont été publiées et sont utilisées notamment pour les études cliniques. La première base de données a été réalisée à partir du dosage de la CML par la technique ELISA<sup>233,234</sup>. Plus récemment, la quantité de différents AGE (CML, N $\epsilon$ -carboxyéthyllysine ou CEL, et *methylglyoxal-derived hydroimidazolone-H1*, ou MG-H1) de 190 aliments et boissons a été mesurée avec la technique CL/SM-SM<sup>235</sup>.

Il peut être compliqué de comparer des résultats semi-quantitatifs à des résultats quantitatifs. De plus, si certains résultats sont concordants, d'autres ne le sont pas. Ceci a notamment mis en évidence la limite de la technique ELISA pour la détection d'AGE dans certaines matrices peu solubles (beurre, huile, ...) <sup>236,237</sup>.

## ***5. Facteurs favorisant la glycation***

### ***i. Glycation des aliments***

- **Température et durée de chauffage**

La température et le temps de chauffage font partie des paramètres essentiels pour la glycation. Premièrement, la température augmente considérablement la vitesse de réaction. Par exemple, un même brunissement issu de la formation de produits de glycation est obtenu après incubation pendant 4 semaines à 20°C, 3 h à 100°C ou 5 minutes à 150°C<sup>238</sup>. La température du corps humain est suffisante pour la formation des AGE mais pas celle des mélanoïdines et des produits volatiles odorants. Il est intéressant

de souligner que des aliments ne subissant pas de cuisson, comme le fromage, peuvent être riches en AGE en raison du traitement des ingrédients à hautes températures (par exemple, la pasteurisation du lait) et du long processus de vieillissement à température ambiante<sup>239</sup>. D'autres facteurs régulent en effet la glycation.

- **Pression, pH et disponibilité en eau**

Le traitement à haute pression, aussi appelé pascalisation, est un procédé utilisé dans l'industrie agro-alimentaire pour stériliser les aliments. Les aliments sont soumis à des pressions pouvant varier de 300 à 600 mégapascal (MPa)<sup>240</sup>. La concentration d'AGE d'une solution d'acétylarginine et de glucose incubée à hautes températures est multipliée par 4 quand elle est soumise à une pression hydrostatique élevée (> 200 MPa)<sup>241</sup>. Cependant, tous les AGE ne sont pas modulés de la même façon par de hautes pressions. L'augmentation de la pression jusqu'à 600 MPa est, en effet, associée à l'augmentation de la formation de pentosidine et à une diminution de la formation de pyrroline, dans une solution d'acides aminés (ou de  $\beta$ -caséine) et de sucres<sup>242</sup>.

La réactivité des groupements amines, donc la glycation, est favorisée à pH basique. A l'inverse, le pH acide réduit cette réaction. Par exemple, mariner de la viande de bœuf dans du jus de citron ou du vinaigre diminue significativement la production de CML à 150°C<sup>233</sup>. De plus, le pH influence la phase de propagation, et donc la nature des produits terminaux formés. Par exemple, la formation des réductones/dihydroréductones est favorisée à  $\text{pH} \leq 7$  tandis que celle des autres produits carbonylés l'est à  $\text{pH} > 7$ <sup>216</sup>.

La glycation des aliments peut se faire dans les aliments secs, mais la vitesse de réaction augmente en présence d'eau<sup>243</sup>. Cette dernière favorise en effet la solubilité et la mobilité des réactifs<sup>244</sup>.

- **Composition de l'aliment**

Parmi un large panel d'aliments, les viandes transformées ainsi que les aliments à base de noix et de céréales traités à hautes température présentent les plus hauts taux d'AGE tandis que les fruits, légumes, beurre et café sont ceux qui en contiennent le moins<sup>235</sup>. La formation d'AGE est modulée par les ingrédients de l'aliment, donc par sa teneur en protéines et graisses. Ces dernières contribuent à la formation d' $\alpha$ -DC *via* la peroxydation lipidique. Certains aliments sont réputés pour être riches en  $\alpha$ -DC, comme

le miel réalisé à partir du nectar de l'arbre de manuka<sup>245</sup>. La teneur en sucres réducteurs est également importante, bien qu'ils ne présentent pas tous la même réactivité avec le groupement amine peptidique ou protéique. Par exemple, le lactose est moins réactif que les deux sucres qui le composent (glucose et galactose)<sup>246</sup>. Les acides aminés ont également une réactivité différente avec les sucres réducteurs : la lysine, la glycine, le tryptophane et la tyrosine sont ceux, parmi les 20 acides aminés classiques, donnant le brunissement le plus intense<sup>247</sup>.

La présence de molécules anti-oxydantes peut inhiber indirectement la glycation en captant les ERO et empêchant la formation d' $\alpha$ -DC. Ces molécules peuvent être naturellement présentes dans l'aliment (surtout végétal comme le persil, la canneberge, ...) ou ajoutées lors de sa transformation. Leur addition est par ailleurs souvent précisée sur l'étiquette principale et constitue un argument de vente important. Les polyphénols font partie des molécules anti-oxydantes les plus étudiées et leur capacité à inhiber la glycation a été mise en évidence<sup>248</sup>. La probabilité de glycation d'une molécule augmente en fonction du nombre d'amines libres disponibles. Cependant, toutes les amines libres d'un peptide ou d'une protéine n'auront pas forcément la même probabilité de glycation. Par exemple, certaines lysines de la  $\beta$ -lactoglobuline ont été identifiées comme particulièrement sensibles à la glycation, sans doute à cause de leur accessibilité sur la structure finale de la protéine<sup>249</sup>.

## ***ii. Glycation endogène***

La glycation est composée d'une succession d'étapes dont les cinétiques varient en fonction de la nature des sucres réducteurs. La base de Schiff est formée quelques heures après la réaction du sucre réducteur avec l'amine libre. Ensuite, le réarrangement permettant la synthèse du produit d'Amadori ou de Heyns dure plusieurs jours. Enfin, plusieurs semaines seraient nécessaires à la formation d'AGE<sup>250</sup>. Un environnement oxydant favorise la production d' $\alpha$ -DC, qui augmentent la vitesse de formation des AGE. Après 4 jours d'incubation à 37°C, les AGE issus de la réaction entre l'albumine sérique bovine (BSA – *bovine serum albumin*) et le MGO sont environ 4 fois plus nombreux que ceux provenant de la réaction de la BSA avec du glucose<sup>251</sup>. Le temps nécessaire à la formation d'AGE *via* les  $\alpha$ -DC n'est cependant pas connu.

En résumé, les AGE peuvent être formés lors de la glycation : par dégradation du produit d'Amadori<sup>218</sup>, et 2- suite à la réaction entre les  $\alpha$ -DC et les amines libres (**Figure 8**). Cette seconde voie de formation est sans doute la plus importante dans l'organisme. Les  $\alpha$ -DC sont, en effet, formés par des voies métaboliques induites par l'excès de sucres et de graisses apporté par le régime occidental (cf. I.B Impacts biologiques du régime alimentaire occidental). L'inflammation et l'oxydation, dénominateurs communs des maladies chroniques dont le DT2, favorisent également la production d' $\alpha$ -DC (cf. I.B.5 Hyperglycémie).

## **II. Effets physiopathologiques de la glycation endogène et alimentaire**

### **A. Glycation endogène**

#### *1. Etudes cliniques*

##### *i. Diabète*

La glycation endogène est un processus difficilement réversible qui se produit en condition physiologique et qui entraîne une accumulation d'AGE, principalement sur les protéines à demi vie longue, au cours du vieillissement. Depuis la découverte de l'augmentation de la concentration sanguine de l'hémoglobine glyquée (HbA<sub>1c</sub>) chez les patients diabétiques<sup>252</sup>, il est maintenant connu que la glycation est favorisée par différentes perturbations biologiques comme l'excès de glucose, l'inflammation et l'oxydation. De nombreuses études ont rapporté une accumulation plus importante d'AGE dans les tissus de patients atteints de diabète que dans les tissus de sujets sains<sup>253-257</sup>.

Si l'excès de glucose induit majoritairement la glycation des protéines de la matrice extracellulaire, il favorise également celle des protéines intracellulaires des cellules non insulino-dépendantes. Ces cellules sont les érythrocytes, les cellules des tissus nerveux périphériques, les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et glomérulaires rénales, et les cellules du cristallin<sup>258</sup>.

Chez des femmes âgées ( $\geq 65$  ans), la concentration de CML sérique est corrélée à l'anémie<sup>259</sup>. Les sujets diabétiques anémiés présentent une concentration d'AGE sérique plus élevée que des sujets diabétiques non anémiés<sup>260</sup>.

L'accumulation des AGE est suspectée d'être à l'origine des complications physiopathologiques du DT2. Ils interviennent également dans la physiopathologie d'autres maladies chroniques, où ils entretiendraient les environnements oxydants et inflammatoires. A ce jour, nous ne savons pas si les AGE sont la cause ou la conséquence des mécanismes physiopathologiques.

### ***ii. Maladies cardiovasculaires***

Une corrélation entre la quantité d'AGE fluorescents dans la peau et le risque de déclarer un évènement cardiovasculaire indésirable majeur a été mise en évidence par différentes études prospectives<sup>261</sup>. Ces résultats montrent que ces AGE, comme les AGE circulants, seraient des biomarqueurs prédictifs du risque cardiovasculaire<sup>262</sup>. La quantité d'AGE augmente chez les patients diabétiques avec complications cardiovasculaires. Globalement, la comorbidité diabète-maladies cardiovasculaires augmente la concentration d'AGE sériques<sup>255,263</sup>. L'âge est également un facteur influençant la concentration d'AGE chez les patients atteints de maladie cardiovasculaire<sup>264</sup>.

La principale cause sous-jacente de la mortalité élevée des sujets atteints de maladies cardiovasculaires est l'athérosclérose qui est responsable du rétrécissement progressif de la lumière des vaisseaux et entraîne l'ischémie des organes distaux<sup>265</sup>. L'analyse immunohistochimique de lésions d'athérosclérose de sujets non diabétiques a révélé l'accumulation de CML dans le cytoplasme des macrophages et des cellules spumeuses<sup>266</sup>. Cette accumulation est probablement liée à l'endocytose des LDL modifiées en conditions oxydantes (oxydation, glycation, carbamylation, ...) (cf. I.B.2 Stress oxydant). Une proportion moins importante de CML était détectée dans la chape fibreuse formée par la matrice extracellulaire. Dans cette matrice, des AGE impliquant des liaisons croisées formés dans et entre les fibres de collagènes, étaient également détectés<sup>266</sup>. La corrélation entre le taux de glycation des protéines aortiques et la rigidité artérielle a été mise en évidence dans d'autres études<sup>255,267</sup>.

### ***iii. Maladies rénales chroniques***

Le rein est l'organe permettant l'élimination des AGE circulants. La fonction rénale décline avec l'âge, induisant l'accumulation d'AGE. Cette accumulation dépend de la sévérité de l'insuffisance rénale<sup>268</sup>. La concentration d'AGE sérique est inversement

corrélée à la clairance de la créatinine, suggérant que les AGE sériques pourraient être de bons biomarqueurs de la diminution du débit de filtration glomérulaire et donc de la dysfonction rénale<sup>255,269,270</sup>.

Le transport du glucose par la plupart des cellules rénales étant indépendant de l'insuline, le rein est particulièrement sensible à l'hyperglycémie et la glycation endogène induite par cette dernière<sup>271</sup>. Environ 50% des sujets diabétiques développent des néphropathies diabétiques avec l'accumulation rénale d'AGE<sup>272,273</sup>. L'hypothèse de l'implication des AGE dans les complications diabétiques, notamment la néphropathie, a été émise dans de nombreuses études mais elle n'a jamais été validée.

#### ***iv. Maladies liées au vieillissement***

- **Maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer est la démence la plus fréquente chez le sujet âgé. Différentes études ont montré que les plaques amyloïdes de cerveaux de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer contiennent plus d'AGE que celles provenant de sujets sains<sup>274-276</sup>. La concentration de précurseurs des AGE (produits d'Amadori) est plus élevée dans le liquide céphalo-rachidien de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer que dans celui de sujets sains. Ces produits ont été identifiés sur différentes protéines comme l'albumine et l'apolipoprotéine E<sup>277</sup>. Même si le DT2 est un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer<sup>278</sup>, il semblerait que la formation des AGE et de leurs précurseurs soit plutôt dépendante de l'oxydation<sup>277</sup>, qui pourrait être partiellement induite par l'excès de glucose. Le DT2 est en effet un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer<sup>278</sup>.

- **Sarcopénie et dynapénie**

La perte de masse musculaire (sarcopénie) et la perte de fonctions musculaires (dynapénie) sont des processus liés au vieillissement biologique qui peuvent être retardés par la pratique d'une activité physique régulière. L'accumulation musculaire de pentosidine chez les sujets âgés est associée à une diminution de la fonctionnalité musculaire<sup>279</sup>. La concentration de CML sérique est associée à une marche « lente » et inversement corrélée à la force de préhension ( $\geq 65$  ans)<sup>280,281</sup>.

- **Ostéoporose**

La CML et la pentosidine s'accumulent dans les os du tibia et leurs concentrations sont corrélées à la fragilité osseuse<sup>254,282</sup>. Des sujets atteints d'ostéoporose présentent des concentrations plus élevées de CML et de pentosidine sériques que des sujets sains<sup>283</sup>. Le diabète de type 1 prédisposerait à cette maladie. Les os fracturés de sujets diabétiques contiennent plus de pentosidine que ceux de sujets sains<sup>254 284</sup>.

- **Cataracte**

La cataracte fait partie des rares maladies pour lesquelles l'impact de la glycation est bien identifié. Cette pathologie est favorisée par le diabète. La glycation des protéines du cristallin induit leur modification, agrégation et précipitation, augmentant l'opacité du cristallin<sup>285</sup>. De plus grandes quantités d'AGE sont retrouvées dans les lentilles opaques de sujets diabétiques que dans celles de sujets sains<sup>286</sup>.

Les AGE peuvent s'accumuler dans d'autres parties de l'œil, comme la rétine et la cornée. Une étude a montré que des sujets atteints de rétinopathie diabétique accumulaient 20 fois plus d'AGE dans l'humeur vitrée (liquide entre le cristallin et la rétine) que des sujets sains<sup>253</sup>.

## *2. Mécanismes pathologiques de la glycation des protéines*

### *i. Modification structurelle et fonctionnelle des protéines*

La modification d'acide aminé(s) d'un peptide ou d'une protéine induit un changement irréversible de sa structure dont l'importance dépend du nombre d'acides aminés glyqués, de leurs positions et de la nature des AGE formés. En conditions physiopathologiques, notamment en conditions oxydantes, le taux de protéines intracellulaires et extracellulaires glyquées est plus important qu'en condition physiologique, augmentant le changement de structure et de la fonction de ces protéines.

Si aucune étude n'a mis en évidence, à ce jour, un lien direct entre glycation et processus physiopathologique, différentes études expérimentales ont permis d'émettre différentes hypothèses mécanistiques.

Les changements structuraux des protéines glyquées pourraient perturber la reconnaissance moléculaire, entraînant de sérieux dysfonctionnements cellulaires et tissulaires. Par exemple, les AGE formés à la surface des érythrocytes peuvent se fixer aux



récepteurs des AGE exprimés à la surface des cellules endothéliales<sup>287,288</sup>. Une des conséquences de cette interaction est l'augmentation de l'adhésion des érythrocytes à l'endothélium vasculaire. L'adhésion érythrocytes/endothélium est accompagnée d'une augmentation des ERO et une activation de NF- $\kappa$ B, probablement *via* l'activation de RAGE<sup>287</sup> qui sera détaillée dans un prochain paragraphe (cf. II.A.2.ii Interaction des AGE avec les récepteurs scavenger et activation de signaux inflammatoires ).

La glycation peut également induire la réticulation de protéines. En effet, les AGE impliquant des liaisons croisées se forment entre des acides aminés d'une même protéine ou entre des acides aminés provenant de protéines différentes. La réticulation de certaines protéines de la matrice extracellulaire (élastine, collagène, ...) est d'ailleurs un phénomène bien décrit<sup>289-291</sup>. En raison de leurs longues demi-vies, elles peuvent accumuler des AGE (dont des AGE impliquant des liaisons croisées), augmentant alors progressivement la rigidité de la matrice extracellulaire. Les conséquences de cette rigidification varient en fonction du tissu ou de l'organe concerné. Par exemple, chez les souris saines, le niveau de réticulation du collagène présent dans les tendons de la queue (principalement du collagène I) diminue avec l'âge<sup>292</sup>. Parallèlement, la quantité d'AGE augmente avec l'âge des souris, et cette augmentation est plus forte chez les souris diabétiques. En effet, le collagène des tendons de souris âgées de 98 semaines présente la même quantité d'AGE que ceux de souris diabétiques de seulement 16 semaines<sup>292</sup>. La réticulation de protéines de la matrice extracellulaire pourrait ainsi induire une perte de souplesse des articulations, participant potentiellement à la perte de motricité des sujets âgés<sup>281</sup>. La glycation de la matrice extracellulaire peut également retenir certaines protéines solubles, comme les LDL, et favoriser les processus athérogènes<sup>293</sup>. La réticulation concerne également le matériel génétique car les AGE impliquant des liaisons croisées peuvent se former entre les nucléotides. La réticulation de l'ADN pourrait augmenter sa fragilité et augmenter les risques de casse, ou des mutations, induisant alors l'expression de protéines anormales.

Une autre conséquence du changement de structure des protéines est la modification de fonction moléculaire. Les dommages inhérents à la glycation peuvent être causés par la formation d'AGE au niveau ou à proximité d'un site actif enzymatique. Par exemple, une perte de fonction d'enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant (glutathion réductase), ou au stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées

(protéasome) a été observée suite à leur glycation<sup>294,295</sup>. Les enzymes ne sont pas les seules molécules dont la fonction peut être impactée par la glycation. La glycation de facteurs de croissance comme le FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) perturbe leurs propriétés angiogéniques<sup>296</sup>. L'angiogénèse est parfois inhibée chez les sujets atteints de DT2<sup>296</sup>.

Les modifications de la structure tridimensionnelle des molécules glyquées pourraient compromettre leur prise en charge par le protéasome, favorisant ainsi les agrégats peptidiques ou protéiques observés lors de complications vasculaires, rénales, et neuronales (cf. II.A.3.i Elimination des AGE par le système de dégradation cellulaire). La formation de produits intermédiaires de glycation comme le produit d'Amadori peut suffire à induire une dysfonction protéique. En effet, l'HbA<sub>1c</sub> présente une affinité beaucoup plus forte pour l'oxygène par rapport à l'hémoglobine non glyquée<sup>297</sup>.

Comme la glycation, de nombreuses modifications post-traductionnelles enzymatiques ou non-enzymatiques qui sont essentielles à la bonne fonctionnalité de la protéine (méthylation, acétylation, ubiquitination, ...) et donc au maintien de l'homéostasie cellulaire, sont catalysées sur les amines libres des protéines. La glycation de ces amines pourrait donc inhiber d'autres modifications. Il semblerait cependant que ces modifications aient des sites préférentiels. Par exemple, l'étude de la glycation et la carbamylation d'une même protéine a identifié des sites communs et distincts de glycation et carbamylation<sup>298</sup>. Une probable compétition carbamylation/glycation a cependant été mise en évidence sur du collagène de type I en condition pathologique<sup>298</sup>.

Comme la quantité des AGE augmente en conditions pathologiques (diabète, insuffisance rénale, ...) et au cours du vieillissement, ces produits de glycation sont considérés comme des motifs moléculaires associés au danger (DAMP - *damage associated molecular pattern*). Les cellules ont à leur surface des récepteurs, dont les récepteurs *scavenger*. L'hyperstimulation de ces récepteurs par de fortes concentrations d'AGE peut entraîner des signaux délétères, notamment pro-inflammatoires et oxydants.

## ***ii. Interaction des AGE avec les récepteurs scavenger et activation de signaux inflammatoires***

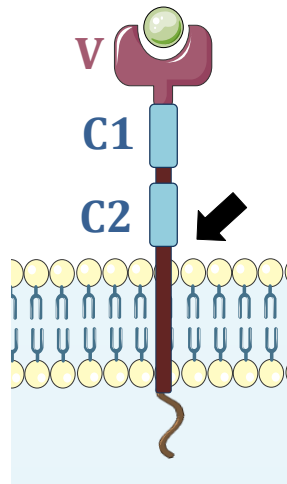
Les récepteurs *scavenger* sont une famille de récepteurs, qui reconnaissent et dégradent les LDL modifiées (acétylées et oxydées)<sup>299</sup>. La caractérisation de ces

récepteurs a ensuite montré qu'ils avaient tous des affinités pour d'autres ligands. La caractérisation de ces récepteurs a montré qu'ils avaient tous des affinités pour d'autres ligands. D'autres modifications post-traductionnelles non-enzymatiques des LDL, comme la carbamylation et la glycation permettent leur reconnaissance par ces récepteurs<sup>300,301</sup>. En parallèle des études réalisées sur l'interaction AGE/récepteurs *scavenger*, l'équipe d'Ann Marie Schmitt a caractérisé un récepteur spécifique des AGE, le RAGE<sup>302</sup>. Depuis sa découverte, de nombreux autres ligands de RAGE ont été découverts dont les LDL oxydées. Le consortium sur les récepteurs *scavenger* a inclus ce récepteur multi-ligands dans cette grande famille de récepteurs. RAGE est le premier membre des récepteurs *scavenger* (SR – *scavenger receptor*) de classe J. Il a donc été nommé SR-J1<sup>303</sup>. Les AGE doivent être sous forme protéique pour se lier au RAGE, mais nous ne savons pas si c'est le cas pour les autres récepteurs *scavenger* capables de fixer les AGE<sup>304,305</sup> (**Tableau 1** : Classification des récepteurs des AGE membranaires regroupant les principales cellules qui les expriment, leurs ligands et leurs principales fonctions. Modifié d'après Ott *et al.* (2014)<sup>211</sup>).

- **RAGE/SR-J1**

### **Structure, expression et ligands**

RAGE est un des premiers récepteurs des AGE caractérisés. Ce récepteur est exprimé uniquement chez les mammifères. Il est de la superfamille des immunoglobulines et il est composé de 3 domaines extracellulaires, le domaine variable V et les deux domaines constants C1 et C2, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique permettant l'activation des voies de signalisation. Les domaines V et C1 forment une unité structurelle fonctionnelle permettant la liaison d'une grande majorité des ligands du RAGE. Le domaine C2 a un rôle majeur dans la stabilisation de l'interaction ligand-RAGE<sup>306</sup> (**Figure 10**).



**Figure 10** : Structure du récepteur aux produits terminaux de glycation avancée (AGE - *advanced glycation end-products*), ou RAGE. Il est composé d'un domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire, deux domaines constants (C1 et C2) et d'un domaine variable (V) extracellulaire permettant la fixation des ligands. La flèche indique le site de coupure de l'enzyme libérant la forme soluble de RAGE.

RAGE est principalement localisé dans la membrane plasmique des cellules mais certaines études ont rapporté sa présence dans le cytosol, le noyau et les mitochondries<sup>307-309</sup>. Le manque de spécificité de certains anticorps commerciaux anti-RAGE peut avoir biaisé les données de certaines de ces études. Le rôle physiologique du RAGE dans ces compartiments cellulaires a été très peu étudié.

Durant le stade embryonnaire et post-natal, RAGE est constitutivement exprimé. L'expression du RAGE dépend ensuite du stade de développement, de l'organe, du type cellulaire mais également de certaines conditions physiopathologiques<sup>306</sup>. A l'âge adulte, RAGE est fortement exprimé dans les poumons et modérément dans d'autres organes comme le cerveau et la peau et dans les muscles. L'expression de RAGE a été détectée sur différents types cellulaires, sous réserve bien sûr de la spécificité des anticorps utilisés dans ces études<sup>211</sup>. L'expression du récepteur augmente fortement en condition inflammatoire, même dans les tissus où il est très faiblement exprimé<sup>310</sup>.

### Ligands

RAGE est un récepteur multi-ligands qui, en plus des AGE peptidiques ou protéiques (origine endogène ou exogène) peut fixer différentes autres molécules exogènes ou endogènes (**Tableau 1**) :

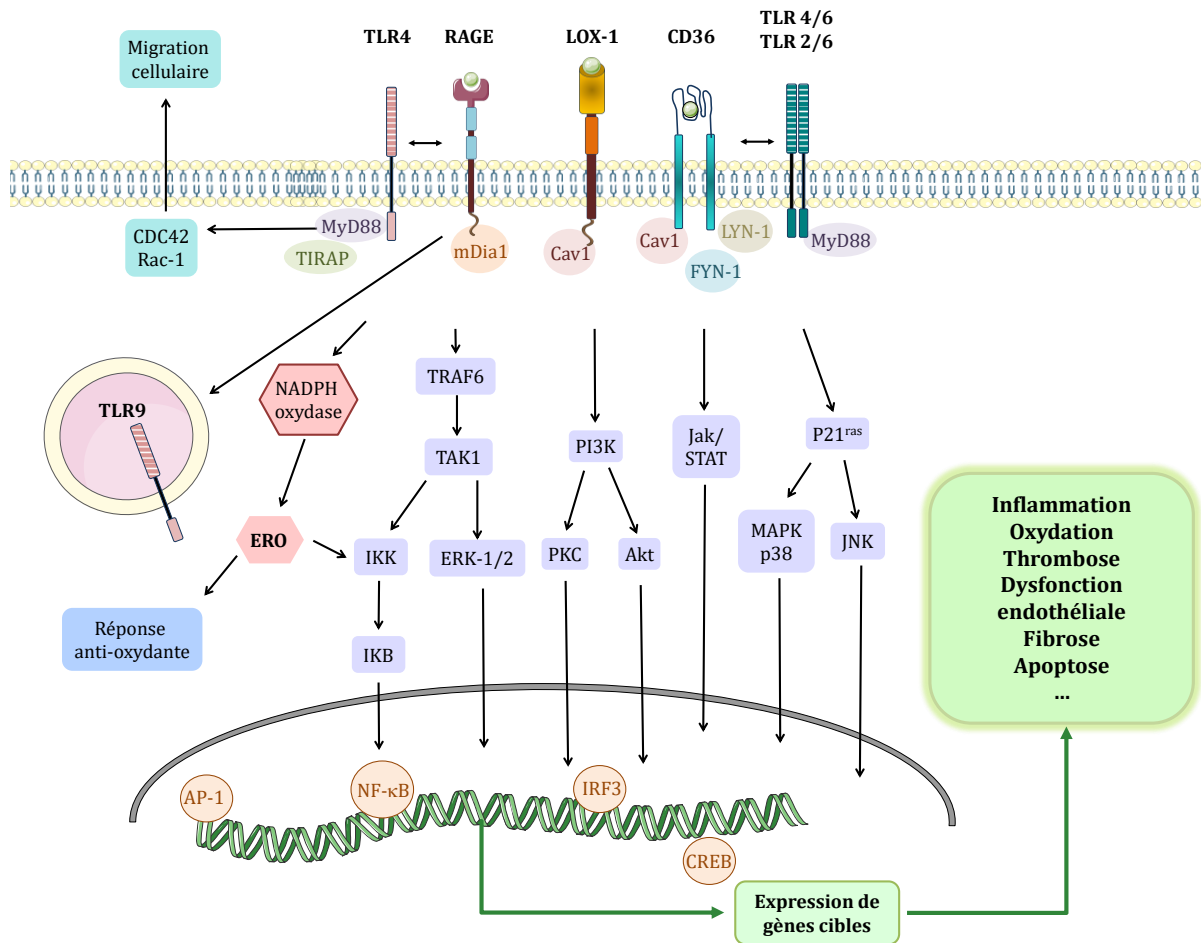
- certains motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes, PAMP (*pathogen associated molecular pattern*), notamment les PAMP bactériens : le lipopolysaccharide (LPS) des Gram négatif, l'ADN et les fibres amyloïdes Curli des entérobactéries<sup>311</sup>.

- d'autres DAMP que les AGE, notamment plusieurs membres de la famille de polypeptides de liaison au calcium intracytosolique, les protéines S100, la protéine nucléaire non-histone qui participe au remodelage de la chromatine, HMGB1 (*high-mobility group box 1*), le peptide  $\beta$ -amyloïde libre ou fibrillaire, les LDL oxydées, et l'ADN mitochondrial<sup>312</sup>.

- D'autres ligands endogènes comme l'intégrine Mac-1 (*macrophage antigen-1*) (CD11b/CD18), les protéines du complément C3a et C1q, la protéine chaperonne HSP70 (*heat shock protein 70*) ou l'acide quinolinique issu du métabolisme du tryptophane<sup>312</sup>. Certains ont été plus récemment identifiés, comme le cofacteur hème<sup>313</sup>.

### **Activation de signaux inflammatoires et oxydants**

Une fois le ligand fixé sur RAGE, la transmission du signal dans le cytoplasme nécessite l'interaction de molécules adaptatrices comme le mDia1 (*mammalian diaphanous 1*) avec le domaine cytoplasmique du récepteur<sup>314</sup>. De nombreuses voies de signalisation sont ainsi activées : PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) / Akt (*serine-threonine kinase*), p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), CDC42 (*cell division control protein 42 homolog*)<sup>315</sup>... Ces différentes voies de signalisation cellulaire permettent : 1- l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires (NF- $\kappa$ B, AP-1 - *activator protein-1*, JNK - *c-Jun N-terminal kinase* ...), 2- l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1...), 3- l'expression de molécules participant aux dysfonctions endothéliales (ICAM-1 - *intercellular adhesion protein-1*, VCAM-1 - *vascular cell adhesion protein-1*, VEGF - *vascular endothelial growth factor*...) et 4- l'expression du RAGE lui-même et d'autres récepteurs *scavenger* comme le récepteur CD36. En parallèle, l'activation de RAGE stimule la NADPH oxydase (**Figure 11**)<sup>316</sup>.



**Figure 11 :** Voies de signalisation induites suite à l'activation de plusieurs récepteurs *scavenger* par leurs ligands, dont les produits terminaux de glycation (*advanced glycation end-product* - AGE) : LOX-1 (*lectin-type oxidized LDL receptor-1*), CD36 (*cluster of differentiation 36*), RAGE (récepteur aux AGE). L'activation de RAGE et CD36 peut nécessiter leur hétérodimérisation avec des récepteurs *Toll-like*-TLR (TLR4/6 et TLR 2/6 pour le CD36 et TLR4/9 pour RAGE). Les voies de signalisation aboutissent à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation, l'apoptose, l'angiogénèse. L'activation de ces récepteurs favorise également un environnement oxydant *via* l'activation de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, productrice d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les sphères vertes représentent les ligands.

La nature du ligand détermine le changement conformationnel de RAGE lors de son activation : il peut être homodimérisé ou hétérodimérisé avec les TLR4 ou de type *toll9* (*toll like receptor 9* - TLR9)<sup>310,317-319</sup>. L'activation de TLR9 nécessite l'endocytose du ligand. En tant que récepteur *scavenger*, RAGE pourrait médier cette endocytose.

Le niveau d'expression de RAGE augmente dans un environnement inflammatoire et oxydant, où certains de ses ligands, notamment les DAMP, sont également libérés. Ces processus maintiennent l'activation du récepteur, générant des états inflammatoires, oxydants, apoptotiques et angiogéniques. Un véritable cercle vicieux s'instaure et il serait responsable, au moins en partie, des complications de nombreuses maladies étroitement liées à l'inflammation comme le diabète, la maladie rénale chronique et les MICI<sup>320-322</sup>.

Une balance bénéfique/délétère de l'activation de RAGE a été mise en évidence dans les neurones. Une faible activation du récepteur aurait un impact bénéfique sur la cellule en promouvant l'expression de molécules impliquées dans la différenciation cellulaire et des molécules antioxydantes. En revanche, une sur-activation du récepteur induirait une expression des molécules impliquées dans la mort neuronale<sup>323</sup>.

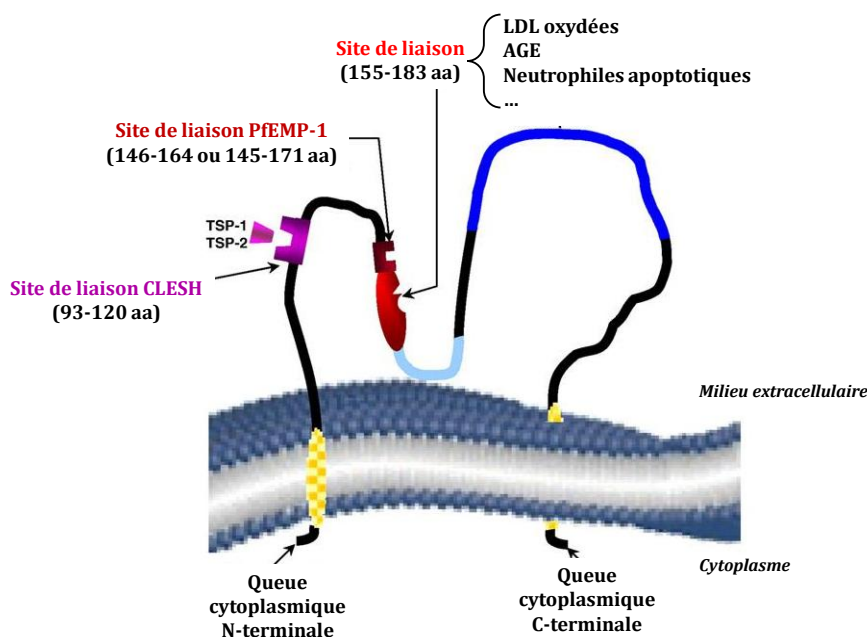
Une des hypothèses du laboratoire est que dans un contexte physiologique, l'activation de RAGE maintiendrait une inflammation à bas bruit caractéristique des maladies chroniques et du vieillissement. En effet, un groupe au laboratoire a montré que des souris n'exprimant pas RAGE ont un vieillissement rénal physiologique plus lent, et ont moins de marqueurs d'inflammation que les souris sauvages<sup>271</sup>. Ces souris RAGE<sup>-/-</sup> sont également protégées de la dysfonction endothéliale et de la rigidité artérielle associée à un régime riche en CML<sup>324</sup>. Un article récent montre que les souris RAGE<sup>-/-</sup> surexpriment le gène codant la glyoxalase 1, qui pourrait compliquer l'interprétation des données expérimentales<sup>325</sup>.

- **CD36/SR-B2**

Le CD36 est le 2<sup>ème</sup> membre de la classe B des récepteurs *scavenger*. Il est composé d'un grand domaine extracellulaire avec les extrémités N- et C- terminales, contenant chacune un segment transmembranaire et cytoplasmique<sup>326</sup>. Comme RAGE, il est exprimé par différents types cellulaires dont les cellules résidentes (adipocytes, macrophages, cellules endothéliales, cellules épithéliales, cellules musculaires lisses...) et circulantes (plaquettes...)<sup>327</sup>.

Le domaine extracellulaire contient 3 sites principaux de fixation des ligands, à proximité de la poche hydrophobique (**Figure 12**)<sup>328</sup> :

- le site CLESH (CD36 LIMP-II *Emp sequence homology*) permettant la fixation de la thrombospondine-1 et -2,
- le site PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1*) qui fixe les érythrocytes infestés par *P. falciparum*,
- un site de fixation pour les neutrophiles apoptotiques<sup>328</sup> et d'autres ligands dont certains reconnus également par RAGE comme les AGE : 1- des PAMP (composants membranaires de *Staphylococcus* ou *Mycobacterium*), 2- des DAMP (LDL oxydées, phospholipides oxydés, HMGB1, protéines S100, peptides  $\beta$ -amyloïdes,...), 3- des ligands endogènes (diacylglycérol, ...) <sup>327</sup>.



**Figure 12** : Structure du CD36 (*cluster of differentiation 36*). Modifié d'après Collot-Teixeira, 2007<sup>328</sup>. La partie transmembranaire est représentée en jaune/orange, la poche hydrophobe est en bleu clair, et la région riche en proline est en bleu foncé. Les sites CD36 LIMP-II *Emp sequence homology* (CLESH) en violet et PfEMP-1 en marron, fixent respectivement, les thrombospondine-1 et -2 (TSP-1/2), et une protéine membranaire des érythrocytes infestés par *Plasmodium falciparum* (PfEMP-1 - *erythrocyte membrane protein-1 P. falciparum*). Le site en rouge fixe différents ligands dont les lipoprotéines à faible densité (LDL - *low-density lipoprotein*), les produits terminaux de glycation avancée (AGE - *advanced glycation end-products*), les neutrophiles apoptotiques ...



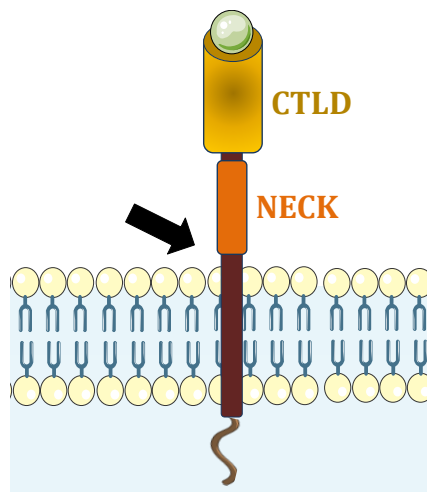
Comme RAGE, l'activation de CD36 est associée à une homodimérisation ou à une hétérodimérisation avec les TLR4/TLR6 ou TLR2/TLR6<sup>114,329</sup> (**Figure 11**). Les voies de signalisation activées dépendent du type de ligand, et comprennent des voies communes à RAGE. L'activation de CD36 stimule également la NADPH oxydase<sup>327</sup>.

Ce récepteur participe donc à l'inflammation, et notamment au processus athérogène par plusieurs mécanismes. Les LDL oxydées peuvent se fixer sur les CD36 (et d'autres récepteurs *scavenger*) exprimés à la surface des macrophages, induisant alors leur endocytose (**Tableau 1**). L'accumulation de cholestérol intracellulaire transforme les macrophages en cellules spumeuses. L'accumulation de ces cellules constitue la plaque d'athérome. Les cellules spumeuses produisent une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires, favorisant le détachement de cette plaque et l'ischémie des organes distaux.

L'axe AGE/CD36 inhibe la migration des cellules spumeuses, favorisant alors l'augmentation de la plaque d'athérome. Cet axe augmente également la réactivité des plaquettes, dont l'implication dans l'athérosclérose est de plus en plus décrite<sup>330,331</sup>. L'internalisation des AGE par le CD36 peut également induire leur dégradation<sup>332,333</sup>. La conséquence de l'activation de ce récepteur par les AGE dépendrait donc du type de cellule et/ou de l'environnement.

- **LOX-1/SR-E1**

Le LOX-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*) est une lectine appartenant à la classe E des récepteurs *scavenger*. Ce récepteur est composé d'un court domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire, un domaine NECK extracellulaire et un domaine de type lectine C (CTLD – *C-type lectin-like domain*)<sup>334</sup> (**Figure 13**).



**Figure 13** : Structure du LOX-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*). Il est composé d'un court domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire, un domaine NECK extracellulaire et un domaine de type lectine C (CTLD - *C-type lectin-like domain*)<sup>335</sup>. La sphère verte représente le ligand. La flèche indique le site de coupure de l'enzyme libérant la forme soluble de LOX-1.

Il est exprimé à la surface de cellules endothéliales vasculaires, musculaires lisses, adipeuses, ainsi que des macrophages et plaquettes. Ses ligands comprennent, en plus des AGE, les LDL oxydées, les phospholipides anioniques, HSP70, les cellules apoptotiques et certaines bactéries comme *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*<sup>303,336</sup> (**Tableau 1**). Les voies de signalisation induites par ce récepteur sont très similaires à celles de RAGE et de CD36, et aboutissent à l'augmentation, entre autres, de TGF- $\beta$ , MCP-1, ICAM-1, VCAM-1<sup>334</sup> (**Figure 11**). L'expression de LOX-1 peut être stimulée par l'axe AGE/RAGE, via la voie PI3K/PDK1 (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*) / mTORC2 (*mechanistic target of rapamycin complex 2*)<sup>337</sup>. Contrairement aux LDL oxydées, l'endocytose des AGE après fixation sur LOX-1 n'a pas été mise en évidence<sup>338</sup>.

- **Complexe AGE-R**

Le complexe AGE-R (*AGE-receptor*) est composé d'OST-48 (*oligosaccharyl transferase 48 kDa subunit*, ou AGE-R1), de 80K-H (AGE-R2) et de la galectine-3 (AGE-R3). OST-48, protéine membranaire, permettrait l'ancrage du complexe dans la membrane et la fixation des AGE<sup>339</sup>. La galectine-3, lectine soluble, peut également fixer les AGE et serait liée à OST-48 au niveau extracellulaire<sup>340</sup>. Enfin, 80K-H est intracellulaire avec un rôle possible dans la signalisation cellulaire car c'est un substrat de la PKC<sup>341</sup>. Ces trois membres sont exprimées par différents types cellulaires : monocytes, macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales ...<sup>211</sup> Ils peuvent avoir des régulations distinctes. Par

exemple, contrairement à OST-48 et 80K-H, la galectine-3 est très peu exprimée dans le mésangium de rat (même si son expression augmente avec l'âge). En revanche, en condition diabétique, l'expression de la galectine-3 augmente, celle de 80K-H augmente légèrement tandis que celle d'OST-48 ne varie pas<sup>342</sup>.

Ce complexe est peu caractérisé : nous ne savons pas si la présence des 3 membres est indispensable pour la fixation des AGE, ni quels mécanismes permettent leur association. Ils sont présents dans d'autres compartiments cellulaires. La galectine-3 est également présente dans le cytoplasme, les lysosomes et le noyau des cellules avec des fonctions spécifiques. OST-48 et 80K-H sont respectivement présents dans la membrane et la lumière du réticulum endoplasmique avec des fonctions essentielles pour la *N*-glycosylation des protéines<sup>339</sup> : OST-48 assure la stabilité du complexe DDOST (*dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit*)<sup>339</sup> et 80K-H est une sous-unité régulatrice de la glucosidase II<sup>341,343</sup>.

Les AGE sont les seuls ligands du complexe AGE-R décrits à ce jour (**Tableau 1**). Cependant, d'autres ligands peuvent être suspectés car la galectine-3 a de nombreux ligands lui permettant d'assurer ses différents rôles biologiques, comme la fibronectine, le collagène de type IV, le LPS, le CD66 ...<sup>211</sup>.

Le complexe AGE-R est surtout décrit comme récepteur permettant l'endocytose et la dégradation des AGE<sup>211,344</sup>. Mais quelques études ont montré que la surexpression d'OST-48 augmente l'élimination des AGE dans les urines, mais ne permet pas de prévenir la néphropathie dans un modèle de souris diabétique<sup>345</sup>. Chez des souris soumises à un régime riche en AGE, sa surexpression induit, entre autres, l'accumulation de glycogène hépatique et l'augmentation de certains marqueurs de stress oxydant et de stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées<sup>346</sup>. Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de mieux apprécier le rôle exact de ces récepteurs, en fonction des cellules qui les expriment et du contexte biologique.

**Tableau 1** : Classification des récepteurs des AGE membranaires regroupant les principales cellules qui les expriment, leurs ligands et leurs principales fonctions. Modifié d'après Ott *et al.* (2014)<sup>211</sup>

Récepteur	Types cellulaires	Ligands	Fonctions
<b>RECEPTEURS SCAVENGER</b>			
<b>SR-AI/II MSR1/2</b>	Monocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales, ...	<b>Endogènes</b> : AGE, LDL acétylées et oxydées, peptide $\beta$ -amyloïde <b>Exogènes</b> : acide lipoteichoïque, ADN bactérien, AGE, bactéries	Endocytose et dégradation des LDL et AGE
<b>SR-BI</b>	Hépatocytes, cellules ciliées bronchiales, cellules ciliées des trompes de Fallope, cellules de Leydig ...	<b>Endogènes</b> : AGE, HDL, LDL acétylées et oxydées, phospholipides anioniques, VLDL <b>Exogènes</b> : AGE	Endocytose des HDL Endocytose et dégradation des AGE
<b>SR-BII CD-36</b>	Plaquettes, cellules endothéliales, cellules épithéliales, adipocytes, lymphocytes, ...	<b>Endogènes</b> : acides gras à longues chaînes, AGE, cellules apoptotiques, collagène, diacylglycérol, HDL, LDL acétylées et oxydées, VLDL, peptide $\beta$ -amyloïde, phospholipides oxydés, protéines S100, thrombospondine-1/2, <b>Exogènes</b> : AGE, diacylglycérides microbiens	Endocytose et dégradation des LDL et AGE Inflammation Oxydation Adhérence/migration cellulaire Régulation du transport des acides gras
<b>SR-E LOX-1</b>	Cellules endothéliales, macrophages, cellules musculaires lisses, adipocytes, plaquettes ...	<b>Endogènes</b> : AGE, cellules apoptotiques, HSP70, LDL oxydées, plaquettes activées, phospholipides anioniques <b>Exogènes</b> : AGE, <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	Endocytose et dégradation des LDL oxydées Signalisation Inflammation Oxydation
<b>SR-H FEEL-1/ 2</b>	Cellules endothéliales, monocytes, macrophages, ...	<b>Endogènes</b> : AGE, LDL oxydées et acétylées, ostéonectine, acide hyaluronique <b>Exogènes</b> : AGE, <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	Endocytose et dégradation de l'acide hyaluronique, des LDL acétylées et des AGE

<b>SR-J RAGE</b>	Monocytes/Macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales, cellules mésangiales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules neuronales, ...	<b>Endogènes</b> : acide quinolinique, ADN mitochondrial, AGE, $\beta$ -intégrine, cofacteur hème, fibre amyloïde, HMGB1, HSP70, LDL oxydées, Mac-1, peptide $\beta$ -amyloïde, polypeptides de liaison au calcium intracytosolique, protéines du complément C3a et C1q, protéines S100 <b>Exogènes</b> : acide lipoteichoïque, ADN/ARN bactérien, AGE, fibre amyloïde Curli des entérobactéries, LPS	Endocytose Signalisation cellulaire Inflammation Oxydation Adhérence/migration cellulaire
<b>COMPLEXE AGE-R</b>			
<b>AGE-R1 OST-48</b>	Monocytes, macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales, cellules mésangiales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules neuronales, ...	<b>Endogènes et exogènes</b> : AGE	Endocytose et dégradation des AGE N-glycosylation Protection contre le stress oxydant
<b>AGE-R2 80K-H</b>	Monocytes, macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales, cellules mésangiales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules neuronales, ...	<b>Endogènes et exogènes</b> : AGE	Signalisation cellulaire Régulation de la glucosidase II
<b>AGE-R3 galectine-3</b>	Monocytes, macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales, cellules mésangiales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules neuronales, ...	<b>Endogènes</b> : AGE, CD66, chaîne lourde de CD98, collagène de type IV, fibronectine, mucine du cancer du côlon, IgE, laminine, LAMP-1/2, Mac-1, Mac-3, récepteur aux IgE, glycoprotéine associée à la myéline <b>Exogènes</b> : AGE, LPS	Adhérence cellulaire Signalisation cellulaire Apoptose Inflammation Fibrose Réparation tissulaire

**AGE** : advanced glycation end-products; **CD36/66/98** : cluster of differentiation 36/66/98; **FEEL-1/2** : **FEEL** : fasciclin EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor ; **IgE** : immunoglobuline E ; **HMGB1** : high-mobility group box 1; **HDL** : high density lipoprotein; **HSP70** : heat shock protein 70; **LAMP-1/2** : lysosome-associated membrane glycoprotein-1/2; **LOX-1** : lectin-type oxidized LDL receptor-1; **LDL** : low density lipoprotein; **LPS** : lipopolysaccharide ; **Mac-1/3** : macrophage integrin-1/3; **OST-48** : oligosaccharyl transferase 48 kDa; **RAGE** : récepteur aux AGE ; **SPARC** : secreted protein, acidic and rich in cysteine (ostéonectine) ; **VLDL** : very low density lipoprotein;

### 3. Mécanismes de défense cellulaire

#### i. Elimination des AGE par le système de dégradation cellulaire

Le système ubiquitine/protéasome est le mécanisme majeur de dégradation des protéines mal repliées<sup>347</sup>. Il se présente sous la forme d'un complexe enzymatique clivant, en son centre, les protéines d'intérêt préalablement ubiquitinylées. L'ajout d'ubiquitine nécessite donc la présence de lysine native et est indispensable pour la reconnaissance des protéines à éliminer par le protéasome. Le changement de conformation de la protéine induit par la glycation peut perturber sa prise en charge par le protéasome. Ce système de dégradation peut être intracellulaire (cytoplasme, noyau) ou extracellulaire (sang, ...)<sup>348</sup>

L'autophagie est également très importante pour la dégradation protéique. Elle permet l'élimination de protéines intracellulaires (microautophagie) et d'organites cellulaires comme les mitochondries (macroautophagie). Les protéines peuvent être incorporées dans le lysosome, *via* une invagination de sa membrane. Les lysosomes contiennent un large panel d'enzymes digestives comme des cathépsines<sup>349</sup>. Contrairement au protéasome, la prise en charge des protéines ne dépend pas forcément d'un motif de reconnaissance particulier<sup>350</sup>. La dégradation des protéines glyquées par cette voie a notamment été mise en évidence au niveau des tubules rénaux de souris diabétiques<sup>351</sup>. L'endocytose est un autre mécanisme permettant l'élimination des protéines extracellulaires<sup>352</sup>. Ce mécanisme peut être initié par des récepteurs<sup>353</sup>.

#### ii. Endocytose des AGE par des récepteurs

Certains récepteurs *scavenger* peuvent lier les AGE, et induire leur endocytose. Ces récepteurs sont CD36, LOX-1 et d'autres récepteurs comme les *macrophage scavenger receptor 1* et 2 (SR-AI/II), récepteur *scavenger* de classe A qui sont exprimés à la surface des macrophages, monocytes, cellules dendritiques et endothéliales. Comme RAGE, CD36 et LOX-1, les ligands de SR-AI/II peuvent être classés en 3 groupes : 1-les PAMP (virus de l'hépatite C, LPS ...), 2- les DAMP (LDL oxydées, peptide  $\beta$  amyloïde et AGE) et 3- les autres ligands endogènes (protéines de choc thermique, acide lipoteïchoïque, phospholipides anioniques, ...). Ils pourraient également induire des signaux pro-inflammatoires *via*, entre autres, les MAPK, PKC et PI3K<sup>354</sup>. Aucune étude n'a montré l'activation de ces deux récepteurs par les AGE. D'autres récepteurs *scavenger* (SR-H1/2 également nommés FEEL

(*fasciclin epidermal growth factor (EGF)-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor*)-1/2) permettraient l'endocytose des AGE<sup>355</sup>.

### ***iii. Élimination des AGE par le RAGE soluble/SR-J1.1***

Deux isoformes du RAGE sont dépourvues du domaine transmembranaire et de la région intracellulaire. Ces récepteurs solubles, nommés *soluble RAGE* (sRAGE), sont issus de deux processus distincts : 1- l'épissage alternatif du gène *AGER* et 2- la protéolyse de RAGE par ADAM10 (*a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) ou certaines métalloprotéases matricielles comme MMP-9 (*matrix metalloproteinase-9*)<sup>356</sup> (**Figure 10**). Le sRAGE permettrait de séquestrer les ligands de RAGE, et de les éliminer dans la circulation. Il représenterait donc un mécanisme de régulation de RAGE. Le rôle exact de sRAGE n'est cependant pas très clair. Sa concentration n'est pas toujours corrélée à un pronostic favorable de la maladie<sup>357-361</sup>. Des travaux sont nécessaires afin de mieux apprécier le rôle physiologique de sRAGE. Comme RAGE, LOX-1 possède également une forme soluble (sLOX-1 – *soluble LOX-1*) issue d'un clivage protéolytique par une métalloprotéase des familles ADAM ou MMP (**Figure 13**)<sup>362</sup>. Cette forme soluble régulerait l'activation de LOX-1. Aucune étude n'a suggéré un rôle de sLOX-1 dans la séquestration et l'élimination des AGE.

### ***iv. Élimination des produits intermédiaires de la glycation***

La fructosamine-3-kinase est une enzyme cytoplasmique qui phosphoryle le produit d'Amadori, formant du fructosamine-3-phosphate, un produit très instable. Chez l'Homme, elle est exprimée dans différents organes (cœur, cerveau, muscles, ...), et plus particulièrement dans les reins<sup>363</sup> et son activité a été vérifiée dans les érythrocytes humains<sup>364</sup>. La dégradation du fructosamine-3-phosphate libère une amine, du phosphate et du 3-DG qui peut être dégradé par une aldose réductase ou aldéhyde déshydrogénase ; Les érythrocytes incubés avec 200 mM de glucose et un inhibiteur de cette enzyme ont deux fois plus d'hémoglobine glyquée que les érythrocytes incubés dans les mêmes conditions sans inhibiteur, montrant l'efficacité de la fructosamine-3-kinase<sup>365</sup>.

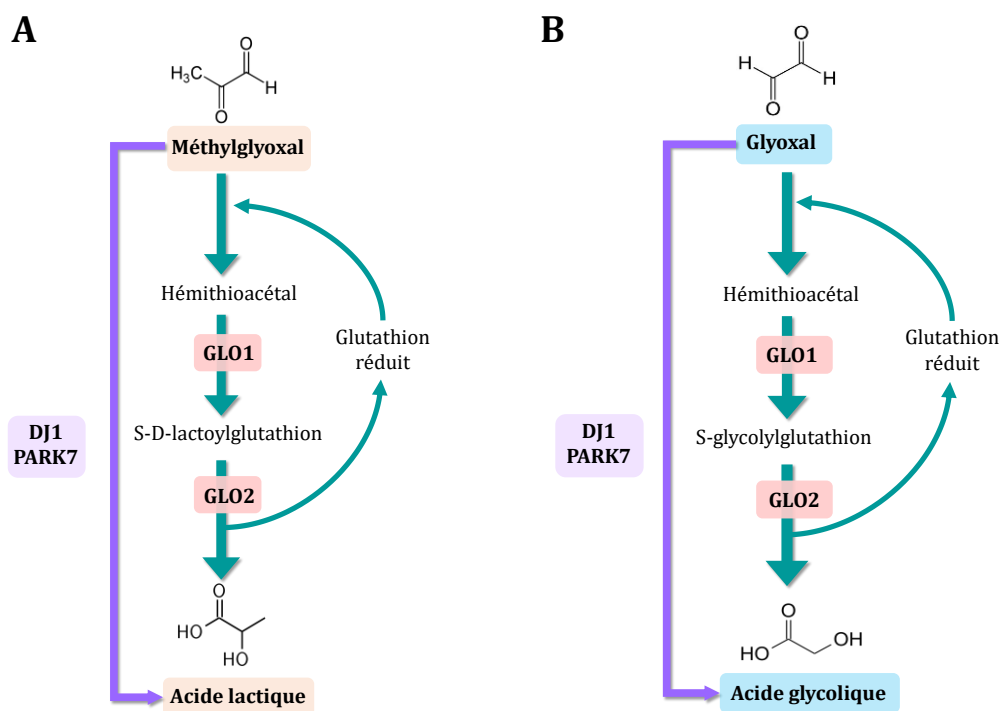


## v. Elimination des produits dicarbonylés

### • Système glyoxalase

Le système glyoxalase est un processus enzymatique permettant la métabolisation de du MGO et du GO (

**Figure 14).** Premièrement, le MGO et le GO réagissent de façon non enzymatique avec le glutathion et donnent un hémithioacétal. La glyoxalase 1 (GLO1) catalyse l'isomérisation de l'adduit hémithioacétal en, respectivement, *S-D*-lactoylglutathion ou *S*-glycolylglutathion. Enfin, la glyoxalase 2 (GLO2) permet l'hydrolyse du *S-D*-lactoylglutathion ou du *S*-glycolylglutathion en acide lactique ou acide glycolique, respectivement. Cette dernière étape permet également la régénération du glutathion réduit<sup>366</sup>.



**Figure 14 :** Détoxification du méthylglyoxal (A) et du glyoxal (B) par le système glyoxalase (vert) et DJ-1/PARK7 (*parkinsonism associated deglycase 7*) (violet). Modifié d'après Xue *et al.* (2011)<sup>367</sup>. Le méthylglyoxal (A) et le glyoxal (B) réagissent de façon non-enzymatique avec le glutathion réduit et forme un hémithioacétal. Ce produit est transformé par une *lactoylglutathione lyase* (GLO1), qui le convertit en *S-D*-lactoylglutathion (A) ou *S*-glycolylglutathion (B) selon la nature du produit dicarbonylé. Le produit intermédiaire est pris en charge par une *hydroxyacylglutathione hydrolase* (GLO2) qui le convertit en acide lactique (A) ou acide glycolique (B). L'enzyme DJ-1/PARK7 catalyse la transformation du méthylglyoxal et glyoxal en acide lactique (A) et acide glycolique (B) respectivement, *via* un mécanisme indépendant du glutathion.

L'activité de GLO1 diminue avec le vieillissement, favorisant alors l'accumulation des AGE<sup>366</sup>. Le système glyoxalase est très efficace pour éliminer le MGO et le GO, et a certainement une place majeure dans la prévention des complications de maladies métaboliques comme le DT2. La surexpression de GLO1 permet d'ailleurs de réduire les complications vasculaires et rénales *in vivo*<sup>368,369</sup>. Cependant, l'implication de GLO1 dans la physiopathologie du cancer du sein a été récemment suggérée. Son expression favoriserait la viabilité cellulaire et la formation de tumeur<sup>370</sup>.

- **DJ-1**

La cellule possède d'autres voies de métabolisation des  $\alpha$ -DC. C'est le cas de l'enzyme DJ-1, aussi appelé PARK7 (*parkinsonism associated deglycase 7*) ou GLO3 (glyoxalase 3). Elle métabolise, comme le système glyoxalase, le MGO et GO en acides lactique et glycolique, respectivement (**Figure 14**)<sup>371</sup>. Certains suggèrent que le système GLO1/GLO2 est plus efficace que DJ-1 mais aucune étude ne semble l'avoir prouvé. Cette enzyme est majoritairement exprimée dans les cellules glandulaires de l'estomac, les cellules gliales de l'hippocampe et les cellules alvéolaires pulmonaires<sup>372</sup>. Elle serait également capable de déglyquer les protéines modifiées par le MGO ou le GO en libérant les protéines réparées et de l'acide lactique ou de l'acide glycolique. Cependant, ce dernier rôle est discuté dans la littérature<sup>373,374</sup>. En plus de la métabolisation des  $\alpha$ -DC, DJ-1 a de multiples fonctions : implication dans la réponse antioxydante (activité peroxydase, stabilisation de Nrf2 - *nuclear factor erythroid-2-related factor 2*) et maintien de l'homéostasie protéique (chaperonne de la synucléine)<sup>373,375-378</sup>.

- **Aldocétoréductase**

Les aldocétoréductases (AKR - *aldo-keto-reductase*) sont une superfamille d'enzymes. Les membres A1 (AKR1A1) et B1 (AKR1B1) de la famille 1 de la superfamille des AKR peuvent transformer le MGO en acétol (95%) et lactaldéhyde (5%), et le 3-DG en 3-désoxyfructose<sup>379,380</sup>. AKR1A1 est particulièrement exprimée dans les cellules tubulaires proximales et à un plus faible niveau, dans les hépatocytes et les macrophages pulmonaires<sup>381</sup>. AKR1B1 est exprimée dans le tissu endocrinien, dans les cellules de Purkinje, dans les cellules de la glande surrénale et les cellules de la membrane basale de la peau<sup>382</sup>. Cette enzyme est également impliquée dans la première étape de la voie des polyols, son expression peut donc être induite lors de perturbations physiopathologiques

comme l'hyperglycémie<sup>383</sup>. Les aldocétoréductases ont une activité 10 à 40 fois inférieure à celle de GLO1<sup>384</sup>. De plus, l'implication de ces enzymes dans la détoxification du MGO (et des autres  $\alpha$ -DC probablement) semble généralement minime par rapport à GLO1<sup>385</sup>.

- **Aldéhyde déshydrogénase**

Le 3-DG peut être oxydé en acide-2-cétogluconique par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) 1 A1 (superfamille des ALDH, famille 1, membre A1). Cette métabolisation a été mise en évidence dans les érythrocytes humains<sup>386</sup>. Chez l'Homme, cette enzyme cytoplasmique est exprimée dans différents organes et tissus comme les cellules glandulaires de l'estomac, les hépatocytes et les adipocytes<sup>387</sup>.

Différentes familles d'ALDH (ALDH-1, -2, -3, -9) peuvent transformer le MGO en pyruvate<sup>388,389</sup>. Elles sont exprimées dans divers organes mais majoritairement dans le foie, à l'exception de l'ALDH-3 qui est très faiblement retrouvée dans cet organe et fortement exprimée dans l'estomac<sup>390-392</sup>.

Les aldocétoréductases et les aldéhydes déshydrogénases regroupent différentes familles. Il est donc probable que d'autres membres de ces familles non spécifiés ici puissent prendre en charge les  $\alpha$ -DC, et qu'une même enzyme puisse métaboliser plusieurs  $\alpha$ -DC.

#### *4. Stratégies pour limiter la glycation et ses effets physiopathologiques*

Les stratégies thérapeutiques contre la glycation endogène et ses effets délétères sont développées selon trois axes : 1- restreindre la formation d'AGE en piégeant les précurseurs ou en évitant leur formation, 2- éliminer les AGE déjà formés et 3- inhiber l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires et pro-oxydantes induites par les AGE.

La régulation de la glycémie grâce à des molécules anti-diabétiques permettrait de diminuer le stress oxydant et la formation d' $\alpha$ -DC, donc des AGE. L'administration d'aminoguanidine, appartenant à cette classe de molécules, permet de diminuer les complications chez des rats et chiens diabétiques. Cependant, ces améliorations ne sont pas toujours corrélées avec une diminution des AGE<sup>393,394</sup>. Les résultats encourageants obtenus avec les modèles expérimentaux ont conduit à des études cliniques. La dernière d'entre elles a été arrêtée à cause d'un rapport bénéfice/risque insuffisant, les effets

secondaires étant trop importants<sup>395</sup>. D'autres molécules anti-diabétiques ont été utilisées, comme la metformine. Cette molécule est le médicament le plus prescrit chez les sujets atteints de DT2. Une étude a montré que la metformine peut réagir avec les  $\alpha$ -DC et inhiber la formation d'AGE endogènes chez des patients diabétiques<sup>396</sup> mais des études complémentaires sont nécessaires afin de valider l'intérêt de la metformine pour la prévention de la glycation endogène.

La prise de certains probiotiques pourraient représenter une option intéressante afin de réduire la glycation endogène et son impact en condition pathologique. Notre équipe a pu mettre en évidence une association entre l'administration d'un probiotique, *Lactobacillus fermentum*, à des souris diabétiques et une diminution de 1- l'accumulation de CML dans les tissus (reins, poumons), 2- une amélioration du profil lipidique et inflammatoire<sup>397</sup>. Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer le réel bénéfice des probiotiques sur la glycation et ses effets physiopathologiques et d'en déterminer les mécanismes.

Les AGE sont des molécules très stables, ce qui complique le développement de molécules capables de les dégrader. Parmi elles, l'alagébrium est certainement l'une des plus étudiée. Elle pourrait 1- cliver les AGE pontants, et 2- prévenir la formation de MGO *via* des mécanismes encore discutés<sup>398</sup>. Son administration permet une amélioration du vieillissement vasculaire chez les animaux diabétiques<sup>399,400</sup> mais les derniers essais cliniques n'ont pas permis de confirmer les résultats obtenus avec les modèles expérimentaux<sup>398</sup>.

Concernant le ciblage des récepteurs responsables des processus inflammatoires et oxydants dont RAGE, il est impossible de bloquer la production de leurs ligands afin d'empêcher leur activation : ils sont trop nombreux, et certains d'entre eux (HMGB1, protéines S100, ...) sont essentiels pour l'homéostasie cellulaire. Des molécules à forte affinité pour RAGE ont donc été choisies pour leur capacité à se fixer au récepteur et empêcher son activation. Parmi ces antagonistes, l'azéliragon représentait une piste thérapeutique intéressante dans la lutte du déclin cognitif caractéristique de la maladie d'Alzheimer. En effet, elle est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, et de prévenir l'agrégation des peptides  $\beta$  amyloïdes induite par le RAGE<sup>401</sup>. L'essai en phase III a été arrêté, faute d'efficacité<sup>402</sup>. Cependant, une analyse post hoc a permis de mettre en

évidence une amélioration de la cognition chez un sous-groupe de sujets diabétiques de type 2<sup>403</sup>.

## **B. Glycation exogène**

### *1. Métabolisme des AGE alimentaires*

#### *i. Digestion*

Pendant longtemps, l'idée selon laquelle la glycation perturbe la digestion des protéines dans le tube digestif a été entretenue. En effet, la modification de la lysine et de l'arginine pourrait perturber l'action d'enzymes digestives, comme la trypsine qui clive au niveau de ces arginines et lysines<sup>404</sup>. De plus, la glycation peut générer un encombrement stérique en changeant la conformation de la protéine, empêchant ainsi l'accès aux enzymes digestives. Les résultats de nombreuses études *in vitro*, notamment sur l'ovalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline, ont conforté cette hypothèse<sup>404,405</sup>. Ces études fournissent des informations intéressantes mais pour une condition digestive simple avec un taux de glycation de la protéine testée bien souvent supérieur au taux retrouvé dans l'alimentation. Cependant, la diversité structurale des produits de glycation (AGE et autres) est telle que la digestion doit sans doute dépendre de chacun d'entre eux. En effet, les mélanoidines, sont par exemple peu digérées<sup>406</sup>. De plus, les études *in vitro* ne permettent pas de reproduire la complexité du système digestif.

Des travaux sur la digestion des protéines glyquées ont été réalisées sur des modèles animaux. La digestion de caséine par des rats, jeunes ou adultes, n'est pas inhibée par la glycation : les mêmes concentrations d'azote sont retrouvées dans les urines des rats nourris avec la caséine native ou glyquée<sup>407</sup>. Ce résultat ne permet pas d'affirmer que la biodisponibilité des acides aminés après digestion est identique, qu'il y ait glycation ou non. Des travaux, réalisés sur le porc, ont permis de répondre à cette question. L'administration de protéines glyquées n'a pas induit de diminution de la concentration d'acides aminés retrouvés dans le sang après digestion, sauf pour la lysine, qui était l'acide aminé principalement glyqué<sup>408</sup>. Chez l'Homme, les conséquences de la glycation sur la digestion des protéines alimentaires sont donc certainement négligeables.

La digestion des protéines n'est jamais totale qu'il y ait ou non glycation, et le transit des protéines et peptides non digérées et/ou non absorbées dans le côlon permet

leur éventuelle métabolisation par le microbiote intestinal, et leur absorption. Dans le cas contraire, elles sont éliminées dans les fèces : il est admis qu'entre 20 et 50% des AGE consommés sont directement éliminés<sup>409,410</sup>.

### ***ii. Dégradation par le microbiote***

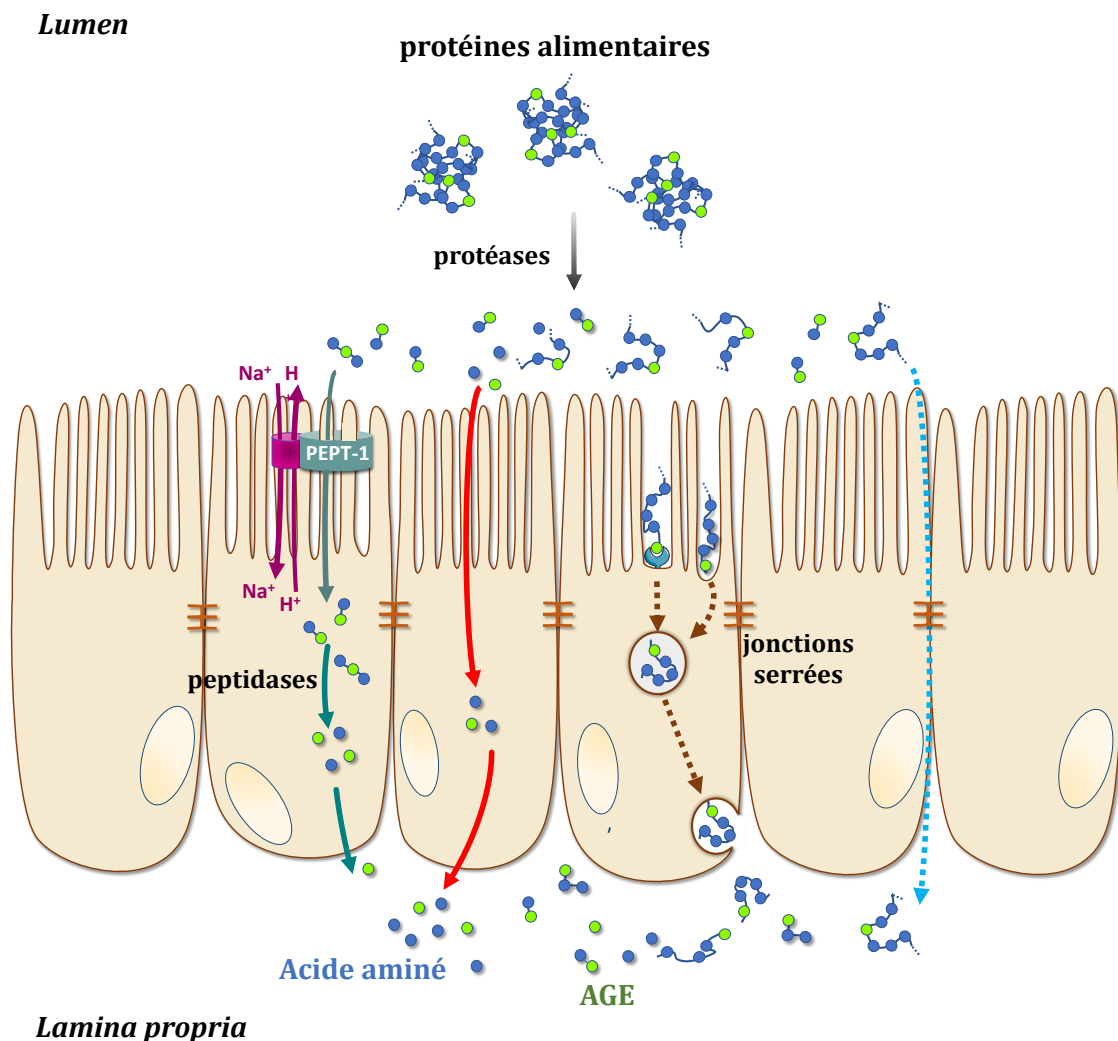
Contrairement à l'Homme, certains champignons et bactéries, dont certaines du microbiote (*E. coli*, *Bacillus subtilis*...) expriment des enzymes, appelées déglycases ou amadoriases<sup>411</sup>. Ces dernières dégradent des produits d'Amadori. Pour les bactéries pouvant utiliser le carbone et l'azote comme sources d'énergie, comme les bactéries du genre *Intestinimonas*, cette métabolisation peut représenter un réel atout énergétique<sup>412</sup>. Certaines bactéries peuvent également métaboliser les AGE. Par exemple, la CML peut être dégradée par différentes souches probiotiques d'*E. coli* en présence d'oxygène<sup>413</sup>. La métabolisation *in vitro* de différents AGE issus des produits de digestion de caséine glyquée par des bactéries fécales dépend de la nature et du poids moléculaire du digestat. La concentration de CML réduit considérablement, reflétant une probable dégradation, contrairement aux concentrations d'AGE fluorescents, certainement à cause des pontages<sup>414</sup>. Les produits de digestion de faible poids moléculaire (< 1 kDA) sont préférentiellement dégradés.

### ***iii. Absorption des AGE***

Il est considéré qu'environ 10% des AGE ingérés sont retrouvés dans la circulation chez la souris mais également chez l'Homme<sup>415,416</sup>. Les mécanismes d'absorption ont une importance majeure car ils vont déterminer les effets physiopathologiques des AGE alimentaires. En effet, ceux absorbés sous forme protéique dans la circulation pourraient activer RAGE et d'autres récepteurs, et participer à l'environnement inflammatoire et oxydant de certaines maladies chroniques. Les AGE libres ne se fixent pas à ces récepteurs, tout du moins à RAGE<sup>304</sup>.

Deux mécanismes d'absorption intestinale ont été décrits pour les AGE, principalement les AGE monovalents. Les AGE libres pénètrent dans l'entérocyte par diffusion simple<sup>417</sup>. En revanche, les di/tri-peptides glyqués sont absorbés par le transporteur peptidique PEPT-1 (*peptide transporter 1*)<sup>418</sup>. Une étude a montré que le passage de la pyrrolidine dans l'entérocyte se fait préférentiellement sous forme de di/tri-peptide<sup>419</sup>. On suppose que cela pourrait être le cas pour d'autres AGE.

Une fois dans la cellule, les di/tri-peptides sont hydrolysés par une aminopeptidase cytoplasmique<sup>418</sup>. Les AGE libres sont ensuite libérés dans la *lamina propria* probablement par diffusion simple. La plupart de ces études ont été réalisées *in vitro* sur des cellules d'une lignée épithéliale du côlon, qui ne présentent pas toutes les fonctionnalités des entérocytes de l'intestin grêle<sup>417,418</sup> (**Figure 15**).



**Figure 15** : Voies d'absorption intestinales démontrées (flèches pleines) et potentielles (flèches en pointillées) des AGE alimentaires. Les di/tri-peptides pénètrent dans les entérocytes grâce au transporteur à peptides PEPT-1 et sont hydrolysés dans l'entérocyte par une aminopeptidase (flèches vertes). Les AGE libres franchissent la membrane entérocytaire par diffusion simple (flèches rouges). Les AGE libres rejoignent ensuite la *lamina propria* par diffusion simple. La transcytose (flèches marrons) et la voie paracellulaire (flèche bleue) n'ont pas encore été mises en évidence pour l'absorption intestinale des AGE alimentaires.

D'autres voies d'absorption des AGE sont suspectées mais elles n'ont jamais été mise en évidence :

- La transcytose permettrait l'internalisation de protéines (ou larges peptides) glyquées par les entérocytes et l'exocytose de ces dernières dans la *lamina propria*<sup>420</sup>.

- la voie paracellulaire permettrait le passage de protéines (ou larges peptides) entre deux entérocytes suite à une altération des jonctions serrées. Certaines maladies chroniques favorisent la rupture de ces jonctions et pourraient donc permettre le passage des AGE peptidiques par cette voie<sup>421</sup>. Le régime occidental pourrait également augmenter la perméabilité intestinale (cf. I.B.3 Perturbation de l'homéostasie intestinale)<sup>422,423</sup>. Il est essentiel d'élucider les mécanismes d'absorption des AGE afin de mieux évaluer l'impact des AGE alimentaires sur la santé (**Figure 15**).

#### ***iv. Accumulation dans les organes***

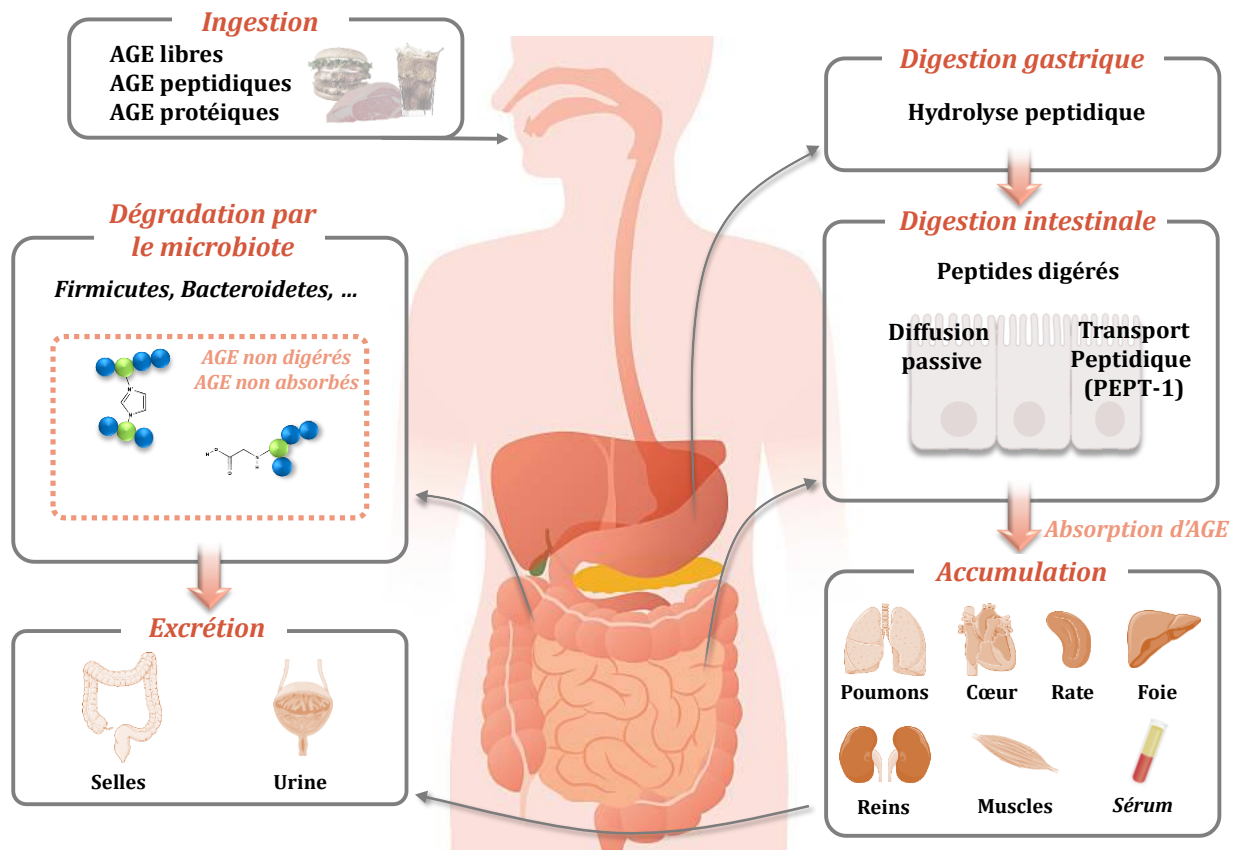
Parmi les AGE absorbés, environ 30% d'entre eux sont retrouvés dans les urines<sup>415,416,424</sup>. Cette concentration peut être modulée en condition pathologique, elle diminue par exemple en fonction de la sévérité de la maladie rénale<sup>416</sup>. Différentes études ont montré que, parmi les AGE non éliminés, certains peuvent s'accumuler dans les organes et biaiser la quantification des AGE endogènes. Cette accumulation a été confirmée *in vivo*. Par exemple, un régime riche en protéines glyquées est associé à une augmentation de la CML dans le cœur et les tendons de la queue de rats<sup>425</sup>. Cependant, la concentration en CML protéique ne varie pas, suggérant que seuls les AGE libres passent dans la circulation<sup>425</sup>. L'utilisation de protéines radiomarquées a été très utile afin de suivre leur distribution au sein des organes.

Les premiers résultats des études sur le métabolisme des AGE alimentaires laissaient supposer qu'ils pouvaient biaiser la quantification des AGE endogènes. Parmi les organes analysés de rats nourris avec de l'ovalbumine glyquée radiomarquée, les reins et le foie accumulent le plus d'AGE<sup>426</sup>. Une étude similaire chez la souris a montré une accumulation de la CML protéique dans les reins et le foie ainsi que dans d'autres organes: l'intestin, les poumons, le cerveau, les testicules, le côlon, ...<sup>415</sup>.

Il est bien sûr difficile de vérifier l'accumulation des AGE alimentaires dans les organes chez l'Homme. Les analyses les plus courantes réalisées lors d'études cliniques sont la mesure de la concentration d'AGE libres dans les urines, les fèces et le sang. Les



résultats s'accordent avec ceux obtenus avec les modèles animaux : la concentration d'AGE éliminés augmente en fonction de la quantité d'AGE ingérée. Certaines études ne rapportent peu, voire pas, de corrélation entre les concentrations d'AGE sériques et urinaires<sup>427,428</sup>. Cette différence pourrait s'expliquer par la détection d'AGE libres et non peptidiques et un délai non adapté entre le repas et le prélèvement<sup>429</sup>. Les résultats obtenus avec les études expérimentales et cliniques permettent de dresser un schéma hypothétique du métabolisme des AGE alimentaires chez l'Homme (**Figure 16**).



**Figure 16** : Métabolisme supposé des AGE alimentaires. Une fois ingérés, les AGE subissent une première hydrolyse par le suc gastrique. Leur digestion se poursuit grâce aux enzymes sécrétées par les entérocytes de l'intestin grêle. Les di/tri-peptides et les acides aminés libres glyqués sont absorbés au niveau de ces cellules : les AGE libres sont absorbés par diffusion simple et les di/tri-peptides glyqués sont absorbés par le transporteur de peptide PEPT-1. La perméabilité intestinale favorise le passage des AGE dans la circulation. Une fois absorbés, les AGE peuvent être éliminés dans les urines ou s'accumuler dans le sang et différents tissus comme les poumons, le cerveau, l'iléon, le côlon et les reins. Les AGE non absorbés et non digérés peuvent être dégradés par le microbiote, et potentiellement absorbés, ou excrétés dans les selles.

Il est nécessaire de continuer les recherches à ce sujet afin d'identifier 1- d'éventuels nouveaux processus de dégradation et d'absorption des protéines glyquées, 2- la localisation des AGE accumulés (intracellulaire ou extracellulaire), 3- les récepteurs des

AGE possiblement impliqués dans cette accumulation (une étude a montré que ce processus est indépendant de RAGE<sup>415</sup>) et 4- le mode de pénétration des AGE libres dans les cellules périphériques.

## *2. Effets santé des AGE exogènes*

### *i. Impact des AGE alimentaires sur l'homéostasie intestinale*

Les organes du tube digestif étant ceux en contact avec les plus fortes quantités d'AGE alimentaires sous forme libre, partiellement digérée ou non-digérée, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact d'un régime riche en AGE sur la perméabilité intestinale. Des souris exposées 24 semaines à un régime riche en AGE présentent une diminution de l'expression de certaines protéines de jonction (occludine et claudine-1) dans le jéjunum. Cette perturbation est associée à une augmentation de LPS dans le sérum<sup>423</sup>. Dans le côlon de rats, une diminution de l'expression d'occludine et de *zonula occludens* est également reportée après 18 semaines de régime riche en AGE (chauffage des aliments à hautes T°C)<sup>430</sup>. Les PAMP et les protéines (ou larges peptides) alimentaires glyquées qui franchissent l'épithélium, peuvent activer des récepteurs des cellules immunitaires de la *lamina propria* comme les cellules dendritiques et participer à l'instauration d'un environnement inflammatoire et oxydant voire déclencher des réactions allergiques. RAGE par exemple est suspecté de contribuer au maintien de l'état inflammatoire caractéristique des sujets ayant une MICI<sup>321</sup>.

La divergence des conclusions concernant l'impact des AGE exogènes sur la santé s'explique par des différences majeures entre les études, notamment au niveau des régimes utilisés (traitement thermique de la nourriture, ajout de BSA glyquée selon différentes méthodes,...), et des méthodes d'analyse des AGE<sup>431</sup>. Dès lors que le régime n'est pas supplémenté avec un type d'AGE défini, l'interprétation des résultats est compliquée. En effet, la supplémentation avec des protéines de croûte de pain apporte d'autres produits terminaux de glycation, comme des mélanoidines qui ont des propriétés anti-oxydantes. De plus, les animaux de même lignée mais élevés dans des animaleries différentes n'auront pas forcément le même microbiote. Même si les informations sur le microbiote sont rapportées, les biais inhérents aux méthodes d'analyse du microbiote (conservation de l'échantillon, technique utilisée...) existent<sup>432</sup>. Il est donc compliqué de pouvoir analyser les différents résultats de la littérature. Des études cliniques ont été

réalisées et si elles ne permettent pas de définir l'effet des AGE sur la santé, elles permettent de préciser certains points pertinents.

## *ii. Etudes cliniques*

Plusieurs études cliniques ont été réalisées chez l'Homme, afin d'évaluer l'impact de la quantité d'AGE alimentaires sur différents paramètres tels que les concentrations 1- de marqueurs métaboliques (cholestérol, triglycérides ...), 2- de marqueurs inflammatoires, 3- d'AGE éliminés dans les urines et fèces et 4- de marqueurs de fonction rénale (**Tableau 2**). Les prises de repas se déroulent sur plusieurs semaines, jusqu'à 5 mois environ mais certaines se concentrent uniquement sur la prise d'un repas.

Globalement, l'effet des AGE alimentaires sur les paramètres métaboliques, inflammatoires et oxydants est principalement montré chez les sujets souffrant de pathologies comme l'obésité et le DT2. Les sujets sains soumis à une restriction en AGE alimentaires ont principalement une diminution d'AGE plasmatiques<sup>428,433,434</sup>. Les conséquences sur les autres marqueurs mesurés sont plus aléatoires.

Plusieurs études montrent en effet une association entre effets des AGE sur la santé et diminution de marqueurs oxydants et inflammatoires uniquement chez les sujets âgés lors d'une restriction en AGE<sup>428,433,435,436</sup>. Peu d'études ont montré une corrélation entre la quantité d'AGE alimentaires et le risque de syndrome métabolique (obésité, hypertriglycéridémie ...) accompagné de l'augmentation de marqueurs inflammatoires et oxydants<sup>437,438</sup>. Ces deux études sont observationnelles avec les limites possibles de ce genre d'études. Chez les sujets pathologiques, la majorité des études met en évidence une diminution des concentrations d'AGE sériques et urinaires après le suivi d'un régime faible en AGE<sup>439-442</sup>. Une étude note une diminution de cholestérol associé aux LDL quand peu d'AGE est consommé<sup>443</sup>. Les marqueurs inflammatoires et oxydants, notamment le TNF- $\alpha$  et le 8-isoprostane, sont diminués par la restriction en AGE<sup>439,444,445</sup> mais certains marqueurs de l'homéostasie lipidiques ne le sont pas<sup>441,444-446</sup>. Cette tendance est d'ailleurs observée chez la plupart des sujets diabétiques<sup>439,445</sup>. Concernant les marqueurs liés à l'insuline (insuline, modèle d'évaluation homéostatique de la résistance à l'insuline - HOMA-IR pour *homeostasis model assessment of insulin resistance*) et à la glycémie, les résultats varient trop entre les études, pour en dégager une tendance particulière<sup>439,442,445</sup>. De la même manière, les marqueurs cardiovasculaires et

métaboliques fluctuent beaucoup entre les différentes études réalisées sur les sujets obèses<sup>441,444,446-448</sup>. Enfin, les pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne ne sont globalement pas perturbés par les AGE alimentaires<sup>441,443,446</sup>.

**Tableau 2 :** Liste non exhaustive des études cliniques analysant l'impact d'un régime riche ou pauvre en produits terminaux de glycation avancée (AGE - *advanced glycation end-products*), entre 2010 et 2020. Modifié d'après Zhang *et al.*<sup>449</sup>

Population étudiée	Design de l'étude	Effets biologiques et corrélations	Références
<b>Sujets sains</b>			
<b>Adultes âgés</b> <b>âge ≥ 65 ans</b> <b>IMC moyen : ND</b> <b>n = 20</b>	étude croisée à 4 semaines <b>régime riche en AGE</b> : régime occidental ; ~6,50,000 kU / 4 semaines <b>régime faible en AGE</b> : régime méditerranéen, ~4 00 000 kU / 4 semaines	CML à jeun et postprandiale ↓, MGO ↓, AGE-R1 ↑, Glo1 ↑, RAGE ↓	436
<b>Adultes</b> <b>âge : 18 à 35 ans</b> <b>IMC : ND</b> <b>n= 126</b>	étude observationnelle rappels alimentaires de 24 heures	corrélation entre les AGE alimentaires, la glycémie à jeun et le syndrome métabolique	438
<b>Adultes</b> <b>âge: 35,1 ± 15,6 ans</b> <b>IMC : 27,7 ± 6,9 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 51</b>	étude croisée à 4 semaines ; calories équivalentes <b>régime riche en AGE</b> : riche en viande rouge et viande transformée <b>régime faible en AGE</b> : riche en graines entières, noix, légumineuses, produits laitiers faibles en matières grasses, sans viande rouge et transformée	CML →, AGE fluorescents →, TG ↓, cholestérol total ↓, PAI-1 ↓, glycémie à jeun →, insuline à jeun →, HOMA-IR→, HDL-cholestérol →, PCR-hs →, IL-6 →	450
<b>Adultes</b> <b>âge : 40,6 ± 12,9 ans</b> <b>IMC : 27,5 ± 4,7 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 5848</b>	étude observationnelle questionnaire semi-quantitatif de fréquence alimentaire	corrélation entre les AGE alimentaires et le risque d'obésité abdominale et d'hypertriglycémie	437

Population étudiée	Design de l'étude	Effets biologiques et corrélations	Références
<b>Adultes d'âge moyen à âgés</b> <b>âge : 50 à 69 ans</b> <b>IMC : 26,2 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 24</b>	étude parallèle de 6 semaines ; calories et nutriments équivalents <b>régime riche en AGE</b> : aliments riches en AGE, à base de cuisson à haute température, 4 fois plus élevé dans les AGE <b>régime faible en AGE</b> : aliments pauvres en AGE, à base de cuisson douce	CML ↓, CML urinaire ↓, cholestérol total ↓, HDL-cholestérol →, LDL-cholestérol ↑, TG →, sRAGE→, esRAGE →, cytokines inflammatoires →, glycémie à jeun →, indice d'hyperémie réactive →	433
<b>Adolescents masculins</b> <b>âge : 11 à 14 ans</b> <b>IMC : ND</b> <b>n = 20</b>	étude croisée à 2 semaines ; calories et nutriments équivalents <b>régime riche en AGE</b> : aliments riches en AGE et cuisson à hautes températures ; 11,3 mg LMC/j <b>régime faible en AGE</b> : aliments pauvres en AGE et cuisson à basse température ; 5,4 mg de LMC/j	CML urinaire →, CML fécale ↓	410
<b>Adultes</b> <b>âge : 18 à 24 ans</b> <b>IMC : 18 à 26,9 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 62</b>	étude croisée à 4 semaines calories et nutriments équivalents <b>régime riche en AGE</b> : aliments riches en AGE et cuisson à hautes températures ; 5,4 mg CML/j <b>régime faible en AGE</b> aliments pauvres en AGE et cuisson à la vapeur ; 2,2 mg de CML/j	glycémie à jeun ↓, insulinémie à jeun ↓, HOMA-IR ↓, HbA <sub>1c</sub> →, produit d'Amadori →, cholestérol total ↓, HDL-cholestérol ↓, LDL-cholestérol →, TG ↓, acides gras oméga-3 ↑, acides gras oméga 6 →, vitamines C et E ↑, ubiquinol (+ubiquinone) ↓, GSH réduit →, MDA→, PAOP →	428
<b>Adultes</b> <b>âge : 21 à 69 ans</b> <b>IMC : ND</b> <b>n = 61</b>	Étude d'observation Rappels alimentaires des 24 h	aucune corrélation entre la CML sérique et les aliments riches en AGE à l'exception du poulet frit	427

Population étudiée	Design de l'étude	Effets biologiques et corrélations	Références
<b>Adultes</b> <b>âge : 67 ± 1,4 ans</b> <b>IMC : 27,3</b> <b>± 1,4 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 18</b>	Étude parallèle de 4 mois ; calories et nutriments équivalents <b>régime riche en AGE</b> : repas habituels ; > 20 AGE Éq/j <b>régime faible en AGE</b> : instructions pour modifier le temps et la température de cuisson; < 10 AGE Éq/j	CML ↓, MGO →, TNF-α ↓, insuline →, glycémie à jeun →, HOMA-IR →, 8-isoprostane ↓, leptine →, adiponectine →, CML intracellulaire →, MG →, AGE-R1 →, RAGE →, SIRT-1 →	439
<b>Sujets pathologiques</b>			
<b>Adultes en surpoids ou obèses</b> <b>âge : 18 à 50 ans</b> <b>IMC moyen : 31,3 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 20</b>	étude croisée à 2 semaines calories et nutriments équivalents <b>régime riche en AGE</b> : aliments riches en AGE ; 59 mg CML/2 semaines, 344 mg MG-H1/2 semaines, 44 mg CEL/2 semaines <b>régime faible en AGE</b> : aliments pauvres en AGE 43 mg CML/2 semaines, 253 mg MG-H1/2 semaines, 28 mg CEL/2 semaines	pressions artérielles systolique et diastolique →, pression artérielle moyenne →, pression pulsée →, cholestérol total →, LDL →, HDL →, TG →, cytokines inflammatoires →	446
<b>Adultes âgés</b> <b>âge ≥ 65 ans</b> <b>IMC moyen : 31,9 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 20</b>	étude croisée à 4 semaines ; calories équivalentes; <b>régime riche en AGE</b> : régime occidental ; ~6,50,000kU / 4 semaines <b>régime faible en AGE</b> : régime méditerranéen, avec ou sans coenzyme Q10 ; ~4 00 000 kU/4 semaines	CML à jeun et postprandiale ↓, MGO ↓, AGE-R1 ↑, Glo1 ↑, RAGE ↓	435
<b>Adultes en surpoids ou obèses</b> <b>âge : 30 ± 9 ans</b> <b>IMC : 31,8 ± 4,8 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 11</b>	étude croisée à 2 semaines ; calories et nutriments équivalents <b>régime riche en AGE</b> : aliments riches en AGE; 14 090 kU/j <b>régime faible en AGE</b> : aliments pauvres en AGE; 3 302 kU/j	glycémie à jeun →, CML ↑, MCP-1 ↓, MIF ↑, cystatine C ↓, cholestérol total →, créatinine →, ratio albumine/créatinine ↓, CML urinaire ↓, 8-isoprostane ↓, albumine →	444

Population étudiée	Design de l'étude	Effets biologiques et corrélations	Références
<b>Patients en dialyse péritonéale</b> <b>âge moyen : 50,1 ans</b> <b>IMC moyen : 26,6 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 20</b>	étude parallèle 4 semaines <b>régime « classique » en AGE</b> : repas habituels <b>régime faible en AGE</b> : mode d'emploi pour faire bouillir, pocher, mijoter ou cuire à la vapeur	CML ↓, MGO ↓ Microbiote intestinal : <i>Prevotella copri</i> ↓, <i>Bifidobacterium animalis</i> ↓, <i>Alistipes indistinctus</i> ↑, <i>Clostridium citroniae</i> ↑, <i>Clostridium hathewayi</i> ↑, <i>Ruminococcus gausvreauii</i> ↑	440
<b>Adultes en surpoids</b> <b>âge : 21 à 50 ans</b> <b>IMC : 29,8 ± 3,7 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 20</b>	étude croisée à 2 semaines ; calories et nutriments équivalents <b>régime riche en AGE</b> : aliments riche en AGE ; 59 mg de CML / 2 semaines, 344 mg MGH1 / 2 semaines, 44 mg CEL / 2 semaines ; <b>régime faible en AGE</b> : aliments pauvres en AGE ; 43 mg de CML / 2 semaines, 253 mg MG-H1 / 2 semaines, 28 mg CEL / 2 semaines	CML →, MG-H1 →, CEL →, CML urinaire →, MG-H1 ↓, CEL ↓, sensibilité à l'insuline ↑, insuline sécrétée →, sRAGE →, eDFG →	447
<b>Patients en surpoids, ou obèses, diabétiques de type 2</b> <b>âge : 30 à 65 ans</b> <b>IMC moyen : 29,3 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n = 26</b>	étude parallèle de 6 semaines <b>régime riche en AGE</b> : repas habituels ; 12 214 kU/j <b>régime faible en AGE</b> : instructions pour faire bouillir et fumer; 3 966 kU/j	glycémie →, cholestérol total →, TG →, HDL-cholestérol →, HbA <sub>1c</sub> →, AGE fluorescents →, MDA ↓, TNF-α ↓, insuline →, HOMA-IR →	445
<b>Patients prédiabétiques</b> <b>âge : 35 à 65 ans</b> <b>IMC : 32,5 ± 5,3 kg/m<sup>2</sup></b> <b>n=62</b>	étude parallèle de 24 semaines ; calories et nutriments équivalents <b>régime « classique » en AGE</b> : repas habituels ; 5 fois plus élevé en AGE <b>régime faible en AGE</b> : mode d'emploi pour faire bouillir, vapeur et marinade, sélectionner aliments peu transformés au lieu de ceux hautement transformés	cholestérol total sérique ↓, TG ↓, LDL-cholestérol ↓, cholestérol non-HDL ↓, ApoB ↓, ApoA ↓, ApoB/ApoA ↓, pressions artérielles systolique et diastolique →, glycémie à jeun →, HbA <sub>1c</sub> →, esRAGE →	443



Population étudiée	Design de l'étude	Effets biologiques et corrélations	Références
<b>Hommes en surpoids ou obèses</b> âge : 30 à 55 ans IMC moyen : 28,9 kg/m <sup>2</sup> n = 43	étude parallèle de 12 semaines ; calories et nutriments équivalents <b>régime « classique » en AGE</b> : repas habituels ; 14 311 kU/j <b>régime faible en AGE</b> : instructions pour mijoter et pocher; 6 389 kU/j	CML sérique ↓, MGO ↓ ; TG ↓, HDL ↑, VO <sub>2</sub> max ↑, pressions artérielles moyenne, systolique et diastolique →, glycémie à jeun →, LDL →	441
<b>Patients diabétiques de type 2</b> âge : 61 ± 4 ans IMC : 32,3 ± 1,6 kg/m <sup>2</sup> n = 18	Étude parallèle de 4 m ; calories et nutriments équivalents <b>régime riche en AGE</b> : repas habituels ; > 20 AGE Éq/j <b>régime faible en AGE</b> : instructions pour modifier le temps et la température de cuisson; < 10 AGE Éq/j	Patients diabétiques : CML ↓, MGO ↓, TNF-α ↓, insuline ↓, glycémie à jeun →, HOMA-IR →, HbA <sub>1c</sub> →, 8-isoprostane ↓, leptine ↓, adiponectine ↑, CML intracellulaire ↓, MGO ↓, AGE R1 ↑, RAGE ↓, SIRT-1 ↑ ;	439
<b>Adultes en surpoids</b> âge : 34,8 ± 10 ans IMC : 31,3 ± 5,1 kg/m <sup>2</sup> n = 19	étude croisée à 1 repas ; calories et nutriments équivalents <b>régime riche en AGE</b> : préparé par torréfaction ; 5,0 mg de CML/repas <b>régime faible en AGE</b> : préparé à la vapeur ; 2,8 mg de CML/repas	CML →, glycémie à jeun ↓, cytokines inflammatoires →, VCAM-1 ↓, sentiment de satiété →, hormone régulant l'appétit → (sauf pour la ghréline ↓), CML urinaire ↓, MG-H1 →, Iso-PGF2α ↓	448
<b>Femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques</b> âge : 23,4 ± 5,7 ans IMC : 26 ± 5,7 kg/m <sup>2</sup> n = 23	Étude parallèle de 2 m ; calories équivalentes <b>régime riche en AGE</b> : instructions pour cuisiner à températures élevées avec faible humidité <b>régime faible en AGE</b> : instructions pour faire bouillir, mijoter, pocher et cuire à la vapeur	AGE ↓, stress oxydant ↓, glucose →, insuline ↓, HOMA-IR ↓, testostérone ↓, SHBG →, androstènedione →	442

Comparaison des données par rapport au « régime riche en AGE », P<0.05

↑ : augmentation significative; ↓ : diminution significative; → : pas de modulation

**AGE** : *advanced-glycation end-products*; **ApoA/B** : apolipoprotéine A et B; **CEL** : Nε-carboxyethyllysine; **CML** : Nε-carboxymethyllysine; **eDFG** : débit de filtration glomérulaire estimé; **esRAGE** : *endogenous secretory RAGE*; **Glo1** : glyoxalase I; **GSH** : *γ-glutamyl-cysteinyl-glycine* (glutathion réduit); **HbA<sub>1c</sub>** : hémoglobine glyquée; **HDL** : *high density lipoprotein*; **HOMA-IR** : *homeostasis model assessment of insulin resistance*; **IL-6** : interleukine-6; **IMC** : indice de masse corporelle; **Iso-PGF2α** : 8-iso prostaglandine F2α; **LDL** : *low density lipoprotein*; **MCP-1** : *monocyte chemoattractant protein-1*; **MDA** : malondialdéhyde; **MGO** : méthylglyoxal ; **MIF** : *macrophage migration inhibitory factor*; **MG-H1** : *methylglyoxal-derived hydroimidazolone-1*; **ND** : non disponible; **PAI-1** : *plasminogen activator inhibitor-1*; **PAOP** : pouvoir anti-oxydant du plasma, **PCR-hs** : protéine C réactive haute sensibilité; **RAGE** : récepteur aux AGE; **SHBG** : *sex hormone-binding globulin*; **SIRT-1** : *sirtuin-1*; **sRAGE** : *soluble*; **TG** : triglycérides; **TNF-α** : *tumor necrosis factor-α*; **VCAM-1**, *vascular cell adhesion molecule-1*; **VO<sub>2</sub>max** : volume maximal d'oxygène consommé durant le test.

### *iii. Etudes expérimentales*

Certains modèles expérimentaux, principalement murins, d'insuffisance rénale ou de troubles métaboliques ont confirmé l'aggravation de l'inflammation, de l'oxydation et des complications métaboliques par les AGE alimentaires<sup>451-456</sup> (**Tableau 3**). Les effets physiopathologiques des AGE ont également été observés chez des animaux sains, où ils favorisent les processus oxydants et inflammatoires et altèrent l'homéostasie métabolique<sup>271,457,458</sup>. Cependant, comme pour les études cliniques, l'utilisation de régimes alimentaires différents d'une étude expérimentale à l'autre complique les comparaisons inter-études.

**Tableau 3** : Liste non exhaustive des études expérimentales analysant l'impact d'un régime riche ou pauvre en produits terminaux de glycation avancée (AGE - *advanced glycation end-products*) sur différents modèles murins. Modifié d'après Peppia *et al.*<sup>458</sup>

Modèle animal	Régime étudié	Résultats	Références
<b>Souris C57BL/6</b>	<b>Régime riche en AGE</b> : 16.6% graisses, 18.8% protéines, 64.6% glucides, 3.73 kcal/g, chauffage à 125°C pendant 30 min <b>Régime contrôle</b> : même régime sans chauffage	Perturbation de la folliculogénèse et de la stéroïdogénèse ↓ du nombre de <i>corpora lutea</i>	459
<b>Souris Swiss albinos</b>	<b>Régime riche en AGE</b> : 18% protéines, 64% glucides, 5.2% graisses, chauffage à 90°C pendant 10 min <b>Régime contrôle</b> : même régime sans chauffage	↑ poids ↑ cytokines pro-inflammatoires, chimiokines, CML, PCR, HbA <sub>1c</sub> , azote uréique sanguine, créatinine	460
<b>Rats Sprague-Dawley</b>	<b>Régime riche en AGE</b> : chauffage à 165°C pendant 1 h <b>Régime contrôle</b> : même régime sans chauffage	↑ voies de signalisation cellulaires liées aux dommages des lymphocytes B ↑ apoptose des lymphocytes B ↑ incidence du diabète auto-immune chez la souris NOD	461
<b>Souris NOD8.3 + NOD/ShiLt +NOD8.3C</b>	<b>Régime riche en AGE</b> : chauffage à 165°C pendant 1 h <b>Régime contrôle</b> : même régime sans chauffage	Exposition de la conception jusqu'au stade post-natal précoce : ↓ hormone sécrétée par les ilots du pancréas <i>ex vivo</i> , ↑ insulite ↓ variance des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> et des cellules dendritiques classiques dans les tissus lymphoïdes locaux ↓ proportion des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans la rate	451

<b>Rats Sprague-Dawley</b>	<b>Régime riche en AGE</b> : chauffage à 125°C pendant 3 h <b>Régime contrôle</b> : même régime sans chauffage	↓ diversité microbienne cœcale, Perturbation des concentrations de métabolites bactériens (acétate, propionate, ammoniac, ...) ↓ protéines de jonction dans le côlon	422
<b>Souris C57BL/6</b>	<b>Régime riche en AGE</b> : 40.9 µg/mg, (autoclavage à 120°C pendant 30 min) <b>Régime contrôle</b> : 7.6 µg d'AGE/mg, même régime sans autoclavage	↑ AGE sériques chez la femelle. ↓ propriétés mécaniques des vertèbres Effets sexe et âge dépendant sur l'accumulation des AGE dans les vertèbres	462
<b>Souris prédiabétiques NOD</b>	<b>Régime riche en AGE</b> : pré-chauffage à 100°C pendant 20–60 s et chauffage à 125°C pendant 20–30 min <b>Régime contrôle</b> : même régime sans l'étape de chauffage	↑ glycémie à jeun, IFN-γ, IL-4, CML sérique ↓ insuline plasmatique, IL-10 ↑ de l'altération des îlots du pancréas ↑ transmission du diabète de type 1 aux générations suivantes	463
<b>Souris db/db<sup>+/+</sup> et db/db<sup>-/+</sup></b>	<b>Régime riche en AGE</b> : pré-chauffage à 100°C pendant 20–60 s et chauffage à 125°C pendant 20–30 min <b>Régime contrôle</b> : même régime sans l'étape de chauffage	↓ du ratio albumine/créatinine, augmente le dépôt de CML et d'AGE dérivés du MGO protéiques dans les tissus Altération de la cicatrisation	464
<b>Souris db/db</b>	<b>Régime riche en AGE</b> : pré-chauffage à 100°C pendant 20–60 s et chauffage à 125°C pendant 20–30 min <b>Régime contrôle</b> : même régime sans la seconde étape de chauffage	↑ AGE urinaires, TGF-β ↑ laminine B1, collagène de type IV ↓ ratio albumine/créatinine urinaire, AGE rénaux ↑ pathologie glomérulaire ↓ longévité	465
<b>Rats Wistar</b>	<b>Régime faible en AGE</b> : 18% protéine, 58% glucides, 7,5% graisses chauffé à 190°C pendant 30 minutes <b>Régime contrôle</b> : même régime sans l'étape de chauffage	↓ activité de GLO1 ovarienne Corrélation positive avec le poids et la concentration de progestérone	466

<b>Souris C57BL/6</b>	<b>Régime riche en AGE</b> : restriction calorique (40% de calories en moins) et chauffage 15 min à 120°C <b>Régime contrôle</b> : restriction calorique sans chauffage	↑8-isoprostane, AGE, RAGE, p66 <sup>shc</sup> ↓OST-48, ratio GSH/GSSG, ↑résistance à l'insuline, marqueurs de fibrose cardiaque et rénale ↓ longévité	467
<b>Souris C57BL/6 WT et RAGE<sup>-/-</sup></b>	<b>Régime riche en AGE</b> : supplément BSA-CML <b>Régime contrôle</b> : supplément BSA	↑RAGE et VCAM-1 ↑ vitesse de l'onde de pouls ↑détérioration de l'élastine Pas de différence chez les souris RAGE <sup>-/-</sup>	468
<b>Souris C57BL/6 WT et RAGE<sup>-/-</sup></b>	<b>Régime riche en AGE</b> : supplément BSA-CML, concentration finale d'environ 200 µg CML/g <b>Régime contrôle</b> : supplémenté en BSA	↑CML dans différents organes (reins, iléon, côlon, poumons, cerveau, cœur, ...)	415
<b>Souris C57BL/6 WT et RAGE<sup>-/-</sup></b>	<b>Régime riche en AGE</b> : supplément BSA-CML, concentration finale d'environ 200 µg CML/g <b>Régime contrôle</b> : supplément BSA	↑CML rénale Protection des souris RAGE <sup>-/-</sup> contre la glomérulosclérose, indépendamment du régime	271

Comparaison des données par rapport au « régime faible en AGE », P<0.05

↑ : augmentation significative; ↓ : diminution significative

**AGE** : *advanced-glycation end-products*; **OST-48** : *oligosaccharyl transferase 48 kDa subunit*; **CD4/8** : *cluster of differentiation 4/8* ; **CML** : Nε-carboxymethyllysine; **Glo1** : glyoxalase 1; **GSH/GSSG** : *γ-glutamyl-cysteinyl-glycine* (glutathion réduit/glutathion oxydé) ; **HbA<sub>1c</sub>**: hémoglobine glyquée; **IL-4/10**: interleukine-4/10;; **IFN- γ** : interféron γ; **MGO** : méthylglyoxal ; **PCR** : protéine C réactive ; **RAGE** : récepteur aux AGE ; **TGF-α** : *tumor growth factor-α*; **VCAM-1**, *vascular cell adhesion molecule-1*

En résumé, il est encore difficile de conclure quant au rôle des AGE sur la santé. Il semblerait cependant que chez les sujets pathologiques, l'ingestion d'AGE augmente l'expression de certains marqueurs inflammatoires, oxydants et métaboliques. La plupart des pathologies étant multifactorielles, il n'est pas étonnant que l'association entre consommation d'AGE et facteurs de risque soit nécessaire pour causer certaines complications physiopathologiques. Comme pour les modèles expérimentaux, les études cliniques présentent plusieurs limites dont la principale est la taille de l'échantillon. Beaucoup d'études, notamment les observationnelles, sont réalisées sur moins de 20 sujets. Très peu de méta-analyses ont été effectuées (ou peut-être publiées par manque d'effet observé) afin de combiner les études de différents groupes. Les différences entre les régimes ne permettent sans doute pas ce genre d'analyse. En effet, les macronutriments peuvent fortement varier entre les régimes comparés. De plus, des régimes qui ont, en théorie, une composition équivalente en nutriments peuvent, en pratique, être déséquilibrés. Par exemple, un manque de vitamines ayant des propriétés anti-oxydantes a déjà été démontré dans un régime riche en AGE par rapport au régime auquel il était comparé<sup>428</sup>. Le chauffage a effectivement un impact important sur la qualité nutritionnelle.

Les études des effets des AGE alimentaires sur la santé ont les mêmes biais que les études épidémiologiques nutritionnelles décrites dans le premier chapitre des généralités (cf. I.A.3 Pertinence et limites des études épidémiologiques nutritionnelles) : honnêteté pour répondre au questionnaire, respect du régime... Les études ne sont en général pas réalisées sur de longues périodes<sup>449,469</sup>. Des instructions sont certainement données afin d'augmenter, ou de diminuer les quantités d'AGE consommées par les participants de chaque cohorte. Cependant, les « nouveaux » régimes alimentaires peuvent être différents des habitudes alimentaires des sujets, rendant leur suivi plus compliqué.

De nombreux modèles expérimentaux sont à la disposition des scientifiques pour mieux comprendre l'impact de la glycation des aliments et endogène dans les maladies chroniques associées au vieillissement. Le modèle doit permettre l'étude de différents phénotypes pathologiques comme l'inflammation à bas bruit, le stress oxydant, la perte de l'homéostasie protéique, la neurodégénération ... L'utilisation de modèles vertébrés « supérieurs » permet d'étudier les phénotypes tissulaires et systémiques. Elle permet également d'évaluer certaines fonctionnalités d'un organe grâce aux biomarqueurs

sanguins. Cependant, l'identification de mécanismes moléculaires sera préférentiellement réalisée chez des organismes modèles plus simples comme les invertébrés ou les microorganismes. Il est évident qu'il n'existe pas de modèle animal idéal puisque chacun a des spécificités que l'Homme n'a pas. Chaque modèle doit être choisi en fonction de sa pertinence et de ses limites par rapport à la question biologique posée. Enfin, la confirmation des mécanismes identifiés avec un modèle animal particulier doit être validée à l'aide d'un autre modèle expérimental *in vivo* ou *in vitro*. Si certains modèles sont meilleurs que d'autres pour l'étude de pathologie ou de mécanisme particulier, les différents modèles, complexes et simples, sont complémentaires.

Concernant la glycation, plusieurs modèles sont utilisables et plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques associés à cette modification post-traductionnelle ont déjà pu être mis en évidence (cf. II.A.2 Mécanismes pathologiques de la glycation des protéines).

### **III. Modèles expérimentaux pour l'étude de la glycation**

#### **A. Modèles vertébrés**

##### *1. Mammifères*

Les caractéristiques biochimiques, physiologiques et anatomiques, qui sont similaires entre l'Homme et les mammifères, font de ces derniers de très bons modèles d'étude. Parmi les différents organismes mammifères étudiés en biologie, la souris est certainement le modèle animal le plus utilisé. Cependant, comme pour tout organisme modèle, tous les résultats obtenus avec cet animal ne sont pas transposables à l'Homme et toutes les pathologies humaines ne sont pas naturellement présentes chez ce modèle, nécessitant soit l'utilisation d'autres modèles mammifères plus adaptés, soit la mise en place de méthodes d'induction de ces maladies. Certaines d'entre elles, dont l'alimentation (modèle de maladies métaboliques induit par un régime riche en graisses et sucrose), souffrent d'un manque de reproductibilité. Certaines pathologies comme le DT2<sup>470</sup> et l'athérosclérose<sup>471</sup> peuvent être induites par mutation génétique. Par exemple, le mutant *ob/ob*, dont la mutation du gène codant la leptine induit, entre autres, une consommation de nourriture excessive et des perturbations métaboliques<sup>470</sup>, est un modèle de DT2. Chaque mutation peut entraîner des effets secondaires comme des compensations en



réponse à la délétion du gène<sup>472</sup>. De plus, la pathologie induite n'est bien sûr jamais totalement similaire à celle de l'Homme<sup>473</sup>. Par exemple, un modèle de diabète chez la souris ne permettra pas l'étude de toutes les complications inhérentes à cette maladie.

En ce qui concerne l'étude du rôle des AGE dans la physiopathologie de différentes maladies, les organismes modèles mammifères ont permis, permettent et permettront d'analyser différents paramètres (**Tableau 4**).

### **Etude du métabolisme des AGE alimentaires**

Les études chez la souris et le rat ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la quantité d'AGE ingérée et celle retrouvée dans les urines ou fèces<sup>415,416</sup>. Cependant, les mécanismes moléculaires permettant l'absorption intestinale (différentes voies d'absorption empruntées par les AGE libres ou peptidiques) ont dû être analysés avec des modèles cellulaires<sup>413</sup>. L'hypothèse selon laquelle la glycation des protéines alimentaires diminue la biodisponibilité des acides aminés a été beaucoup discutée, et peut l'être encore. L'utilisation du cochon ayant un tractus digestif et une absorption des nutriments proches de l'Homme a permis de montrer que ce n'était pas le cas<sup>474</sup>.

### **Analyse de l'accumulation des AGE alimentaires et endogènes**

L'étude de l'accumulation des AGE alimentaires dans les organes est particulièrement adaptée chez la souris. Ce modèle a permis de mettre en évidence l'accumulation de CML dans différents organes (reins, iléon, côlon, poumons, cerveau, cœur, ...) <sup>415</sup>. La petite taille de ses organes peut néanmoins limiter certaines analyses tissulaires. L'utilisation du rat est une alternative afin de bénéficier d'organes plus gros et il possède un volume sanguin entre 10 et 20 fois plus élevé que celui de la souris<sup>475</sup>.

L'accumulation des AGE endogènes en conditions pathologiques a été vérifiée grâce à des modèles de souris diabétiques. Cependant, le métabolisme de la souris n'est pas similaire à celui de l'Homme, contrairement au rat<sup>476</sup>. Ce dernier est donc préféré pour les études métaboliques complémentaires. Il représente par exemple un modèle de choix pour évaluer, *in vivo*, les potentiels bienfaits de composés anti-glycation<sup>477</sup>. Ses organes plus gros que ceux de la souris, facilitent l'étude de l'implication des AGE au niveau de la matrice extracellulaire et du système cardiovasculaire<sup>478,479</sup>.

## **Etude des effets physiopathologiques des AGE alimentaires et endogènes**

Le lien entre AGE, principalement alimentaires, et maladies métaboliques a été largement analysé chez les modèles mammifères. Comme discuté en début de paragraphe, la souris n'est pas un modèle idéal pour étudier ces pathologies, notamment le DT2. En ce qui concerne l'athérosclérose, un modèle génétique de cet animal a été utilisé avec succès pour étudier l'impact des AGE et de RAGE<sup>480</sup>. Chez un autre modèle, le lapin, l'athérosclérose est induite avec un régime riche en cholestérol<sup>481</sup>. Ce modèle peut être plus approprié pour étudier l'athérosclérose afin d'éviter les effets secondaires de la mutation et de reproduire des contextes pathologique et métabolique similaires à ceux de l'Homme<sup>482</sup>.

Travailler avec des modèles complexes comme la souris est très intéressant pour analyser l'effet des AGE sur le vieillissement d'un organe, voire de l'organisme entier. Par exemple, une étude a mis en évidence une association entre un régime faible en AGE et une diminution de la longévité<sup>483</sup>. Par contre, l'analyse des mécanismes moléculaires régulant la longévité sont très difficilement identifiables sans utiliser des organismes simples. Mais la simplicité de certains modèles ne permet pas forcément de détecter toutes les voies activées. De plus, tous les processus de vieillissement d'un organisme à longévité longue ne sont pas existants chez les organismes à durée de vie courte. En ce qui concerne la caractérisation des processus contrôlant les vieillissements physiologique et pathologique, qui est difficilement réalisable dans un organisme modèle complexe, les modèles cellulaires (provenant souvent de lignée immortalisée) peuvent être limités. L'utilisation de cellules primaires est néanmoins pertinente, notamment dans les mécanismes de sénescence.

Pour l'étude des maladies associées au vieillissement comme la sarcopénie, le choix du modèle s'avère également déterminant. Par exemple, l'étude de la biomécanique des muscles et des tendons, qui permet d'évaluer l'atteinte de l'appareil locomoteur, typique de la sarcopénie, est uniquement réalisable chez un modèle de grande taille comme le lapin. Il a d'ailleurs permis de mettre en évidence la corrélation entre la teneur en pentosidine de son collagène et la rigidité du talon d'Achille, études réalisées *ex vivo* sur les tendons<sup>484</sup>. En revanche, d'autres maladies liées au vieillissement et à l'accumulation d'AGE ont été étudiées chez la souris, comme la maladie d'Alzheimer et la cataracte<sup>485,486</sup>. Pour cette dernière, la physiologie de l'œil de la souris n'étant pas

vraiment comparable à celle de l'Homme, l'utilisation des yeux du cochon (taille et forme très proches de ceux l'Homme) permet une analyse plus représentative<sup>487,488</sup>.

### **Sélection de molécules anti-glycantes**

La souris a permis de vérifier l'action de molécules curatives et préventives contre la glycation<sup>356,489</sup>. Cependant, les phases de développement contenant plusieurs dizaines de molécules à tester peuvent nécessiter un nombre très important de souris au début du criblage. Ces premières étapes de criblage seront donc préférentiellement réalisées avec un modèle vertébré permettant de travailler sur une grande population, par exemple le poisson-zèbre ou des modèles invertébrés comme la drosophile et le nématode *C. elegans*.

#### ***2. Poisson zèbre***

Ce modèle est particulièrement utile pour l'étude de composés d'intérêt dans le développement de complications diabétiques, notamment la néphropathie, l'athérosclérose et la rétinopathie<sup>490,491</sup>. Les travaux sur la glycation chez le poisson-zèbre ne sont pas nombreux. Pourtant, le poisson-zèbre diabétique présente une concentration élevée d'AGE sérique ainsi qu'une accumulation d'AGE dans les organes, notamment dans les yeux<sup>492,493</sup>. Récemment, il a été montré que l'incubation de ses embryons en présence de MGO et glucose augmente l'angiogenèse rétinienne<sup>494</sup>. L'administration d'un inhibiteur du VEGF inhibe les effets pro-angiogéniques du MGO, suggérant la pertinence de ce modèle dans les études sur la glycation et les complications diabétiques. Comme chez le lapin, l'athérosclérose peut être induite par un régime riche en cholestérol<sup>495</sup> (**Tableau 4**). Cette pathologie est accompagnée d'hypercholestérolémie, d'oxydation des lipoprotéines et d'augmentation de la masse graisseuse. Ainsi, le poisson-zèbre est un bon modèle pour tester des composés anti-athérogènes<sup>491</sup>. L'évaluation d'extraits de plantes a d'ailleurs permis d'identifier deux composés ayant des propriétés anti-oxydantes prévenant la glycation de l'apoprotéine A, l'oxydation des LDL et leur phagocytose par les macrophages<sup>496</sup>.

Le poisson-zèbre est un modèle émergent et tous les outils de biologie moléculaires ne sont pas disponibles chez ce modèle. Son élevage demande une certaine expertise et sa manipulation est régulée comme celle des mammifères supérieurs. L'utilisation de modèles invertébrés est donc plus facilement réalisable, ils permettent de

s'affranchir de la complexité des vertébrés « supérieurs » ou « inférieurs », au moins pour l'étude des mécanismes conservés.

## **B. Modèles invertebrés**

La manipulation d'organismes invertebrés est moins contrôlée éthiquement que les modèles mammifères. Les deux modèles invertebrés majeurs, la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* et le nématode *C. elegans*, ont plusieurs caractéristiques communes comme une longévité et un temps de génération courts, une progéniture très importante et une culture à grande échelle facile à mettre en place<sup>497,498</sup>. Ces caractéristiques en font des modèles de choix pour le criblage de molécules d'intérêt.

### *1. Drosophile*

Même si la physiologie de la mouche *Drosophila melanogaster* reste très éloignée de celle de l'Homme, elle possède des organes similaires à ceux de l'Homme comme le cœur, des reins, un intestin et un cerveau. Elle peut être disséquée afin de mettre en évidence des réponses spécifiques de ces tissus (**Tableau 4**).

La drosophile n'exprime pas d'orthologue du gène codant pour RAGE mais possède les orthologues de ceux codant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et les constituants de la réponse immunitaire innée comme les récepteurs Toll, initialement découverts chez ce modèle<sup>499</sup>. Elle exprime d'autres récepteurs des AGE. Ce modèle peut donc permettre d'étudier 1- les effets des AGE, exogènes voire endogènes, qui sont indépendants de RAGE ou au moins de vérifier le rôle des récepteurs non-RAGE dans la physiopathologie des produits de glycation et 2- l'élimination des AGE par les récepteurs non-RAGE. L'expression orthologue de RAGE humain pourrait permettre d'étudier l'activation du récepteur *via* l'hétérodimérisation avec les récepteurs Toll.

Ce modèle a été utilisé pour étudier l'effet de la glycation dans la perturbation de la protéostasie, notamment dans les neurones et le cerveau<sup>500</sup>. Un modèle de maladie de Parkinson produisant le peptide  $\alpha$ -synucléine dans les neurones a permis de démontrer que la glycation de ce peptide perturbe la locomotion des drosophiles, montrant le rôle de la glycation dans la neurotoxicité induite par l'aggrégation peptidique<sup>501</sup>. La perte de l'homéostasie protéique a été également beaucoup étudiée chez *C. elegans*.

## 2. *Cænorhabditis elegans*

Ce nématode a d'abord été utilisé pour identifier les mécanismes impliqués dans la biologie du développement. Depuis plusieurs années, il est de plus en plus utilisé pour analyser les processus du vieillissement. Il partage en effet plusieurs caractéristiques du vieillissement avec l'Homme, telles que la sarcopénie et la perte de l'homéostasie protéique<sup>502</sup>. Ce modèle peut s'avérer utile afin d'étudier l'impact des AGE exogènes sur ces 2 processus.

Les AGE endogènes (formation et effets biologiques) peuvent être étudiés chez ce ver. La glycation endogène est en effet induite par des régimes riches en glucose ou  $\alpha$ -DC (**Tableau 4**). Les conditions de culture de *C. elegans* (20°C) et sa durée de vie courte ne sont pas propices à la glycation endogène en condition physiologique, permettant d'étudier principalement les AGE endogènes induits et d'en déterminer les conséquences biologiques. Des molécules inhibitrices de la glycation comme la rifampicine, ont été testées et ont permis de diminuer la quantité de CML détectée chez le ver<sup>503</sup>. Les cibles exactes de ces molécules ne sont pas toujours identifiées et il semblerait qu'elles soient plus antioxydantes qu'anti-glycantes. Néanmoins, ces études montrent que le ver peut être utilisé pour un criblage *in vivo* de molécules anti-glycantes. *C. elegans* exprime différentes glyoxalases permettant de métaboliser les  $\alpha$ -DC<sup>504</sup>. L'intérêt de ces enzymes dans la prévention de la glycation endogène pourra être particulièrement vérifié dans ce modèle.

Le nématode ne possède pas d'inflammation et n'exprime pas RAGE<sup>505</sup>. La plupart des autres récepteurs des AGE, notamment le complexe AGE-R et différents récepteurs *scavenger* de classe B, sont exprimés chez le ver. Ce modèle, comme la drosophile, peut donc permettre 1- d'étudier les effets des AGE qui sont indépendants de RAGE, 2- de vérifier le rôle des récepteurs non-RAGE dans la physiopathologie des produits de glycation et 3- étudier l'élimination des AGE endogènes. Le rôle des AGE sur l'oxydation, indépendamment de l'inflammation, pourra être vérifié et le rôle de l'oxydation sur la glycation endogène pourra être étudiée grâce aux outils pour inhiber les gènes clés de la réponse antioxydante (*daf-16* et *skn-1*) : ARN interférence ou utilisation de mutants. Il est évident que l'absence d'un système circulatoire, d'immunité acquise et d'une immunité innée primitive limitent l'utilisation de *C. elegans* pour caractériser certains mécanismes dépendants de la glycation.

### **C. Modèles *in vitro***

Les cultures cellulaires (lignées cellulaires ou cultures primaires) sont utilisées afin d'étudier les fonctionnalités de type cellulaire particulier des tissus. Elles sont indispensables pour identifier le lien direct entre la présence d'un composé et l'activation de signaux particuliers (inflammatoires, oxydants, angiogéniques ...) révélateurs des pathologies chroniques. L'utilisation d'outils complémentaires comme l'ARN interférence, des inhibiteurs chimiques ou des anticorps bloquants, permettent d'identifier les différents protagonistes moléculaires : du récepteur au facteur de transcription activé. Ces modèles ont d'ailleurs permis l'identification et la caractérisation des récepteurs des AGE et les réponses induites par leur interaction avec les AGE<sup>332</sup>. En plus des marqueurs de pathologies chroniques, la sénescence cellulaire, analysée avec les cellules primaires, est un marqueur de vieillissement dont la relevance *in vivo* a été démontrée.

Elles peuvent également servir à mettre en évidence des modifications moléculaires comme la glycation endogène, notamment *via* les  $\alpha$ -DC, et d'en étudier l'impact<sup>506-509</sup> (**Tableau 4**). Ces modèles sont nécessaires pour cribler des molécules chimiques, par exemples des anti-glycants, avant de pouvoir les tester chez des modèles animaux.

### **D. Micro-organismes**

Les micro-organismes sont facilement cultivables et ont des systèmes de défense très efficaces. Leur simplicité anatomique et leur métabolisme en font des outils de biologie moléculaire particulièrement utilisés. Concernant la glycation, le système glyoxalase et l'aldose réductase et leurs rôles dans la détoxification du MGO ont été largement étudiés chez ces organismes. GLO3 a été d'ailleurs identifié chez *E. coli*<sup>510</sup>.

Les levures, surtout *Saccharomyces cerevisiae*, sont très utilisées 1- comme système d'expression protéique permettant d'obtenir des modifications post-traductionnelles présentes chez les eucaryotes, 2 - pour étudier les interactions protéines-protéines, 3 - pour analyser la fonctionnalité protéique chez des mutants dépourvus de cette dernière. Chez *S. cerevisiae*, l'activité glyoxalase de GLO3 a été en partie confirmée par expression hétérologue et complémentation de la perte d'activité glyoxalase du mutant Hsp31<sup>511</sup>. La levure a également été particulièrement intéressante pour l'étude de

l'impact de la glycation sur la fonctionnalité de la protéine. Elle a permis de confirmer par exemple que la glycation augmente l'agrégation de l'huntingtine (protéine impliquée dans la maladie de Huntington)<sup>501</sup>. Elle pourrait être utilisée pour cribler des molécules anti-glycantes (**Tableau 4**).

Les bactéries, organismes majoritaires du microbiote digestif, ont certainement un rôle essentiel dans l'effet des AGE alimentaires sur la santé, notamment en métabolisant ces derniers. La métabolisation d'AGE a par exemple été décrite pour des souches d'*E. coli* probiotiques et des bactéries anaérobies du microbiote<sup>413,512</sup>. La part d'AGE alimentaires métabolisés par le microbiote n'est pas connue, de plus, les métabolites produits ainsi que leur impact sur la santé ont été très peu étudiés. L'isolement de souches caractéristiques du microbiote humain est nécessaire pour évaluer leur capacité à dégrader les AGE et analyser les métabolites synthétisés. La purification de ces métabolites permettrait d'envisager des essais *in vitro* puis, le cas échéant *in vivo*, pour contrôler leur inertie biologique ou, dans le cas contraire, déterminer leurs effets biologiques potentiels.

Les AGE alimentaires peuvent moduler le développement de souches présentes dans le microbiote et participer à une dysbiose<sup>409,513-516</sup>. Cela peut se révéler intéressant afin de favoriser le développement de certaines souches au détriment d'autres ou d'envisager de donner des souches probiotiques aux personnes prédisposées au développement de pathologies chroniques<sup>517</sup>.

**Tableau 4 :** Avantages, inconvénients et axes de recherche dans le cadre de la glycation des principaux modèles expérimentaux.

Modèle		Avantages	Inconvénients	Sujets à étudier par rapport à la glycation
Vertébrés	<b>Souris</b>	Génome proche de celui de l'Homme Mutants disponibles Systèmes cardiovasculaire et digestif développés Grande diversité de lignées Immunité innée et acquise	Mutations nécessaires pour certaines maladies Biomarqueurs inflammatoires pas toujours pertinents Manque de reproductibilité Microbiote éloigné de celui de l'Homme Longévité (2/3ans) Petite taille Animalerie	Métabolisme des AGE alimentaires Accumulation dans les organes Marqueurs inflammatoires et oxydants Glycation endogène physiologique Inflammation stérile systémique de bas grade Effets récepteurs dépendant Complications diabétiques
	<b>Rat</b>	Génome proche de celui de l'Homme Systèmes cardiovasculaire et digestif développés Mutants disponibles Diversité de lignées Métabolisme proche de l'Homme Reproductibilité Immunité innée et acquise	Mutations indispensables pour certaines maladies Biomarqueurs inflammatoires pas toujours pertinents Longévité (2/3ans) Petite taille Animalerie Microbiote éloigné de celui de l'Homme	Métabolisme des AGE alimentaires Marqueurs inflammatoires et oxydants Accumulation dans les organes Hypertension Marqueurs métaboliques, inflammatoires et oxydants Effets récepteurs dépendant Complications diabétiques Glycation endogène physiologique



	<b>Modèle</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Sujets à étudier par rapport à la glycation</b>
<b>Vertébrés</b>	<b>Lapin</b>	Grande taille Systèmes cardiovasculaires et digestif développés Sensible aux variations de sucres et de graisses dans la nourriture Immunité innée et acquise	Animalerie Peu de modèles génétiques Longévité (5-10 ans) Biomarqueurs inflammatoires pas toujours pertinents Microbiote éloigné de celui de l'Homme	Atteintes de l'appareil locomoteur Marqueurs inflammatoires et oxydants Athérosclérose Effets récepteurs dépendant Complications diabétiques Glycation endogène physiologique
	<b>Cochon</b>	Phylogénétiquement proche de l'Homme Organes très similaires à ceux de l'Homme (notamment système digestif) Grande taille des organes du cochon nouveau-né Immunité innée et acquise	Animalerie spécifique Très grande taille Peu de progéniture Peu de modèles génétiques disponibles Longue gestation Longévité (15-20 ans) Microbiote éloigné de celui de l'Homme	Maladies cardiovasculaires Complications diabétiques Marqueurs inflammatoires et oxydants Métabolisme des AGE alimentaires Effets récepteurs dépendant Glycation endogène physiologique
	<b>Poisson-zèbre</b>	Développement rapide Œufs transparents Grande population Dissection possible	Anatomie éloignée de celle de l'Homme Absence de certains organes Animalerie spécifique Longévité (3-5 ans) Température physiologique Microbiote simple	Complications diabétiques Athérosclérose Criblage Marqueurs inflammatoires et oxydants Métabolisme lipidique

	<b>Modèle</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Sujets à étudier par rapport à la glycation</b>
<b>Invertébrés</b>	<b>Drosophile</b>	Grand choix de mutants Longévité courte Grande population Développement rapide Dissection possible Réponse immunitaire innée	Anatomie éloignée de celle de l'Homme Absence de certains organes Température physiologique Microbiote simple	Criblage Systèmes de défenses Protéostasie Mécanismes RAGE indépendant Vieillessement Neuro-toxicité Métabolisme glucidique Oxydation
	<b>Nématode</b>	Grand choix de mutants Longévité courte Grande population Développement rapide ARN interférence très efficace Possible congélation des souches	Anatomie simple Pas d'inflammation Dissection difficile Température physiologique Microbiote très simple	Criblage Système de défenses Mécanismes RAGE indépendant Voies du vieillissement Oxydation Métabolisme glucidique
<b><i>In vitro</i></b>	<b>Cellules primaires Lignées cellulaires</b>	Issue de l'Homme ou d'animaux Possible congélation des lignées	Pas d'organisation structurale Monoculture Culture exigeante	Identification de récepteurs Voies de signalisation Type cellulaire Marqueurs inflammatoires et oxydants Sénescence
<b>Micro-organismes</b>	<b>Eucaryote</b>	Facilement modifiable génétiquement Maîtrise du modèle Possible congélation des souches	Morphologie et structure particulière Résistant à la glycation	Fonction protéique Interaction protéine-protéine Mise en évidence de sites de glycation Protéostasie Comparaison avec d'autres modifications post-traductionnelles Modulation du microbiote Systèmes de défenses
	<b>Procaryote</b>	Composant majeur du microbiote Maîtrise du modèle Possible congélation des souches	Morphologie et structure particulière Résistant à la glycation	Modulation du microbiote Dégradation par le microbiote Systèmes de défense

## **E. Perspectives d'études**

Les différents modèles expérimentaux nous permettent de répondre à un large panel de questions. Certaines questions nécessitent une approche *in vitro*, notamment pour les études signalétiques ou de transport cellulaire. Afin de répondre aux questions difficilement étudiables sur un organisme complexe ou simple, l'utilisation de modèles *in vitro* plus complexe que la culture cellulaire classique, comme les organoïdes, représente un compromis intéressant. En effet, ils représentent une portion d'organe miniature humaine, assurant une ou plusieurs de ses fonctions *in vitro*. Ce type de modèle étant récent, il est encore difficile d'en connaître les limites autres que l'absence de composés majeurs des organes.

Beaucoup de questions restent sans réponse concernant les effets de la glycation des aliments ou endogène sur la santé. Le choix hétéroclite de modèles cellulaires, microbiens et animaux pour élucider 1- les mécanismes favorisant ou inhibant la formation des AGE dans l'organisme, 2- les mécanismes d'absorption ou de métabolisation des AGE alimentaires et 3- les mécanismes physiopathologiques des AGE endogènes, permet de définir différentes stratégies scientifiques et expérimentales comme je l'ai fait pour mon projet de thèse.

# Hypothèses de travail

La formation des AGE est initiée par une liaison non-enzymatique entre une fonction amine libre d'une protéine, d'un lipide ou d'acide nucléique et le groupement carbonyle d'un sucre réducteur comme le glucose ou le fructose<sup>214,216</sup>. Différentes étapes réactionnelles, composant la réaction de Maillard ou glycation, sont ensuite nécessaires pour la formation d'AGE dont la nature dépendra de l'acide aminé, du sucre réducteur et de possibles pontages intra- ou inter-protéines. Les  $\alpha$ -DC, comme le GO ou MGO, sont formés en conditions oxydantes. Ces molécules très réactives glyquent plus rapidement les protéines que les sucres réducteurs<sup>518</sup>. Les AGE forment un groupe de molécules complexe et varié.

La glycation a été découverte suite à la formation d'AGE lors de la transformation ou ultra-transformation des aliments<sup>213</sup>. Les AGE sont également produits dans les cellules et les tissus suite à un contexte pathologique favorisant l'excès de glucose, l'inflammation et/ou l'oxydation, ou physiologique comme le vieillissement<sup>498</sup>. Contrairement à la plupart des modifications post-traductionnelles enzymatiques, aucun effet bénéfique de la glycation sur la structure et/ou la fonction des protéines n'a été décrit. Par contre, l'association entre la formation des AGE et les maladies dont la fréquence augmente avec l'âge (DT2, maladies rénales chroniques, ...) ou les maladies liées à l'âge (cataracte, dégénérescence maculaire liée à l'âge, ...) est largement documentée dans la littérature<sup>263,401,519-522</sup>.

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la glycation endogène :

- les modifications de leur structure tridimensionnelle pourraient compromettre la prise en charge optimale des protéines glyquées par le protéasome. La glycation des protéines pourrait ainsi favoriser les agrégats peptidiques ou protéiques observés lors de complications vasculaires, rénales, et neurologiques.

- les changements structuraux des protéines glyquées pourraient perturber la reconnaissance moléculaire, entraînant des dysfonctionnements cellulaires et tissulaires qui seraient aussi favorisés lorsque les AGE sont formés au niveau ou à proximité d'un site actif enzymatique.

- les AGE formés peuvent se fixer au RAGE, et activeraient plusieurs voies de signalisation générant un état inflammatoire et oxydant délétère pour les cellules et les tissus, favorisant le vieillissement et les complications de certaines maladies chroniques<sup>310,356,523</sup>. Les AGE alimentaires interagiraient également avec RAGE même si les voies identifiées permettant leur absorption intestinale ne sont pas compatibles avec ce mécanisme physiopathologique : RAGE ne fixe pas les AGE libres<sup>305</sup>.

L'interaction entre les AGE et RAGE semble être contrôlée par d'autres récepteurs des AGE : le complexe AGE-R et différents récepteurs *scavenger*, comme RAGE d'ailleurs : MSR1, CD36, LOX-1 et FEEL-1/2<sup>332,336,355,524</sup>. Ces récepteurs permettraient l'élimination des AGE par endocytose et dégradation de ces derniers. La fixation des AGE au complexe AGE-R entraînerait également l'inhibition de l'expression et de l'activation de RAGE<sup>211</sup>. Plusieurs études montrent cependant que ces récepteurs pourraient également intervenir dans la physiopathologie des AGE, notamment dans les processus athérogènes, thrombotiques et fibrosants<sup>330,346,525</sup>.

A ce jour, les mécanismes contrôlant les effets physiopathologiques des AGE ne sont pas complètement décrits, mais il semblerait que la concentration d'AGE ainsi que le nombre de leurs différents récepteurs soient déterminants. L'étude de ces mécanismes est difficile à appréhender chez les mammifères, et nécessiterait l'utilisation de modèles animaux dits simples comme le ver *C. elegans*. La facilité de culture et la durée de vie courte (environ 3 semaines) de cet organisme ne sont pas ses seuls atouts comme modèle d'étude du vieillissement<sup>505</sup>. Les autres avantages de ce modèle sont la connaissance parfaite de son cycle de vie et de son génome (plus de 80 % d'orthologues de gènes humains participant aux voies de signalisation)<sup>526</sup>; sa simplicité anatomique minimisant les paramètres à prendre en compte; les outils moléculaires disponibles permettant de moduler facilement et efficacement l'expression de ses gènes ou d'exprimer des protéines hétérologues et sa transparence, permettant une étude microscopique *in vivo*.

La durée de vie courte de *C. elegans* et ses conditions de culture dont la température (entre 16°C et 25°C) ne favorisent pas la glycation endogène physiologique.

Il est donc aisé d'objectiver chez cet organisme les conditions favorisant la glycation endogène, même faible. *C. elegans* ne possède pas d'orthologue du gène humain *AGER* qui code RAGE mais il possède les orthologues de la plupart des autres récepteurs des AGE, permettant 1- de définir les effets des AGE qui sont indépendants de RAGE et 2- caractériser le(s) rôle(s) des autres récepteurs des AGE. Comme *C. elegans* n'a pas d'inflammation, ce modèle pourrait permettre de mettre en évidence les effets de l'oxydation sur la glycation et les complications générées par cette dernière. Les effets des processus oxydants sont en effet difficilement différenciables des processus inflammatoires chez les mammifères. *C. elegans* a d'ailleurs le système de métabolisation des  $\alpha$ -DC qui favorisent la glycation endogène<sup>371,527</sup>. Ce modèle présente néanmoins certains inconvénients, pris en compte dans l'interprétation des résultats, qui seront soulignés dans la discussion.

Nous avons donc initié un travail sur *C. elegans* pour 1- évaluer la digestion intestinale et l'absorption des AGE alimentaires et 2- analyser la formation d'AGE endogènes en condition riche en glucose. Nous avons principalement travaillé sur la CML, un des AGE exogènes et endogènes les plus étudiés.

# Travaux personnels

## I. Digestion et absorption intestinale des AGE alimentaires

Plusieurs études cliniques ont analysé les effets des AGE alimentaires sur la santé humaine<sup>435,438,440,443,446,450</sup>. Les résultats de ces études ne sont pas tous concordants. Il est donc difficile de conclure sur les mécanismes physiopathologiques possibles des AGE alimentaires sur la santé humaine. Globalement, ces AGE seraient des facteurs aggravants chez les personnes âgées et chez les personnes atteintes de certaines pathologies, notamment de troubles métaboliques et hormonaux et de maladies rénales chroniques. Dans ces populations, un régime à faible teneur en AGE peut diminuer les concentrations plasmatique et urinaire d'AGE ainsi que les marqueurs inflammatoires, de stress oxydant et métaboliques (ex. résistance à l'insuline, cholestérol, ...)<sup>435,436,440,441</sup>. Cependant, certaines études ont montré que la concentration de certains de ces marqueurs, voire aucun, n'est amélioré par la restriction en AGE<sup>441,443,446</sup>. Chez les sujets sains, bien que certaines études aient montré le contraire, les AGE alimentaires ont moins d'impact sur l'homéostasie métabolique et l'inflammation; certains régimes riches en AGE n'ont même pas augmenté la concentration de ces produits dans les plasmas et les urines<sup>427,433,448</sup>. Les AGE seraient efficacement éliminés chez ces personnes.

Les études cliniques présentent plusieurs limites qui peuvent perturber leur interprétation et surtout les comparaisons entre les différentes études. La taille des échantillons est évidemment une limite majeure pour certaines d'entre elles. Le suivi alimentaire est souvent à la discrétion des sujets, ce qui rend difficile le contrôle du régime réellement suivi. Différents types de régimes pauvres ou riches en AGE ont été utilisés, ne permettant alors qu'une comparaison limitée entre les études. Ces régimes présentent souvent d'autres différences nutritionnelles que la quantité d'AGE. La transformation des aliments nécessaire à la formation des AGE, y compris le chauffage, peut altérer les nutriments essentiels à la santé<sup>428</sup>. Divers AGE sont formés et ils n'ont peut-être pas les mêmes effets biologiques, des effets complémentaires ou des effets antagonistes. De plus, les différentes méthodes analytiques de dosage des AGE ne donnent pas de mesures consensuelles pour certaines matrices alimentaires<sup>229</sup>.

Les études expérimentales, réalisées principalement chez la souris, ont confirmé l'induction d'inflammation, d'oxydation et de complications métaboliques par les AGE,

même chez les animaux sains<sup>422,458,460,461,528</sup>. Cependant, comme pour les études cliniques, l'utilisation de régimes alimentaires différents et de méthode de glycation pouvant altérer certains aliments complique les comparaisons intra- et inter-études. Les précurseurs des AGE tels que les  $\alpha$ -DC, formés au cours de la transformation des aliments, peuvent également induire une glycation endogène, dont l'impact physiopathologique peut être faussement attribué aux AGE alimentaires.

Afin de travailler avec des AGE mieux définis en termes de quantité et de structure, diverses études expérimentales ont utilisé des suppléments protéiques tels que la caséine, les protéines de soja, l'ovalbumine ou la BSA, glyquée ou non, ajoutés aux aliments conventionnels pour animaux ou administrés par gavage<sup>468,529-531</sup>. Cependant, le choix du supplément protéique est délicat et peut entraîner des biais d'analyse. En effet, de nombreux compléments protéiques, qui ne font pas partie de l'alimentation classique des animaux, ont des propriétés physiologiques spécifiques<sup>532,533</sup>. La glycation de ces compléments peut altérer leur conformation structurelle et inhiber leurs activités biologiques, avec un possible impact physiologique indépendant de la consommation des AGE.

L'activation de RAGE est un des mécanismes physiopathologiques des AGE alimentaires les plus suspectés<sup>212</sup>. Les AGE alimentaires et endogènes auraient donc des mécanismes physiopathologiques communs. Cependant, en dehors de l'intestin, l'activation directe du récepteur par les AGE alimentaires semble peu probable car seuls les AGE libres passeraient la barrière intestinale<sup>418</sup>, alors que seuls les peptides glyqués de grande taille se lient à RAGE et l'activent<sup>305</sup>. D'autres voies d'absorption intestinale sont suggérées, notamment la transcytose et la paracytose, qui permettraient le passage de peptides glyqués, mais aucun travail ne les a mises en évidence. Face à ces différentes données et hypothèses sur le devenir des AGE alimentaires *in vivo* et leur impact sur la santé, nous avons initié l'évaluation de la digestion et de l'absorption intestinale de ces AGE chez *C. elegans*, modèle simple possédant un tube digestif complet.

Une première étude, publiée en décembre 2021 (cf. Résultats I. Digestion et absorption intestinale des AGE alimentaires)<sup>534</sup>, dans laquelle nous avons glyqué la nourriture des vers (*E. coli*, souche OP50), est complétée par un travail en cours (**Annexe I**), où nous avons ajouté un supplément protéique (BSA) glyqué à la nourriture des vers. Le but de cette démarche expérimentale était de comparer les effets de macronutriments essentiels glyqués à ceux d'un complément nutritionnel glyqué. Pour les aliments glyqués,






les bactéries ou la BSA ont été modifiées avec de l'acide glyoxylique pour produire majoritairement de la CML. Nous avons effectué différentes analyses immunologiques avec un anticorps anti-CML pour la quantification relative de la CML ingérée et la localisation de cet AGE dans l'intestin des vers. L'expression relative des gènes codant différents processus biologiques tels que la réponse à différents stress et la digestion intestinale a été déterminée. Le développement physiologique des vers et leur longévité ont été analysés.

Nos résultats ont mis en évidence une nouvelle voie d'absorption intestinale de la CML alimentaire, l'endocytose. Ce processus n'est pas spécifique de la source des protéines glyquées mais de la CML. L'expression d'orthologues de certains récepteurs des AGE, notamment les récepteurs de classe B (CD36), augmente en présence de protéines glyquées, suggérant un possible rôle de ces récepteurs dans l'endocytose. L'exposition des vers à la CML alimentaire, principalement les bactéries glyquées, a induit une augmentation de la réponse transcriptionnelle, reflétant les stress oxydant, carbonylé et à l'accumulation de protéines mal repliées. Un défaut de reproduction et une augmentation de la longévité ont été observés chez les vers incubés avec les bactéries glyquées alors qu'une réduction de la longévité est induite par la BSA glyquée.

Article

# Exposure of *Caenorhabditis elegans* to Dietary N $\epsilon$ -Carboxymethyllysine Emphasizes Endocytosis as a New Route for Intestinal Absorption of Advanced Glycation End Products

Constance Dubois <sup>1</sup>, Rachel Litke <sup>1</sup> , Stéphane Rianha <sup>1</sup>, Charles Paul-Constant <sup>1</sup> , Jean-Marc Lo Guidice <sup>2</sup>, Solenne Taront <sup>1</sup>, Frédéric J. Tessier <sup>1</sup> , Eric Boulanger <sup>1</sup> and Chantal Fradin <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167-RID-AGE-Facteurs de Risque et Déterminants Moléculaires des Maladies Liées au Vieillessement, F-59000 Lille, France; [constance.dubois@univ-lille.fr](mailto:constance.dubois@univ-lille.fr) (C.D.); [rachel.litke@mssm.edu](mailto:rachel.litke@mssm.edu) (R.L.); [st.rianha@gmail.com](mailto:st.rianha@gmail.com) (S.R.); [charles.paul-constant@univ-lille.fr](mailto:charles.paul-constant@univ-lille.fr) (C.P.-C.); [solenne.taront@univ-lille.fr](mailto:solenne.taront@univ-lille.fr) (S.T.); [frederic.tessier@univ-lille.fr](mailto:frederic.tessier@univ-lille.fr) (F.J.T.); [eric.boulanger@univ-lille.fr](mailto:eric.boulanger@univ-lille.fr) (E.B.)

<sup>2</sup> Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, ULR 4483-IMPECS-IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé Humaine, F-59000 Lille, France; [jean-marc.lo-guidice@univ-lille.fr](mailto:jean-marc.lo-guidice@univ-lille.fr)

\* Correspondence: [chantal.fradin@univ-lille.fr](mailto:chantal.fradin@univ-lille.fr); Tel.: +33-320-623-486



**Citation:** Dubois, C.; Litke, R.; Rianha, S.; Paul-Constant, C.; Lo Guidice, J.-M.; Taront, S.; Tessier, F.J.; Boulanger, E.; Fradin, C. Exposure of *Caenorhabditis elegans* to Dietary N $\epsilon$ -Carboxymethyllysine Emphasizes Endocytosis as a New Route for Intestinal Absorption of Advanced Glycation End Products. *Nutrients* **2021**, *13*, 4398. <https://doi.org/10.3390/nu13124398>

Academic Editor: Armin Alaedini

Received: 29 October 2021

Accepted: 30 November 2021

Published: 8 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The impact of dietary advanced glycation end products (dAGEs) on human health has been discussed in many studies but, to date, no consensual pathophysiological process has been demonstrated. The intestinal absorption pathways which have so far been described for dAGEs, the passive diffusion of free AGE adducts and transport of glycated di-tripeptides by the peptide transporter 1 (PEPT-1), are not compatible with certain pathophysiological processes described. To get new insight into the intestinal absorption pathways and the pathophysiological mechanisms of dAGEs, we initiated an in vivo study with a so-called simple animal model with a complete digestive tract, *Caenorhabditis elegans*. Dietary bacteria were chemically modified with glyoxylic acid to mainly produce N $\epsilon$ -carboxymethyllysine (CML) and used to feed the worms. We performed different immunotechniques using an anti-CML antibody for the relative quantification of ingested CML and localization of this AGE in the worms' intestine. The relative expression of genes encoding different biological processes such as response to stresses and intestinal digestion were determined. The physiological development of the worms was verified. All the results were compared with those obtained with the control bacteria. The results revealed a new route for the intestinal absorption of dietary CML (dCML), endocytosis, which could be mediated by scavenger receptors. The exposure of worms to dCML induced a reproductive defect and a transcriptional response reflecting oxidative, carbonyl and protein folding stresses. These data, in particular the demonstration of endocytosis of dCML by enterocytes, open up new perspectives to better characterize the pathophysiological mechanisms of dAGEs.

**Keywords:** advanced glycation end products (AGEs); N $\epsilon$ -carboxymethyllysine (CML); *Caenorhabditis elegans*; intestine; absorption; enterocyte; endocytosis; lysosome; digestion

## 1. Introduction

Dietary advanced glycation end products (dAGEs) are formed during cooking as well as subsequent food processing, which can impact various factors such as the pH and the availability of water and transition metals, promoting glycation [1]. Given the number of alimentary products containing AGEs, many reports have rightly questioned the impact of dAGEs on human health [2,3]. Several observational and interventional studies, including parallel and crossover trials for the latter, were thus carried out.

In short, dAGEs would be aggravating factors in older adults and in people with certain pathologies, in particular metabolic and hormonal disorders and chronic kidney

diseases [4–11]. In these populations, a low-AGE diet can decrease plasma and urinary AGEs levels together with inflammatory, oxidative stress and metabolic (e.g., insulin resistance, cholesterol, . . . ) markers. However, studies have shown that not all, if any, markers are improved by dAGE restriction [3,10,12]. In healthy subjects, although some studies have shown the opposite [13], dAGEs have less impact on metabolic homeostasis and inflammation [14]; some diets rich in dAGEs did not even increase the levels of these products in plasma and urine [15,16]. The dAGEs would be effectively eliminated in those people.

Clinical studies have several limitations which do not allow a flawless interpretation. The size of the samples for some clinical studies is obviously a major limitation. Food monitoring of subjects is often at the discretion of the latter, making it difficult to control the diet actually followed. Different kinds of low/high-AGE diets were used in the various studies [3], allowing limited inter-study comparison. Diets low and high in AGEs often have other nutritional differences than the amount of dAGEs. The food processing necessary for the formation of AGEs, including heating, can alter essential nutrients for health [17]. A variety of AGEs are formed and it is unclear whether all of these products have the same complementary or adverse biological impacts [12,18,19]. In addition, the different analytical methods for assaying AGEs do not give consensual measurements for certain food matrices [18].

Some experimental models, mainly murine, of renal insufficiency or metabolic disorders have confirmed the induction of inflammation and metabolic complications by dAGEs [20–22]. The pathophysiological effects of dAGEs were also observed in healthy animals, where they promote oxidative and inflammatory processes and impair metabolic homeostasis [23]. However, as with clinical studies, the use of different diets from one experimental study to another complicates the inter-study comparisons. Glycation of foods has indeed been induced by various processes including heating [24], irradiation [25] or addition of dicarbonyl products [26]. All these processes can alter certain nutrients and can therefore bias the comparison of glycated vs. non-glycated diets. The precursors of AGEs, such as dicarbonyl products formed during food processing [27], can induce endogenous glycation, the pathophysiological impact of which can be falsely attributed to dAGEs.

In order to work with better defined dAGEs in terms of quantity and structure, various experimental studies have used protein supplements such as casein, soy protein, ovalbumin or bovine serum albumin (BSA), glycated vs. non-glycated, added to conventional animal food or given by oral gavage [28–31]. However, the choice of protein supplement is delicate and can lead to analytical bias. Indeed, many protein supplements, which are not part of the classic diet of animals have specific physiological properties [32,33]. The glycation of these supplements can alter their structural conformation and inhibit their biological activities, with a possible health impact that is independent of dAGE consumption.

The implication of dAGEs on health would depend on different mechanisms including their interaction with the receptor for advanced glycation end products (RAGE), which is certainly one of the most described [34]. Dietary or endogenous AGEs would thus have common pathophysiological mechanisms. Outside of the intestine, direct activation of the receptor by dAGEs seems unlikely because only free AGE adducts would pass the intestinal barrier, while only larger glycated peptides bind to and activate RAGE [35,36]. It cannot be ruled out that the accumulation of larger glycated peptides in the intestine, due, among other things, to the slower digestion of glycated proteins, could lead to their transcytosis [37]. Likewise, some chronic diseases and other conditions induce the rupture of tight junctions in the intestinal epithelium [38], leading to possible paracellular transport of these glycated peptides. To date, although the transport of glycated peptides through transcytosis or the paracellular absorption pathway is not excluded, no study has demonstrated it. Only the passive diffusion and absorption of glycated di-tripeptides, and more rarely free dAGEs, by the peptide transporter 1 (PEPT-1) have been demonstrated [39,40]. Then the intracellular digestion of the di-tripeptides allows the release of dAGEs which can diffuse throughout the body [41].

The promotion of food allergies by ingestion of dAGEs is suggested in a growing number of reviews [42,43]. On the one hand, structural modification and incomplete digestion of glycosylated allergenic proteins could promote the formation of neo-allergens, which is a source of food allergy. On the other hand, although no study has yet shown it, RAGE, which is involved in pulmonary allergies via the induction of a T helper type 2 (TH2) response after interaction with certain alarmins [44], may be involved in the allergenic effects of AGEs. The AGE-RAGE axis, which seems to have a key role in the pathogenicity of endogenous and dAGEs, is regulated by various factors including other AGE receptors. Although being suspected of scavenging AGEs by disposing of them, these receptors, such as cluster of differentiation (CD) 36, also known as scavenger receptor class B member 2 (SR-B2) and one member of the AGE receptor complex (AGE-R), AGE-R1/ oligosaccharyl transferase 48 kDa subunit (OST-48), could be involved in the pathophysiology of dAGEs as for endogenous AGEs [45,46]. A recent experimental study has demonstrated an alternative pathophysiological mechanism of dAGEs, which promotes inflammation and kidney injury [47]. In this study, the heat-induced AGEs increased intestinal permeability and induced systemic innate immune complement activation.

Faced with these various promising but incomplete data on the fate of dAGEs in vivo and their impact on health, we aimed to use a so-called simple organism with a complete digestive tract, the nematode *Caenorhabditis elegans*, to initiate the evaluation of intestinal digestion and the uptake of dAGEs with the resulting physiological consequences. We exposed the worms to their classic laboratory food, *Escherichia coli* bacteria, glycosylated or non-glycosylated. For glycosylated food, bacteria were chemically modified with glyoxylic acid to mainly produce *N* $\epsilon$ -carboxymethyllysine (CML) [48]. We performed different immunotechniques using an anti-CML antibody for relative quantification of ingested CML and localization of this AGE in the worms' intestine. The relative expression of genes encoding different biological processes such as response to different stresses and intestinal digestion were determined. The physiological development of the worms was verified. Our results highlighted a new route of intestinal absorption of dietary CML (dCML), endocytosis, which could be receptor-mediated. Exposure of worms to dCML induced a reproductive defect and a transcriptional response reflecting oxidative, carbonyl and protein folding stresses.

## 2. Materials and Methods

### 1. Nematode and Bacterial Strains

The Bristol N2 wild type strain and the OP50 *E. coli* feeding strain were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (<https://cgc.umn.edu>, accessed on 6 December 2021).

### 2. Culture of OP50 Strain and Maintenance of *C. elegans*

OP50 bacteria was grown in lysogeny broth medium (LB: tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L and NaCl 10 g/L) at 37 °C with stirring. Worms were maintained at 20 °C on nematode growth medium (NGM: agar 20 g/L, peptone 2 g/L, NaCl 41 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pH 6.0, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM and cholesterol 5 mg/L) agar plates seeded with OP50 bacteria. Before each experiment, eggs were harvested from gravid worms by lysis with sodium hypochlorite. Young adult worms were then obtained from synchronized L1 larvae after culture of eggs for 20 h in M9 buffer (NaCl 86 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM and MgSO<sub>4</sub> 1 mM).

Except for maintenance and larval development, feeding bacteria were 10 times concentrated and heat-inactivated 30 min at 65 °C.

### 3. Preparation of CML-Bound BSA and CML-Bound Bacteria

CML-bound BSA (BSA-CML) was prepared by reaction of glyoxylic acid with BSA, as described previously [29]. Briefly, BSA was incubated in 0.2 M phosphate buffer pH 7.8 containing 60 mM of glyoxylic acid and 180 mM of reducing agent, sodium cyanoborohydride. Heat-inactivated OP50 bacteria were glycosylated using the same method with either

20 mM or 60 mM of glyoxylic acid and 60 mM or 180 mM of sodium cyanoborohydride, respectively. Control BSA or heat-inactivated bacteria were incubated under the same conditions without glyoxylic acid. After 17 h of incubation at 37 °C, the 2 BSA preparations were dialyzed against ultrapure water and the bacteria were washed several times with M9 buffer. Glycation of BSA and bacteria was confirmed by western blot, and for bacteria only, by immunofluorescence with an anti-CML antibody (ab27684, Abcam, Paris, France).

#### 2.4. Immunofluorescence of Control and CML-Bound Bacteria

Bacteria were fixed with buffered formaldehyde 4% pH 7.0 and washed in phosphate buffer saline (PBS: 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0018 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, 0.137 M NaCl and 0.0027 M KCl) prior to being immobilized on poly-L-lysine coated glass slide. The bacteria were then permeabilized with absolute ethanol. After blocking with 0.1% BSA in PBST (PBS containing 0.05% Tween), bacteria were incubated 2 h at room temperature with anti-CML antibody diluted 1:200 in PBST. After several washes, bacteria were incubated 2 h at room temperature with Alexa Fluor 568-conjugated antibody (anti-rabbit IgG, Molecular probes, Eugene, OR, USA) and Alexa Fluor 488-conjugated concanavalin A or Con A (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) diluted 1:1000 and 1:100 in PBST containing 2.5 g/L of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

Slides were examined under a ZEISS Axiophot fluorescent microscope using Adobe Image Ready CS software (Adobe Systems France SAS, Paris, France).

#### 5. Pepsin Digestion of Control and CML-Bound Bacteria and BSA

BSA and bacteria were resuspended in PBS at a protein concentration of 2 g/L. HCl was added to the BSA or bacteria solutions to a final concentration of 0.04 N. Pepsin (Sigma Aldrich Chimie SARL, Saint-Quentin-Fallavier, France) was added using enzyme:protein ratio of 1:20. After 8 h of incubation at 37 °C, reactions were stopped by heating at 95 °C for 10 min and analyzed by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) with 12% acrylamide as previously described [49,50] and western blot with anti-CML antibody as described later.

#### 6. Exposure of Worms to dCML

For each condition, day 0 adult worms were grown several days at 20 °C in 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flask with vented cap (approximately 1000 worms/mL) containing 10 mL liquid synthetic medium (S medium: 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.0, 100 mM NaCl, 1 M potassium citrate pH 6.0, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium, 1 mM FeSO<sub>4</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 1 mM CuSO<sub>4</sub> and 5 mg/L cholesterol) supplemented with 50 µM 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR) to prevent the reproduction of the worms.

For experiments with protein supplement, S medium contained heat-inactivated bacteria and 1.6 mg/mL CML-bound BSA or control BSA.

For experiments with dietary bacteria, S medium was supplemented with CML modified bacteria, which were glycated with 20 or 60 mM glyoxylic acid (G20 and G60, respectively), or control bacteria (G0).

For some experiments, S medium was supplemented with both G0 and G60 bacteria at different G0:G60 ratio.

Before adding the worms to the different media, 50 µL of each medium was taken for quantification of CML by dot blot.

At different given times, 150 µL or 1 mL of worms were taken for each analysis.

To analyze the formation of progeny after exposure of the worms to dCML or to the control, after 24 h of culture, 200 µL of worms from each condition were taken and extensively washed with M9 buffer. Worms were resuspended in 2 mL of their respective media without FUdR and grown at 20 °C in 6-well plates. After 2 days of incubation, the number of eggs and larvae per worm was determined.

All the experiments were carried out in 3 biological replicates.



### 7. Whole Protein Extraction and Western and Dot Blotting

The soluble and insoluble protein fractions of the bacteria were obtained after grinding in the lysis buffer (100 mM Tris pH8.0, 140 mM NaCl, 20 mM EDTA and 1% SDS with protease inhibitors, Roche, Mannheim, Germany) with glass beads (<106 µm; Sigma Aldrich Chimie SARL, Saint-Quentin-Fallavier, France) using a homogenizing bead mill (Fisherbrand Bead Mills, Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) at 4 m/s, 3 times 10 s, 4 cycles. After centrifugation at 15,000 × g for 15 min at 4 °C, the supernatant containing the soluble fraction was separated from the insoluble pelleted fraction. The protein fractions (2 µg of each fraction) were analyzed by SDS-PAGE with 12% acrylamide as described before [49,50].

Total extracts of *C. elegans* were obtained by heating worms 10 min at 95 °C in lysis buffer (100 mM Tris pH 8.0, 140 mM NaCl, 20 mM EDTA and 5% SDS with protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany) and 10 µg of each extract were analyzed by SDS-PAGE with 10% acrylamide.

Membranes were probed with anti-CML and, for worms' extracts, anti-actin (A2066, Merck, Sigma Aldrich Chimie SARL, Saint-Quentin-Fallavier, France) antibodies diluted 1:5000 and 1:2500, respectively, and then a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Danvers (MA), USA) diluted 1:5000. Enzyme activity was detected with Clarity western ECL substrate (BioRad, Marne-la-Coquette, France). The chemiluminescent signals were detected using the Fusion FX Spectra system (Vilber, Collégien, France).

For dot blotting of worms' extracts, 0.2 µg of each worms' protein extract was spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. Membranes were probed and detected as described for western blotting. For each dot, CML signal intensity was measured with ImageJ software and was normalized to actin.

For the semi-quantification of CML in culture media, an equal volume of each medium was mixed with the worm's lysis buffer. After 10 min of heating at 95 °C, 1 µL of each solution was spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. Five BSA-CML standards with known increasing concentration of CML were used to estimate the concentration of CML in the culture media. Each standard was diluted in S medium, treated like the different culture media and similarly spotted. Membranes were stained with ponceau S before being probed with anti-CML antibody and detected as described above. For each dot, CML signal intensity was measured with ImageJ software, normalized to ponceau S staining and compared to the BSA-CML standards. The concentration of CML in the culture media was expressed in mM of CML equivalent from BSA-CML.

### 8. Isolation of Total RNAs and Gene Expression Analysis

At the different analysis times, the worms' pellets were quickly frozen in liquid nitrogen. The worms were then homogenized in Trizol (Ambion, Huntingdon, UK) with acid-washed glass beads (425–600 µm; Sigma Aldrich Chimie SARL, Saint Quentin Fallavier, France) using a homogenizing bead mill at full speed (6 m/s), 3 times 10 s, 3 cycles. Total RNAs were extracted as previously described [51]. RNAs were treated with DNaseI (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) prior to being reverse transcribed to cDNA (High-capacity cDNA reverse transcription kits, Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France).

Quantitative real-time PCR was performed using PowerUp SYBR Green 2X Master Mix (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). Gene levels were normalized to 2 housekeeping genes that encode cell division cycle protein 42 (CDC-42) and peroxisomal membrane protein 3 (PMP-3) and relative expression was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. The relative expression of genes was analyzed by comparing the condition with dCML to the same condition without dCML. Primers are listed in Table S1.

### 9. Immunohistochemistry

The Bouin's tube fixation protocol with slight modifications was followed [52]. Briefly, for each condition, approximately 150 worms were washed with M9 buffer and fixed in an

equal volume of Bouin's solution and methanol with 0.125 M dithiothreitol (DTT). Worms were then permeabilized by a rapid freeze-thaw cycle followed by repeated incubations in borate/triton buffer (0.01 M DTT, 1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.5 M NaOH and 0.5% Triton X-100). After blocking with BSA 0.1% in PBS with 0.5% Triton X-100 and 1 mM EDTA disodium, worms were incubated overnight at room temperature with primary antibodies diluted in blocking solution: anti-CML 1:200, anti-IFB-2 (MH33, DSHB, Iowa city, IA, USA) 1:40, anti-RME-1 (RME1, DSHB) 1:10, anti-DYN-1 (DYN1, DSHB) 1:10 and anti-LMP-1 (LMP1, DSHB) 1:10. After several washes, worms were incubated 2 h at room temperature with secondary antibodies conjugated to either fluorescein isothiocyanate, FITC (anti-rabbit IgG, Molecular probes, Eugene, OR, USA) or Alexa Fluor 568 (anti-mouse IgG, Molecular probes) diluted respectively 1:200 and 1:1000 in blocking buffer containing 2.5 µg/µL of DAPI (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). For Con A staining, worms were incubated 2 h at room temperature with Alexa Fluor 488-labelled Con A diluted 1:100 in blocking buffer.

Slides were examined under a ZEISS spinning disk confocal microscope using ZEN 3.3 software (Zeiss, Marly-le-Roi, France).

### 2.10. Statistical Analyses

Statistical analyses were generated by bioinformatics software, GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Gene expression analysis: all experiments were performed in 2 technical replicates and 3 biological replicates and the results were expressed as mean ± standard deviation (SD). Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the means were determined by the Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparisons test.

Dot blotting analysis: all experiments were performed in 3 biological replicates and the results were expressed as mean ± SD. Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the means were determined by 2-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test.

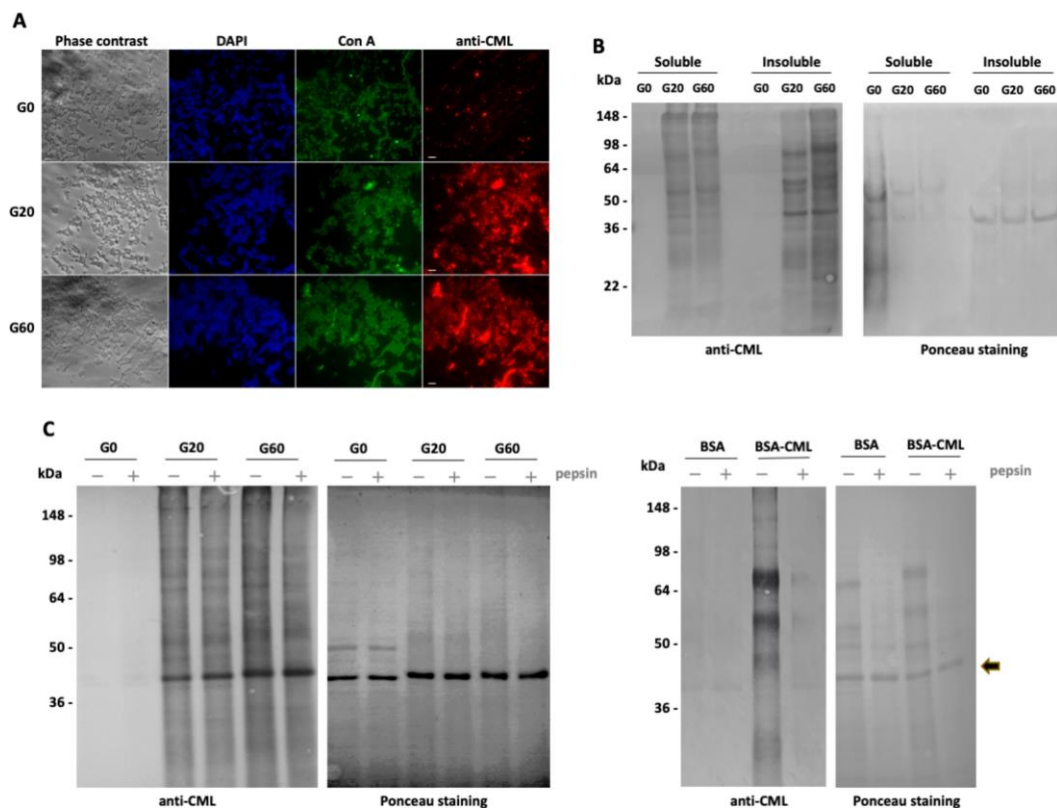
Progeny analysis: all experiments were performed in 3 biological replicates and the results were expressed as mean ± SD. Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the means were determined by Mann-Whitney test.

## 3. Results

### 1. Glycation of Bacteria and Detection of CML Epitopes

Bacteria being the main food of the worms in the laboratory, we decided to feed *C. elegans* with this glycated or non-glycated food. In order to reduce the diversity of the AGEs formed and thus to facilitate the interpretation of the results, glyoxylic acid was chosen as the glycating agent. Treatment of proteins with glyoxylic acid mainly modifies lysine to CML, which is one of the most studied major endogenous and exogenous AGEs [48]. In adulthood, *C. elegans* can be grown with either living or dead bacteria. The use of dead bacteria limits the side effects linked to bacterial metabolism. Before glycation, the bacteria were heat inactivated for 30 min at 65 °C. Two concentrations of glyoxylic acid were used in order to obtain bacteria with different rates of CML.

We first confirmed the glycation of the bacteria by immunofluorescence with an anti-CML antibody. As expected, only bacteria treated with glyoxylic acid, regardless of its concentration, contained CML epitopes (Figure 1A). In contrast, all bacteria, glycated or non-glycated, were stained with Con A. This lectin is specific for α-D-mannose and α-D-glucose. In *E. coli*, it mainly recognizes exopolysaccharides. In order to have a better overview of the bacterial proteins that were glycated, we lysed the bacteria with a bead mill homogenizer and analyzed the soluble and insoluble fractions by western blot. Only the proteins from bacteria treated with glyoxylic acid had CML epitopes (Figure 1B). Several soluble and insoluble proteins were glycated, confirming homogeneous glycation of the bacteria with glyoxylic acid. As expected, more CML epitopes were detected on proteins from G60 bacteria, which were glycated with the highest amount of glyoxylic acid (60 mM).



**Figure 1.** Glycation of bacteria and control of membrane and parietal integrities. (A) Indirect immunofluorescence assays were performed on bacteria, which were pretreated with 0 mM (G0), 20 mM (G20) or 60 mM (G60) of glyoxylic acid, using anti-*N* $\epsilon$ -carboxymethyllysine (CML) antibody and lectin concanavalin A (Con A). Bacteria DNA was stained with DAPI. For each type of bacteria, phase contrast and fluorescence micrographs with the mentioned DNA-binding probe, lectin or antibody are shown. Scale bars = 2  $\mu$ m. (B) Western blot of soluble and insoluble protein extracts from G0, G20 or G60 bacteria was detected with anti-CML antibody. Before immunostaining, the membrane was stained with ponceau S for loading control. (C) Western blots of extracts from G0, G20 or G60 bacteria or non-glycated bovine serum albumin (BSA) or glycated BSA (BSA-CML) were stained with anti-CML antibody. Before electrophoresis, non-glycated and glycated bacteria or BSA were incubated without (–) or with (+) pepsin in acidic solution. Before immunostaining, the membranes were stained with ponceau S for loading control. The acidic condition induced the proteolysis of BSA with fragments of different sizes detectable after electrophoretic separation. One of these fragments, marked with an arrow, is known to be resistant to pepsin digestion [53]. All results are representative of 3 independent experiments.

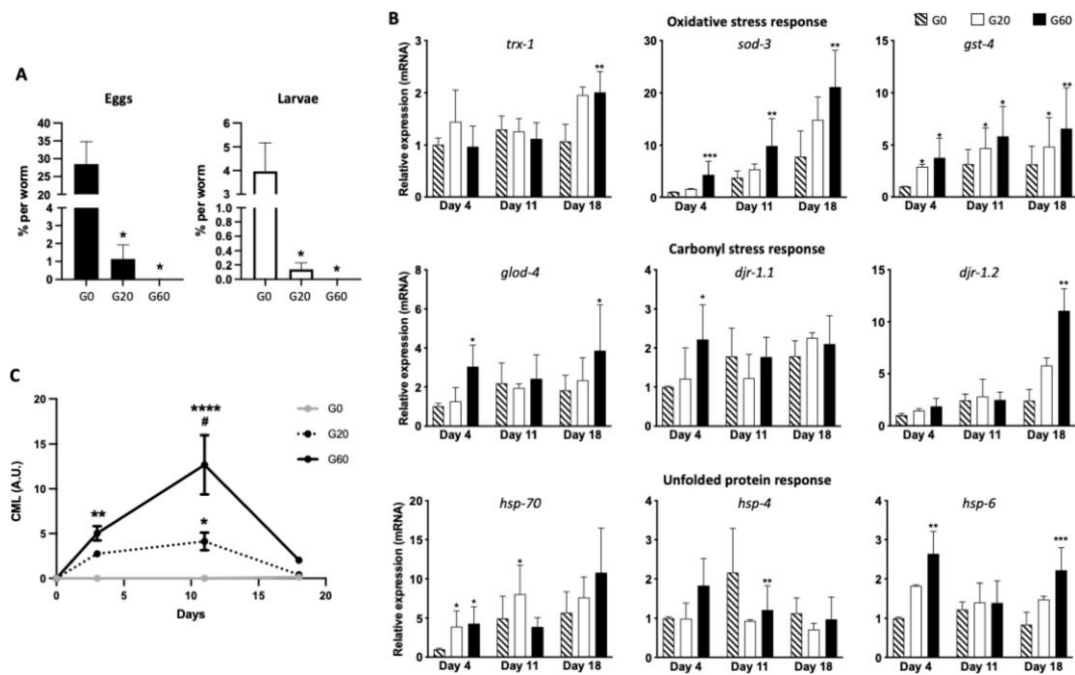
### 3.2. Analysis of the Integrity of CML-Bound Bacteria

Before feeding the worms with the inactivated bacteria, glycated or not, we wanted to verify that the glycation of the bacteria did not lead to a strong loss of outer membrane and cell wall integrities. Immunofluorescence analyses, which were carried out with DAPI, showed that glycated and non-glycated bacteria had a similar staining of their DNA, excluding the possibility of leakage of the latter following glycation (Figure 1A). Additional analyses were performed to assess the susceptibility of bacteria to pepsin digestion. The outer membrane and the cell wall of the bacteria effectively prevent the passage of enzymes to digest proteins. Digestion of bacterial proteins by proteases seems unlikely without alteration of the cell wall and membranes of the bacteria, as when these are ground in the pharynx of *C. elegans*. Unlike BSA, glycated or not, used as a control, almost no bacterial protein was degraded by pepsin, whatever the glycation of the bacteria (Figure 1C). These results suggest that the integrity of heat-inactivated bacteria was maintained after glycation.



### 3.3. Glycated Bacterial Proteins Were Ingested by the Worms and Impaired Their Reproduction

We exposed young adult worms to diets containing either non-glycated or glycated bacteria. Media with G20 and G60 contained  $0.975 \text{ mM} \pm 0.053$  and  $1.252 \text{ mM} \pm 0.096$  of CML equivalent, respectively. Before studying the ingestion and digestion of dCML by *C. elegans*, we ensured that our diets rich in CML did not induce toxicity in the worms. By maintaining the culture of the worms up to 18 days, we found that dCML had no drastic effect on the survival of the worms at least until this incubation time (data not shown). On the other hand, we noticed that the worms incubated with the 2 glycated diets contained fewer embryos. We therefore analyzed in more detail the formation of progeny after exposure of the worms to dCML or to the control. After 24 h of culture in the presence or absence of dCML, the worms were incubated for 2 days in their respective media without FUdR. The progeny, eggs and larvae, present in the media were counted. No offspring was found in the medium containing the most dCML, G60 (Figure 2A). Worms incubated in medium with less glycated bacteria (G20) produce 96% less eggs and larvae than those incubated in medium without CML. These results suggest that diets rich in CML have a significant effect on the reproduction of worms.



**Figure 2.** Effects of dietary *N*-carboxymethyllysine (dCML) exposure on worms' progeny, transcriptional response to different stresses and levels of CML epitopes inside the worms. (A) Young adult worms were fed with bacteria, which were pretreated with 0 mM (G0), 20 mM (G20) or 60 mM (G60) of glyoxylic acid, in medium containing 5-fluoro-2<sup>d</sup>deoxyuridine (FUdR). After 24 h of incubation, worms were grown for 2 days in the same conditions without FUdR. Number of eggs and larvae per worm present in the media were determined. Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) of 3 biological replicates. \*  $p \leq 0.05$  G20 or G60 vs. G0 (Mann–Whitney test). (B) Young adult worms were fed for 4, 11 and 18 days with G0, G20 or G60 bacteria. Relative expression of gene coding for antioxidant, carbonyl stress and unfolded protein responses were analyzed by comparing all the conditions to the G0 at day 4. Data were expressed as means  $\pm$  SD of three biological replicates. The *cdc-42* and *pmp-3* genes were used to normalize levels of gene expression. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  G20 or G60 vs. G0 for the same incubation time (Kruskal–Wallis, Dunn's multiple comparisons test). (C) Dot blots of lysates from worms fed 4, 11 and 18 days with G0, G20 or G60 bacteria were stained with anti-CML and anti-actin antibodies. CML and actin epitopes were quantified with ImageJ software and relative quantification of CML epitopes was normalized to actin. Data are expressed in arbitrary units (A.U.) and presented as the means  $\pm$  SD of 3 biological replicates. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  G20 or G60 vs. G0, #  $p \leq 0.05$  G60 vs. G20 (2-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test).

#### 4. dCML Induced Different Stresses

We wondered if this reproductive defect could be due to a poor nutritional intake of glycated bacteria. We therefore analyzed the expression of the thioredoxin 1 encoding gene, *trx-1*, whose expression increases during nutritional restrictions, in particular by maintaining redox homeostasis [54]. After 4 and 11 days of culture of the worms, the expression of *trx-1* was not significantly modulated by dCML, suggesting that the worms did not undergo stress linked to a nutritional defect (Figure 2B). On the other hand, the key antioxidant genes of *C. elegans*, *sod-3* and *gst-4* coding respectively for mitochondrial superoxide dismutase 3 (SOD-3) and glutathione S-transferase 4 (GST-4), were significantly more expressed after 4, 11 and 18 days of incubation with dCML (Figure 2B). Significant induction of *sod-3* by dCML was only observed for the most glycated diet (G60), whereas the expression of *gst-4* was significantly induced by the 2 glycated diets. Higher expression of *sod-3* and *gst-4* in CML-rich diets suggests induction of an oxidative environment by these diets which may be associated with the reproductive defect of worms.

Oxidative environments can promote carbonyl stress with the production of potent glycating agents, the  $\alpha$ -ketoaldehydes such as glyoxal and methylglyoxal [55]. Studies have indeed shown that diets rich in AGEs can induce the formation of endogenous AGEs [29]. We therefore analyzed the expression of genes encoding glyoxalases which convert  $\alpha$ -ketoaldehydes into  $\alpha$ -hydroxyacids [56]. *C. elegans* possesses 3 glyoxalases which are either dependent on glutathione, GLOD-4 (mammalian GLO1), or independent of this cofactor, DJR-1.1 and DJR-1.2 (mammalian DJ-1). Only the diet containing the most CML (G60) significantly induced the expression of *glod-4* and *djr-1.1* at day 4 (Figure 2B). This induction however seemed to be transient, since on day 11, no modulation of the expression of these genes was detected and on day 18, expression of *glod-4* and *djr-1.2* was induced by G60. After 18 days of culture, the worms were getting old and differences related to the aging of the worms may add to the effects of dCML. Moreover, at this time, the worms incubated with diets rich in CML expressed more *trx-1*, suggesting that dCML could have an effect on the worms' aging, possibly by alteration of the redox homeostasis (Figure 2B).

As redox homeostasis is very important for proper protein folding which can be impaired by other sources of oxidative stress, we analyzed the expression of the genes coding for key chaperones of the unfolded protein response (UPR): the cytoplasmic heat shock proteins (HSP) 16.2 and 70, the mitochondrial HSP-6 and the endoplasmic reticulum (ER) HSP-4. The genes coding for HSP-70 and HSP-6 were upregulated in worms incubated 4 and 18 days with glycated bacteria (Figures 2B and S1). Expression of HSP-16.2 encoding gene was significantly regulated at different incubation times; it increased at day 4 in the presence of dCML while it decreased at days 11 and 18 under the same conditions. These results suggest impairment of protein folding in the cytoplasm and mitochondria under glycating conditions, at least the most glycated condition (G60). Concerning *hsp-4*, its expression was less regulated than *hsp-70* and *hsp-6*. Glycated conditions reduced *hsp-4* expression at day 11.

#### 5. Glycated Bacterial Proteins Are Digested by the Worms

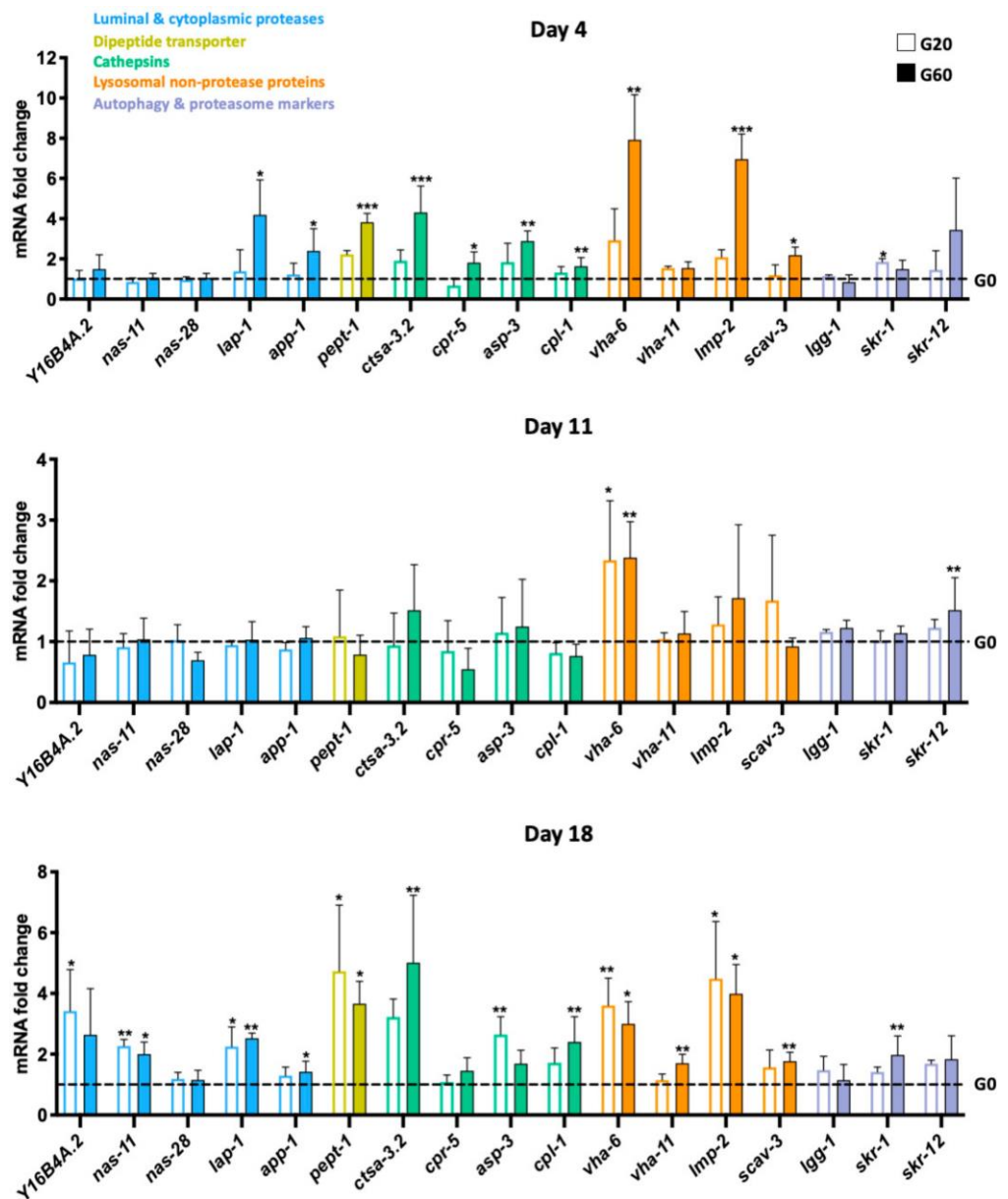
In order to better understand the impact of dCML on the physiology of worms, we monitored this AGE over time. For this, we measured the relative expression of CML epitopes detected by dot blot. As expected, almost no CML epitope was detected in the worms' lysates incubated in the control medium while the lysates of worms grown with the two glycated media contained detectable levels of CML (Figure 2C). More CML epitopes were measured in lysates of worms exposed to G60 than to G20. The amount of CML found in the worms increased over time before decreasing, with many fewer epitopes present at day 18. This detection profile is in line with 1 – ingestion of glycated bacteria by the worms over time, 2 – less ingestion of food by older worms and 3 – digestion of glycated proteins.

Concerning the intestinal digestion of glycated proteins, we checked whether we could detect different transcriptional profiles between the worms exposed or not to dCML. We have selected genes encoding different intestinal proteases: members of the astacin

family of metalloproteases (nematode astacin proteases 11 and 28, NAS-11 and NAS-28), aminopeptidases (leucine aminopeptidase 1 and aminopeptidase P 1, LAP-1 and APP-1), a carboxypeptidase (Y16B4A.2) and cathepsins A (cathepsin A homolog 3.2, CTSA-3.2), B (cysteine protease related 5, CPR-5), D (aspartyl protease 3, ASP-3) and L (cathepsin L family 1, CPL-1). Among the genes encoding the luminal or cytoplasmic digestive proteases, only *lap-1* and *app-1* were significantly overexpressed on days 4 and 18 under glycation conditions, mainly with the highest concentration of dCML (Figure 3). These results show that worms do not have a major transcriptional reprogramming of their digestive enzymes when they were grown in CML-rich diets. We checked the digestion in worms incubated for 4 days with the control bacteria or the most glycated bacteria (G60) or a mixture with different ratios of these two bacteria. After 4 days of culture, the worms were incubated for 1 day in the medium without bacteria. Immunostaining of the worm lysates, compared to those fed for 4 days with the bacteria, shows a major decrease in CML epitopes, suggesting that glycated bacterial proteins were digested, at least up to the detection threshold of glycated peptides in western blot (Figure S2). Very few glycated proteins had been poorly digested.

The upregulation of the genes encoding the aminopeptidases in glycated conditions is very interesting, especially *app-1* which codes for a cytoplasmic aminopeptidase. APP-1 could be more expressed to hydrolyze the glycated di-tripeptides transported in the cytosol by PEPT-1. As PEPT-1 is transcriptionally regulated by its substrates [57], we checked expression of its gene. Our data show that *pept-1* was indeed overexpressed at the same times and under the same conditions as *app-1* (Figure 3). Most of the cathepsin encoding genes were overexpressed on days 4 and 18 in worms exposed to dCML, especially G60 (Figure 3). As cathepsins are lysosomal proteases, our results suggest that worms need lysosomes and its hydrolases to digest glycated bacteria. We therefore investigated the expression of lysosomal genes encoding non-protease proteins. Among the genes tested we chose those encoding membrane proteins, the lysosome-membrane associated protein LMP-2 (mammalian LAMP1) and the scavenger receptor 3 (SCAV-3) which maintains lysosomal integrity, as well as components of the vacuolar-type ATPase (V-ATPase) proton pump (VHA-6 and -11) which are essential to regulate the lysosomal pH to promote lysosomal hydrolase activity. Most of these genes were overexpressed in the presence of dCML, in particular G60 on days 4 and 18. These results suggest 1—an increase in the lysosomal activity of worms exposed to dCML and 2—endocytosis of glycated proteins, potentially after luminal digestion. We were surprised to find that most of the lysosomal genes were not regulated on day 11. By analyzing the kinetics of the expression of these genes in the control condition, we noticed that most of these genes were significantly, or tended to be, more expressed at this time, compared to day 4, like most of the genes analyzed coding for digestive enzymes (Figure S3). The overexpression of these genes on day 11 certainly compensated for their need in glycation conditions before their expression was again increased on day 18.

As endocytosis has a common denominator, ubiquitin, in the targeting of substrates with two other degradation pathways, the proteasome and autophagy [58], we analyzed the regulation of the expression of markers of these processes: the genes encoding two components of the ubiquitin ligase complex (proteasome), SKR-1 and SKR-12, and the gene encoding an autophagy-related protein, LGG-1 (Figure 3). Unlike the expression of *lgg-1* which was not modulated by any diet at the three incubation times, the expression of *skr-1* and *skr-12* was significantly higher, or at least tended to be, after 4 and 18 days of culture of the worms with the glycated diets. These results suggest that the activity of the proteasome would be higher after exposure to dCML, possibly following its endocytosis.



**Figure 3.** Impact of dietary *Nε*-carboxymethyllysine (dCML) exposure on transcriptional regulation of some digestive enzymes, lysosomal proteins and proteasomal and autophagy markers. Young adult worms were fed with bacteria, which were pretreated with 0 mM (G0), 20 mM (G20) or 60 mM (G60) of glyoxylic acid. After 4, 11 and 18 days of culture, relative expression of genes coding for luminal and/or cytoplasmic proteases, cathepsins, lysosomal nonprotease proteins, an autophagy marker and proteasome markers were analyzed by comparing all the conditions to the G0. Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation of 3 biological replicates. The *cdc-42* and *pmp-3* genes were used to normalize levels of gene expression. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  G20 or G60 vs. G0 (Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparisons test).

### 3.6. CML-Bound Proteins Are Endocytosed by the Worms' Enterocytes

In order to confirm the endocytosis of CML-bound proteins or peptides, we performed immunohistochemical staining with the anti-CML antibody. In order to optimize the detection of CML epitopes inside enterocytes, we followed with slight adaptations a protocol eliminating luminal epitopes [52]. To locate the apical cortex of enterocytes, we co-stained the worms with an antibody specific for an intermediate filament protein of this cortex, IFB-2. Several vesicles, most probably endosomes, labeled with the anti-CML

antibody were observed around the nuclei of the enterocytes, only of the worms incubated with both glycosylated bacteria, G20 and G60 (Figure 4A). More than 50 and 80% of worms contained CML-labeled endosomes after 1 and 4 days of incubation with glycosylated bacteria, respectively (data not shown). In order to verify if dCML endocytosis depends on the glycosylated protein, we analyzed whether a glycosylated supplement protein (BSA) could be endocytosed. We, therefore, cultured the worms with non-glycosylated bacteria containing a protein supplement, BSA, glycosylated or non-glycosylated. Immunohistochemistry with the anti-CML antibody showed that the worms grown with BSA-CML had endosomes containing CML epitopes (Figure 4A). As expected, the worms incubated with the BSA control were negative. These results show that any CML-bound protein could be endocytosed by *C. elegans* enterocytes.

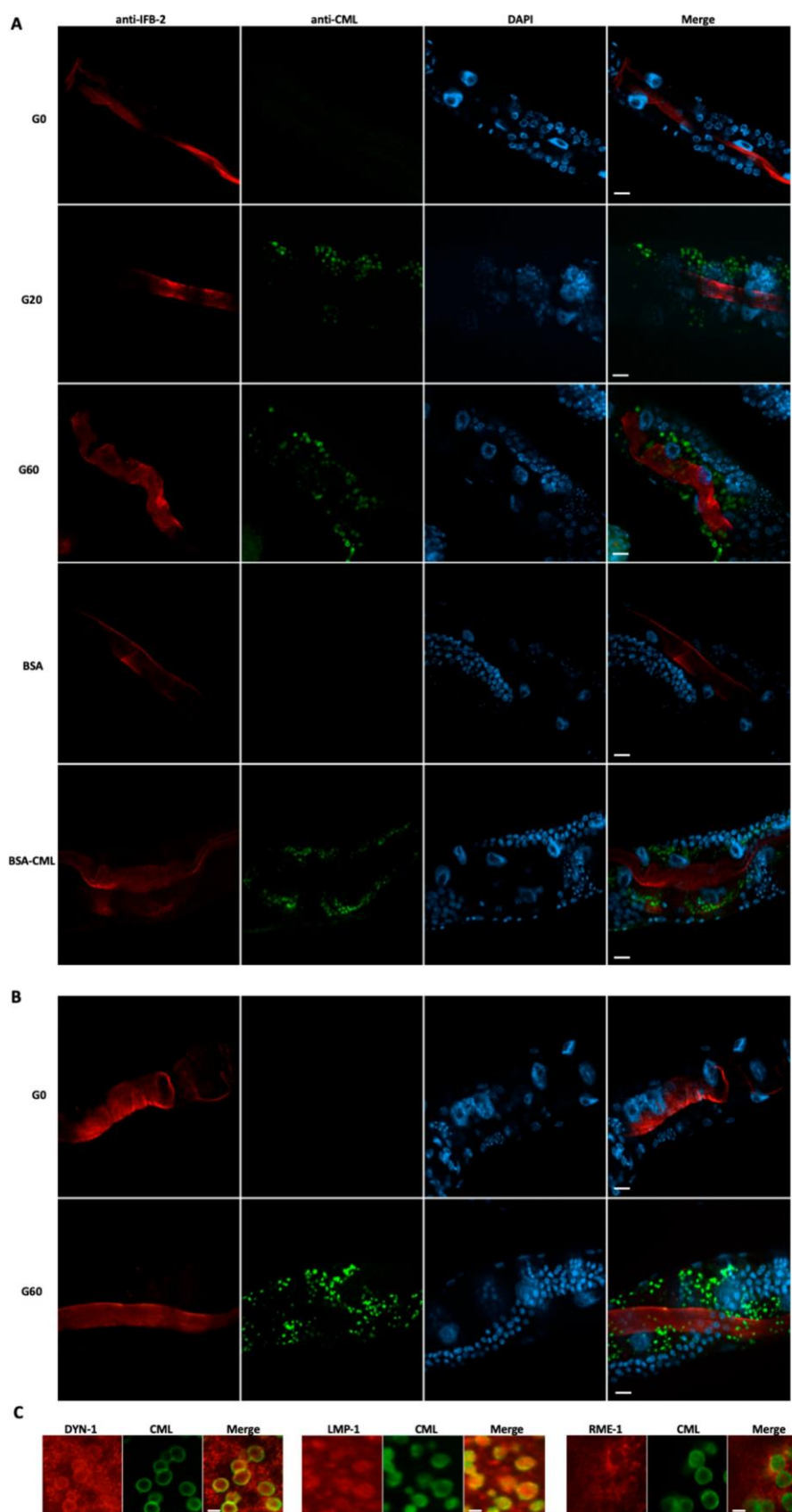
We followed the evolution of the CML epitopes by washing the worms fed for 4 days with the most glycosylated bacteria (G60) and by incubating them for 6 h in M9 buffer without food. After immunohistochemical observation of the worms, some endosomes containing CML epitopes appeared smaller, suggesting endolysosomal degradation of the CML-bound peptides (Figure 4B).

To confirm endocytosis and the fusion of endosomes with lysosomes, we performed a series of double immunostaining with anti-CML antibody and antibodies recognizing different markers of endocytosis: dynamin, DYN-1, which is involved in the early phase of endocytosis; the lysosome-associated membrane protein LMP-1 (mammalian LAMP1) and an endocytosis-mediating receptor, RME-1, which is involved in the process of endosome recycling. The results show a co-localization between the CML epitopes and the DYN-1 and LMP-1 epitopes, confirming the process of endocytosis of dCML and the fusion of endosomes with lysosomes, respectively (Figure 4C). Some CML epitopes are localized at the periphery of endosomes.

### 3.7. Endocytosis of CML-Bound Bacterial Proteins Is Specific of CML

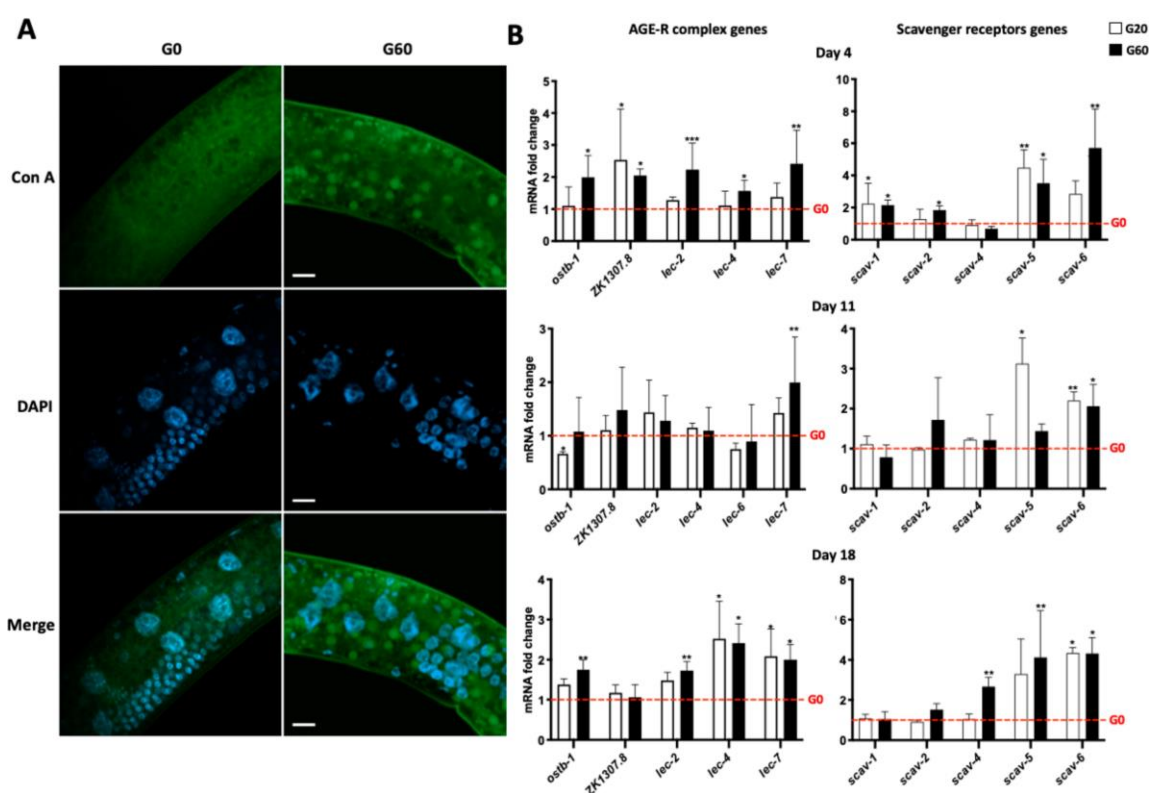
We wondered if the endocytosis was specific for glycosylated proteins. We, therefore, labeled the worms with Con A which recognized both non-glycosylated and glycosylated bacteria (Figure 1A). *C. elegans* has glycoproteins that can be labeled with Con A, but none has been identified as marker of endolysosomes. Moreover, fluorescent Con A did not stain the endosomes of worms incubated with the non-glycosylated bacteria, suggesting that the non-glycosylated bacteria molecules were not endocytosed (Figure 5A). In contrast, worms incubated with glycosylated bacteria contained endosomes labeled with Con A. These endosomes co-stained with LMP-1 epitopes (Figure S4). The endocytosis of glycosylated bacterial components therefore seems to depend on CML. There could be co-endocytosis of non-glycosylated bacterial compounds with CML-bound bacterial proteins or peptides. The hypothesis of endocytosis of CML-bound peptides/proteins mediated by an AGE receptor seemed to be quite plausible. As *C. elegans* has different orthologs of the human genes encoding AGE receptors except RAGE, we analyzed the expression of these orthologs in the presence of glycosylated or non-glycosylated bacteria. We measured the relative expression of the orthologs of human genes encoding 1—the AGE-R complex: OST-B1 (mammalian AGE-R1), ZK1307.8 (mammalian AGE-R2) and the members of the galectin (LEC) family (mammalian AGE-R3/galectin-3) and 2—the members of the SCAV family (mammalian SR-A and SR-B members). On day 4, the two glycosylated diets induced significantly the expression of three of these genes: the genes coding for SCAV-1, SCAV-5 and ZK1307.8 (Figure 5B). Although not significantly, *scav-6* expression was increased by the two glycosylated regimens. From these genes, only the expression of *scav-5* and *scav-6* was significantly increased by at least one glycosylated diet on days 11 and 18. On day 18, the genes encoding LEC-4 and LEC-7 were more expressed in the presence of dCML, whatever its concentration. These data suggest a possible role of some of these receptors, notably SCAV-5, in dCML mediated endocytosis.





**Figure 4.** Mapping of *Ne*-carboxymethyllysine (CML) epitopes in *C. elegans* intestine. (A) Immunohistochemical staining was performed on worms fed for 4 days with bacteria, which were pretreated

with 0 mM (G0), 20 mM (G20) or 60 mM (G60) of glyoxylic acid, or 1.6 mg/mL of non-glycated bovine serum albumin (BSA) or glycated BSA (BSA-CML), using anti-CML and anti-IFB-2 antibodies. (B) Worms were fed for 4 days with either G0 or G60 bacteria. After washing, worms were incubated for 6 h in nutrient-free buffer, fixed and permeabilized with modified Bouin's solution and stained with anti-CML and anti-intermediate filament B (IFB-2) antibodies. (C) Immunohistochemical staining was performed on worms fed for 4 days with G60 using either anti-CML and anti-dynamin (DYN-1) antibodies, anti-CML and anti-lysosome-associated membrane protein homolog 1 (LMP-1) antibodies or anti-CML and anti-endocytosis-mediating receptor 1 (RME-1) antibodies. Worms' nuclei were stained with DAPI. For each type of feeding condition, fluorescence micrographs with the mentioned DNA-binding probe or antibody are shown. Scale bars = 10  $\mu\text{m}$  (A,B) and 2.5  $\mu\text{m}$  (C). All results are representative of 3 independent experiments.



**Figure 5.** Specificity of endocytosis for dietary *N* $\epsilon$ -carboxymethyllysine and analysis of expression of advanced glycation end product (AGE) receptor encoding genes. (A) Worms fed for 4 days with bacteria, which were pretreated with 0 mM (G0) or 60 mM (G60) of glyoxylic acid, were fixed and permeabilized with modified Bouin's solution and stained with concanavalin A (Con A). Worms' nuclei were stained with DAPI. For each type of feeding condition, fluorescence micrograph with the mentioned DNA-binding probe or lectin are shown. Scale bars = 10  $\mu\text{m}$ . Endogenous glycoproteins were stained with Con A, a diffuse labeling is visible in the worms incubated with the control bacteria. All results are representative of 3 independent experiments. (B) Young adult worms were fed with G0, G20 (bacteria pretreated with 20 mM of glyoxylic acid) and G60. After 4, 11 and 18 days of culture, relative expression of mammalian ortholog coding for members of AGE-R complex and class A and B scavenger receptors, was analyzed by comparing all the conditions to the G0. Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation of 3 biological replicates. The *cdc-42* and *pmp-3* genes were used to normalize levels of gene expression. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  G20 or G60 vs. G0 for the same incubation time (Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparisons test).

#### 4. Discussion

Clearance of AGEs occurs in the endothelium, vasculature, neural tissues and some types of immune cells, mainly by endocytosis [3,16,59]. Various AGE receptors, including SR-A and SR-B members and the AGE-R complex, induce this process. With regard to

dAGEs, this mechanism would take place after intestinal absorption and passage into the blood vessels. It is surprising that endocytosis of AGEs by intestinal cells, especially enterocytes, has not been further considered. On the one hand, SR-A and SR-B members and AGE-R complex are indeed expressed by enterocytes (<https://www.proteinatlas.org>, accessed on 6 December 2021), in particular in the small intestine, and on the other hand, endocytosis in the enterocytes is an essential cellular process with various biological impacts, including digestion and absorption of nutrients [60]. Until now, only the passage of free AGE adducts or glycated di-tripeptides into enterocytes has been reported. Uptake of these AGEs involves an oligopeptide transporter, PEPT-1, or passive diffusion [39,40]. The glycated di-tripeptides are further digested by endopeptidases in the enterocytes before the free AGE adducts are released into the circulation. In our study, ingestion of glycated bacteria induced the expression of *pept-1*, *C. elegans* ortholog to the human SLC15A1 gene coding for PEPT-1. Since PEPT-1 is transcriptionally regulated by its substrates [57], we suspect that a similar regulatory process is taking place in *C. elegans*. Indeed, the ingestion of CML-bound proteins by the worms has probably generated an accumulation of glycated di-tripeptides, requiring transport by PEPT-1 for their absorption by enterocytes. After exposure of the worms to dCML, we also observed the induction of a gene encoding a cytoplasmic endopeptidase, APP-1, potentially involved in the digestion of glycated di-tripeptides. These results support our decision to use *C. elegans* as a relevant model to analyze the digestion and absorption of glycated peptides.

While simple diffusion and transport by PEPT-1 are undoubtedly two absorption pathways for dAGEs, others must take place to further explain certain pathophysiological mechanisms described or hypothesized for dAGEs [2,3,12]. For example, the mechanisms involving RAGE can be activated only by glycated proteins or larger peptides than di-tripeptides [36]. One of the most plausible hypotheses to date would be that dAGEs induce the formation of endogenous AGEs which would bind to RAGE to activate different signaling pathways. Some studies have actually shown that endogenous AGEs are produced following the ingestion of dAGEs including dCML [29]. Our results show that, indeed, dCML significantly induced the expression of genes encoding glyoxalases which convert endogenous glycation precursors,  $\alpha$ -ketoaldehydes such as glyoxal and methylglyoxal, into  $\alpha$ -hydroxyacids [56]. Oxidizing conditions favor the generation of these precursors. The expression of *sod-3* and *gst-4* genes, key markers of the antioxidant response in *C. elegans*, were indeed significantly higher throughout the experiment when the worms were incubated with glycated bacteria, especially the most glycated one. Induction of these markers by dCML shows that the latter is certainly a source of reactive oxygen species which would induce the expression of these genes and potentially the production of  $\alpha$ -ketoaldehydes. The increase in proteasomal markers (*skr-1* and *skr-12*) in worms exposed to dCML could be a cellular response to degrade the endogenous AGEs formed. Additional experiments, in particular the analysis of endogenous AGEs and other proteasomal markers, would allow this hypothesis to be verified.

Bacteria are the main food for worms. Their glycation, even if it did not impair membrane and the parietal integrity of the bacteria, could have induced a nutritional alteration of this food with potential physiological effects. We have, indeed, detected a reproduction defect in worms incubated with glycated bacteria. These worms had fewer embryos and laid fewer eggs than worms under the normal diet. Additional analyses will of course be necessary to determine the pathophysiological mechanisms involved following ingestion of dCML. We suspected that the glycated diets could have induced a state of starvation leading to the reproduction defect. However, starvation has been shown to have only a small impact on the number of eggs laid by the worms [61]. In addition, our results show that the expression of *trx-1*, which is induced by starvation [54], was not modulated by glycated diets at least up to 11 days of culture. Likewise, the gene encoding a key autophagy molecule, LGG-1, has never been regulated by dCML. Autophagy is indeed an essential mechanism allowing, among other things, energetic homeostasis to be



maintained during starvation [62]. An absence of starvation does not, however, exclude a possible nutritional impact of food glycation, which should be explored.

The exposure of the worms to dCML clearly caused cellular alterations as evidenced on the one hand by the induction of the antioxidant response but also the induction of the cytoplasmic and mitochondrial unfolded protein responses (UPR<sup>cyt</sup> and UPR<sup>mt</sup>, respectively), in particular the significant increase in the genes encoding the chaperones HSP-70 and HSP-6, respectively. Any causal or consequential link between the reproductive defect in worms exposed to dCML and the induction of antioxidant and unfolded protein responses remains to be determined. Among the genes encoding digestive enzymes, *lap-1*, which codes for an endopeptidase, was induced by the two glycated diets on days 4 and 18. Inhibition of *lap-1* was described to lead to a defect in oviposition [63]. The increased expression of *lap-1* could then be a response to the reproductive defect induced by *lap-1*.

We were surprised to discover, among the genes whose expression was induced by dCML, the genes encoding lysosomal proteases, cathepsins. The expression of other lysosomal genes was increased in CML-rich diets, such as those encoding V-ATPase, which regulate the pH of lysosomes to promote cathepsin activity, and the lysosome-associated membrane protein homolog 2 (LMP-2 or LAMP1 in mammals), which is important for the functionality of lysosomes. These results strongly suggest that dCML has been internalized by enterocytes and has undergone intracellular hydrolysis. The glycated di-tripeptides transported by PEPT-1 are effectively hydrolyzed before the free AGE adducts pass into the general circulation. However, this digestion involves cytoplasmic but not lysosomal endopeptidases [39]. The hypothesis of endocytosis of glycated proteins or larger peptides was therefore verified by immunohistochemistry. The images clearly show the presence of endosomes containing CML epitopes in the worms. These endosomes presented distinct markers such as dynamin 1 or DYN-1, which is involved in the early stage of endocytosis, the lysosomal membrane protein LMP-1 which confirms fusion with lysosomes and, for some, the RME-1 receptor which is involved in endosomal recycling. These results clearly demonstrate a new mechanism of intestinal absorption for dCML which is therefore endocytosis.

As mentioned earlier, what is most surprising is not to have demonstrated endocytosis as a route of intestinal absorption of dAGEs but rather not to have demonstrated it earlier. The absorption of AGEs has mainly been analyzed in vitro with cells of an immortalized cell line of human colorectal adenocarcinoma cells named Caco-2, which are commonly used to study intestinal permeability [39,40,64]. Because these epithelial cells are derived from colon cells, they do not have all of the characteristics of small intestine enterocytes, including the expression of digestive enzymes in their microvilli [65]. In addition, absorption experiments were mostly performed with small defined glycated oligopeptides instead of glycated proteins or larger peptides. In *C. elegans*, it was possible to carry out immunohistochemical analysis while preserving the whole intestine of the worm. In addition, the worm's intestine contains only enterocytes, making visualization of these cells easy. In mammalian models, such as the murine ones, the intestinal epithelium can only be analyzed by cell imaging after histological sections. Since it is composed of several cell types, without electron microscopy, the analysis is much more complex than in the worm. This once again demonstrates the essential contribution of so-called simple model organisms to analyze certain cellular functions.

The use of *C. elegans* to analyze the absorption of dAGEs by enterocytes is all the more relevant as this organism expresses the orthologs of the genes encoding the AGE receptors described for endocytosing AGEs in non-intestinal tissues: SR-A and SR-B members and the AGE-R complex. Analysis of the expression of these genes after culturing the worms with non-glycated or glycated bacteria showed a stronger expression of the genes encoding SCAV-5, SCAV-6 and some LECs in the presence of glycated bacteria, regardless of their glycation rate. These receptors may mediate the endocytosis of dCML. Our immunohistochemical staining with Con A revealed that the endocytosis of bacterial components was indeed specific for dCML. By targeting these genes by RNA interference

in a future study, we will be able to explore the role of these receptors in the endocytosis of dCML.

Endocytosis is a mechanism that can modulate different cellular functions and participate in cellular adaptation to different stresses, but it is an active process that consumes energy in the form of adenosine triphosphate (ATP) [66,67]. The enterocytes of worms incubated with glycosylated bacteria, therefore, certainly need more ATP than those of worms incubated with non-glycosylated bacteria. They must therefore produce more ATP from various catabolic mechanisms including respiration in the mitochondrial matrix. This need can lead to ATP deficiencies for other important cellular functions, including certain enzymatic activities. In addition, increased mitochondrial respiration can be a source of oxidative stress. This could explain on the one hand the increase in antioxidant responses including the expression of the mitochondrial SOD-3 encoding gene and that of the gene encoding the HSP-6 chaperone of UPR<sup>mt</sup> with impacts on cytoplasmic homeostasis. Since bacteria are the main food source for worms, the nutritional intake of glycosylated bacteria might not compensate for the energy required by the endocytosis of glycosylated proteins. The reproductive defect of worms incubated with dCML might be therefore associated with the ATP shortage induced by endocytosis.

Our study deserves additional analyses, in particular: 1—the quantification of the fate of dCML (free CML adduct and CML-bound protein) ingested by worms, 2—deciphering between endocytosed dCML and dCML transported by PEPT-1, 3—a demonstration of the health effect of glycosylated dietary proteins vs. glycosylated protein supplement which, as we have shown in this study, is also endocytosed by enterocytes, 4—highlighting the mechanisms induced by the ingestion of dCML and the receptors involved. It is essential to analyze the fate of endocytosed dCML, in particular its digestion and/or its possible transcytosis in the lamina propria. Exocytosis of glycosylated peptides could promote food intolerance and activate RAGE in other organs after transport via the general circulation. *C. elegans* is a good model for studying the health effects of dAGEs; not necessarily for the observed phenotypes which are quite dependent on the organism studied but for the induced mechanisms which are often conserved in the animal kingdom.

## 5. Conclusions

Our results have given new insights into the intestinal absorption of dCML. We have indeed shown that dCML was endocytosed by enterocytes. In parallel, we have observed a reproductive defect in worms exposed to dCML. Additional studies will be necessary to determine the mechanisms, possibly dependent on dCML endocytosis, involved in this pathophysiological effect. However, our results are already opening up new perspectives to better characterize the pathophysiological mechanisms of dAGEs.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu13124398/s1>, Table S1: Primers' list, Figure S1: Relative expression of *hsp-16.2* gene, Figure S2: Digestion of bacterial glycosylated proteins by *C. elegans*, Figure S3: Impact of dietary *N*-carboxymethyllysine (dCML) exposure on transcriptional regulation of some digestive enzymes and lysosomal proteins, Figure S4: Mapping of lysosomal epitope and concanavalin A (Con A) staining on intestinal endosomes.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.F., C.D., F.J.T. and E.B.; methodology, C.D., C.F., S.R., C.P.-C., S.T. and J.-M.L.G.; validation, C.F., C.D., S.R., C.P.-C. and S.T.; formal analysis, C.D. and C.F.; investigation, C.D., C.F., S.R., C.P.-C., S.T. and R.L.; resources, C.F., E.B., F.J.T. and J.-M.L.G.; writing—original draft preparation, C.F. and C.D.; writing—review and editing, C.F., C.D., E.B., F.J.T., S.R., C.P.-C., S.T., J.-M.L.G. and R.L.; supervision, C.F.; funding acquisition, E.B., F.J.T. and C.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Agence Nationale de la Recherche (ANR), grant number ANR-19-CE34-0013. C.D. is the recipient of a « Université de Lille/Région Hauts-de-France » doctoral fellowship. R.L. is the recipient of a « Fondation I-Site ULNE » doctoral fellowship (Health-PhD).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** All strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). Some antibodies were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. We would like to thank Antonino Bongiovanni for the microscopy Facility of BioImaging Center, Lille (UMS 2014–US 41 -PLBS, F-59000 Lille, France) and for the expert technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Sharma, C.; Kaur, A.; Thind, S.S.; Singh, B.; Raina, S. Advanced glycation End-products (AGEs): An emerging concern for processed food industries. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 7561–7576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nowotny, K.; Schröter, D.; Schreiner, M.; Grune, T. Dietary advanced glycation end products and their relevance for human health. *Ageing Res. Rev.* **2018**, *47*, 55–66. [[CrossRef](#)]
- Zhang, Q.; Wang, Y.; Fu, L. Dietary advanced glycation end-products: Perspectives linking food processing with health implications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 2559–2587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Di Pino, A.; Currenti, W.; Urbano, F.; Mantegna, C.; Purrizzo, G.; Piro, S.; Purrello, F.; Rabuazzo, A.M. Low advanced glycation end product diet improves the lipid and inflammatory profiles of prediabetic subjects. *J. Clin. Lipidol.* **2016**, *10*, 1098–1108. [[CrossRef](#)]
- Lopez-Moreno, J.; Quintana-Navarro, G.M.; Delgado-Lista, J.; Garcia-Rios, A.; Alcala-Diaz, J.F.; Gomez-Delgado, F.; Camargo, A.; Perez-Martinez, P.; Tinahones, F.J.; Striker, G.E.; et al. Mediterranean Diet Supplemented With Coenzyme Q10 Modulates the Postprandial Metabolism of Advanced Glycation End Products in Elderly Men and Women. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2016**, *73*, 340–346. [[CrossRef](#)]
- Macías-Cervantes, M.H.; Rodríguez-Soto, J.M.D.; Uribarri, J.; Diaz-Cisneros, F.J.; Cai, W.; Garay-Sevilla, M.E. Effect of an advanced glycation end product-restricted diet and exercise on metabolic parameters in adult overweight men. *Nutrition* **2015**, *31*, 446–451. [[CrossRef](#)]
- Tantalaki, E.; Piperi, C.; Livadas, S.; Kollias, A.; Adamopoulos, C.; Koulouri, A.; Christakou, C.; Diamanti-Kandarakis, E. Impact of dietary modification of advanced glycation end products (AGEs) on the hormonal and metabolic profile of women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hormones* **2014**, *13*, 65–73. [[CrossRef](#)]
- Uribarri, J.; Cai, W.; Ramdas, M.; Goodman, S.; Pyzik, R.; Chen, X.; Zhu, L.; Striker, G.E.; Vlassara, H. Restriction of Advanced Glycation End Products Improves Insulin Resistance in Human Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2011**, *34*, 1610–1616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Harcourt, B.E.; Sourris, K.C.; Coughlan, M.T.; Walker, K.Z.; Dougherty, S.L.; Andrikopoulos, S.; Morley, A.L.; Thallas-Bonke, V.; Chand, V.; Penfold, S.A.; et al. Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity. *Kidney Int.* **2011**, *80*, 190–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Luévano-Contreras, C.; Garay-Sevilla, M.E.; Wrobel, K.; Malacara, J.M.; Wrobel, K. Dietary advanced glycation end products restriction diminishes inflammation markers and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2013**, *52*, 22–26. [[CrossRef](#)]
- Yacoub, R.; Nugent, M.; Cai, W.; Nadkarni, G.N.; Chaves, L.D.; Abyad, S.; Honan, A.M.; Thomas, S.A.; Zheng, W.; Valiyaparambil, S.A.; et al. Advanced glycation end products dietary restriction effects on bacterial gut microbiota in peritoneal dialysis patients; a randomized open label controlled trial. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184789. [[CrossRef](#)]
- Poulsen, M.W.; Hedegaard, R.V.; Andersen, J.M.; de Courten, B.; Bügel, S.; Nielsen, J.; Skibsted, L.H.; Dragsted, L.O. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *60*, 10–37. [[CrossRef](#)]
- Birlouez-Aragon, I.; Saavedra, G.; Tessier, F.; Galinier, A.; Ait-Ameur, L.; Lacoste, F.; Niamba, C.-N.; Alt, N.; Somoza, V.; Lecerf, J.-M. A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 1220–1226. [[CrossRef](#)]
- Semba, R.D.; Gebauer, S.K.; Baer, D.J.; Sun, K.; Turner, R.; Silber, H.A.; Talegawkar, S.; Ferrucci, L.; Novotny, J.A. Dietary Intake of Advanced Glycation End Products Did Not Affect Endothelial Function and Inflammation in Healthy Adults in a Randomized Controlled Trial. *J. Nutr.* **2014**, *144*, 1037–1042. [[CrossRef](#)]
- Semba, R.D.; Ang, A.; Talegawkar, S.; Crasto, C.; Dalal, M.; Jardack, P.; Traber, M.; Ferrucci, L.; Arab, L. Dietary intake associated with serum versus urinary carboxymethyl-lysine, a major advanced glycation end product, in adults: The Energetics Study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2011**, *66*, 3–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Poulsen, M.W.; Bak, M.J.; Andersen, J.M.; Monošik, R.; Giraudi-Futin, A.C.; Holst, J.J.; Nielsen, J.; Lauritzen, L.; Larsen, L.H.; Bügel, S.; et al. Effect of dietary advanced glycation end products on postprandial appetite, inflammation, and endothelial activation in healthy overweight individuals. *Eur. J. Nutr.* **2014**, *53*, 661–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Reddy, M.B.; Love, M. The Impact of Food Processing on the Nutritional Quality of Vitamins and Minerals. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *459*, 99–106. [[CrossRef](#)]

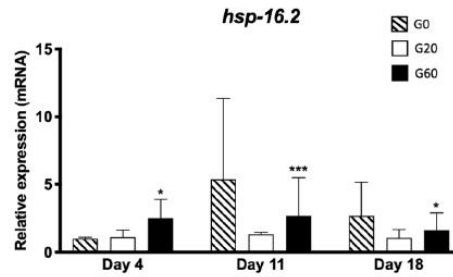
43. Gupta, R.K.; Gupta, K.; Sharma, A.; Das, M.; Ansari, I.A.; Dwivedi, P.D. Maillard reaction in food allergy: Pros and cons. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 208–226. [[CrossRef](#)]
44. Ullah, M.A.; Loh, Z.; Gan, W.J.; Zhang, V.; Yang, H.; Li, J.H.; Yamamoto, Y.; Schmidt, A.M.; Armour, C.L.; Hughes, J.M.; et al. Receptor for advanced glycation end products and its ligand high-mobility group box-1 mediate allergic airway sensitization and airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *134*, 440–450.e3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Xu, S.; Li, L.; Zhengyang, B.; Ye, F.; Shao, C.; Sun, Z.; Bao, Z.; Dai, Z.; Zhu, J.; Jing, L.; et al. CML/CD36 accelerates atherosclerotic progression via inhibiting foam cell migration. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *97*, 1020–1031. [[CrossRef](#)]
46. Zhuang, A.; Yap, F.Y.; Bruce, C.; Leung, C.; Plan, M.R.; Sullivan, M.; Herath, C.; McCarthy, D.; Sourris, K.C.; Kantharidis, P.; et al. Increased liver AGEs induce hepatic injury mediated through an OST48 pathway. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12292. [[CrossRef](#)]
47. Snelson, M.; Tan, S.M.; Thallas-Bonke, V.; Sourris, K.; Ziemann, M.; El-Osta, A.; Cooper, M.; Forbes, J.; Coughlan, M. Thermally Processed Diet-Induced Albuminuria, Complement Activation and Intestinal Permeability Are Attenuated by Resistant Starch in Experimental Diabetes. *Curr. Dev. Nutr.* **2021**, *5*, 608. [[CrossRef](#)]
48. Alsamad, F.; Brunel, B.; Vuiblet, V.; Gillery, P.; Jaisson, S.; Piot, O. In depth investigation of collagen non-enzymatic glycation by Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *251*, 119382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Courjol, F.; Jouault, T.; Mille, C.; Hall, R.; Maes, E.; Sendid, B.; Mallet, J.M.; Guerardel, Y.; Gow, N.A.R.; Poulain, D.; et al.  $\beta$ -1,2-Mannosyltransferases 1 and 3 Participate in Yeast and Hyphae O- and N-Linked Mannosylation and Alter Candida albicans Fitness During Infection. In *Open Forum Infectious Diseases*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2015; Volume 2. [[CrossRef](#)]
50. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)]
51. Moreton, C.; Gouttefangeas, C.; Dubois, C.; Tessier, F.J.; Fradin, C.; Prost-Camus, E.; Prost, M.; Haumont, M.; Nigay, H. Investigation of the antioxidant capacity of caramels: Combination of laboratory assays and C. elegans model. *J. Funct. Foods* **2021**, *78*, 104308. [[CrossRef](#)]
52. Duerr, J.S. Immunohistochemistry. In *WormBook*. 2006. Available online: [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_immunohistochemistry/immunohistochemistry.pdf](http://www.wormbook.org/chapters/www_immunohistochemistry/immunohistochemistry.pdf) (accessed on 6 December 2021).
53. Estey, T.; Kang, J.; Schwendeman, S.P.; Carpenter, J.F. BSA Degradation Under Acidic Conditions: A Model For Protein Instability During Release From PLGA Delivery Systems. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 1626–1639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Fierro-González, J.C.; González-Barrios, M.; Miranda-Vizuete, A.; Swoboda, P. The thioredoxin TRX-1 regulates adult lifespan extension induced by dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *406*, 478–482. [[CrossRef](#)]
55. Thornalley, P.J. Endogenous  $\alpha$ -Oxoaldehydes and Formation of Protein and Nucleotide Advanced Glycation Endproducts in Tissue Damage. In *Acetaldehyde-Related Pathology: Bridging the Trans-Disciplinary Divide*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2007; Volume 285, pp. 229–246. ISBN 978-0-470-51184-8.
56. He, Y.; Zhou, C.; Huang, M.; Tang, C.; Liu, X.; Yue, Y.; Diao, Q.; Zheng, Z.; Liu, D. Glyoxalase system: A systematic review of its biological activity, related-diseases, screening methods and small molecule regulators. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131*, 110663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Spanier, B. Transcriptional and functional regulation of the intestinal peptide transporter PEPT. *J. Physiol.* **2013**, *592*, 871–879. [[CrossRef](#)]
58. Clague, M.J.; Urbe, S. Ubiquitin: Same Molecule, Different Degradation Pathways. *Cell* **2010**, *143*, 682–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ott, C.; Jacobs, K.; Haucke, E.; Santos, A.N.; Grune, T.; Simm, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 411–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Zimmer, K.-P.; De Laffolie, J.; Barone, M.V.; Naim, H.Y.; Zimmer, U.-P.D.K.-P. Endocytosis in enterocytes. *Wien. Med. Wochenschr.* **2016**, *166*, 205–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Lai, S.; Pangilinan, K.; Sanjabi, K.; Savic, D. Starvation of Adult *Caenorhabditis Elegans* and Its Effect on Health and Reproduction. Available online: <File:///C:/Users/MDPI/Downloads/184795-Article%20Text-191480-1-10-20140604.pdf> (accessed on 6 December 2021).
62. Kang, C.; You, Y.-J.; Avery, L. Dual roles of autophagy in the survival of *Caenorhabditis elegans* during starvation. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 2161–2171. [[CrossRef](#)]
63. Dubois, C.; Pophillat, M.; Audebert, S.; Fourquet, P.; Lecomte, C.; Dubourg, N.; Galas, S.; Camoin, L.; Frelon, S. Differential modification of the C. elegans proteome in response to acute and chronic gamma radiation: Link with reproduction decline. *Sci. Total Environ.* **2019**, *676*, 767–781. [[CrossRef](#)]
64. Van Der Lugt, T.; Opperhuizen, A.; Bast, A.; Vrolijk, M.F. Dietary Advanced Glycation Endproducts and the Gastrointestinal Tract. *Nutrients* **2020**, *12*, 2814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lundquist, P.; Artursson, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *106*, 256–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. López-Hernández, T.; Haucke, V.; Maritzen, T. Endocytosis in the adaptation to cellular stress. *Cell Stress* **2020**, *4*, 230–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Kirchhausen, T. Bending membranes. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 906–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



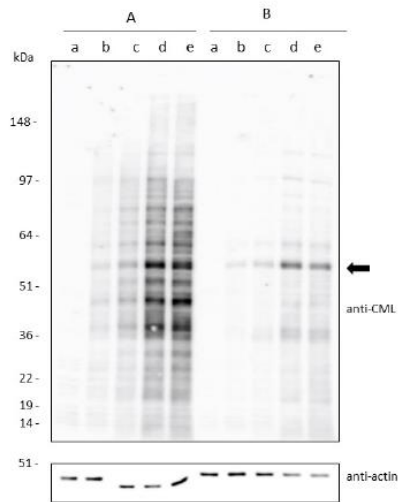
**Table S1. Primers list**

	<b>Forward (5'-3')</b>	<b>Reverse (3'-5')</b>
<i>app-1</i>	CACGAAGGACCGATCGGAAT	TAAGCACTTGGCTGGCATGA
<i>asp-3</i>	TGCACAACAGATTTGATTGC	AGACAACATCGTTGTCAACG
<i>cdc-42</i>	GATCAAGTGCCTCGTCGTTG	TGTGACGGCGTAATTGTCGA
<i>cpl-1</i>	GACGTCTCTTCGGTACTCC	TGGGTATCACGCCAGTCAAC
<i>cpr-5</i>	TGTGTCGACTCCTGCACTTC	TGGATTTGCTCGACCTTCTT
<i>ctsa-3.2</i>	TTGAAACACGGGCCATGGTA	CAAGTGGCACAAAGTGACCG
<i>djr-1.1</i>	GCACTCTTGAGCCATGGAGT	TGCCACTGACAACAACACGA
<i>djr-1.2</i>	AGAGCGTGTCACTTGTCACT	ACTCTGTCGCTGATAACAACG
<i>glod-4</i>	GTGCCAAGACCATCGACTTT	TCTTGCTCCATCGTCCGTTAT
<i>gst-4</i>	TTTGATGCTCGTGTCTTGC	AATGGGAAGCTGGCCAAATG
<i>hsp-16.2</i>	TGCAGAATCTCTCCATCTGAG T	TGGTTTAAACTGTGAGACGTTG A
<i>hsp-4</i>	AACCTACTCGTGCCTGGAG	TCTCCGAAAACGCAACGTA
<i>hsp-6</i>	TCGTGAACGTTTCAGCCAGA	CTCAGCGGCATTCTTTTCGG
<i>hsp-70</i>	CTACATGCAAAGCGATTGGA	GGCGTAGTCTTGTTCCTTC
<i>lap-1</i>	ATTGCTCGGACCTTCTGCAA	TCCTCGTTGGTGAGCTTGTC
<i>lec-1</i>	TCGTTCCACTTCAACCCACG	GAATGGGTTCTTTCCTTCGC
<i>lec-2</i>	TGCTGAAATGGCCCATGAGT	GGTGTGAAGGTTGACGGTGA
<i>lec-3</i>	CCTGGAAGTGTGCTCCGTA	TGGGTTCTTTCCTCTCGTT
<i>lec-4</i>	CTCGACGCTGGACAGACATT	CACCACCTCCCTGGAGAAGA
<i>lec-5</i>	ATATGGCAGTTGCTGGTCTT	TTGACACGCTTTCCTTTTGG
<i>lec-6</i>	CGCCAATCCATTCCAGCAGA	ATGAGATGGACTCCGTGGGA
<i>lec-7</i>	CTCAGCTCCGACATAGCCAC	ACCGGGAACCGATGATCAAA
<i>lec-8</i>	GCTCAAGCACCACGATCACT	TCAACTGGGAAACGGTGTGG
<i>lec-9</i>	CAGGAACCTTTGCTCTCCCC	ACCGGAGATCAGGTTGACGA
<i>lec-10</i>	TTCACCACTCGGAGCACTTC	AATCCGATGGCTTGAACCGA
<i>lec-11</i>	CGTTGCAATGACTGTTTCGAG	ATCGGAGTTGGAGCAACAGG
<i>lec-12</i>	AAAAACCGGATGGTTCAGCG	CGAATCGTTCTTCGTTGCC
<i>lgg-1</i>	TACCAGGACCATCACGAGGA	CGACCTCTCCTCCATACACAC
<i>lmp-2</i>	TCGCTGGACTCATGTGCTC	ATGAGCTTCTGGGTTGACCA
<i>nas-11</i>	GACCCTGCCAACCAGTTTA	CGATCATTGCGAAGGTGCTG
<i>nas-28</i>	CAGCTGTCTGAGCTTCAAGG	AACGTATCACAGTTTGGCCC
<i>ostb-1</i>	AGGAGAAACTGCTGCTGTGA	ACGGTTAGCTCATGTCCTCG
<i>pept-1</i>	TGTCATCACGGCAGCAGAAA	AATCTCCAGCAGCAGTGGTC
<i>pmp-3</i>	AGTTCAGTTGCTCTCGTTGC	AGGCCAGCAAACATTCTGAAG
<i>scav-1</i>	GTACTGCAAGGACCCGAAC	CCGACACGAATGCTGGTAGA
<i>scav-2</i>	AACCGCCTTCTTGAAGTCG	TCCAAAATCGCTTCGCACAC
<i>scav-3</i>	TTACGATCCTGCTCTTCCGC	TGGCATCGTGACAAGTCGAT
<i>scav-4</i>	ACGGGTTCAAGGTGGAAGAC	ACATGGCCAGTTGGGGAAAT

<i>scav-5</i>	CTCAATAGCCGAGGGAGCAG	AGGATTTTTGCCGTGGGACT
<i>scav-6</i>	ATGCTTTACTGTCCGCTGCT	TTCGGCATAGCTGGAATCGG
<i>skr-1</i>	GCTGGGACGTCGAGTTTCTT	AGCAACAGTCTTGCAGGTAA
<i>skr-12</i>	TCCAATTGTCGATGCCCCAG	TCGATGGTGTAGCCGAGATT
<i>sod-3</i>	AAGCATCATGCCACCTACGT	CGCTGGTTGGAGAGCAATTG
<i>trx-1</i>	GAGACGCAATTGAGGCACTG	GAGCAGATACGTGCTCCAAC
<i>vha-6</i>	AGAATGCGTACACGAGAAAA	ATGCTCATCGTAGTCTGGAA
<i>vha-11</i>	GGCAGATTTGGTGAAGGCTG	CGACGAGAGTGTCCGCTATT
Y16B4A.2	TGCACAAATGCTTCCACCCA	ATGCAGCTTGGTTTCTGTAG
ZK1307.8	GGAATGGAGTGGCCCAGAAG	ATTTTGCTGGCTCCGTGACT



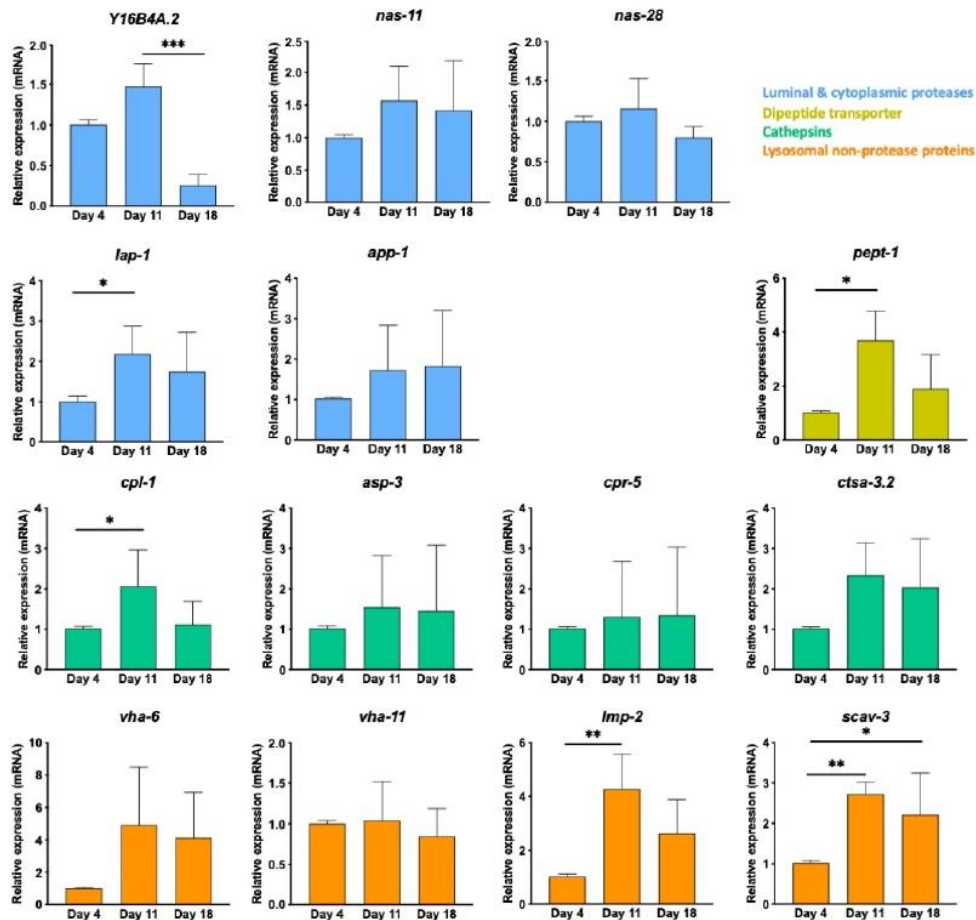
**Figure S1:** Relative expression of heat shock protein 16.2 (HSP-16.2) encoding gene. Young adult worms were fed for 4, 11 and 18 days with bacteria, which were pre-treated with 0 mM (G0), 20 mM (G20) or 60 mM (G60) of glyoxylic acid. Relative expression of genes coding for antioxidant, carbonyl stress and unfolded protein responses were analyzed by comparing all the conditions to the Ctrl at day 4. Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation of 3 biological replicates. The *cdc-42* and *pmp-3* genes were used to normalize levels of gene expression. \* $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p \leq 0.001$  G20 or G60 vs G0 for the same incubation time (Kruskal–Wallis, Dunn’s multiple comparisons test).



**Figure S2:** Digestion of bacterial glycosylated proteins by *C. elegans*. Young adult worms were fed with bacteria, which were incubated with 0 mM (G0) and 60 mM (G60) of glyoxylic acid. Some worms were only incubated with either G0 (a) or G60 (e) bacteria, while others were incubated with a mixed of the 2 bacteria types with a ratio G0:G60 of 7:1 (b), 3:1 (c) and 1:1 (d). After 4 days of culture, half of the worms were lysed (A) while the other half was incubated in the bacteria-free medium for 1 day before being washed and lysed (B). Western blots of worms' lysates were stained with anti-CML and anti-actin antibodies. The arrow shows a protein band poorly digested by the worms.

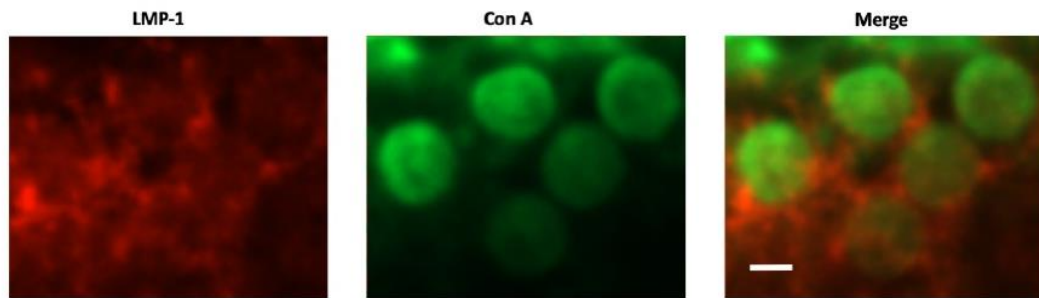
All results are representative of 3 independent experiments.





**Figure S3:** Impacts of dietary *N*-carboxymethyllysine (dCML) exposure on transcriptional regulation of some digestive enzymes and lysosomal proteins. Young adult worms were fed with bacteria, which were incubated with 0 mM of glyoxylic acid. After 4, 11, and 18 days of culture, relative expression of genes coding for luminal and/or cytoplasmic proteases, lysosomal cathepsins and lysosomal non-protease proteins were analyzed by comparing all the conditions to the day 4. Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation of 3 biological replicates. The *cdc-42* and *pmp-3* genes were used to normalize levels of gene expression.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Kruskal–Wallis, Dunn’s multiple comparisons test).

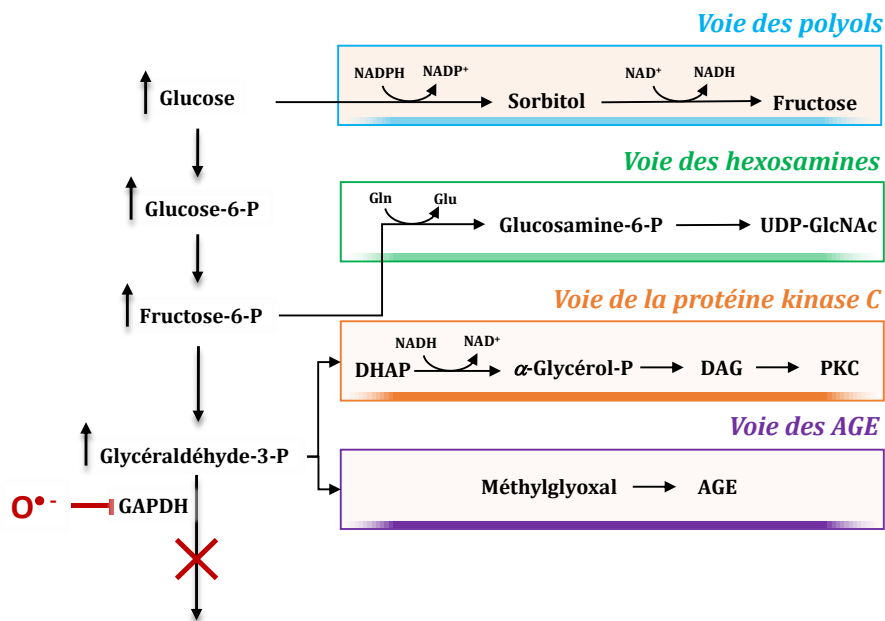


**Figure S4:** Mapping of lysosomal epitope and concanavalin A (Con A) staining on intestinal endosomes. Immunohistochemical assays were performed on worms fed for 4 days with bacteria, which were pretreated with 60 mM of glyoxylic acid, using Con A and anti-lysosome-associated membrane protein homolog 1 (LMP-1) antibody. Fluorescence micrographs with the mentioned lectin or antibody are shown. Scale bars = 2.5  $\mu\text{m}$ .

All results are representative of 3 independent experiments.

## II. Induction de la glycation endogène en condition riche en glucose

L'hyperglycémie persistante, caractéristique du DT2, favorise la glycation endogène et augmente le risque de diverses complications microangiopathiques, telles que les rétinopathies, les néphropathies et les neuropathies, et de complications macroangiopathiques conduisant à des maladies cardiovasculaires<sup>48,203</sup>. Aucune étude n'a, à ce jour, permis de déterminer si les AGE sont la cause et/ou la conséquence de ces complications. Michael Brownlee a émis une hypothèse sur l'implication de 4 voies métaboliques du glucose qui induiraient les dommages cellulaires et tissulaires favorisés par l'hyperglycémie (**Figure 17**)<sup>131</sup>.



**Figure 17** : Mécanisme potentiel de l'activation de 4 voies métaboliques de dommages cellulaires et tissulaires en condition d'hyperglycémie. Modifié d'après Brownlee<sup>131</sup>. L'excès d'espèces réactives de l'oxygène (dont l'anion superoxyde,  $O_2^{\bullet-}$ ) inhibe partiellement l'enzyme glycolytique glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), augmentant ainsi les précurseurs de glycolyse en amont de cette réaction. Différentes voies métaboliques du glucose utilisant ces précurseurs vont être activées. Il en résulte une augmentation du flux de dihydroxyacétone phosphate (DHAP) vers le diacylglycérol (DAG), un activateur de la protéine kinase C (PKC), et des trioses phosphate vers le méthylglyoxal, le principal précurseur intracellulaire des produits terminaux de glycation avancée (*advanced glycation end-products*, AGE). L'augmentation du flux de fructose-6-phosphate en uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-N-acétylglucosamine) augmente la modification des protéines par la N-acétylglucosamine O-liée (GlcNAc) et l'augmentation du flux de glucose par la voie des polyols consomme du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et épuise le glutathion. Gln : glutamine, Glu : glutamate, NAD<sup>+</sup>/NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, -P : phosphate

Ces voies seraient activées suite à l'emballement de la glycolyse et la suractivité de la chaîne respiratoire mitochondriale qui génère des ERO. Une des enzymes glycolytiques, la GAPDH, est sensible à l'oxydation. Son inhibition partielle par les ERO induit une augmentation des différents produits intermédiaires de la glycolyse en amont et l'activation de 4 voies métaboliques annexes :

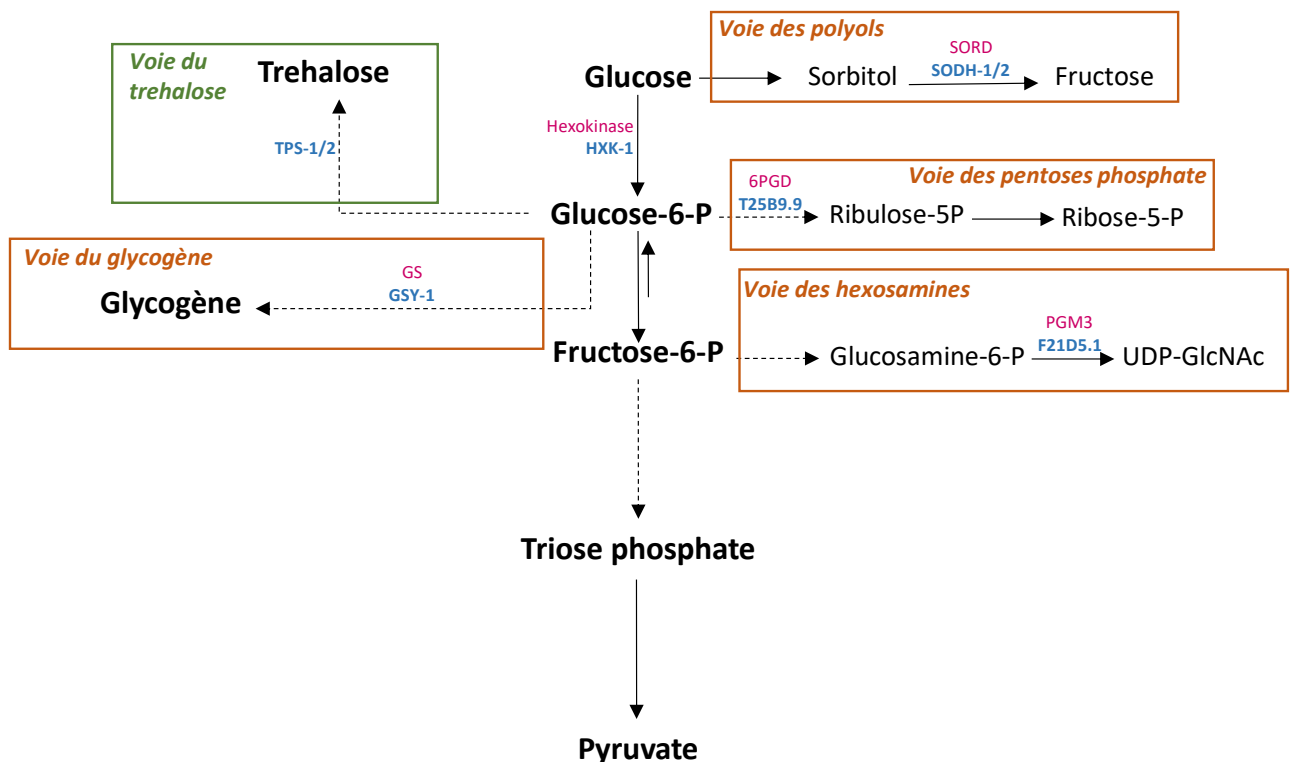
- voie des polyols
- voie des hexosamines
- voie de la PKC
- glycation endogène induite par la production de MGO

Ces voies amplifieraient les processus oxydants et induiraient de l'inflammation. Leur régulation et les mécanismes associés sont complexes et ne sont pas encore complètement élucidés. Par exemple, le rôle exact de la formation d'AGE endogènes dans les complications de l'hyperglycémie n'est pas démontré.

L'objectif principal de notre étude était de révéler une association entre la concentration de glucose alimentaire et certains mécanismes physiopathologiques induits. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'activation de différentes voies métaboliques du glucose, dont celles qui sont suspectées d'être à l'origine de la toxicité du glucose<sup>131</sup>. Afin de cribler rapidement l'activation de ces voies, nous nous sommes concentrés sur l'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans les différentes voies métaboliques du glucose. Bien que la régulation principale des enzymes soit post-traductionnelle, l'expression de leurs gènes peut refléter leur activation et les besoins enzymatiques des cellules. En outre, il a été rapporté que l'expression des gènes de *C. elegans* codant les enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose était corrélée à leur activité<sup>535</sup>. Cette approche scientifique est rapide et sensible même si des études analytiques futures seront essentielles pour valider les mécanismes identifiés.

Après avoir cultivé les vers avec différentes quantités de glucose, nous avons analysé l'expression de gènes codant les enzymes clés impliquées dans la synthèse du glucose-6-phosphate (hexokinase-1, HXK-1) et dans les voies du métabolisme du glucose dépendant du glucose-6-phosphate : les tréhalose-6-phosphatase synthases (TPS-1 et TPS-2), la glycogène synthase (GSY-1), la phosphogluconate déshydrogénase (T25B9.9) et la phosphoacétylglucosamine mutase (F21D5.1) qui sont impliquées respectivement dans les voies du tréhalose, du glycogène, des pentoses phosphates et de l'hexosamine,

respectivement (**Figure 18**). Le disaccharide tréhalose sert de stockage d'énergie et de résistance au stress ; même si sa voie de biosynthèse n'existe pas chez les mammifères, nous l'avons analysé afin de pouvoir interpréter correctement nos résultats.



**Figure 18** : Schéma simplifié de différentes voies métaboliques du glucose chez *Cænorhabditis elegans*.

Nous avons également analysé l'expression des gènes codant les isozymes qui transforment le sorbitol en fructose : les sorbitol déshydrogénases. La voie de la PKC n'a pas été analysée et la voie permettant la glycation endogène a été évaluée par l'analyse des gènes codant les glyoxalases qui métabolisent le GO et MGO, et la formation d'AGE dérivés de cet  $\alpha$ -DC. Nous avons complété ces analyses avec l'analyse du stress oxydant (analyse transcriptionnelle de la réponse oxydante et évaluation de l'oxydation des protéines). La longévité des vers a été mesurée et nous avons analysé l'induction de la glycation endogène par le GO et le MGO et son impact transcriptionnel sur différents marqueurs biologiques.

Nos résultats ont montré une association entre alimentation riche en glucose, augmentation des marqueurs oxydants, formation de CML endogène et réduction de la longévité des vers. L'activation d'une des voies métaboliques du glucose (voie des polyols) et la génération d'un précurseur de glycation (GO) favoriseraient la glycation endogène.

La formation de CML induite par le GO a été associée à différentes altérations biologiques qui ont été mises en évidence par une modulation transcriptionnelle telle que la réponse aux protéines mal repliées cytoplasmique et mitochondriale et certaines fonctions lysosomales.

## Exposure of *Cænorhabditis elegans* to dietary glucose induced N $\epsilon$ -carboxymethyllysine formation through possible mechanisms involving polyol pathway and glyoxal

Constance Dubois<sup>1</sup>, Shuting Chen<sup>1</sup>, Charles Paul-Constant<sup>1</sup>, Ibrahim Bin'Said<sup>1</sup>, Michael Howsam<sup>1</sup>, Frédéric J Tessier<sup>1</sup>, Eric Boulanger<sup>1</sup> and Chantal Fradin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France

\* Corresponding author, e-mail address: chantal.fradin@univ-lille.fr

### Abstract

**Background** The formation of endogenous advanced glycation end-products (AGEs) is promoted by various pathogenic processes such as inflammation, oxidation and hyperglycemia. AGEs, which accumulate during type 2 diabetes, are suspected to be involved in the complications of this disease. However, whether AGEs formation is a causal mechanism or simply a pathological consequence is still under discussion.

**Purpose of the study** To analyze the association between exposure to dietary glucose, AGEs formation, oxidation, glucose metabolism and *Cænorhabditis elegans* lifespan.

**Methods** *C. elegans* worms were grown in medium containing no glucose or different concentrations of glucose: 40 mM, 110 mM or 550 mM. Lifespan assays were performed with live or heat-inactivated bacteria to 1- check impact of glucose and bacteria on longevity and 2- choose the type of food to give to the worms for biological analysis. After 3, 6, 10 and 13 days of incubation, expression of antioxidant and metabolic genes was measured by RTqPCR whereas protein oxidation (carbonylation) and glycation (N $\epsilon$ -carboxymethyllysine or CML and methylglyoxal-derived AGEs) were monitored by western blot.

**Results** The highest concentration of glucose (550 mM) decreased lifespan of *C. elegans*. In this glucose-rich diet, worms displayed more oxidized proteins and CML-modified proteins, whereas no methylglyoxal-derived AGEs epitopes were detected on worms' proteins. Furthermore, genes coding for isozymes with sorbitol dehydrogenase activity from the polyol

pathway were modulated. CML formation induced by glyoxal was associated with different biological alterations which were highlighted by transcriptional modulation such as cytoplasmic and mitochondrial unfolded protein response (UPR) and lysosomal functions.

**Conclusion** This study has demonstrated induction of oxidation and glycation of endogenous proteins, which were possibly derived from the modulation of the polyol pathway and the formation of glyoxal. These results open perspectives on the use of the *C. elegans* model to better understand the health effects of endogenous glycation.

**Keywords:** Advanced glycation end products (AGE), N $\epsilon$ -carboxymethyllysine (CML), *C $\alpha$ enorhabditis elegans*, Glucose, polyol pathway, oxidation.

## 1. Introduction

Unhealthy diet and sedentary lifestyle are responsible for an epidemic of obesity worldwide and limit the trend toward longer life expectancy<sup>1</sup>. Excessive caloric intake and its related metabolic dysfunctions are risk factors for and accelerate the onset of chronic age-related conditions such as type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases. T2D is generally known as a metabolic disorder, characterized by insulin resistance, following progressive deterioration of hyperglycemia control and related impaired beta-cell function. Persistent hyperglycemia can be severe, increasing the risk of a variety of microangiopathic complications, such as retinopathies, nephropathies and neuropathies, and macroangiopathic complications leading to cardiovascular diseases<sup>2</sup>. These complications are multifactorial and are associated with the increase of endogenous advanced glycation end-products (AGEs) during diabetes. Glycated hemoglobin, glycation intermediate, is considered a biochemical marker of the regulation of diabetes and of the risk of microvascular complications<sup>3</sup>.

AGEs are products resulting from a non-enzymatic reaction between reducing sugars and free-amino groups of proteins. Glycation includes various intermediate reversible steps before final irreversible rearrangements leading to the formation of AGEs. AGEs constitute a heterogenous group of compounds, which can display cyclic structure such as pentosidine or not like N $\epsilon$ -carboxymethyllysine (CML). Glycation can occur both exogenously during food processing and endogenously in the human body. Since diabetes is characterized by uncontrolled hyperglycemia, the excess glucose can interact with endogenous proteins to form AGEs. This mechanism is one of the hypothetical toxicity pathways of hyperglycemia<sup>4</sup>. Glucose metabolism involves a series of complex physiological processes that include several



pathways. After glucose reaches the cytosol through glucose transporters (GLUTs), it can be stored as glycogen, or be metabolized by various metabolic pathways<sup>5</sup>.

Under hyperglycemia condition, the metabolic flux of glucose is shifted from complete oxidation in mitochondria through the glycolysis pathway to different pathways: polyol, pentose phosphate, hexosamine and protein kinase C pathways<sup>4,6</sup>. This shift is mainly due to the oxidative status generated in diabetic patients with reactive oxygen species (ROS) inhibiting pyruvate formation and then to the accumulation of glycolytic intermediates, which can activate those pathways. These pathways can lead to the formation of reducing sugars, such as fructose (polyol pathway) or ribose (pentose phosphate pathway), that are more reactive than glucose on proteins to form AGEs. Formation of methylglyoxal (MGO) from glyceraldehyde-3-phosphate derived dihydroacetone-phosphate can enhance endogenous glycation. Like other  $\alpha$ -dicarbonyl ( $\alpha$ -DC) compounds such as glyoxal (GO) and MGO readily reacts with proteins, lipids and nucleic acids to form AGE. Most of the glucose metabolism pathways generate ROS, which can further induce AGEs formation.

Inflammation plays a major role in the pathophysiology of diabetes. This context of inflammation causes oxidative stress, which is at the origin of lipid peroxidation and oxidation of sugars known as the Wolff reaction<sup>7</sup>. Lipid peroxidation can induce the formation of AGEs like CML. Oxidized sugars will form  $\alpha$ -DC compounds. Glycation through these compounds is faster than through reducing sugars, generating high levels of AGEs. Excess production of the reducing sugars  $\alpha$ -DC compounds would favor AGEs production with associated cellular damages, resulting in cellular lysis and release of very stable AGEs in the extracellular environment. The exact role of these different processes in the complications of diabetes is still under discussion and additional studies are needed to clearly decipher between the role of AGE in diabetes complications or their formation as a result of these complications.

We initiated a work on *Caenorhabditis elegans* in order to highlight an association between the ingestion of glucose, the formation of AGEs and the pathophysiological impact of the latter. Promising studies have already been carried out with this model. They have demonstrated the induction of mitochondrial dysfunction induced by the ingestion of glucose by the production of MGO-derived AGEs<sup>8</sup>. On our side, preliminary work has shown that CML, which is not derived from MGO, could also be induced by dietary glucose, implying another synthetic pathway. Thus, we first analyzed the impact of glucose on *C. elegans* lifespan depending on the feeding bacteria and the glucose concentration. We performed different immunological analyzes with anti-CML and anti-MGO-derived AGEs antibodies for relative quantification of AGEs in worms. Protein oxidation and the relative expression of genes

encoding different biological processes such as glucose metabolism and response to different stresses were determined. The induction of endogenous glycation by GO and MGO and its biological impact was also verified.

Our results highlighted an association between a glucose-rich diet, increased oxidative markers, endogenous CML formation and reduced worm lifespan. The activation of one of the glucose metabolic pathways (polyol pathway) and the generation of a glycation precursor (GO) would promote endogenous glycation.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 *C. elegans* strain and maintenance**

The Bristol N2 wild type strain and the OP50 *Escherichia coli* (*E. coli*) feeding strain were obtained from the *Cænorhabditis* Genetics Center (<https://cgc.umn.edu>, accessed 09 March 2022). Worms were grown on Nematode Growth Medium (NGM) containing NaCl (2,4g/L), pepton (2 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.0 (20 mM), CaCl<sub>2</sub> (1 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM) and cholesterol (5µg/mL). Agar (20 g/l) was added to prepare maintenance and lifespan plates.

OP50 bacteria were grown 16h at 37°C with continuous shaking in Lysogeny Broth (LB) medium containing pepton (10 g/l), yeast extract (5 g/l) and NaCl (10 g/l). The overnight culture served as feeding source of *C. elegans* culture and was stored at 4°C up to 2 weeks. NGM plates were seeded with 200µl of OP50 suspension and incubated overnight at 37°C. Except for maintenance and larval development, some experiments were performed with heat-killed feeding bacteria. For this, overnight OP50 culture was 10 times concentrated and heat-killed 30 min at 65°C.

*C. elegans* was maintained at 20°C on NGM agar plates seeded with OP50 bacteria. Before each experiment, young adult worms were obtained after synchronization of eggs released from gravid worms by lysis with hypochlorite. Eggs were recovered and incubated in M9 buffer (NaCl 86 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM and MgSO<sub>4</sub> 1 mM) containing no nutrients to stop into L1 stage after hatching. L1 were then grown on NGM plates seeded with OP50 bacteria for 2 days at 20°C to develop into the 3 next larval stages and to become young adults.

### **2.2 Lifespan assay**

N2 young adults were grown at 20°C on NGM agar plates containing no glucose or different concentrations of glucose: 40 mM (Low glucose diet, LGD), 110 mM (Intermediate glucose diet, IGD) or 550 mM (High glucose diet, HGD). To prevent progeny, the anti-mitotic

5-fluorodesoxyuridine (FUdR) was added at a final concentration of 50  $\mu\text{M}$ <sup>9</sup>. The plates were seeded with either heat-killed or live bacteria. Plates seeded with bacteria were incubated overnight at 20°C before addition of the worms. Each condition included 3 technical replicates.

The worms were scored every 2-3 days and they were considered as dead when they did not move after repeated stimuli. Animals were censored when they crawled off the plate, exploded or contained internally hatched larvae. Three independent experiments were performed with more than 60 animals each.

### 2.3 Culture conditions for analysis of gene expression, AGEs production and protein oxidation

Day1 adult worms were grown in 6-well plates (approximately 1000 worms per well) containing S medium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 6.0, NaCl 100 mM, potassium citrate 1 M pH 6.0, MgSO<sub>4</sub> 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium 1 mM, FeSO<sub>4</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, ZnSO<sub>4</sub> 1 mM, CuSO<sub>4</sub> 1 mM, cholesterol 5 mg/L) alone or S medium plus D-glucose at a final concentration of 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD). All the media were supplemented with FUdR (50  $\mu\text{M}$ ) and heat-inactivated bacteria. An osmotic stress control was performed by incubating the worms in 550 mM of D-mannitol (HGD). Worms were incubated 3, 6, 10 and 13 days at 20°C in those different conditions. Three independent experiments were performed.

For GO and MGO experiments, in the same way as for glucose, worms were incubated in S medium alone or S medium supplemented with FUdR (50 $\mu\text{M}$ ), heat-inactivated bacteria and 1 mM, 5 mM or 15 mM of  $\alpha$ -DC compounds. Worms were incubated several days at 20°C. Three independent experiments were performed.

For RNA extraction, worm cultures were centrifuged 2min at 500g and worms were suspended in RNA later before to be stored appropriately until processing.

For protein extraction, worms' cultures were centrifuged 2min at 500g and worms were washed 5 times with M9 buffer before to be suspended in RIPA buffer (Tris HCl 100 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, EDTA 5 mM, sodium deoxycholate 1%, SDS 0.1% and  $\beta$ -mercaptoethanol 1.5%) and stored at -20°C until processing.

All culture supernatants were kept for determination of glucose concentration.

### 2.4 Glucose assay

Glucose concentration in culture supernatants and worm lysates was determined using OneTouch Verio IQ blood glucose meter and test strip (OneTouch®). The samples were

compared to a glucose standard curve within the range of 0-8 mM (18-144 mg/dL), which gives a linear detection.

## 2.5 Whole protein extraction, western blotting and dot Blotting

Protease inhibitors (cOmplete EDTA-free proteinase inhibitor cocktail, Sigma Aldrich) and acid-washed glass beads (425–600  $\mu\text{m}$ ) were added to the worms' suspension. The worms were then homogenized with Precellys®24 (Bertin Technologies) at full speed, 4 times 10s, 3 cycles. The samples were kept at 4°C during the whole process. Soluble materials were recovered by centrifugation at 15000g for 15min at 4°C and protein concentration was determined using the Bradford assay (Sigma Aldrich).

Lysis supernatants (2  $\mu\text{g}$ ) were denatured with lithium dodecyl sulfate (LDS) containing buffer (Life technologies) at 70°C for 10min. Samples were loaded and separated on a Bis-Tris 4-12% precast polyacrylamide gels (Life Technologies) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Free membrane sites were blocked with nonfat dried milk diluted to a 5% concentration in TBST buffer (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.4): 1h at room temperature. The membranes were then incubated 2h at room temperature with either anti-CML (Abcam ab27684), anti-MGO-derived AGEs (Abcam ab243074) or anti-actin antibodies (Sigma Aldrich A2066) diluted 1:5000, 1:2000 and 1:2500 in TBST buffer containing 0.5% nonfat dried milk, respectively. After several washes with TBST buffer, membranes were incubated 2h at room temperature with HRP (*horseradish peroxidase*)-secondary antibody conjugate diluted 1:5000 in TBST buffer containing 0.5% nonfat dried milk. After several washes with TBST buffer and a final wash in the substrate buffer (Tris 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, Ph 9.5), Enzyme activity was detected with Clarity western ECL substrate (BioRad, Marne-la-Coquette, France). The chemiluminescent signals were detected using the Fu-sion FX Spectra system (Vilber, Collégien, France). Bands were normalized to actin levels using ImageJ.

For dot blotting of worms' extracts, 0.2  $\mu\text{g}$  of each worms' protein extract was spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. Membranes were probed and detected as described for western blotting. For each dot, CML or MGO-derived AGEs signal intensity was measured with ImageJ software and was normalized to actin.

## 2.6 Total RNA extraction and gene expression analysis by RT-qPCR

RNAs were extracted using the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method<sup>10</sup>. Briefly, the worms were homogenized in Trizol (Ambion) with acid-washed glass

beads (425–600  $\mu\text{m}$ ) using Precellys®24 at full speed, 4 times 10s, 3 cycles. Addition of chloroform to the worms' lysates containing phenol allowed separation of RNAs from DNA and proteins after centrifugation. RNAs recovered in the upper aqueous phase were precipitated by isopropanol and washed with ethanol 70%. Amount of total RNAs were measured with the NanoDrop™ (Ozyme) spectrometer. RNAs (1 $\mu\text{g}$ ) were treated with DNaseI (Thermo Scientific) to remove genomic DNA prior to be reverse transcribed to complementary DNA, cDNA (High-capacity cDNA reverse transcription kits, Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed using PowerUp™ SYBR® Green 2X Master Mix (Applied Biosystems). Genes expression levels were normalized to genes that encode cell division cycle protein 42 (CDC-42) and peroxisomal membrane protein 3 (PMP-3) and relative expression was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. Primers are listed in **Table 1**.

**Table 1.** Primers list for real-time PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	
<i>F21D5.1</i>	Forward: GGTGCTCCACGGTTCAGAAA	Reverse: GGCACCACATCCCTGATTCA
<i>fgt-1</i>	Forward: TGCTCGTCACCATCGCAATT	Reverse: GGAGACTCTGGGCACAACAT
<i>glod-4</i>	Forward: GTGCCAAGACCATCGACTTT	Reverse: TCTTGCTCCATCGTCCGTTAT
<i>djr-1.1</i>	Forward: GCACTCTTGAGCCATGGAGT	Reverse: TGCCACTGACAACAACACGA
<i>djr-1.2</i>	Forward: AGAGCGTGTCACTTGTCCT	Reverse: ACTCTGTCGCTGATAACAACG
<i>gst-14</i>	Forward: TTCGGGTTGCTGGAAAAAC	Reverse: CCGACTCGTTTTGCAATGAC
<i>gst-4</i>	Forward: TTTGATGCTCGTCTTTC	Reverse: AATGGGAAGCTGGCCAAATG
<i>gsy-1</i>	Forward: CCGGAGCCGTCAGATGAAT	Reverse: CCGAGGATCACAGCGTCATT
<i>hvk-1</i>	Forward: GCACCGAATGGGATGAAGTT	Reverse: TCGGGCACACTCTCCCATAT
<i>pmp-3</i>	Forward: AGTTCAGTTGCTCTCGTTGC	Reverse: AGGCCAGCAAACATTCGAAG
<i>sod-1</i>	Forward: TCCGTCACGTAGGCGATCTA	Reverse: TCCGGCATGAACAACCATAGA
<i>sod-3</i>	Forward: AAAGCATCATGCCACCTACG	Reverse: TGAATTCAGCGCTGGTTGG
<i>sodh-1</i>	Forward: GGTTGGAGGACACGAAGGAG	Reverse: GGCTCGTGGCCTTTCTTACA
<i>sodh-2</i>	Forward: ACGAATGGAGGAGCACATGG	Reverse: GACCAACAAACACCACGGTC
<i>T25B9.9</i>	Forward: AGCAAATCAGCAAGGCTCTTT	Reverse: GCATCCTCCTCTCCACATCAA
<i>tps-1</i>	Forward: CCTGGCGTCCGACAAAGTAT	Reverse: TCTCCTCGGAGCCCATTTTG

<i>tps-2</i>	<b>Forward:</b> GCCTTGCCACGTACATTTTC	<b>Reverse:</b> CCTCCGGAACCTTGCTTGAT
--------------	--------------------------------------	--------------------------------------

## 2.7. Detection of oxidized proteins

Protein carbonylation is a major hallmark of oxidative damage<sup>11</sup>. The OxyBlot Protein Oxidation Detection kit (Merck) was used to analyze possible protein oxidation induced by glucose diets. The manufacturer's instructions were followed to perform the immunoblot detection of the protein carbonyl groups. Briefly, the carbonyl groups (soluble worm lysates: 0.5µg of proteins) were derivatized with 1X 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution, adding DNP residues on proteins. After neutralization, proteins were loaded and separated on a Bis-Tris 4-12% precast polyacrylamide gels (Life Technologies) and transferred to PVDF membrane. Membranes were probed and detected as described for western blotting using anti-DNP antibody. Bands were normalized to actin levels using ImageJ.

## 2.8. Immunohistochemistry

The Bouin's tube fixation protocol with slight modifications was followed as previously described<sup>12,13</sup>. Primary antibodies used were anti-CML 1:200 and anti-IFB-2 (MH33, DSHB, Iowa city (IA), USA) 1:40. These antibodies were detected with secondary antibodies conjugated to either fluorescein isothiocyanate, FITC (anti-rabbit IgG, Molecular probes, Eugene (OR), USA) or Alexa Fluor 568 (anti-mouse IgG, Molecular probes) diluted respectively 1:200 and 1:1000 in blocking buffer containing 2.5µg/µL of DAPI (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

Slides were examined under a ZEISS spinning disk confocal microscope using ZEN 3.3 software (Zeiss, Marly-le-Roi, France).

## 2.9 Statistics

Statistical analyses were generated by bioinformatics software, GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, San Diego (CA), USA).

Survival curves are based on log rank test

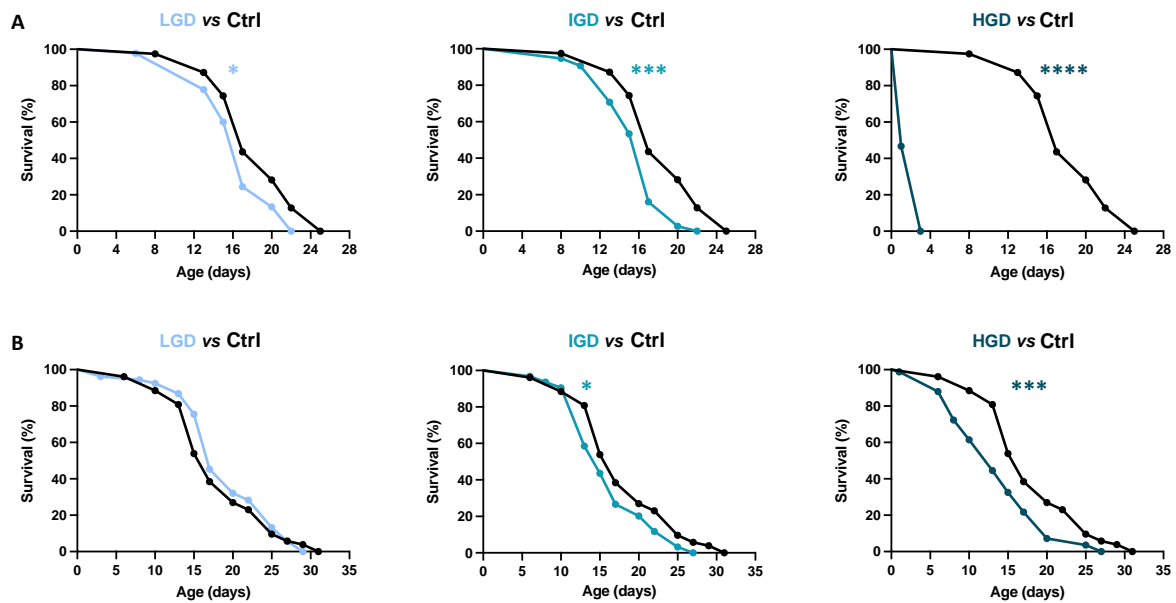
Gene expression analysis: all experiments were performed in 2 technical replicates and 3 biological replicates and the results were expressed as mean ± standard deviation (SD). Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the means were determined by the Kruskal–Wallis, Dunn's multiple comparisons test.

Dot -blotting analysis: all experiments were performed in 3 biological replicates and the results were expressed as mean  $\pm$  SD. Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the means were determined by 2-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test.

### 3. Results

#### 3.1 Dose dependent effect of dietary glucose on *C. elegans* lifespan and antioxidant response were influenced by the feeding bacteria

We first aimed to determine the concentrations of glucose to use throughout the study by testing the impact of various concentration of dietary glucose on *C. elegans* lifespan. As lifespan can be modulated by the metabolism of bacteria used to feed the worms<sup>14</sup>, we have performed the lifespan assays with live and heat-inactivated bacteria. Therefore, adult worms were exposed to 0, 40, 110 or 550 mM of D-glucose in presence of live or heat-inactivated bacteria at 20°C. As expected, control worms grown with live bacteria had a shorter lifespan compared to control worms grown with heat-inactivated bacteria: maximum lifespan of 25 vs 31 days. Worms incubated with live bacteria didn't survive in the highest concentration of glucose (**Figure 1A**). At 40 mM and 110 mM, glucose had a significant effect on *C. elegans* lifespan, the highest concentration with the most impact. When incubated with heat-inactivated bacteria, the worms were more susceptible to 550 mM glucose (**Figure 1B**). At this concentration glucose significantly reduced both, the median and the maximum lifespan compared to the control condition (**Figure 1B**): 13 vs 17 days and 27 vs 31 days, respectively. The intermediate concentration of glucose (110 mM) had a slighter effect on the worms' lifespan whereas the lowest concentration (40 mM) seemed to improve lifespan, although this effect was not significant. These results confirm the influence of bacteria, certainly through glucose processing, on *C. elegans* lifespan.



**Figure 1. Survival of worms in presence of glucose.** N2 wild-type strain of *C. elegans* was grown in NGM containing no glucose (Ctrl) or 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose. Worms were incubated at 20°C in presence of live (A) or heat-inactivated (B) bacteria.

Data are representative of 3 biological replicates.

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared to control survival.

After 13 days of culture, we measured the relative expression of genes encoding some of the key antioxidant enzymes of *C. elegans*: mitochondrial superoxide dismutase SOD-3 and glutathione *S* transferase GST-4. SODs are the first ROS detoxifying enzymes<sup>15</sup>. GSTs have important role in antioxidant recycling but also deactivate electrophilic xenobiotics<sup>16</sup>. Furthermore, some glucose metabolism pathways can impair the glutathione recycling with direct impact on the glutathione-dependent antioxidant system. With live bacteria, the expression of these genes increased with glucose concentration (**Figure S1A**), while in the presence of heat-inactivated bacteria (**Figure S1B**), their expression was mainly induced by the highest glucose concentration (550 mM). In 40 and 110 mM of glucose, the expression of *sod-3* and *gst-4* was higher when the worms were grown with the live bacteria than with the heat-inactivated bacteria (**Figure S1**).

Thus, we decided to use the worms fed with the heat-inactivated bacteria with the 3 concentrations of glucose throughout the study in order to 1- limit the biases due to the metabolism of the bacteria, 2- test conditions that have specific impact on the longevity of worms. The worms were not incubated longer than 13 days to have at least 50% of worms alive in 550 mM of glucose (**Figure S1B**). The control group was incubated with no glucose.



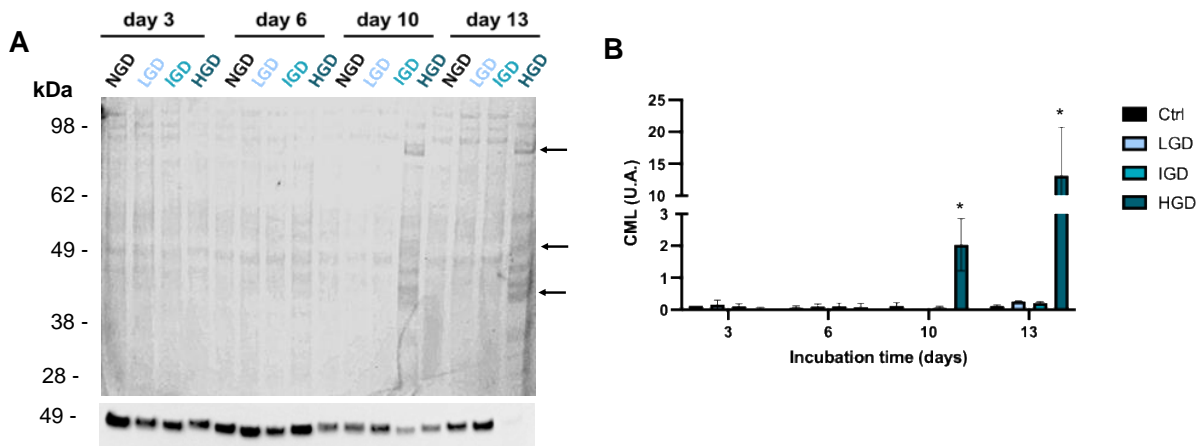
### **3.2 Glucose was not detectable in worms and expression of FGT-1 glucose transporter encoded gene was not modulated by dietary glucose**

To determine the amount of glucose ingested by the worms, glucose concentrations in the culture media and in the worms' lysates were monitored. Levels of glucose didn't vary in the culture media during the incubation time (**Figure S2A**), showing that, as expected, *C. elegans* ingested low amounts of glucose. When the worms were incubated with 40 mM of glucose, lower amount of glucose was detected after 13 days of incubation, although this decrease was not significant. This trend suggests that, in medium containing lower concentration of glucose, decrease of glucose level due to ingestion by the worms could be detected. Glucose ingestion could not be confirmed because of the sensitivity threshold of the glucose assay used, which did not allow to detect glucose in the worms.

The range of linear detection of this glucose assay is 1 to 8 mM, meaning that the lysates contained less than 1 mM of glucose; thus, less than 90 ng glucose per worm (for each lysate: 1000 worms were lysed in 500µl of lysis buffer). Concentration of the lysates didn't help to detect glucose as the buffer reagents started to interfere with the test (data not shown). We have then tried to indirectly verify the ingestion of glucose. We have monitored the expression of the gene coding the major *C. elegans* glucose transporter (FGT-1, ortholog of human GLUT4). The expression of the gene coding FGT-1 transporter mainly increased with the different glucose concentrations after 13 days of culture. Its expression did not depend on the concentration of glucose. (**Figure S2B**).

### **3.3 Glucose exposure induces the production of endogenous CML**

We wondered if dietary glucose could induce endogenous glycation. We've then analyzed the presence of CML and MGO-derived AGEs epitopes on *C. elegans* proteins after incubation in conditions containing none or different concentrations of glucose. Different proteins of worms grown 10 and 13 days in medium containing 550 mM of glucose displayed CML epitopes (**Figure 2A**). Quantification of the signals revealed a significant induction of CML epitopes on proteins after 10 and 13 days of incubation with 550 mM of dietary glucose, confirming induction of endogenous glycation during glucose-rich conditions (**Figure 2B**). No MGO-derived AGEs epitopes were detected in worms' lysates (**Figure S3**).

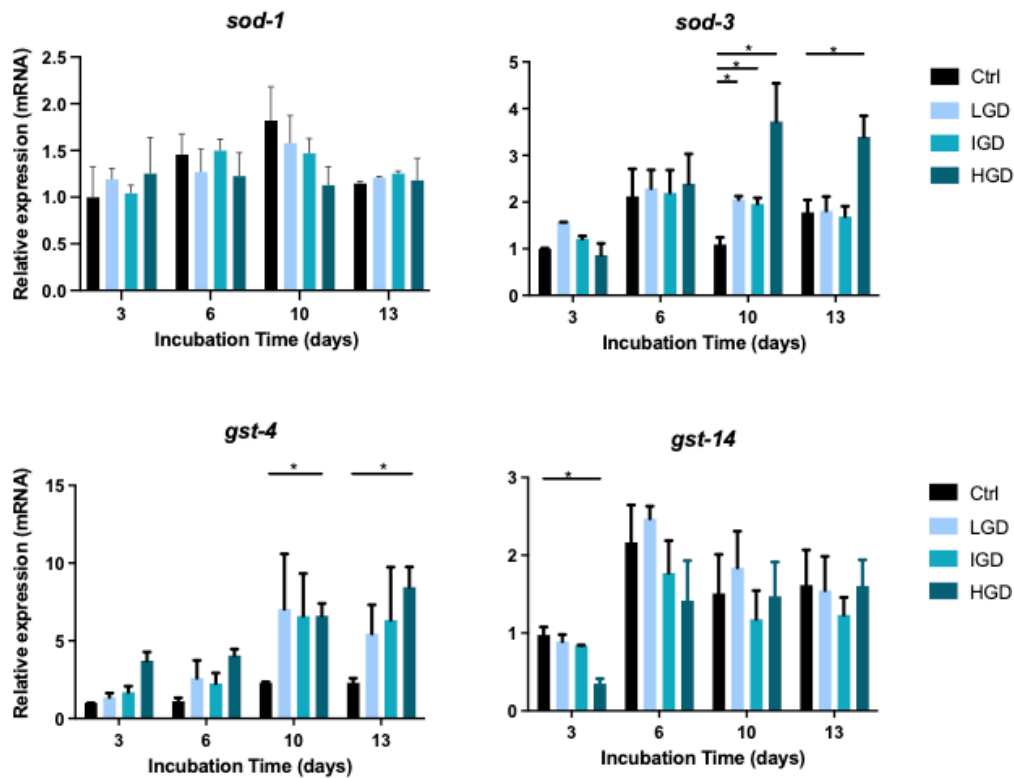


**Figure 2. Mapping of *N*ε-carboxymethyllysine (CML) epitopes.** Worms were grown in S medium containing 0 mM (Ctrl), 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose. After 3, 6, 10 and 13 days of incubation at 20°C, CML modified proteins were analyzed by western blot (A). CML epitopes from different proteins (arrows) were quantified, normalized to actin and results are expressed as arbitrary units (B).

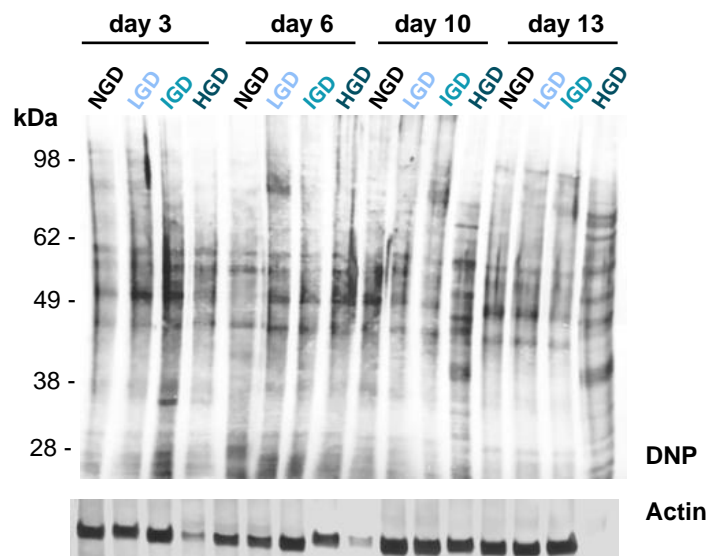
Data were expressed as means  $\pm$  SD of three biological replicates. \* $p < 0.05$  HGD vs Ctrl

### 3.4 Dietary glucose generated an oxidative environment and induce a specific transcriptional scavenging response towards $\alpha$ -dicarbonyl compounds

Considering the association between glycation and oxidation, we've then further analyzed the antioxidant response which is induced in the presence of ROS. In addition to expression of *sod-3* and *gst-4*, measurements of relative expression of *sod-1* (cytoplasmic SOD-1 encoding gene) and *gst-14* were determined. The highest concentration of glucose (550 mM) significantly induced expression of *sod-3* and *gst-4* after incubation of the worms 10 and 13 days in this glucose-rich condition (**Figure 1B and 3**). Lower concentrations of glucose (40 and 110 mM) had less effect on expression of these genes. Expression of SOD-1 encoding gene was not modulated by dietary glucose. Surprisingly, expression of *gst-14* was significantly down-regulated by 550 mM of dietary glucose at the earliest time of incubation (day 3). We've finally analyzed carbonylation of *C. elegans* proteins, which is a major hallmark of oxidative damage, after 13 days of growth in glucose-free and glucose-rich diets<sup>11</sup>. Western blot analysis shows glucose dose-dependent oxidation of proteins in glucose-rich diet (550 mM after 10 and 13 days of culture), confirming generation of oxidative stress in glucose rich conditions (**Figure 4**).



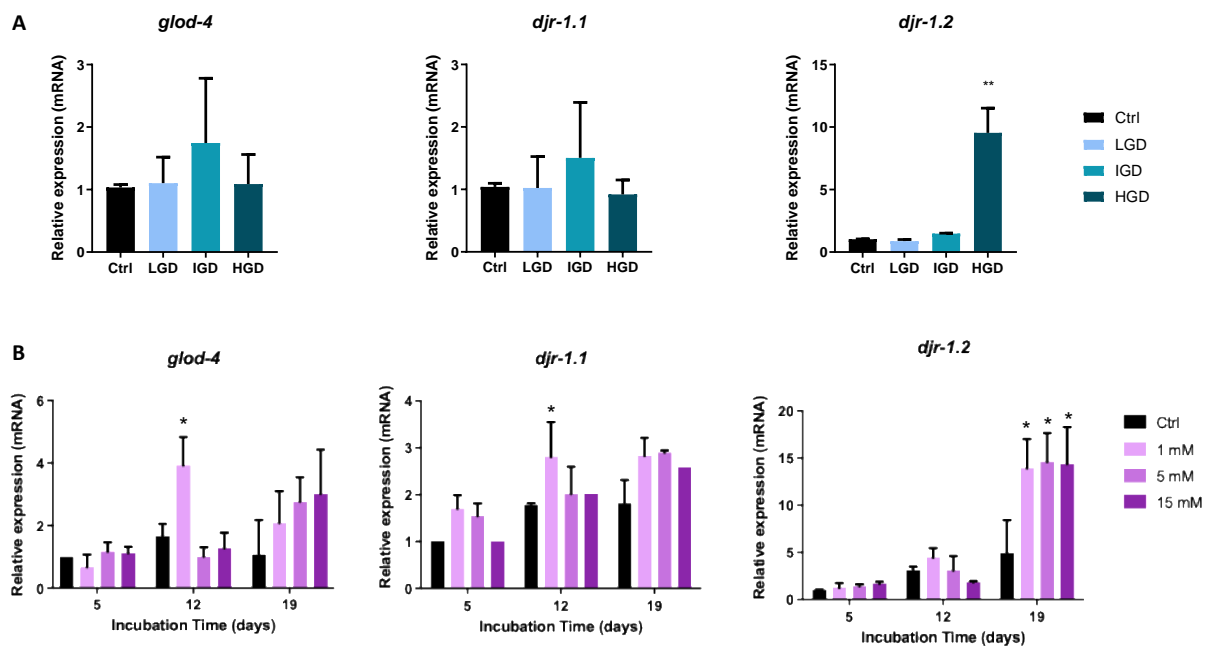
**Figure 3. Relative expression of *sod-1*, *sod-3*, *gst-4* and *gst-14* after exposure of *C. elegans* to dietary glucose.** Worms were grown in S medium containing 0 mM (Ctrl), 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose. After 3, 6, 10 and 13 days of incubation at 20°C, expression of SOD-1/3 and GST-4/14 encoding genes was analyzed. Relative expression of each condition was compared to the relative expression in medium with no glucose after 3 days of incubation. Data were expressed as means  $\pm$  SD of three biological replicates. \*p<0.05



**Figure 4. Carbonylation of proteins after 13 days' exposure of *C. elegans* to dietary glucose.** Worms were grown in S medium containing 0 mM (Ctrl), 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose. After 3, 6, 10 and 13 days of incubation at 20°C, carbonylation of proteins were analyzed by western blot. DNPH (1X 2,4-

Dinitrophenylhydrazine) was used to derivatize carbonyl groups on proteins. Data are representative of 3 biological replicates.

Oxidative conditions favor generation of  $\alpha$ -DC compounds such as GO and MGO. We analyzed the transcriptional expression of enzymes involved in their metabolism, converting GO and MGO to glycolate and lactate, respectively, thereby reducing endogenous glycation. After 13 days of culture, we measured the expression of genes encoding glyoxalase with glutathione dependent (GLOD-4) or independent (DJR-1.1 and DJR-1.2) activities. No regulation of the *glod-4* and *djr-1.1* genes was observed under the different conditions tested (Figure 5A). The *djr-1.2* gene was more expressed after incubation with the highest concentration of glucose (550 mM), suggesting an association between *djr-1.2* modulation and both the antioxidant response and glycation.



**Figure 5. Relative expression of *glod-4*, *djr-1.1* and *djr-1.2* after exposure of *C. elegans* to dietary glucose (A) or glyoxal, GO (B).** Worms were grown in S medium containing: A- 0 mM (Ctrl), 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose or 0 mM, 1mM, 5 mM or 15 mM of GO. After several days of incubation at 20°C, expression of GLOD-4, DJR-1.1 and DJR-1.2 encoding genes was analyzed.

Relative expression of each condition was compared to the relative expression in medium with no glucose after 3 days of incubation.

Data were expressed as means  $\pm$  SD of three biological replicates. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Ctrl

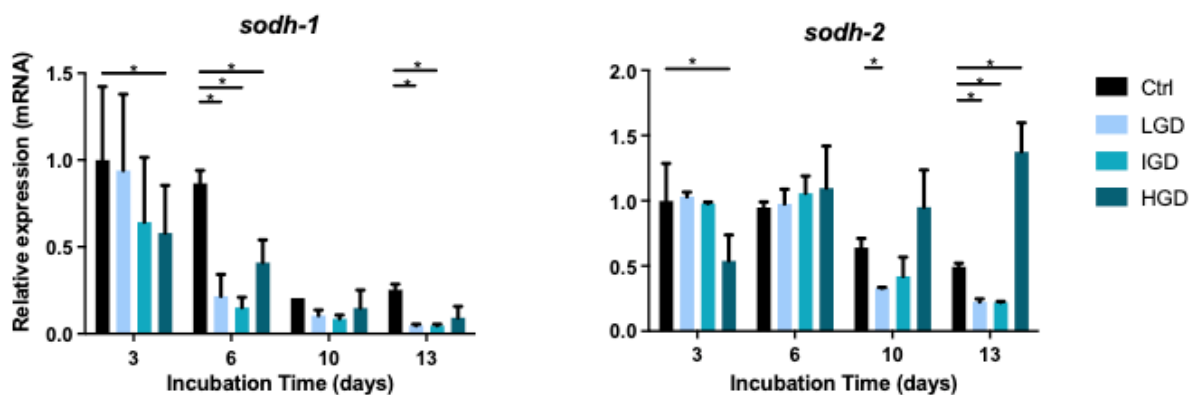
### **3.4 Dietary glucose did not affect the expression of genes coding hexokinase and enzymes involved in glucose-6-P dependent pathways**

We have checked if the expression of genes coding enzymes involved in the different pathways of glucose metabolism was modulated by dietary glucose after 3, 6, 10 and 13 days of incubation. We have first focused on key enzymes involved in glucose-6-phosphate synthesis (hexokinase-1, HXK-1) and in glucose-6-phosphate dependent glucose metabolism pathways: the trehalose-6-phosphatase synthases (TPS-1 and TPS-2), the glycogen synthase (GSY-1), the phosphogluconate dehydrogenase (T25B9.9) and the phosphoacetylglucosamine mutase (F21D5.1) that are involved in the trehalose, glycogen, pentose phosphate and hexosamine pathways, respectively (**Figure S4**). Whatever the glucose concentration used, no significant regulation of the expression of genes coding these different enzymes was detected with respect to the control condition (**Figure S4**). Moreover, the expression of these genes was not modulated by the worms age.

### **3.5 Dietary glucose dose dependently modulated the expression of sorbitol dehydrogenase encoding genes**

As expression of genes coding hexokinase-1 and enzymes involved in glucose-6-phosphate dependent pathways was not modulated by glucose-rich diet, we wondered if excess glucose would rather enter the polyol pathway. We've then analyzed expression of genes coding isozymes that convert sorbitol into fructose: the sorbitol dehydrogenases, SODH-1 and SODH-2. Expression of the 2 genes significantly decreased overtime (days 3 and 6 vs days 10 and 13) in the control condition as well as in medium containing 40 or 110 mM of glucose (**Figure 6**). In 550 mM of glucose, *sodh-1* also significantly decreased overtime whereas *sodh-2* did not. In addition to modulation by worms' age, the expression of *sodh-1* and *sodh-2* varies with glucose concentrations in the culture medium. Expression of *sodh-1* significantly decreased when worms were incubated for 6 and 13 days in glucose-containing medium, regardless of concentration, although worms seemed to express more this gene when grown in medium with 550 mM of glucose vs 40 or 110 mM of glucose (**Figure 6**). Glucose concentration also influenced *sodh-2* expression: the highest concentration of glucose significantly enhanced the gene expression compared to the other concentrations and the control condition. Older worms (10 and 13 days old) expressed less *sodh-2* gene in medium containing 40 and 110 mM of glucose than in medium containing 550 mM of glucose or no glucose. The high concentration of glucose (550 mM) could have induced osmotic shock and thus the expression of, among others, *sodh-2*. As for the other glucose studies, we performed a culture control (medium with

the same concentration of mannitol). This condition gave the same results as the condition without glucose. (**Figure 6**).



**Figure 6. Relative expression of *sodh-1* and *sodh-2* after exposure of *C. elegans* to dietary glucose.**

Worms were grown in medium containing 0 mM (Ctrl), 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose. After 3, 6, 10 and 13 days of incubation at 20°C, expression of SODH-1 and SODH-2 encoding genes was analyzed.

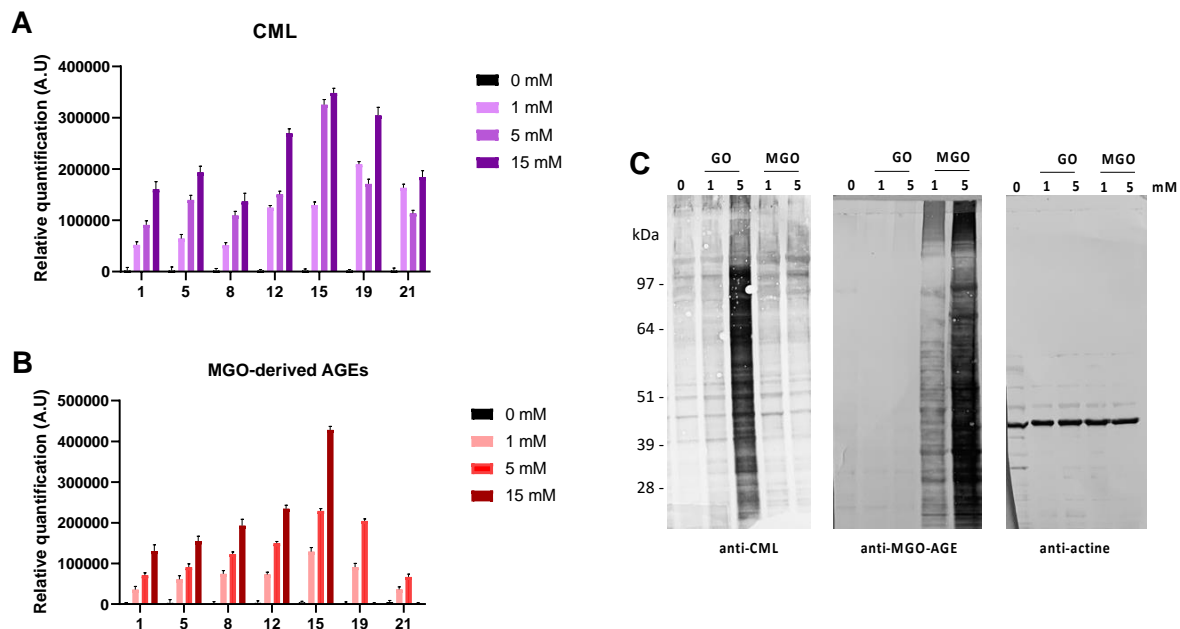
Relative expression of each condition was compared to the relative expression in medium with no glucose after 3 days of incubation.

Data were expressed as means  $\pm$  SD of three biological replicates. \*p<0.05

### 3.6 Induction of endogenous CML formation by GO-rich diet

Knowing the link between 1- the polyol pathway and the generation of oxidative stress, 2- oxidative stress and the generation of  $\alpha$ -DC compounds, and 3-  $\alpha$ -DC compounds and glycation, especially CML formation, we therefore tested the induction of endogenous glycation in worms after culture in the presence of GO. This product reacts with proteins to form AGEs including CML. Based on data from the literature and some preliminary experiments, we selected 3 concentrations of GO with no effect (1 mM), little effect (5 mM), and a significant effect (15 mM) on *C. elegans* longevity<sup>17</sup>. Median longevity was reduced by approximately 25% with 15 mM GO compared to the control (data not shown). The relative amount of CML formed under these culture conditions was measured by dot-blot with an anti-CML antibody. CML formation depended on the concentration of glyoxal and the incubation period of the worms with this compound (**Figure 7A**). The maximum level of CML epitopes was detected after 15 days of growth of worms in GO-rich medium. Western blot analysis of

lysates from worms incubated 13 days with GO revealed that CML epitopes were localized on different proteins (**Figure 7C**). The amount of CML seems to decrease at day 22. As expected, the addition of MGO to the worm culture medium did not induce the formation of CML epitopes but the formation of MGO-derived AGE epitopes (**Figure 7B, C**).



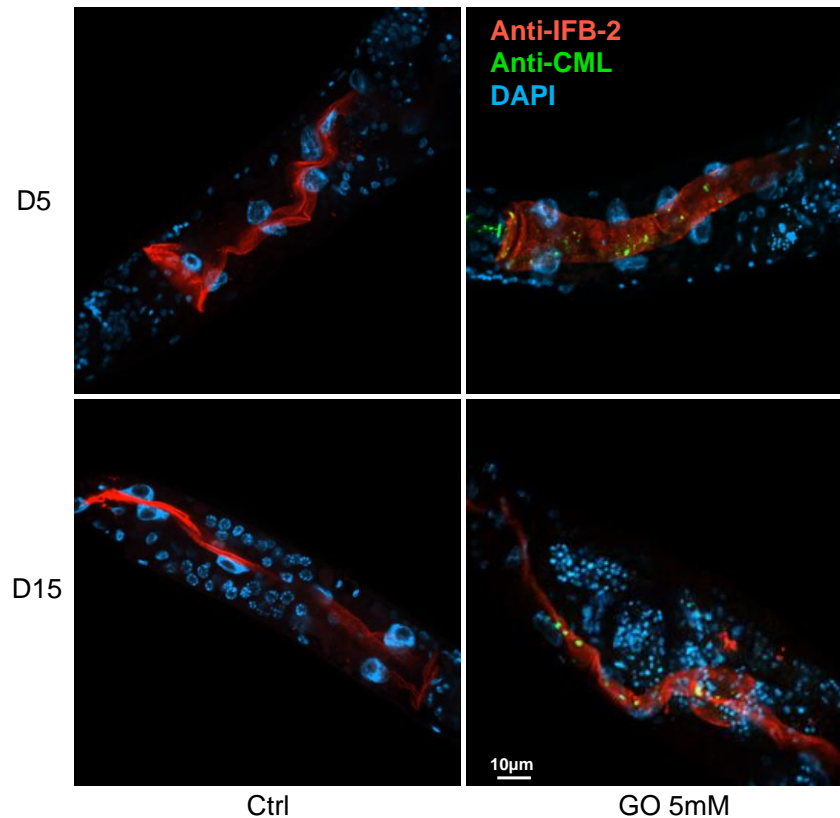
**Figure 7. Detection of *N* $\epsilon$ -carboxymethyllysine (CML) epitopes in *C. elegans* exposed to glyoxal, GO (A, C) or methylglyoxal, MGO (B).** A, B- Using anti-CML and anti-MGO-derived antibodies, AGE epitopes were quantified by dot-blot in worms incubated 1, 5, 8, 12, 15, 19, and 21 days with different concentrations of GO (A) or MGO (B): 0, 1, 5, and 15 mM. Results are expressed as arbitrary units (A.U) and data are expressed as the means  $\pm$  SD of three biological replicates. B- The use of an anti-CML antibody allowed the detection of CML epitopes by western-blot in worms incubated 15 days with different concentrations of GO or MGO (0, 1 and 5).

We analyzed the expression of the glyoxalase encoding genes. Only the expression of *djr-1.2* was significantly induced by GO exposure (**Figure 5B**). The expression of this gene is dependent on the concentration of GO but also on the time of exposure with an increase from day 5.

### 3.7 GO induced CML formation on intestinal proteins and impaired biological functions with generation of oxidative conditions

Bacteria contained in the culture medium and ingested by the worms could be modified by GO. We have shown in a previous study that dietary glycated proteins are endocytosed by enterocytes. In order to find out whether the CML epitopes, detected in worms incubated with GO, originate from endogenous protein glycation and/or bacterial glycation, we analyzed the localization of CML epitopes in the worm. By day 5, more than 75% of the worms incubated

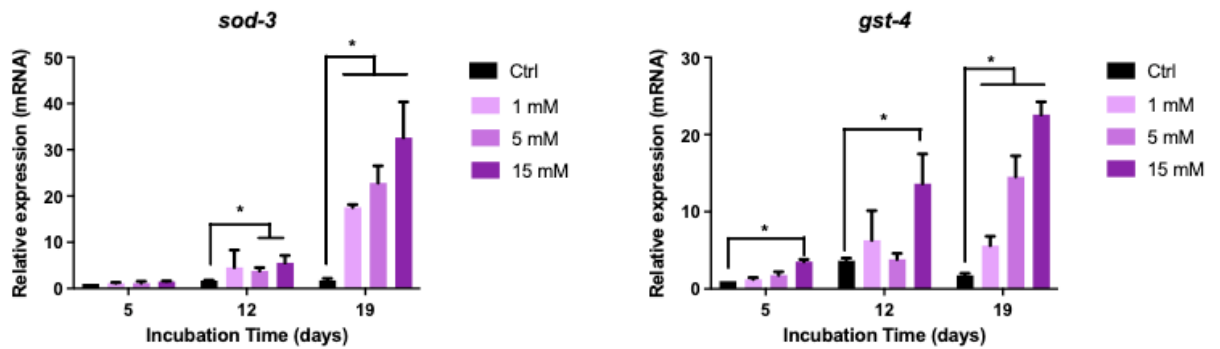
with the different concentrations of GO had CML epitopes in their gut. Most of the CML epitopes co-localized with the Intermediate Filament B-2 (IFB-2) epitope, suggesting that they were localized in the apical cortex of the worm intestine (**Figure 8**). These epitopes appeared to form aggregates that increase with GO exposure time and concentration (data not shown). Some worms also displayed CML epitopes in their enterocytes; some endosomal vesicles were observed (data not shown).



**Figure 8. Mapping of *N*ε-carboxymethyllysine (CML) epitopes in *C. elegans* intestine.** Immunohisto-chemical staining was performed on worms exposed for 5 and 15 days to 5mM of glyoxal, using anti-CML and anti-IFB-2 (Intermediate Filament B-2) antibodies. Worms' nuclei were stained with DAPI. Fluorescence micrographs with the mentioned DNA-binding probe or antibody are shown. Scale bar = 10 µm.

GO and MGO modify proteins with a risk of misfolding and aggregation. Protein misfolding is an oxidative process that generates ROS. We therefore analyzed the antioxidant response following incubation of worms in GO-rich diets; relative expression of *sod-3* and *gst-4* was monitored. At day 5, the 3 concentrations of GO induced the expression of *gst-4* (**Figure 9**). This induction was dependent on the concentration of GO. The expression of *sod-3* was induced by 5 and 15 mM GO at day 12 and that of *gst-4* by 15 mM GO at days 12 and 19, confirming the very close link between carbonyl and oxidative stress.





**Figure 9. Relative expression of *sod-3* and *gst-4* after exposure of *C. elegans* to glyoxal.** Worms were grown in *S* medium containing 0 mM (Ctrl), 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose. After 5, 12 and 19 days of incubation at 20°C, expression of SOD-3 and GST-4 encoding genes was analyzed.

Relative expression of each condition was compared to the relative expression in medium with no glucose after 3 days of incubation.

Data were expressed as means  $\pm$  SD of three biological replicates. \* $p < 0.05$

#### 4. Discussion

*C. elegans* has been reported to be a putative model for diabetes research, notably to determine the mechanisms responsible for glucose induced cellular dysfunctions<sup>8</sup>. Several studies have indeed highlighted the pathophysiological role of dietary glucose in this model. However, the results obtained by the different groups vary for the concentration of dietary glucose required to impact longevity, but also for the specific biological mechanisms induced. In some studies, a concentration of dietary glucose as low as 5.5 mM is sufficient to decrease the worm's lifespan<sup>18</sup>; in others, 40 mM or more than 222 mM of dietary glucose are needed to have this negative effect on *C. elegans*' lifespan<sup>8,19</sup>. While glucose restriction extended lifespan of *C. elegans* by inducing modest ROS formation<sup>20</sup>, glucose was shown to reduce proteotoxicity through autophagy and inhibit neurodegeneration<sup>19,21</sup>. Similarly, discordant results have been published regarding the signaling pathways modulated by dietary glucose<sup>8,18,22,23</sup>. In most studies, ingested dietary glucose is rarely measured. The few times it is, the results may be given in units that are difficult to interpret. Some give the amount of glucose ingested by the worm in molarity when the worm has no circulation; it is then difficult to know the exact amount of glucose per worm. It seems to us essential to associate the glucose-induced mechanisms to the quantity of dietary glucose ingested rather than to the concentration of glucose in the diet. Interlaboratory studies would then certainly be less discordant. Our glucose assay has unfortunately not been sensitive enough to detect endogenous glucose. The buffer used to lyse worms did not allow us to perform more sensitive commercial tests because of chemical interference.

Feeding bacteria, which can metabolize glucose, are also largely responsible for the inter-study differences. They can clearly modulate the amount of glucose ingested by worms. Most of the studies were performed with live bacteria; although controls with inactivated bacteria, mainly ultraviolet (UV), confirm the results obtained with live bacteria. This is quite surprising because in our laboratory conditions, the highest concentration of glucose tested (550 mM) was not tolerated by worms fed with live bacteria, while it was with heat-inactivated bacteria, even though the longevity was reduced. In order to study the effect of dietary glucose without external interference, we therefore decided to feed the worms with heat-inactivated bacteria. We will certainly analyze the effect of live bacteria in a future study. We incubated the worms with 3 concentrations of dietary glucose that had different impact on its lifespan.

The main goal of our study was to reveal an association between the dietary glucose concentration and the pathophysiologic mechanisms induced. We have been particularly interested in the activation of the various glucose metabolic pathways, some of which are suspected to be the cause of glucose toxicity<sup>4</sup>. In order to rapidly screen the activation of these pathways, we've focused on the expression of genes encoding enzymes involved in different glucose metabolism pathways. Although the main regulation of enzymes is post-translational, the expression of their genes may reflect their activation and the enzymatic needs of the cells. In addition, the expression of *C. elegans* genes coding the enzymes involved in glucose metabolism was reported to be correlated with their activity<sup>24</sup>. This scientific approach is fast and sensitive but, it is obvious that no definite conclusion will be drawn without having assayed the end products of the metabolic pathways possibly activated under our conditions, as well as the measurement of the activity of key enzymes of these pathways. These experimental approaches will be part of a future analytical study.

We were surprised that the expression of the gene encoding the main worm glucose transporter (FGT-1) was not modulated by glucose-enriched diets. This gene is ortholog of the human gene coding the GLUT4 transporter which can be transcriptionally regulated except during insulin resistance<sup>25</sup>. *C. elegans* genome contains other orthologs of human GLUTs genes that may be involved in intracellular glucose transport<sup>26</sup>. The expression of the genes encoding the enzymes involved in the phosphorylation of glucose to produce glucose-6-P and in the metabolic pathways using this hexose phosphate was not significantly regulated. One might wonder if the glucose has been ingested by the worm and/or has penetrated inside the cells. By analyzing the polyol pathway that is initiated by the conversion of glucose into sorbitol, we've identified a regulation of the expression of genes encoding SODH enzymes that convert sorbitol into fructose. Overall, the glucose concentration (550 mM) that reduced the longevity of worms,

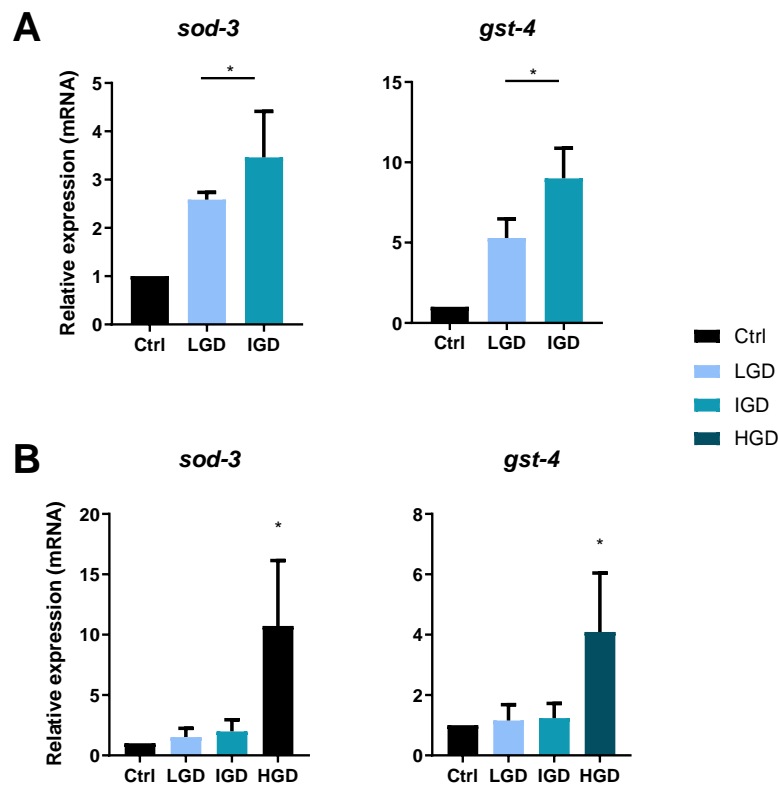
induced more expression of these genes, especially that of *sodh-2*, than other glucose concentrations. These results suggest that the polyol pathway would be activated by dietary glucose. The polyol pathway leads to a deregulation of the glutathione recycling system and thus to antioxidant defenses, thus increasing the ROS level. Indeed, the genes encoding SOD-3 and GST-4, major antioxidant enzymes of the worm, were more expressed in medium containing the highest concentration of glucose. The regulation of *sod-3* (mitochondrial SOD encoding gene) and not of *sod-1* (cytoplasmic SOD encoding gene) could be the consequence of mitochondrial dysfunction. High glucose or fructose concentrations, which is produced when the polyol pathway is activated, have been reported to enhance mitochondrial respiratory chain activity and oxidative stress liver and cardiac and skeletal muscles<sup>27,28</sup>. The high level of ROS induced by the highest concentration of glucose was consistent with the high level of oxidized proteins detected in worms incubated with 550 mM of glucose. ROS and fructose production can lead to endogenous glycation that we have confirmed by analyzing epitopes of CML, one of the most abundant and studied AGEs. The production of endogenous CML can be formed following the oxidation of the proteins but also through different reactions: 1- reaction of reducing sugars with proteins or 2- the production of  $\alpha$ -DC compounds such as GO and MGO which directly reacts with proteins. The study from Schlotterer *et al* highlighted an association between MGO-derived AGEs and mitochondrial dysfunction with reduced longevity<sup>8</sup>. MGO can be produced from trioses-phosphate derived from glycolysis or fructose metabolism, sugar oxidation (Wolff reaction) and lipid peroxidation. Our results regarding the expression of MGO epitopes were disappointing and are inconsistent with dietary glucose-induced MGO production. We are aware that the antibody used does not recognize all MGO-derived AGEs, but incubation of worms in the presence of MGO induced the formation of epitopes recognized by this antibody. Conversely, dietary glucose induced the formation of CML epitopes while MGO did not. As expected, incubation of worms with GO induced the formation of this AGE. These results suggest that exposure of worms to dietary glucose promoted GO production that glycated endogenous proteins. The indirect oxidative parameters that we measured (antioxidant transcriptional response and protein oxidation), show that an oxidative environment, certainly favorable to glyoxal formation, was induced by dietary glucose. The oxidative environment could be induced by the activation of metabolic pathways including the polyol pathway. Induction of expression of the gene encoding the glyoxalase DJR-1.2 would confirm the production of  $\alpha$ -DC products. However, it is not clear whether this induction is in response to GO production and/or whether it would have allowed efficient metabolism of MGO. In any case, the experiments of exposure of worms to GO have highlighted different potential

biological disturbances which could explain the toxicity of dietary glucose which would be partly dedicated by this  $\alpha$ -DC product. This study opens different perspectives on the use of *C. elegans* after exposure to glucose or GO to highlight changes in endogenous proteins responsible for pathophysiological processes.

## **5. Conclusion**

Our study revealed an association between glucose-rich diet, increased oxidative markers, endogenous CML formation and reduced worm lifespan. The activation of one of the glucose metabolic pathways (polyol pathway) and the generation of a glycation precursor (GO) would promote endogenous glycation. These results open short-term and longer-term perspectives that will highlight the precise mechanisms involved and their impacts in order to better understand the role of AGEs in diabetic complications and other age-related chronic diseases.

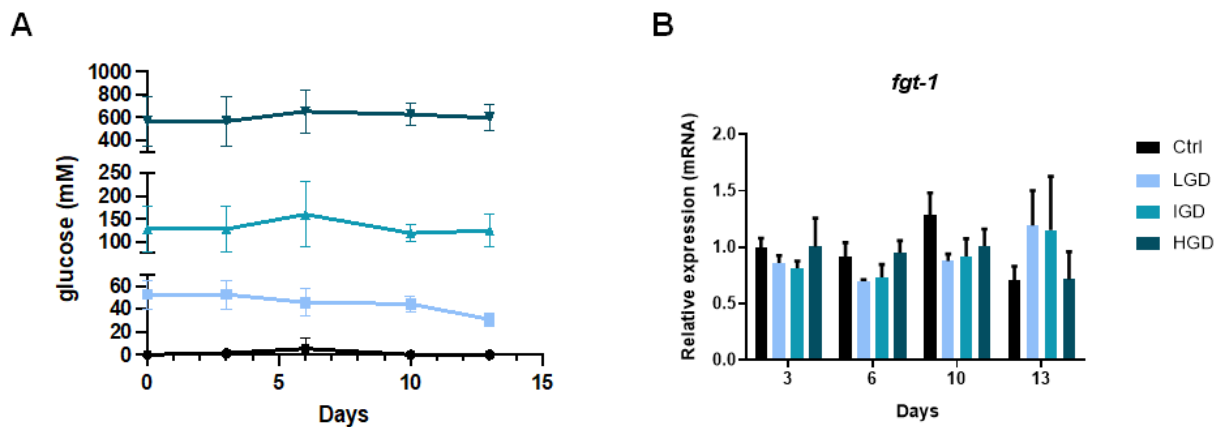
## Supplementary figures



**Figure S1. Relative expression of *sod-3* and *gst-4* after exposure of *C. elegans* to dietary glucose.** Worms were grown in S medium containing 0 mM (Ctrl), 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose and live (A) or heat-inactivated (B) bacteria. After 3, 6, 10 and 13 days of incubation at 20°C, expression of SOD-3 and GST-4 encoding genes was analyzed.

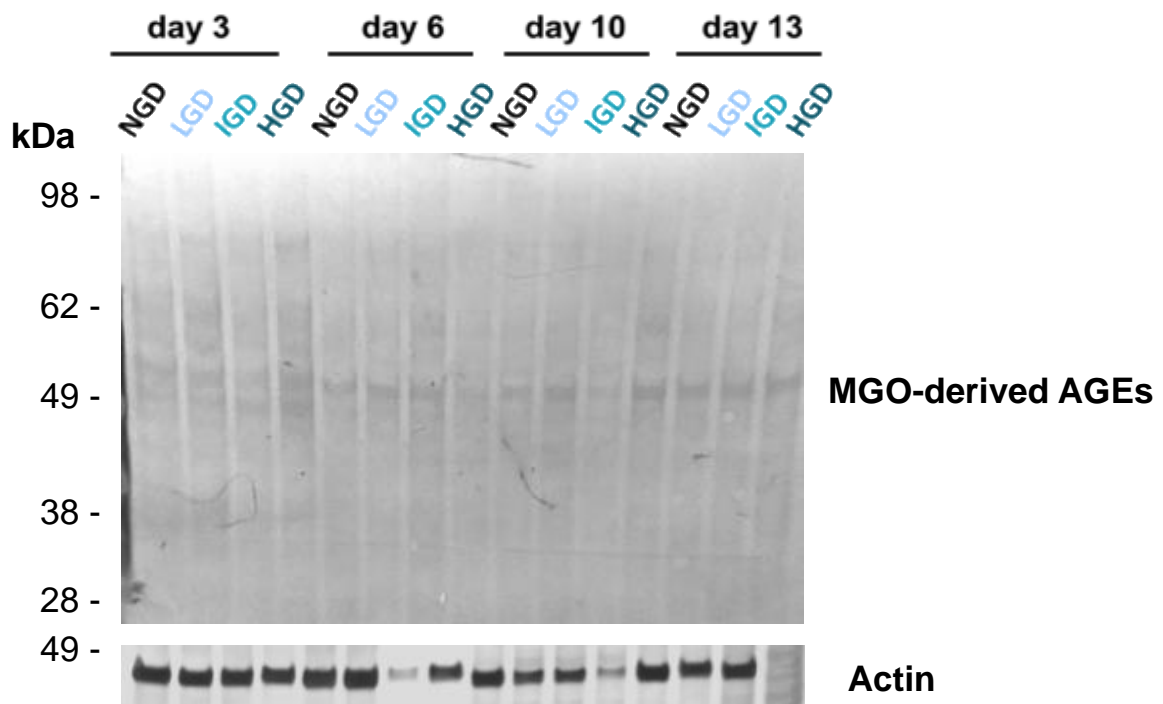
Relative expression of each condition was compared to the relative expression in medium with no glucose after 3 days of incubation.

Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation of three biological replicates. \* $p < 0.05$

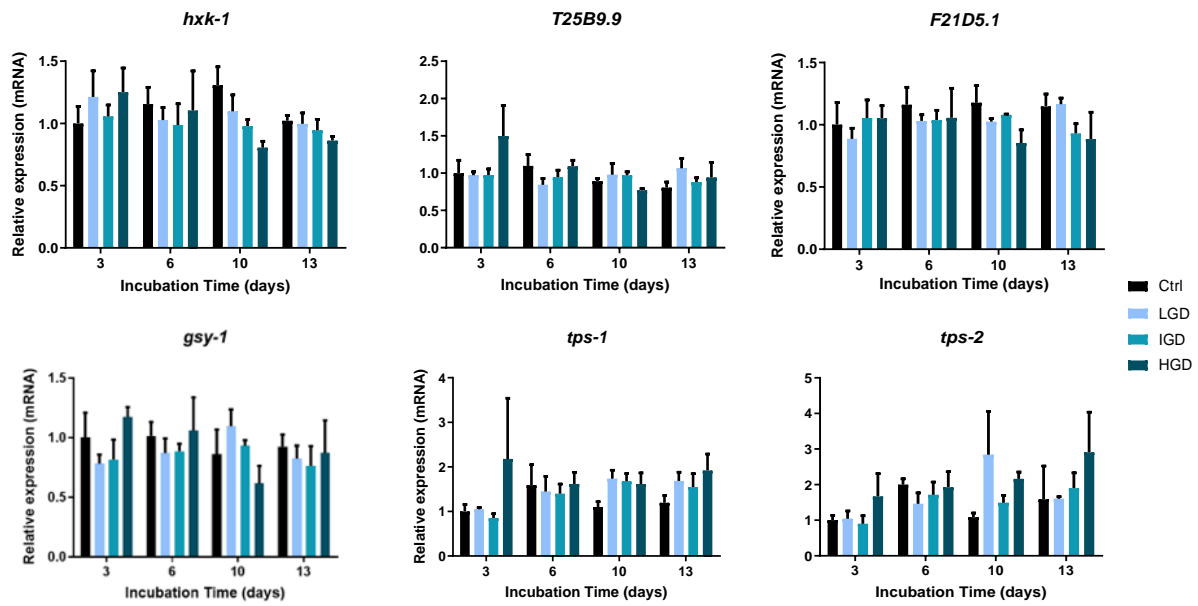


**Figure S2 Glucose concentration in culture medium.** Worms were grown in S medium containing 0 mM (Ctrl), 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose. After 3, 6, 10 and 13 days of incubation at 20°C, glucose concentration was monitored in the different culture media (A) and expression of *FGT-1* encoding gene was analyzed and relative expression of each condition was compared to the relative expression in medium with no glucose after 3 days of incubation (B).

Data are the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments.



**Figure S3 Mapping of methylglyoxal (MGO)-derived advanced glycation end-products (AGEs) epitopes.** Worms were grown in *S* medium containing 0 mM (Ctrl), 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose. After 3, 6, 10 and 13 days of incubation at 20°C, MGO-derived AGEs epitopes were analyzed by western blot. Data are representative of 3 independent experiments.



**Figure S4. Relative expression of *hxx-1*, *T25B9.9*, *F21D5.1*, *gsy-1*, *tps-1* and *tps-2* after exposure of *C. elegans* to dietary glucose.** Worms were grown in S medium containing 0 mM (Ctrl), 40 mM (LGD), 110 mM (IGD) or 550 mM (HGD) of glucose and live (A) or heat-inactivated (B) bacteria. After 3, 6, 10 and 13 days of incubation at 20°C, expression of HXX-1, T25B9.9, F21D5.1, GSY-1, TPS-1 and TPS-2 encoding genes was analyzed. Relative expression of each condition was compared to the relative expression in medium with no glucose after 3 days of incubation. Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation of three biological replicates.



## Bibliography

1. Caballero, B. The Global Epidemic of Obesity: An Overview. *Epidemiologic Reviews* **29**, 1–5 (2007).
2. Fowler, M. J. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes* **26**, 77–82 (2008).
3. Wareham, N. J. & Pfister, R. Diabetes: glycated hemoglobin is a marker of diabetes and CVD risk. *Nat Rev Cardiol* **7**, 367–368 (2010).
4. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813–820 (2001).
5. Watts, J. L. & Ristow, M. Lipid and Carbohydrate Metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **207**, 413–446 (2017).
6. Yaribeygi, H., Atkin, S. L. & Sahebkar, A. A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology* **234**, 1300–1312 (2019).
7. Wolff, S. P. & Dean, R. T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of ‘autoxidative glycosylation’ in diabetes. *Biochem J* **245**, 243–250 (1987).
8. Schlotterer, A. *et al.* *C. elegans* as Model for the Study of High Glucose– Mediated Life Span Reduction. *Diabetes* **58**, 2450–2456 (2009).
9. Park, H.-E. H., Jung, Y. & Lee, S.-J. V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* **40**, 90–99 (2017).
10. Chomczynski, P. & Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* **1**, 581–585 (2006).
11. Fedorova, M., Bollineni, R. C. & Hoffmann, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews* **33**, 79–97 (2014).

12. Duerr, J. Immunohistochemistry. *WormBook* (2006) doi:10.1895/wormbook.1.105.1.
13. Dubois, C. *et al.* Exposure of *Caenorhabditis elegans* to Dietary Nε-Carboxymethyllysine Emphasizes Endocytosis as a New Route for Intestinal Absorption of Advanced Glycation End Products. *Nutrients* **13**, 4398 (2021).
14. Kingsley, S. F. *et al.* Bacterial processing of glucose modulates *C. elegans* lifespan and healthspan. *Sci Rep* **11**, 5931 (2021).
15. Zelko, I. N., Mariani, T. J. & Folz, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 337–349 (2002).
16. Galal, A. M., Walker, L. A. & Khan, I. A. Induction of GST and related events by dietary phytochemicals: sources, chemistry, and possible contribution to chemoprevention. *Curr Top Med Chem* **14**, 2802–2821 (2015).
17. Chaudhuri, J. *et al.* A *Caenorhabditis elegans* Model Elucidates a Conserved Role for TRPA1-Nrf Signaling in Reactive α-Dicarbonyl Detoxification. *Current Biology* **26**, 3014–3025 (2016).
18. Lee, S.-J., Murphy, C. T. & Kenyon, C. Glucose Shortens the Life Span of *C. elegans* by Downregulating DAF-16/FOXO Activity and Aquaporin Gene Expression. *Cell Metabolism* **10**, 379–391 (2009).
19. Tauffenberger, A., Vaccaro, A., Aulas, A., Velde, C. V. & Parker, J. A. Glucose delays age-dependent proteotoxicity. *Aging Cell* **11**, 856–866 (2012).
20. Schulz, T. J. *et al.* Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metabolism* **6**, 280–293 (2007).

21. Franco-Juárez, B. *et al.* A high glucose diet induces autophagy in a HLH-30/TFEB-dependent manner and impairs the normal lifespan of *C. elegans*. *Aging (Albany NY)* **10**, 2657–2667 (2018).
22. Tauffenberger, A., Vaccaro, A. & Parker, J. A. Fragile lifespan expansion by dietary mitohormesis in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)* **8**, 50–57 (2016).
23. Gusarov, I. *et al.* Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress. *Nat Commun* **8**, 15868 (2017).
24. Miersch, C. & Döring, F. Sex Differences in Carbohydrate Metabolism Are Linked to Gene Expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* **7**, e44748 (2012).
25. Karnieli, E. & Armoni, M. Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **295**, E38–E45 (2008).
26. Kitaoka, S., Morielli, A. D. & Zhao, F.-Q. FGT-1 is a mammalian GLUT2-like facilitative glucose transporter in *Caenorhabditis elegans* whose malfunction induces fat accumulation in intestinal cells. *PLoS One* **8**, e68475 (2013).
27. Lanaspá, M. A. *et al.* Endogenous fructose production and metabolism in the liver contributes to the development of metabolic syndrome. *Nat Commun* **4**, 2434 (2013).
28. Jaiswal, N. *et al.* Fructose induces mitochondrial dysfunction and triggers apoptosis in skeletal muscle cells by provoking oxidative stress. *Apoptosis* **20**, 930–947 (2015).

# Discussion

Les habitudes alimentaires définissant le régime occidental favorisent la glycation. D'une part, la transformation et l'ultra-transformation des aliments génèrent la formation d'AGE exogènes et d'autre part, les différentes pathologies associées au régime occidental favorisent la glycation endogène<sup>536</sup>. Malgré la présence de plusieurs systèmes de défense permettant de réguler leurs taux, les AGE s'accumulent dans les tissus lors de différentes pathologies chroniques<sup>537</sup>. Comme certaines de ces maladies ont une fréquence qui augmente avec l'âge (DT2, cancers, maladies rénales chroniques...) ou sont liées à l'âge (maladie d'Alzheimer, ostéoporose, sarcopénie...), il n'est pas surprenant que l'accumulation des AGE augmente avec le vieillissement physiologique. Comme c'est le cas pour de nombreux autres mécanismes (immunité, système antioxydant...), il y a une diminution des défenses contre la formation des AGE avec l'âge<sup>538</sup>.

De nombreuses études ont rapporté des conséquences physiopathologiques de ces produits de glycation mais très peu ont mis en évidence le lien direct entre consommation ou formation des AGE et activation de mécanismes physiopathologiques, dont l'inflammation à bas bruit et l'oxydation. Afin de participer aux recherches sur la mise en évidence de ces mécanismes, nous avons choisi le modèle *C. elegans* qui a été utilisé avec succès par quelques équipes de recherche pour étudier la glycation. Même si cet organisme a des conditions de vie (température  $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ) et une longévité (environ 1 mois) peu compatibles avec la glycation endogène physiologique, la glycation des protéines endogènes peut être induite par des régimes riches en sucres<sup>539</sup> (Dubois *et al.* en préparation ; cf. Résultats II. Induction de CML endogène par un régime riche en glucose). Cette caractéristique peut être un atout pour étudier les effets de la glycation des aliments, notamment la digestion et l'absorption intestinales des AGE exogènes. L'absence de RAGE, récepteur des AGE considéré comme le principal acteur des conséquences physiopathologiques des AGE endogènes voire exogènes, pourrait permettre 1- d'analyser les effets physiopathologiques potentiels des AGE qui sont indépendants de RAGE, entre autres, les effets de la modification des protéines endogènes, 2- caractériser le rôle des récepteurs *scavenger*, principalement ceux de la classe B, dans l'élimination des AGE et 3- analyser l'impact de RAGE dans la modulation de ces différents processus après

transfection du RAGE humain chez cet organisme (un des projets en cours de l'équipe). Mon projet de thèse comprenait donc 2 objectifs distincts :

- 1- Evaluer la digestion intestinale et l'absorption des AGE alimentaires
- 2- Analyser la formation d'AGE endogènes induite par un régime riche en glucose.

Par souci de clarté, les résultats obtenus en réponse à ces deux objectifs sont discutés de manière indépendante.

## **I. Evaluation de la digestion intestinale et de l'absorption des AGE alimentaires**

La faible digestibilité des protéines alimentaires glyquées a pendant longtemps été suspectée<sup>404,405</sup>. Cependant, différentes études expérimentales *in vivo* ont démontré que les protéines glyquées étaient aussi bien digérées que les protéines non-glyquées<sup>407,408</sup>. La digestion des aliments glyqués est indispensable à l'absorption intestinale des AGE. En effet, jusqu'à notre publication récente<sup>534</sup>, seul le passage de di/tri-peptides glyqués ou d'AGE libres dans les entérocytes avait été rapporté. L'absorption de ces AGE implique un transporteur oligopeptidique, PEPT-1, ou une diffusion passive. Les di/tri-peptides glyqués sont ensuite digérés par des endopeptidases dans les entérocytes avant que les AGE libres ne soient libérés dans la circulation. Dans notre étude, l'ingestion de bactéries glyquées a induit l'expression du gène *pept-1*, orthologue du gène SLC15A1 humain codant PEPT1<sup>534</sup>. Puisque PEPT-1 est régulé transcriptionnellement par ses substrats<sup>540</sup>, nous suspectons qu'un processus de régulation similaire est induit chez *C. elegans*. L'ingestion de protéines glyquées par les vers a probablement généré une accumulation de di/tri-peptides glyqués, nécessitant un transport par PEPT-1 pour leur absorption par les entérocytes. PEPT-1 est bien sûr également impliqué dans le transport de peptides non-glyqués, mais ces derniers peuvent être internalisés par d'autres transporteurs.

Après l'exposition des vers à la CML alimentaire (les bactéries glyquées avec l'acide glyoxylique ont majoritairement des lysines modifiées en CML), nous avons également observé l'induction d'un gène codant une endopeptidase cytoplasmique, APP-1 (aminopeptidase P), potentiellement impliquée dans la digestion des di/tri-peptides glyqués. Ces résultats nous semblaient cohérents par rapport aux voies d'absorption des AGE alimentaires. Cependant, certains mécanismes physiopathologiques décrits ou

supposés pour les AGE alimentaires, notamment l'activation de RAGE<sup>448,449,541</sup>, sont certainement indirects puisque RAGE n'est pas activé par les AGE libres ou les di/tripeptides glyqués<sup>305</sup>. L'une des hypothèses serait que les AGE alimentaires induiraient la formation d'AGE endogènes protéiques qui se lieraient à RAGE et activeraient différentes voies de signalisation. Certaines études ont effectivement montré que des AGE endogènes sont produits après l'ingestion d'AGE, dont la CML<sup>468</sup>. Nos résultats montrent qu'en effet, la CML alimentaire induit significativement l'expression des gènes codant les glyoxalases qui convertissent les  $\alpha$ -DC tels que le GO et le MGO, en  $\alpha$ -hydroxyacides<sup>542</sup>. Les conditions oxydantes favorisent la génération de ces précurseurs de glycation endogène. L'expression des gènes *sod-3* et *gst-4*, marqueurs clés de la réponse antioxydante chez *C. elegans*, était en effet significativement plus élevée tout au long de l'expérience lorsque les vers étaient incubés avec des bactéries glyquées, notamment celles avec le taux de glycation le plus élevé. L'induction de ces marqueurs montre que la CML alimentaire est certainement une source d'ERO qui induirait l'expression de ces gènes et potentiellement la production des céto-aldéhydes. L'augmentation des marqueurs protéasomiaux (*skr-1* et *skr-12*) chez les vers exposés à cette CML pourrait être une réponse cellulaire pour dégrader les AGE endogènes formés. Des expériences supplémentaires, notamment l'analyse des AGE endogènes et d'autres marqueurs protéasomiaux, permettront de vérifier cette hypothèse. Une autre hypothèse serait que le RAGE exprimé à la surface apicale des cellules intestinales pourrait être activé par les AGE alimentaires pas ou peu digérés. L'oxydation et l'inflammation induites par cette activation pourraient induire un état inflammatoire systémique favorisant l'oxydation et donc la glycation endogène dans d'autres organes. Cette hypothèse est bien sûr invérifiable chez *C. elegans*.

Les bactéries constituent la principale nourriture des vers. Leur glycation, même si elle n'a pas altéré les intégrités membranaires et pariétales des bactéries, pourrait avoir induit une altération nutritionnelle avec des effets physiologiques potentiels. Nous avons en effet détecté un défaut de reproduction chez les vers incubés avec des bactéries glyquées. Ces vers avaient moins d'embryons et pondaient moins d'œufs que les vers soumis à un régime normal. Des analyses supplémentaires seront bien sûr nécessaires pour déterminer les mécanismes physiopathologiques impliqués suite à l'ingestion de la CML alimentaire. Nous avons suspecté que les régimes glyqués auraient pu induire une restriction nutritionnelle conduisant au défaut de reproduction. Cependant, il a été démontré qu'une telle restriction n'a qu'un faible impact sur le nombre d'œufs pondus

par les vers<sup>543</sup>. De plus, nos résultats montrent que l'expression du gène *trx-1* codant la thiorédoxine-1, qui est induite par la restriction calorique<sup>544</sup>, n'a pas été modulée par les régimes glyqués, du moins jusqu'à 11 jours de culture. De même, le gène *lgg-1* codant une molécule de l'autophagie, n'a jamais été régulée par la CML alimentaire. L'autophagie est en effet un mécanisme essentiel permettant, entre autres, de maintenir l'homéostasie énergétique pendant les restrictions nutritionnelles<sup>545</sup>. L'ingestion de supplément protéique glyqué (BSA-CML) n'a pas induit cette diminution de reproduction, suggérant que la modification des protéines alimentaires, plus que l'AGE formé en tant que tel (principalement la CML), a entraîné ce phénotype. Des tests de longévité ont également montré des résultats différents des vers incubés avec les 2 sources de CML alimentaires. Le supplément protéique glyqué (BSA-CML) réduit la longévité des vers, modérément mais significativement, alors que le régime alimentaire glyqué l'augmente par rapport au régime normal (bactéries non glyquées) avec ou sans supplément protéique non glyqué. L'augmentation de la longévité des vers nourris avec les bactéries glyquées est certainement favorisée par la diminution de la fécondité<sup>546</sup>.

L'exposition des vers à la CML alimentaire a provoqué des altérations cellulaires comme en témoigne l'induction de la réponse antioxydante mais aussi l'induction des réponses cytoplasmiques et mitochondriales au stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées (*unfolded protein response* ou UPR<sub>cyt/mt</sub>). Tout lien de causalité ou de conséquence entre le défaut de reproduction des vers exposés à la CML alimentaire et l'induction de réponses antioxydante ou UPR reste à déterminer. Parmi les gènes codant les enzymes digestives, *lap-1*, qui code une endopeptidase, a été induit par les 2 régimes glyqués aux jours 4 et 18. L'inhibition de *lap-1* a été décrite comme conduisant à un défaut d'oviposition<sup>547</sup>. L'augmentation de l'expression de *lap-1* pourrait donc être une réponse au défaut de reproduction induit par la CML alimentaire. Nous avons été surpris de découvrir, parmi les gènes dont l'expression était induite par la CML alimentaire, les gènes codant les protéases lysosomales : les cathepsines. L'expression d'autres gènes lysosomaux était augmentée dans les régimes riches en CML, comme ceux codant la V-ATPase, qui régule le pH des lysosomes pour favoriser l'activité des cathepsines, et le *lysosome-associated membrane protein homolog-2* (LMP-2 ou LAMP1 chez les mammifères), qui est important pour la fonctionnalité des lysosomes. Ces résultats suggèrent que la CML alimentaire a été internalisée par les entérocytes et a subi une hydrolyse intracellulaire. Les di/tri-peptides glyqués transportés par PEPT-1 sont

effectivement hydrolysés avant que les AGE libres ne passent dans la circulation. Cependant, cette digestion implique des endopeptidases cytoplasmiques et non lysosomales<sup>418</sup>. L'hypothèse d'une endocytose de protéines glyquées ou de peptides plus larges que les di/tri-peptides a donc été vérifiée par immunohistochimie avec un anticorps qui ne reconnaît que la CML protéique. Les images montrent clairement la présence d'endosomes contenant des épitopes CML dans les cellules intestinales des vers. Ces endosomes présentaient des marqueurs distincts tels que la dynamine 1 ou DYN-1, qui est impliquée dans le stade précoce de l'endocytose, la protéine de membrane lysosomale LMP-1 qui confirme la fusion avec les lysosomes et, pour certains, le récepteur RME-1 (*receptor mediated endocytosis-1*) qui est impliqué dans le recyclage endosomal. Ces résultats démontrent clairement un nouveau mécanisme d'absorption intestinale pour la CML alimentaire qui est donc l'endocytose.

Nous avons bien sûr été surpris d'observer l'endocytose de la CML alimentaire mais surtout qu'elle ne l'ait pas été avant. En effet, divers récepteurs des AGE, dont les récepteurs *scavenger* de classe B et le complexe AGE-R éliminent les AGE dans l'endothélium, le système vasculaire, les tissus neuraux et certains types de cellules immunitaires, principalement par endocytose<sup>448,449,548</sup>. En ce qui concerne les AGE alimentaires, ce mécanisme aurait donc lieu après absorption intestinale et passage dans les vaisseaux sanguins. L'endocytose des AGE par les cellules intestinales, notamment les entérocytes, n'a pas été envisagée bien que les récepteurs *scavenger* de classe B et le complexe AGE-R soient exprimés par les entérocytes (<https://www.proteinatlas.org>, accès le 15/03/2022), en particulier dans l'intestin grêle. De plus, l'endocytose dans les entérocytes est un processus cellulaire essentiel ayant divers impacts biologiques, dont la digestion et l'absorption des nutriments<sup>211</sup>.

L'absorption des AGE a principalement été analysée *in vitro* avec des cellules d'une lignée immortalisée d'adénocarcinomes colorectaux humains, cellules Caco-2, qui sont couramment utilisées pour étudier la perméabilité intestinale<sup>417,418,549</sup>. Comme ces cellules épithéliales sont dérivées de cellules du côlon, elles ne possèdent pas toutes les caractéristiques des entérocytes de l'intestin grêle, notamment l'expression de certaines enzymes digestives dans leurs microvillosités<sup>550</sup>. En outre, les expériences d'absorption ont été réalisées le plus souvent avec de petits oligopeptides glyqués plutôt qu'avec des protéines glyquées ou des peptides plus larges. Chez *C. elegans*, il a été possible d'effectuer des analyses immunohistochimiques tout en conservant l'intégralité de l'intestin du ver.



L'intestin du ver ne contient que des entérocytes, ce qui facilite la visualisation de ces cellules qui sont les plus grandes de ses cellules. Dans les modèles de mammifères tels que les modèles murins, des coupes histologiques sont nécessaires pour analyser l'épithélium intestinal par imagerie cellulaire. Comme il est composé de plusieurs types de cellules, l'analyse est beaucoup plus complexe que chez le ver. Ceci démontre une fois de plus l'apport essentiel des organismes modèles dits simples pour analyser certaines fonctions cellulaires. Nous avons commencé une collaboration avec Bertrand Meresse, CR Inserm de l'U1266, INFINITE, pour confirmer l'endocytose des AGE alimentaires par les entérocytes de l'épithélium intestinal murin et humain.

L'utilisation de *C. elegans* pour analyser l'absorption des AGE alimentaires par les entérocytes est d'autant plus pertinente que cet organisme exprime les orthologues des gènes codant les membres SR-B (SCAV - *scavenger*) et le complexe AGE-R (OST-B1/AGE-R1), ZK1307.8/AGE-R2, LEC/AGE-R3). L'analyse de l'expression de ces gènes après la culture des vers avec des bactéries non glyquées ou glyquées a montré une plus forte expression des gènes codant SCAV-5, SCAV-6 et certaines lectines (LEC) en présence de bactéries glyquées, indépendamment de leur taux de glycation. Ces récepteurs pourraient médier l'endocytose des AGE alimentaires, au moins la CML. Nos analyses immunohistochimiques avec la concanavaleine A ont révélé que l'endocytose des composants bactériens semblait effectivement spécifique de la CML. En ciblant les gènes de ces récepteurs par ARN interférence, nous pourrions dans une étude future explorer leur rôle dans l'endocytose de la CML alimentaire.

L'endocytose est un mécanisme qui peut moduler différentes fonctions cellulaires et participer à l'adaptation cellulaire à différents stress. C'est un processus actif qui consomme de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP)<sup>551,552</sup>. Les entérocytes des vers incubés avec des bactéries glyquées ont certainement besoin de plus d'ATP que ceux des vers incubés avec des bactéries non glyquées. Ils doivent donc produire plus d'ATP par divers mécanismes cataboliques, dont la respiration dans la matrice mitochondriale. Ce besoin peut entraîner des déficiences en ATP pour d'autres fonctions cellulaires importantes, notamment certaines activités enzymatiques. De plus, l'augmentation de la respiration mitochondriale peut être une source de stress oxydant. Ceci pourrait expliquer d'une part l'augmentation des réponses antioxydantes dont l'expression du gène *sod-3* mitochondrial et celle du gène codant la chaperonne HSP-6 de l'UPRmt avec des impacts sur l'homéostasie cytoplasmique. Les bactéries étant la

principale source de nourriture des vers, l'apport nutritionnel de bactéries glyquées pourrait ne pas compenser l'énergie requise par l'endocytose des protéines glyquées. Le défaut de reproduction des vers incubés avec la CML alimentaire pourrait donc être associé au manque d'ATP induit par l'endocytose.

Notre étude mérite des analyses complémentaires, notamment :

- la quantification du devenir des CML alimentaires (CML libre et protéique dosées par CL/SM-SM) ingérées par les vers,
- la distinction entre la CML alimentaire endocytée et la CML alimentaire transportée par PEPT-1 afin de déterminer la proportion de chacune de ces voies
- la démonstration de l'effet santé des protéines alimentaires glyquées par rapport à un supplément protéique glyqué qui, comme nous l'avons montré dans cette étude, est également endocytée par les entérocytes
- la mise en évidence des mécanismes induits par l'ingestion de la CML alimentaire et des éventuels récepteurs impliqués.

Il est essentiel d'analyser le devenir de la CML endocytée, en particulier sa digestion et/ou son éventuelle transcytose dans la *lamina propria*. L'exocytose de peptides glyqués pourrait favoriser l'intolérance alimentaire et activer RAGE dans d'autres organes. *C. elegans* est un bon modèle pour étudier les effets des AGE alimentaires sur la santé ; pas nécessairement pour les phénotypes observés qui sont assez dépendants de l'organisme étudié mais pour les mécanismes induits qui sont souvent conservés dans le règne animal.

## II. Induction de CML endogène par un régime riche en glucose

Les effets de régimes riches en glucose ont été très étudiés chez *C. elegans*. Ce sucre réduit la longévité des vers et induit différents mécanismes physiopathologiques qui sont bien sûr dépendants de la concentration de glucose mais également des conditions de laboratoire. En effet, les résultats obtenus par les différents groupes varient pour la concentration de glucose alimentaire nécessaire pour moduler la longévité, mais aussi pour les mécanismes biologiques spécifiques induits. Dans certaines études, une concentration de glucose alimentaire aussi faible que 5,5 mM est suffisante pour diminuer la durée de vie du ver<sup>553</sup>; dans d'autres, 40 mM ou plus de 222 mM de glucose alimentaire sont nécessaires pour réduire sa longévité<sup>539,554</sup>. Alors que la restriction en glucose prolonge la durée de vie de *C. elegans* en induisant un stress oxydant modéré<sup>555</sup>, il a été démontré que le glucose réduit la protéotoxicité par autophagie et inhibe la neurodégénérescence<sup>539,553,556,557</sup>. De même, des résultats discordants ont été publiés concernant les voies de signalisation modulées par le glucose alimentaire<sup>539,553,556,557</sup>. Dans la plupart des études, le glucose alimentaire ingéré est rarement mesuré. Il nous semble essentiel d'associer les mécanismes induits par le glucose à la quantité de glucose ingérée plutôt qu'à sa concentration dans le régime alimentaire. Les études inter-laboratoires seraient certainement moins discordantes. Notre dosage du glucose n'a malheureusement pas été assez sensible pour détecter le glucose endogène. Avant la soumission de l'article, nous allons tester différents tests commerciaux plus sensibles et faire des volumes de culture plus importants pour analyser un plus grand nombre de vers.

Les bactéries alimentaires, qui peuvent métaboliser le glucose, sont sans doute également responsables des différences inter-études. Elles peuvent clairement moduler la quantité de glucose ingérée par les vers. La plupart des études ont été réalisées avec des bactéries vivantes, bien que des contrôles avec des bactéries inactivées, principalement aux ultraviolets (UV), confirment les résultats obtenus avec des bactéries vivantes. Ceci est assez surprenant car dans nos conditions expérimentales, la plus forte concentration de glucose testée (550 mM) n'a pas été tolérée par les vers nourris avec des bactéries vivantes, alors qu'elle l'a été avec des bactéries inactivées par la chaleur, même si la longévité a été réduite. Les traitements aux UV ou à la chaleur modifient sans doute distinctement les protéines bactériennes induisent sans doute des changements distincts.

Afin d'étudier l'effet du glucose alimentaire en minimisant les interférences exogènes, nous avons décidé de nourrir les vers avec des bactéries inactivées par la chaleur. Nous analyserons certainement l'effet des bactéries vivantes dans une étude future car il est intéressant de comprendre le rôle du microbiote sur la glycation endogène induite par un régime riche en sucre.

L'objectif principal de notre étude était de révéler une association entre la concentration de glucose alimentaire et les mécanismes physiopathologiques induits. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'activation de différentes voies métaboliques du glucose, dont certaines sont suspectées d'être à l'origine de la toxicité du glucose<sup>131</sup>. Afin de cribler rapidement l'activation de ces voies, nous nous sommes concentrés sur l'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans différentes voies du métabolisme du glucose. Bien que la régulation principale des enzymes soit post-traductionnelle, l'expression de leurs gènes peut refléter leur activation et les besoins enzymatiques des cellules. En outre, il a été rapporté que l'expression des gènes de *C. elegans* codant les enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose était corrélée à leur activité<sup>535</sup>. Cette approche scientifique est rapide et sensible mais, il est évident qu'aucune conclusion définitive ne pourra être tirée sans avoir dosé les produits finaux des voies métaboliques éventuellement activées dans nos conditions, ainsi que la mesure de l'activité des enzymes clés de ces voies. Ces approches expérimentales feront partie d'une future étude analytique.

Nous avons été surpris de constater que l'expression du gène codant le principal transporteur de glucose du ver FGT-1 (*facilitated glucose transporter-1*) n'était pas modulée par les régimes enrichis en glucose. Ce gène est un orthologue du gène humain codant le transporteur GLUT4 (*glucose transporter 4*). Il a été montré que GLUT4 peut être régulé transcriptionnellement<sup>558</sup>. Le génome de *C. elegans* contient d'autres orthologues des gènes GLUT humains qui pourraient être impliqués dans le transport intracellulaire du glucose chez *C. elegans*<sup>559</sup>. L'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans la phosphorylation du glucose pour produire du glucose-6-phosphate et dans les voies métaboliques utilisant cet hexose phosphate n'était pas significativement régulée. En analysant la voie du polyol qui est initiée par la conversion du glucose en sorbitol, nous avons identifié une régulation de l'expression des gènes codant les enzymes SODH (*sorbitol déshydrogénase*) qui convertissent le sorbitol en fructose. Globalement, la concentration de glucose (550 mM) qui a réduit la longévité des vers, a induit une plus

grande expression de ces gènes, notamment celle de *sodh-2*, par rapport aux autres concentrations de glucose. Ces résultats suggèrent que la voie des polyols serait activée par le glucose alimentaire. Cette activation semble être modulée car le gène *sodh-2* était moins exprimé dans les conditions contenant une plus faible teneur en glucose (40 mM ou 110 mM) que dans les conditions sans glucose.

La voie des polyols conduit à une dérégulation du système de recyclage du glutathion et donc des défenses antioxydantes, augmentant ainsi le niveau d'ERO. En effet, les gènes codant SOD-3 et GST-4, enzymes antioxydantes, étaient plus exprimés dans le milieu contenant la plus forte concentration de glucose. La régulation de *sod-3* (gène codant une SOD mitochondriale) et non de *sod-1* (gène codant la SOD cytoplasmique) pourrait être la conséquence d'un dysfonctionnement mitochondrial. Chez les mammifères, il a été montré que des concentrations élevées de glucose ou de fructose, qui sont produites lorsque la voie des polyols est activée, augmentent l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et le stress oxydant dans le foie et les muscles cardiaques et squelettiques<sup>560,561</sup>. Le niveau élevé d'ERO induit par la plus forte concentration de glucose était cohérent avec le niveau élevé de protéines oxydées détectées dans les vers incubés avec 550 mM de glucose. La production d'ERO et de fructose pourrait avoir entraîné une glycation endogène que nous avons confirmée en analysant les épitopes CML, l'un des AGE les plus étudiés. La CML endogène peut être formée suite à l'oxydation des protéines mais aussi par différentes réactions : 1- la réaction des sucres réducteurs avec les protéines ou 2- la production de composés  $\alpha$ -DC tels que GO et MGO qui réagissent directement avec les protéines. L'étude de Schlotterer *et al.* a mis en évidence une association entre les AGE dérivés du MGO et le dysfonctionnement mitochondrial avec une longévité réduite<sup>539</sup>.

Le MGO peut être produit à partir de trioses phosphate dérivés de la glycolyse, ou du métabolisme du fructose, de l'oxydation des sucres (réaction de Wolff) et de la peroxydation des lipides. Nos résultats concernant l'expression des épitopes AGE dérivés du MGO étaient décevants et sont incompatibles avec une production de MGO induite par le glucose alimentaire. Nous sommes conscients que l'anticorps utilisé ne reconnaît pas tous les AGE dérivés du MGO, mais l'incubation des vers en présence de MGO a induit la formation d'épitopes reconnus par cet anticorps alors qu'aucun épitope CML n'était détecté. Le glucose alimentaire a induit la formation d'épitopes CML qui peut être induite par le GO. L'incubation des vers avec du GO a effectivement induit la formation de cet AGE.

Ces résultats suggèrent que l'exposition des vers au glucose alimentaire a favorisé la production de GO qui a glyqué les protéines endogènes. Les paramètres oxydants indirects que nous avons mesurés (réponse transcriptionnelle antioxydante et oxydation des protéines), montrent qu'un environnement oxydant, certainement favorable à la formation de GO, a été induit par le glucose alimentaire. L'environnement oxydant pourrait être induit par l'activation de voies métaboliques incluant la voie des polyols. L'induction de l'expression du gène codant la glyoxalase DJR-1.2 confirmerait la production des  $\alpha$ -DC. Cependant, il n'est pas clair si cette induction est en réponse à la production de GO et/ou de MGO, dont la glycolyse est la voie de production majoritaire *in vivo*. DJR-1.2 aurait permis un métabolisme plus efficace du MGO que du GO. La production de GO dans la matrice extracellulaire, *via* la peroxydation lipidique, comme chez les sujets diabétiques<sup>562</sup> est une hypothèse qui devra être explorée. Le GO extracellulaire pourrait échapper à la métabolisation par les glyoxalases, enzymes cytoplasmiques. Par contre, les  $\alpha$ -DC extracellulaires peuvent induire l'expression des gènes codant les glyoxalases *via* une voie de signalisation impliquant le récepteur ionotrope TRPA-1 (*transient receptor potential cation channel subfamily A member-1*)<sup>504</sup>, favorisant la dégradation d' $\alpha$ -DC cytoplasmiques. Les expériences d'exposition des vers au GO ont mis en évidence différentes perturbations biologiques qui pourraient expliquer la toxicité du glucose alimentaire en partie médiée par cet  $\alpha$ -DC. Cette étude ouvre différentes perspectives sur l'utilisation de *C. elegans* après exposition au glucose ou au GO pour mettre en évidence des modifications des protéines endogènes responsables de processus physiopathologiques comme l'oxydation et la perte de l'homéostasie protéique.

### III. Perspectives

Différentes analyses complémentaires sont programmées à court ou à plus long terme, notamment :

- l'analyse des effets du glucose après inhibition de la voie des polyols (ARN interférence en ciblant des gènes *sodh*). Comme les mammifères, *C. elegans* possède plusieurs aldoses réductases et celle qui participe à la 1<sup>ère</sup> étape de la voie des polyols n'est pas décrite. L'utilisation d'inhibiteurs connus des aldoses pourrait être envisagée mais ils ne seront pas spécifiques de cette voie métabolique et ils pourraient cibler l'enzyme qui détoxifie le 3-DG, amenant à une mauvaise interprétation des résultats. Il

serait intéressant d'ailleurs de détecter cet  $\alpha$ -DC et les AGE formés par ce dernier. Les dosages du fructose et du sorbitol sont également programmés.

- l'analyse du stress oxydant généré et de son impact sur la glycation endogène. L'utilisation de mutants *daf-16* et/ou *skn-1*, qui n'expriment plus les facteurs de transcription induisant différentes réponses aux stress, ou l'inhibition de ces gènes par ARN interférence, sera particulièrement intéressante pour évaluer l'impact de ce stress et de la réponse antioxydante sur la formation des AGE mais également déterminer le rôle de ces derniers sur les possibles effets pathologiques des AGE.

- la détermination du rôle des glyoxalases notamment celles qui sont indépendantes du glutathion (DJR-1/2) car leur rôle est assez négligé chez les mammifères, certainement parce que leurs activités sont plus larges que la simple activité glyoxalase. L'inhibition et/ou la surexpression de ces enzymes dans nos conditions d'étude pourrait permettre de mieux définir leur rôle dans la formation des AGE, dépendante notamment du MGO et leurs fonctions, du moins en ce qui concerne la régulation de la glycation.
- la mise en évidence des effets potentiellement délétères des AGE ou du moins de la formation de ces derniers (modification des protéines):

- \* analyse du rôle des récepteurs aux AGE : inhibition et surexpression de récepteurs de *C. elegans* et expression hétérologue de récepteurs humains dont RAGE

- \* analyse de la perte de l'homéostasie protéique en utilisant les souches transgéniques pour étudier l'agrégation de peptides spécifiques.

- \* analyse de l'effet de la glycation endogène sur l'endocytose des AGE alimentaires.

## **IV. Conclusion**

Nos deux études ont révélé d'une part, une nouvelle voie d'absorption intestinale des AGE alimentaires et d'autre part, une association entre un régime riche en glucose, une augmentation des marqueurs oxydants, la formation de CML endogènes et une réduction de la durée de vie des vers. L'activation d'une des voies métaboliques du glucose (voie des polyols) et la génération d'un précurseur de glycation (GO) favoriseraient la glycation endogène. Ces résultats ouvrent des perspectives à court et plus long terme pour mettre en évidence les mécanismes impliqués et leurs impacts afin de mieux comprendre le rôle des voies synthétiques exogènes et endogènes de glycation dans les complications du diabète et autres maladies chroniques liées à nos nouveaux modes de vie.



# Références

1. Cordain, L. *et al.* Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**, 341–354 (2005).
2. Monteiro, C., Cannon, G., Lawrence, M., Louzada, M. L. & Machado, P. FAO. Ultra-processed foods, diet quality, and health using the NOVA classification system. (2019).
3. Guilleminault, L. *et al.* Diet and Asthma: Is It Time to Adapt Our Message? *Nutrients* **9**, 1227 (2017).
4. Graham, L. C. *et al.* Chronic consumption of a western diet induces robust glial activation in aging mice and in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Sci Rep* **6**, 21568 (2016).
5. Etievant, P. *et al.* *Les comportements alimentaires. Quels en sont les déterminants ? Quelles actions, pour quels effets ?* (2010).
6. Les fast-foods. *Jamais la même histoire* (2020).
7. Zagorsky, J. L. & Smith, P. K. The association between socioeconomic status and adult fast-food consumption in the U.S. *Econ Hum Biol* **27**, 12–25 (2017).
8. Schroeder, H. A. Losses of vitamins and trace minerals resulting from processing and preservation of foods. *American Journal of Clinical Nutrition* **24**, 562–573 (1971).
9. Carrera-Bastos, P., Fontes-Villalba, M., O’Keefe, J. H., Lindeberg, S. & Cordain, L. The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *RRCC* **2**, 15–35 (2011).
10. Gardner, G. & Halweil, B. Underfed and Overfed: The Global Epidemic of Malnutrition. *Worldwatch Paper X–68* (2000).
11. Ritchie, H. & Roser, M. Obesity. *Our World in Data* (2017).
12. Ogden, C. L., Carroll, M. D., McDowell, M. A. & Flegal, K. M. Obesity among adults in the United States—no statistically significant change since 2003–2004. *NCHS Data Brief* 1–8 (2007).
13. MU, M., XU, L.-F., HU, D., WU, J. & BAI, M.-J. Dietary Patterns and Overweight/Obesity: A Review Article. *Iran J Public Health* **46**, 869–876 (2017).
14. Phillips, C. M. *et al.* High Dietary Saturated Fat Intake Accentuates Obesity Risk Associated with the Fat Mass and Obesity–Associated Gene in Adults. *The Journal of Nutrition* **142**, 824–831 (2012).
15. Schlesinger, S. *et al.* Food Groups and Risk of Overweight, Obesity, and Weight Gain: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *Adv Nutr* **10**, 205–218 (2019).
16. Rauber, F. *et al.* Ultra-processed food consumption and risk of obesity: a prospective cohort study of UK Biobank. *Eur J Nutr* **60**, 2169–2180 (2021).
17. Machado, P. P. *et al.* Ultra-processed food consumption and obesity in the Australian adult population. *Nutr Diabetes* **10**, 39 (2020).
18. Cordova, R. *et al.* Consumption of ultra-processed foods associated with weight gain and obesity in adults: A multi-national cohort study. *Clin Nutr* **40**, 5079–5088 (2021).
19. Fardet, A. Minimally processed foods are more satiating and less hyperglycemic than ultra-processed foods: a preliminary study with 98 ready-to-eat foods. *Food Funct.* **7**, 2338–2346 (2016).
20. Murea, M., Ma, L. & Freedman, B. I. Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications. *Rev Diabet Stud* **9**, 6–22 (2012).
21. Obésité et surpoids. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

22. Wearing, S. C., Hennig, E. M., Byrne, N. M., Steele, J. R. & Hills, A. P. Musculoskeletal disorders associated with obesity: a biomechanical perspective. *Obesity Reviews* **7**, 239–250 (2006).
23. De Pergola, G. & Silvestris, F. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *Journal of Obesity* **2013**, e291546 (2013).
24. Hubert, H. B., Feinleib, M., McNamara, P. M. & Castelli, W. P. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* **67**, 968–977 (1983).
25. Boles, A., Kandimalla, R. & Reddy, P. H. Dynamics of diabetes and obesity: Epidemiological perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1863**, 1026–1036 (2017).
26. Frühbeck, G. *et al.* Obesity: The Gateway to Ill Health – an EASO Position Statement on a Rising Public Health, Clinical and Scientific Challenge in Europe. *Obes Facts* **6**, 117–120 (2013).
27. Frank, A. P., de Souza Santos, R., Palmer, B. F. & Clegg, D. J. Determinants of body fat distribution in humans may provide insight about obesity-related health risks. *J Lipid Res* **60**, 1710–1719 (2019).
28. Beck, E., Esser, N., Paquot, N. & Scheen, A. J. Sujets de poids normal «métaboliquement obèses» et sujets obèses «métaboliquement sains». *Revue Médicale Suisse* **5** (2009).
29. Beck, E. & Scheen, A. J. sujets «métaboliquement obèses» sans excès de poids : un phénotype interpellant. *Rev Med Liège* **9**.
30. Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. & Shaw, J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine* **23**, 469–480 (2006).
31. Lorenzo, C., Okoloise, M., Williams, K., Stern, M. P. & Haffner, S. M. The Metabolic Syndrome as Predictor of Type 2 Diabetes: The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* **26**, 3153–3159 (2003).
32. Wilson, P. W. F., D’Agostino, R. B., Parise, H., Sullivan, L. & Meigs, J. B. Metabolic Syndrome as a Precursor of Cardiovascular Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation* **112**, 3066–3072 (2005).
33. Fuster, J. J., Ouchi, N., Gokce, N. & Walsh, K. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation Research* **118**, 1786–1807 (2016).
34. Albu, J. & Pi-Sunyer, F. X. Obesity and Diabetes. in *Handbook of Obesity* (CRC Press, 2003).
35. Leitner, D. R. *et al.* Obesity and Type 2 Diabetes: Two Diseases with a Need for Combined Treatment Strategies - EASO Can Lead the Way. *Obes Facts* **10**, 483–492 (2017).
36. Diabète. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
37. Saeedi, P. *et al.* Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice* **157**, 107843 (2019).
38. Eschwège, E. [Epidemiology of type II diabetes, diagnosis, prevalence, risk factors, complications]. *Arch Mal Coeur Vaiss* **93 Spec No 4**, 13–17 (2000).
39. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Spectrum* **17**, 51–59 (2004).
40. Guillausseau, P.-J. & Laloi-Michelin, M. Physiopathologie du diabète de type 2. *La Revue de Médecine Interne* **24**, 730–737 (2003).
41. Lin, X. *et al.* Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Sci Rep* **10**, 14790 (2020).

42. Ramachandran, A., Snehalatha, C., Shetty, A. S. & Nanditha, A. Trends in prevalence of diabetes in Asian countries. *World J Diabetes* **3**, 110–117 (2012).
43. Guasch-Ferré, M. *et al.* Total and subtypes of dietary fat intake and risk of type 2 diabetes mellitus in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) study. *The American Journal of Clinical Nutrition* **105**, 723–735 (2017).
44. Fung, T. T., Schulze, M., Manson, J. E., Willett, W. C. & Hu, F. B. Dietary Patterns, Meat Intake, and the Risk of Type 2 Diabetes in Women. *Archives of Internal Medicine* **164**, 2235–2240 (2004).
45. Erber, E. *et al.* Dietary Patterns and Risk for Diabetes: The Multiethnic Cohort. *Diabetes Care* **33**, 532–538 (2009).
46. Yang, X. *et al.* Meat and fish intake and type 2 diabetes: Dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Metab* **46**, 345–352 (2020).
47. Laakso, M. Hyperglycemia as a risk factor for cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Prim Care* **26**, 829–839 (1999).
48. Marcovecchio, M. L., Lucantoni, M. & Chiarelli, F. Role of Chronic and Acute Hyperglycemia in the Development of Diabetes Complications. *Diabetes Technology & Therapeutics* **13**, 389–394 (2011).
49. Diabète de type 2 · Inserm, La science pour la santé. *Inserm* <https://www.inserm.fr/dossier/diabete-type-2/>.
50. Eschwège, E., Simon, D. & Balkau, B. Le diabète de type 2 vu par l'épidémiologiste. *Dis- Manage-Health-Outcomes* **4**, 1–12 (1998).
51. Romon, I., Jouglu, E. & Weill, A. ENTRED. Description de la mortalité et des causes de décès dans une cohorte d'adultes diabétiques en France Métropolitaine. *Bull Epidemiol Hebd* **42**, 469–472 (2009).
52. Roth, G. A. *et al.* Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol* **70**, 1–25 (2017).
53. Cœur des Français : attention danger. *FFC* <https://fedecardio.org/presse/coeur-des-francais-attention-danger/>.
54. Sheiham, A. & Watt, R. G. The Common Risk Factor Approach: a rational basis for promoting oral health. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* **28**, 399–406 (2000).
55. Buttar, H. S., Li, T. & Ravi, N. Prevention of cardiovascular diseases: Role of exercise, dietary interventions, obesity and smoking cessation. *Exp Clin Cardiol* **10**, 229–249 (2005).
56. Meier, T. *et al.* Cardiovascular mortality attributable to dietary risk factors in 51 countries in the WHO European Region from 1990 to 2016: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study. *Eur J Epidemiol* **34**, 37–55 (2019).
57. Micha, R. *et al.* Association Between Dietary Factors and Mortality From Heart Disease, Stroke, and Type 2 Diabetes in the United States. *JAMA* **317**, 912–924 (2017).
58. Nanri, A. *et al.* Dietary patterns and all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in Japanese men and women: The Japan public health center-based prospective study. *PLoS One* **12**, e0174848 (2017).
59. Song, S., Paik, H. Y., Park, M. & Song, Y. Dyslipidemia patterns are differentially associated with dietary factors. *Clinical Nutrition* **35**, 885–891 (2016).
60. Donat-Vargas, C. *et al.* High Consumption of Ultra-Processed Food is Associated with Incident Dyslipidemia: A Prospective Study of Older Adults. *The Journal of Nutrition* **151**, 2390–2398 (2021).
61. Tzoulaki, I. *et al.* Relation of iron and red meat intake to blood pressure: cross sectional epidemiological study. *BMJ* **337**, a258 (2008).

62. Srour, B. *et al.* Ultra-processed food intake and risk of cardiovascular disease: prospective cohort study (NutriNet-Santé). *BMJ* **365**, l1451 (2019).
63. Elizabeth, L., Machado, P., Zinöcker, M., Baker, P. & Lawrence, M. Ultra-Processed Foods and Health Outcomes: A Narrative Review. *Nutrients* **12**, 1955 (2020).
64. Hord, N. G. Dietary Nitrates, Nitrites, and Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep* **13**, 484–492 (2011).
65. Cappuccio, F. P. Cardiovascular and other effects of salt consumption. *Kidney Int Suppl (2011)* **3**, 312–315 (2013).
66. Rao Ch., S. & Subash Y., E. The Effect of Chronic Tobacco Smoking and Chewing on the Lipid Profile. *J Clin Diagn Res* **7**, 31–34 (2013).
67. Lee, P. H. & Wong, F. K. Y. The Association Between Time Spent in Sedentary Behaviors and Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med* **45**, 867–880 (2015).
68. Brocklebank, L. A., Falconer, C. L., Page, A. S., Perry, R. & Cooper, A. R. Accelerometer-measured sedentary time and cardiometabolic biomarkers: A systematic review. *Preventive Medicine* **76**, 92–102 (2015).
69. Connelly, P. W. *et al.* Prevalence of high plasma triglyceride combined with low HDL-C levels and its association with smoking, hypertension, obesity, diabetes, sedentariness and LDL-C levels in the Canadian population. Canadian Heart Health Surveys Research Group. *Can J Cardiol* **15**, 428–433 (1999).
70. Larsson, S. C. & Wolk, A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer* **119**, 2657–2664 (2006).
71. Toniolo, P., Riboli, E., Protta, F., Charrel, M. & Cappa, A. P. M. Calorie-Providing Nutrients and Risk of Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **81**, 278–286 (1989).
72. Levi, F., La Vecchia, C., Gulie, C. & Negri, E. Dietary factors and breast cancer risk in Vaud, Switzerland. *Nutrition and Cancer* **19**, 327–335 (1993).
73. Danaei, G. *et al.* Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* **366**, 1784–1793 (2005).
74. Narula, N. *et al.* Association of ultra-processed food intake with risk of inflammatory bowel disease: prospective cohort study. *BMJ* **374**, n1554 (2021).
75. Hou, J. K., Abraham, B. & El-Serag, H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol* **106**, 563–573 (2011).
76. Jantchou, P., Morois, S., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C. & Carbonnel, F. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *Am J Gastroenterol* **105**, 2195–2201 (2010).
77. Chiba, M., Nakane, K. & Komatsu, M. Westernized Diet is the Most Ubiquitous Environmental Factor in Inflammatory Bowel Disease. *Perm J* **23**, 18–107 (2019).
78. Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L. & Masson, P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet* **389**, 1238–1252 (2017).
79. Yoon, C.-Y. *et al.* High dietary phosphorus density is a risk factor for incident chronic kidney disease development in diabetic subjects: a community-based prospective cohort study. *The American Journal of Clinical Nutrition* **106**, 311–321 (2017).
80. Mirmiran, P. *et al.* A Prospective Study of Dietary Meat Intake and Risk of Incident Chronic Kidney Disease. *Journal of Renal Nutrition* **30**, 111–118 (2020).
81. Muñoz-Garach, A., García-Fontana, B. & Muñoz-Torres, M. Nutrients and Dietary Patterns Related to Osteoporosis. *Nutrients* **12**, 1986 (2020).

82. Mangano, K. M., Walsh, S. J., Kenny, A. M., Insogna, K. L. & Kerstetter, J. E. Dietary Acid Load Is Associated With Lower Bone Mineral Density in Men With Low Intake of Dietary Calcium. *Journal of Bone and Mineral Research* **29**, 500–506 (2014).
83. Więckowska-Gacek, A., Mietelska-Porowska, A., Wydrych, M. & Wojda, U. Western diet as a trigger of Alzheimer’s disease: From metabolic syndrome and systemic inflammation to neuroinflammation and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews* **70**, 101397 (2021).
84. Gustaw-Rothenberg, K. Dietary patterns associated with Alzheimer’s disease: population based study. *Int J Environ Res Public Health* **6**, 1335–1340 (2009).
85. Park, J. H., Moon, J. H., Kim, H. J., Kong, M. H. & Oh, Y. H. Sedentary Lifestyle: Overview of Updated Evidence of Potential Health Risks. *Korean J Fam Med* **41**, 365–373 (2020).
86. Chastin, S. F. M., Mandrichenko, O., Helbostadt, J. L. & Skelton, D. A. Associations between objectively-measured sedentary behaviour and physical activity with bone mineral density in adults and older adults, the NHANES study. *Bone* **64**, 254–262 (2014).
87. Smith, L. *et al.* The Association Between Sedentary Behavior and Sarcopenia Among Adults Aged ≥65 Years in Low- and Middle-Income Countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**, 1708 (2020).
88. Sauvageot, N., Alkerwi, A., Albert, A. & Guillaume, M. Use of food frequency questionnaire to assess relationships between dietary habits and cardiovascular risk factors in NESCOV study: validation with biomarkers. *Nutrition Journal* **12**, 143 (2013).
89. Dandamudi, A., Tommie, J., Nommsen-Rivers, L. & Couch, S. Dietary Patterns and Breast Cancer Risk: A Systematic Review. *Anticancer Research* **38**, 3209–3222 (2018).
90. Field, A. P. & Gillett, R. How to do a meta-analysis. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology* **63**, 665–694 (2010).
91. Amato, M. *et al.* Overall dietary variety and adherence to the Mediterranean diet show additive protective effects against coronary heart disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **30**, 1315–1321 (2020).
92. Estruch, R. *et al.* Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *The New England journal of medicine* **368**, (2013).
93. Salas-Salvadó, J. *et al.* Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes With the Mediterranean Diet: Results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care* **34**, 14–19 (2010).
94. Satija, A. *et al.* Healthful and Unhealthful Plant-Based Diets and the Risk of Coronary Heart Disease in U.S. Adults. *Journal of the American College of Cardiology* **70**, 411–422 (2017).
95. Muzzioli, L., Penzavecchia, C., Donini, L. M. & Pinto, A. Are Front-of-Pack Labels a Health Policy Tool? *Nutrients* **14**, 771 (2022).
96. Fardet, A., Christodoulou, A., Frank, K. & Davidou, S. La classification holistico-réductionniste Siga des aliments en fonction de leur degré de transformation. (2019).
97. Hercberg, S., Touvier, M., Salas-Salvado, J. & on, behalf of the G. of E. scientists supporting the implementation of N.-S. in E. The Nutri-Score nutrition label. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* (2021) doi:10.1024/0300-9831/a000722.
98. Wolowczuk, I. *et al.* Feeding Our Immune System: Impact on Metabolism. *Clinical and Developmental Immunology* **2008**, e639803 (2008).
99. Lercher, A., Baazim, H. & Bergthaler, A. Systemic Immunometabolism: Challenges and Opportunities. *Immunity* **53**, 496–509 (2020).
100. Minihane, A. M. *et al.* Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr* **114**, 999–1012 (2015).

101. Christ, A., Lauterbach, M. & Latz, E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity* **51**, 794–811 (2019).
102. Tannock, L. R. *et al.* Cholesterol Feeding Increases C-Reactive Protein and Serum Amyloid A Levels in Lean Insulin-Sensitive Subjects. *Circulation* **111**, 3058–3062 (2005).
103. van Dijk, S. J. *et al.* A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition* **90**, 1656–1664 (2009).
104. Raatz, S. K., Johnson, L. K. & Picklo, M. J. Consumption of Honey, Sucrose, and High-Fructose Corn Syrup Produces Similar Metabolic Effects in Glucose-Tolerant and -Intolerant Individuals. *The Journal of Nutrition* **145**, 2265–2272 (2015).
105. Aeberli, I. *et al.* Low to moderate sugar-sweetened beverage consumption impairs glucose and lipid metabolism and promotes inflammation in healthy young men: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* **94**, 479–485 (2011).
106. Shivappa, N., Steck, S. E., Hurley, T. G., Hussey, J. R. & Hébert, J. R. Designing and developing a literature-derived, population-based dietary inflammatory index. *Public Health Nutr* **17**, 1689–1696 (2014).
107. Nguyen, S. *et al.* The effects of fatty acid composition on cardiac hypertrophy and function in mouse models of diet-induced obesity. *J Nutr Biochem* **46**, 137–142 (2017).
108. Progatzky, F. *et al.* Dietary cholesterol directly induces acute inflammasome-dependent intestinal inflammation. *Nat Commun* **5**, 5864 (2014).
109. Laffin, M. *et al.* A high-sugar diet rapidly enhances susceptibility to colitis via depletion of luminal short-chain fatty acids in mice. *Sci Rep* **9**, 12294 (2019).
110. Wen, H. *et al.* Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* **12**, 408–415 (2011).
111. Rajamäki, K. *et al.* Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PLOS ONE* **5**, e11765 (2010).
112. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
113. Sheedy, F. J. *et al.* CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* **14**, 812–820 (2013).
114. Stewart, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* **11**, 155–161 (2010).
115. Chen, J. & Vitetta, L. Inflammation-Modulating Effect of Butyrate in the Prevention of Colon Cancer by Dietary Fiber. *Clinical Colorectal Cancer* **17**, e541–e544 (2018).
116. Foitzik, T. *et al.* Omega-3 fatty acid supplementation increases anti-inflammatory cytokines and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **26**, 351–356 (2002).
117. Zhao, G. *et al.* Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **336**, 909–917 (2005).
118. Colson, C. *et al.* Diet Supplementation in  $\omega$ 3 Polyunsaturated Fatty Acid Favors an Anti-Inflammatory Basal Environment in Mouse Adipose Tissue. *Nutrients* **11**, 438 (2019).
119. Schwingshackl, L. & Hoffmann, G. Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: A systematic review and meta-analysis of intervention trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **24**, 929–939 (2014).

120. Konstantinidou, V. *et al.* In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *The FASEB Journal* **24**, 2546–2557 (2010).
121. Edrisi, F. *et al.* Effects of supplementation with rice husk powder and rice bran on inflammatory factors in overweight and obese adults following an energy-restricted diet: a randomized controlled trial. *Eur J Nutr* **57**, 833–843 (2018).
122. Faintuch, J. *et al.* Systemic Inflammation in Morbidly Obese Subjects: Response to Oral Supplementation with Alpha-Linolenic Acid. *OBES SURG* **17**, 341–347 (2007).
123. Dai, J. *et al.* Association between adherence to the Mediterranean diet and oxidative stress. *Am J Clin Nutr* **88**, 1364–1370 (2008).
124. Aleksandrova, K., Koelman, L. & Rodrigues, C. E. Dietary patterns and biomarkers of oxidative stress and inflammation: A systematic review of observational and intervention studies. *Redox Biology* **42**, 101869 (2021).
125. Thaiss, C. A. *et al.* Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science* **359**, 1376–1383 (2018).
126. Tan, B. L., Norhaizan, M. E. & Liew, W.-P.-P. Nutrients and Oxidative Stress: Friend or Foe? *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 9719584 (2018).
127. Patel, C. *et al.* Prolonged Reactive Oxygen Species Generation and Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation after a High-Fat, High-Carbohydrate Meal in the Obese. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92**, 4476–4479 (2007).
128. Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483–495 (2005).
129. Lingappan, K. NF- $\kappa$ B in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol* **7**, 81–86 (2018).
130. Du, X.-L. *et al.* Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 12222–12226 (2000).
131. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813–820 (2001).
132. Redza-Dutordoir, M. & Averill-Bates, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1863**, 2977–2992 (2016).
133. Choi, K., Kim, J., Kim, G. W. & Choi, C. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Curr Neurovasc Res* **6**, 213–222 (2009).
134. Halliwell, B. & Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* **57**, 715S-725S (1993).
135. Gasparovic, A. C., Milkovic, L., Sunjic, S. B. & Zarkovic, N. Cancer growth regulation by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* **111**, 226–234 (2017).
136. McFarland, L. V. Normal flora: diversity and functions. *Microbial Ecology in Health and Disease* **12**, 193–207 (2000).
137. Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* **3**, 213–223 (2008).
138. MetaHIT Consortium *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).

139. Garcia-Mantrana, I., Selma-Royo, M., Alcantara, C. & Collado, M. C. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Front Microbiol* **9**, 890 (2018).
140. Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P. & Colombel, J. F. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* **53**, 1–4 (2004).
141. Qin, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55–60 (2012).
142. Rajilić-Stojanović, M. *et al.* Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **141**, 1792–1801 (2011).
143. Larsen, N. *et al.* Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS One* **5**, e9085 (2010).
144. Lutsey, P. L., Steffen, L. M. & Stevens, J. Dietary Intake and the Development of the Metabolic Syndrome. *Circulation* **117**, 754–761 (2008).
145. Machado, M. V. *et al.* Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. *PLOS ONE* **10**, e0127991 (2015).
146. García-Montero, C. *et al.* Nutritional Components in Western Diet Versus Mediterranean Diet at the Gut Microbiota–Immune System Interplay. Implications for Health and Disease. *Nutrients* **13**, 699 (2021).
147. Zhu, W. *et al.* Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell* **165**, 111–124 (2016).
148. Geng, J. *et al.* Trimethylamine N-oxide promotes atherosclerosis via CD36-dependent MAPK/JNK pathway. *Biomed Pharmacother* **97**, 941–947 (2018).
149. Donohoe, D. R. *et al.* The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metabolism* **13**, 517–526 (2011).
150. Velázquez, O. C., Lederer, H. M. & Rombeau, J. L. Butyrate and the Colonocyte. in *Dietary Fiber in Health and Disease* (eds. Kritchevsky, D. & Bonfield, C.) 123–134 (Springer US, 1997). doi:10.1007/978-1-4615-5967-2\_14.
151. Byndloss, M. X. *et al.* Microbiota-activated PPAR- $\gamma$  signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* **357**, 570–575 (2017).
152. Segain, J.-P. *et al.* Butyrate inhibits inflammatory responses through NF $\kappa$ B inhibition: implications for Crohn’s disease. *Gut* **47**, 397–403 (2000).
153. Parada Venegas, D. *et al.* Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
154. Liu, H. *et al.* Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Advances in Nutrition* **9**, 21–29 (2018).
155. Jung, T.-H., Park, J. H., Jeon, W.-M. & Han, K.-S. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. *Nutr Res Pract* **9**, 343–349 (2015).
156. Ghosh, S., Whitley, C. S., Haribabu, B. & Jala, V. R. Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **11**, 1463–1482 (2021).
157. Peng, L., Li, Z.-R., Green, R. S., Holzman, I. R. & Lin, J. Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *J Nutr* **139**, 1619–1625 (2009).



158. Agus, A. *et al.* Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive E. coli infection and intestinal inflammation. *Sci Rep* **6**, 19032 (2016).
159. McOrist, A. L. *et al.* Fecal Butyrate Levels Vary Widely among Individuals but Are Usually Increased by a Diet High in Resistant Starch. *The Journal of Nutrition* **141**, 883–889 (2011).
160. Western diet induces Paneth cell defects through microbiome alterations and farnesoid X receptor and type I interferon activation. *Cell Host & Microbe* **29**, 988–1001.e6 (2021).
161. Cho, Y.-E. *et al.* Fructose Promotes Leaky Gut, Endotoxemia, and Liver Fibrosis Through Ethanol-Inducible Cytochrome P450-2E1–Mediated Oxidative and Nitrative Stress. *Hepatology* **73**, 2180–2195 (2021).
162. Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A. & Parthasarathy, S. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr* **11**, 77–91 (2020).
163. Peiser, L. & Gordon, S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* **3**, 149–159 (2001).
164. Park, B. S. & Lee, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* **45**, e66–e66 (2013).
165. Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K. & Kwiatkowska, K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 557–581 (2015).
166. Park, B. S. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–1195 (2009).
167. Huang, S. *et al.* Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res* **53**, 2002–2013 (2012).
168. Farré, R., Fiorani, M., Abdu Rahiman, S. & Matteoli, G. Intestinal Permeability, Inflammation and the Role of Nutrients. *Nutrients* **12**, 1185 (2020).
169. Dubois, C., Fradin, C. & Boulanger, É. Axe AGE-RAGE : conséquences physiopathologiques et inflammaging. *Médecine des Maladies Métaboliques* **13**, 595–601 (2019).
170. Ference, B. A. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* **38**, 2459–2472 (2017).
171. Korbecki, J. & Bajdak-Rusinek, K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm. Res.* **68**, 915–932 (2019).
172. Lee, J. Y., Sohn, K. H., Rhee, S. H. & Hwang, D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **276**, 16683–16689 (2001).
173. Kim, F. *et al.* Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res* **100**, 1589–1596 (2007).
174. Singh, M., Kumari, B. & Yadav, U. C. S. Regulation of oxidized LDL-induced inflammatory process through NLRP3 inflammasome activation by the deubiquitinating enzyme BRCC36. *Inflamm Res* **68**, 999–1010 (2019).
175. Zhao, M. *et al.* Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *APMIS* **110**, 458–468 (2002).
176. Orekhov, A. N. LDL and foam cell formation as the basis of atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology* **29**, 279–284 (2018).
177. Yanai, H. *et al.* An Improvement of Cardiovascular Risk Factors by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Clin Med Res* **10**, 281–289 (2018).

178. Mozaffarian, D. *et al.* Fish Consumption and Stroke Risk in Elderly Individuals: The Cardiovascular Health Study. *Archives of Internal Medicine* **165**, 200–206 (2005).
179. Larsson, S. C. & Orsini, N. Fish Consumption and the Risk of Stroke. *Stroke* **42**, 3621–3623 (2011).
180. Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S. & Appel, L. J. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation* **106**, 2747–2757 (2002).
181. Zampelas, A. *et al.* Fish Consumption Among Healthy Adults Is Associated With Decreased Levels of Inflammatory Markers Related to Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* **46**, 120–124 (2005).
182. Cordain, L. Implications for the Role of Diet in Acne. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* **24**, 84–91 (2005).
183. Chen, C., Cohrs, C. M., Stertmann, J., Bozsak, R. & Speier, S. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab* **6**, 943–957 (2017).
184. Nguyen, D., Shaw, L. & Grant, M. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Frontiers in Endocrinology* **3**, (2012).
185. Giacco, F. & Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* **107**, 1058–1070 (2010).
186. Shadel, G. S. & Horvath, T. L. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* **163**, 560–569 (2015).
187. Ferré, P. & Foufelle, F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res* **68**, 72–82 (2007).
188. Li, X. *et al.* Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol* **6**, 19 (2013).
189. Lipid Metabolism signaling pathway - Creative Diagnostics. <https://www.creative-diagnostics.com/lipid-metabolism-signaling-pathway.htm>.
190. Paul, S., Ali, A. & Katare, R. Molecular complexities underlying the vascular complications of diabetes mellitus - A comprehensive review. *J Diabetes Complications* **34**, 107613 (2020).
191. Hamada, Y. *et al.* Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, reduces the levels of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine protein adducts and their precursors in erythrocytes from diabetic patients. *Diabetes Care* **23**, 1539–1544 (2000).
192. Tomlinson, D. R., Stevens, E. J. & Diemel, L. T. Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications. *Trends in Pharmacological Sciences* **15**, 293–297 (1994).
193. Thakur, S., Gupta, S. K., Ali, V., Singh, P. & Verma, M. Aldose Reductase: a cause and a potential target for the treatment of diabetic complications. *Arch. Pharm. Res.* **44**, 655–667 (2021).
194. Kültz, D. Hyperosmolality triggers oxidative damage in kidney cells. *PNAS* **101**, 9177–9178 (2004).
195. Liu, M. *et al.* The role of protein kinase C in the metabolic regulation of the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Heart Rhythm* **14**, 440–447 (2017).
196. Ussher, J. R., Jaswal, J. S. & Lopaschuk, G. D. Pyridine nucleotide regulation of cardiac intermediary metabolism. *Circ Res* **111**, 628–641 (2012).
197. Song, J., Yang, X. & Yan, L.-J. Role of pseudohypoxia in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Hypoxia (Auckl)* **7**, 33–40 (2019).
198. Chen, C., Lü, J.-M. & Yao, Q. Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Med Sci Monit* **22**, 2501–2512 (2016).

199. Buse, M. G. Hexosamines, insulin resistance and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E1–E8 (2006).
200. James, L. R. *et al.* Flux Through the Hexosamine Pathway Is a Determinant of Nuclear Factor  $\kappa$ B– Dependent Promoter Activation. *Diabetes* **51**, 1146–1156 (2002).
201. Schleicher, E. D. & Weigert, C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney International* **58**, S13–S18 (2000).
202. Hiraga, R., Kato, M., Miyagawa, S. & Kamata, T. Nox4-derived ROS signaling contributes to TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* **33**, 4431–4438 (2013).
203. Yan, L.-J. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res* **2014**, 137919 (2014).
204. Zhang, J., Zhao, W.-S., Wang, X., Xu, L. & Yang, X.-C. Palmitic Acid Increases Endothelin-1 Expression in Vascular Endothelial Cells through the Induction of Endoplasmic Reticulum Stress and Protein Kinase C Signaling. *CRD* **140**, 133–140 (2018).
205. Andrea, J. E. & Walsh, M. P. Protein kinase C of smooth muscle. *Hypertension* **20**, 585–595 (1992).
206. Kelly, D. J. *et al.* Protein Kinase C  $\beta$  Inhibition Attenuates the Progression of Experimental Diabetic Nephropathy in the Presence of Continued Hypertension. *Diabetes* **52**, 512–518 (2003).
207. Kim, J.-H., Kim, J. H., Jun, H.-O., Yu, Y. S. & Kim, K.-W. Inhibition of Protein Kinase C  $\delta$  Attenuates Blood-Retinal Barrier Breakdown in Diabetic Retinopathy. *The American Journal of Pathology* **176**, 1517–1524 (2010).
208. Allaman, I., Bélanger, M. & Magistretti, P. J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Front Neurosci* **9**, 23 (2015).
209. Wareham, N. J. & Pfister, R. Diabetes: glycated hemoglobin is a marker of diabetes and CVD risk. *Nat Rev Cardiol* **7**, 367–368 (2010).
210. Ziemann, S. J. & Kass, D. A. Advanced Glycation Endproduct Crosslinking in the Cardiovascular System. *Drugs* **64**, 459–470 (2004).
211. Ott, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology* **2**, 411–429 (2014).
212. Bettiga, A. *et al.* The Modern Western Diet Rich in Advanced Glycation End-Products (AGEs): An Overview of Its Impact on Obesity and Early Progression of Renal Pathology. *Nutrients* **11**, E1748 (2019).
213. Ling, A. R. Malting. *Journal of the Institute of Brewing* **14**, 494–521 (1908).
214. Maillard, L. C., Maillard, L. C., Maillard, L. C. & Maillard, L. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. (1912).
215. Hodge, J. E. & Rist, C. E. The Amadori Rearrangement under New Conditions and its Significance for Non-enzymatic Browning Reactions<sup>2</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 316–322 (1953).
216. Hodge, J. E. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1**, 928–943 (1953).
217. Martins, S. I. F. S. & Van Boekel, M. A. J. S. A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chemistry* **90**, 257–269 (2005).
218. Ahmed, M. U., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* **261**, 4889–4894 (1986).
219. Langner, E. & Rzeski, W. Biological Properties of Melanoidins: A Review. *International Journal of Food Properties* **17**, 344–353 (2014).

220. Milkovska-Stamenova, S. & Hoffmann, R. Influence of storage and heating on protein glycation levels of processed lactose-free and regular bovine milk products. *Food Chemistry* **221**, (2016).
221. Sheng, Z. *et al.* Physicochemical Changes and Glycation Reaction in Intermediate-Moisture Protein-Sugar Foods with and without Addition of Resveratrol during Storage. *J Agric Food Chem* **64**, 5093–5100 (2016).
222. Levi, V., Villamil Giraldo, A. M., Castello, P. R., Rossi, J. P. F. C. & González Flecha, F. L. Effects of phosphatidylethanolamine glycation on lipid-protein interactions and membrane protein thermal stability. *Biochem J* **416**, 145–152 (2008).
223. Cämmerer, B., Jalyschkov, V. & Kroh, L. W. Carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *International Congress Series* **1245**, 269–273 (2002).
224. Wei, Q., Liu, T. & Sun, D.-W. Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science & Technology* **82**, 32–45 (2018).
225. Niquet-Léridon, C. & Tessier, F. J. Quantification of N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography–linear ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **126**, 655–663 (2011).
226. He, J., Zeng, M., Zheng, Z., He, Z. & Chen, J. Simultaneous determination of N $\epsilon$ -(carboxymethyl) lysine and N $\epsilon$ -(carboxyethyl) lysine in cereal foods by LC–MS/MS. *Eur Food Res Technol* **238**, 367–374 (2014).
227. Münch, G. *et al.* Determination of Advanced Glycation End Products in Serum by Fluorescence Spectroscopy and Competitive ELISA. **35**, 669–678 (1997).
228. Taneda, S. & Monnier, V. M. ELISA of pentosidine, an advanced glycation end product, in biological specimens. *Clinical Chemistry* **40**, 1766–1773 (1994).
229. Inan-Eroglu, E., Ayaz, A. & Buyuktuncer, Z. Formation of advanced glycation endproducts in foods during cooking process and underlying mechanisms: a comprehensive review of experimental studies. *Nutrition Research Reviews* 1–13 (2019) doi:10.1017/S0954422419000209.
230. Gómez-Ojeda, A. *et al.* Comparative evaluation of three different ELISA assays and HPLC-ESI-ITMS/MS for the analysis of N $\epsilon$ -carboxymethyl lysine in food samples. *Food Chem* **243**, 11–18 (2018).
231. Atzeni, I. M. *et al.* The AGE Reader: A non-invasive method to assess long-term tissue damage. *Methods* (2021) doi:10.1016/j.ymeth.2021.02.016.
232. Hofmann, B. *et al.* It's all in our skin—Skin autofluorescence—A promising outcome predictor in cardiac surgery: A single centre cohort study. *PLoS One* **15**, e0234847 (2020).
233. Uribarri, J. *et al.* Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *Journal of the American Dietetic Association* **110**, 911-916.e12 (2010).
234. Goldberg, T. *et al.* Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association* **104**, 1287–1291 (2004).
235. Scheijen, J. L. J. M. *et al.* Analysis of advanced glycation endproducts in selected food items by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: Presentation of a dietary AGE database. *Food Chem* **190**, 1145–1150 (2016).
236. Assar, S. H., Moloney, C., Lima, M., Magee, R. & Ames, J. M. Determination of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino Acids* **36**, 317–326 (2009).
237. Goldberg, T. *et al.* Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* **104**, 1287–1291 (2004).

238. Ledl, F. & Schleicher, E. New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body. *Angewandte Chemie International Edition in English* **29**, 565–594 (1990).
239. Sharma, C., Kaur, A., Thind, S. S., Singh, B. & Raina, S. Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *J Food Sci Technol* **52**, 7561–7576 (2015).
240. Lavigne, C. La conservation des aliments par le procédé à haute pression hydrostatique. *Nutrition Science en évolution* **16**, 15 (2019).
241. Alt, N. & Schieberle, P. Model Studies on the Influence of High Hydrostatic Pressure on the Formation of Glycated Arginine Modifications at Elevated Temperatures. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5789–5797 (2005).
242. Schwarzenbolz, U., Klostermeyer, H. & Henle, T. Maillard reaction under high hydrostatic pressure: studies on the formation of protein-bound amino acid derivatives. *International Congress Series* **1245**, 223–227 (2002).
243. Oliver, C. M., Melton, L. D. & Stanley, R. A. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **46**, 337–350 (2006).
244. *Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems*. (Springer New York, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-2578-0.
245. Adams, C. J. *et al.* Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* **343**, 651–659 (2008).
246. Buera, M. D. P., Chirife, J., Resnik, S. L. & Wetzler, G. Nonenzymatic Browning in Liquid Model Systems of High Water Activity: Kinetics of Color Changes due to Maillard's Reaction Between Different Single Sugars and Glycine and Comparison with Caramelization Browning. *Journal of Food Science* **52**, 1063–1067 (1987).
247. Ashoor, S. H. & Zent, J. B. Maillard Browning of Common Amino Acids and Sugars. *Journal of Food Science* **49**, 1206–1207 (1984).
248. Crascì, L., Lauro, M. R., Puglisi, G. & Panico, A. Natural antioxidant polyphenols on inflammation management: Anti-glycation activity vs metalloproteinases inhibition. *Crit Rev Food Sci Nutr* **58**, 893–904 (2018).
249. Chevalier, F., Chobert, J.-M., Mollé, D. & Haertlé, T. Maillard glycation of  $\beta$ -lactoglobulin with several sugars: comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Le Lait* **81**, 651–666 (2001).
250. Lee, A. T. & Cerami, A. Role of Glycation in Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* **663**, 63–70 (1992).
251. Schalkwijk, C. G., Posthuma, N., ten Brink, H. J., ter Wee, P. M. & Teerlink, T. Induction of 1,2-dicarbonyl compounds, intermediates in the formation of advanced glycation end-products, during heat-sterilization of glucose-based peritoneal dialysis fluids. *Perit Dial Int* **19**, 325–333 (1999).
252. Rahbar, S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta* **22**, 296–298 (1968).
253. Sebag, J., Buckingham, B., Charles, M. A. & Reiser, K. Biochemical abnormalities in vitreous of humans with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* **110**, 1472–1476 (1992).
254. Farlay, D. *et al.* Nonenzymatic Glycation and Degree of Mineralization Are Higher in Bone From Fractured Patients With Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of Bone and Mineral Research* **31**, 190–195 (2016).
255. Makita, Z. *et al.* Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* **325**, 836–842 (1991).

256. Kopytek, M., Ząbczyk, M., Mazur, P., Undas, A. & Natorska, J. Accumulation of advanced glycation end products (AGEs) is associated with the severity of aortic stenosis in patients with concomitant type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology* **19**, 92 (2020).
257. Meerwaldt, R. *et al.* The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovasc Diabetol* **7**, 29 (2008).
258. Tessier, F. J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathologie Biologie* **58**, 214–219 (2010).
259. Semba, R. D. *et al.* Elevated serum advanced glycation end products and their circulating receptors are associated with anaemia in older community-dwelling women. *Age and Ageing* **38**, 283–289 (2009).
260. Thomas, M. C. *et al.* Low-molecular-weight AGEs are associated with GFR and anemia in patients with type 2 diabetes. *Kidney International* **66**, 1167–1172 (2004).
261. Chen, Q., Huang, Q., Liu, W. & Zhou, X. Advanced glycation end products via skin autofluorescence as a new biomarker for major adverse cardiovascular events: a meta-analysis of prospective studies. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* (2022) doi:10.1016/j.numecd.2022.01.032.
262. Sharifi-Zahabi, E., Sharafabad, F. H., Abdollahzad, H., Malekahmadi, M. & Rad, N. B. Circulating Advanced Glycation End Products and Their Soluble Receptors in Relation to All-Cause and Cardiovascular Mortality: A Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Observational Studies. *Advances in Nutrition* **12**, 2157–2171 (2021).
263. Kilhovd, B. K., Berg, T. J., Birkeland, K. I., Thorsby, P. & Hanssen, K. F. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care* **22**, 1543–1548 (1999).
264. SEMBA, R. D. *et al.* Serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, is associated with arterial stiffness in older adults. *J Hypertens* **33**, 797–803 (2015).
265. Brophy, M. L. *et al.* Eating the Dead to Keep Atherosclerosis at Bay. *Front Cardiovasc Med* **4**, 2 (2017).
266. Sakata, N. *et al.* Immunohistochemical localization of different epitopes of advanced glycation end products in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* **141**, 61–75 (1998).
267. Sims, T. J., Rasmussen, L. M., Oxlund, H. & Bailey, A. J. The role of glycation cross-links in diabetic vascular stiffening. *Diabetologia* **39**, 946–951 (1996).
268. Agalou, S., Ahmed, N., Babaei-Jadidi, R., Dawnay, A. & Thornalley, P. J. Profound mishandling of protein glycation degradation products in uremia and dialysis. *J Am Soc Nephrol* **16**, 1471–1485 (2005).
269. Semba, R. D. *et al.* Advanced Glycation End Products and Their Circulating Receptors and Level of Kidney Function in Older Community-Dwelling Women. *Am J Kidney Dis* **53**, 51–58 (2009).
270. Semba, R. D., Fink, J. C., Sun, K., Windham, B. G. & Ferrucci, L. Serum Carboxymethyl-lysine, a Dominant Advanced Glycation End Product, is Associated with Chronic Kidney Disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Ren Nutr* **20**, 74–81 (2010).
271. Teissier, T. *et al.* Knockout of receptor for advanced glycation end-products attenuates age-related renal lesions. *Aging Cell* **18**, e12850 (2019).
272. La néphropathie. *Diabète Québec* <https://www.diabete.qc.ca/fr/comprendre-le-diabete/tout-sur-le-diabete/complications/la-nephropathie/>.
273. Oldfield, M. D. *et al.* Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* **108**, 1853–1863 (2001).

274. Vitek, M. P. *et al.* Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *PNAS* **91**, 4766–4770 (1994).
275. Smith, M. A. *et al.* Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5710–5714 (1994).
276. Lüth, H.-J. *et al.* Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb Cortex* **15**, 211–220 (2005).
277. Shuvaev, V. V. *et al.* Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; AGEs, advanced glycation end products; apo, apolipoprotein; BSA, bovine serum albumin; CSF, cerebrospinal fluid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PBS, phosphate buffer saline. *Neurobiology of Aging* **22**, 397–402 (2001).
278. Vieira, M. N. N., Lima-Filho, R. A. S. & De Felice, F. G. Connecting Alzheimer's disease to diabetes: Underlying mechanisms and potential therapeutic targets. *Neuropharmacology* **136**, 160–171 (2018).
279. Haus, J. M., Carrithers, J. A., Trappe, S. W. & Trappe, T. A. Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **103**, 2068–2076 (2007).
280. Dalal, M. *et al.* Elevated serum advanced glycation end products and poor grip strength in older community-dwelling women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64**, 132–137 (2009).
281. Semba, R. D., Bandinelli, S., Sun, K., Guralnik, J. M. & Ferrucci, L. Relationship of an advanced glycation end product, plasma carboxymethyl-lysine, with slow walking speed in older adults: the InCHIANTI study. *Eur J Appl Physiol* **108**, 191 (2009).
282. Thomas, C. J., Cleland, T. P., Sroga, G. E. & Vashishth, D. Accumulation of carboxymethyl-lysine (CML) in human cortical bone. *Bone* **110**, 128–133 (2018).
283. Hein, G., Wiegand, R., Lehmann, G., Stein, G. & Franke, S. Advanced glycation end-products pentosidine and Nε-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology* **42**, 1242–1246 (2003).
284. Saito, M., Fujii, K., Soshi, S. & Tanaka, T. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation-induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int* **17**, 986–995 (2006).
285. Monnier, V. M., Stevens, V. J. & Cerami, A. Nonenzymatic glycosylation, sulfhydryl oxidation, and aggregation of lens proteins in experimental sugar cataracts. *J Exp Med* **150**, 1098–1107 (1979).
286. Hashim, Z. & Zarina, S. Advanced glycation end products in diabetic and non-diabetic human subjects suffering from cataract. *Age (Dordr)* **33**, 377–384 (2011).
287. Wautier, J. L. *et al.* Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7742–7746 (1994).
288. Wautier, J. L. *et al.* Increased adhesion of erythrocytes to endothelial cells in diabetes mellitus and its relation to vascular complications. *N Engl J Med* **305**, 237–242 (1981).
289. Kuzan, A., Chwiłkowska, A., Kobielarz, M., Pezowicz, C. & Gamian, A. [Glycation of extracellular matrix proteins and its role in atherosclerosis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **66**, 804–809 (2012).
290. Reiser, K. M. Nonenzymatic Glycation of Collagen in Aging and Diabetes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **196**, 17–29 (1991).

291. Reiser, K., McCormick, R. J. & Rucker, R. B. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *The FASEB Journal* **6**, 2439–2449 (1992).
292. Stammers, M. *et al.* Age-related changes in the physical properties, cross-linking, and glycation of collagen from mouse tail tendon. *J Biol Chem* **295**, 10562–10571 (2020).
293. Brownlee, M., Vlassara, H. & Cerami, A. Nonenzymatic Glycosylation Products on Collagen Covalently Trap Low-Density Lipoprotein. *Diabetes* **34**, 938–941 (1985).
294. Blakytyn, R. & Harding, J. J. Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase. *Biochem J* **288 ( Pt 1)**, 303–307 (1992).
295. Carrard, G., Dieu, M., Raes, M., Toussaint, O. & Friguet, B. Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**, 728–739 (2003).
296. Facchiano, F. *et al.* Sugar-Induced Modification of Fibroblast Growth Factor 2 Reduces Its Angiogenic Activity in Vivo. *The American Journal of Pathology* **161**, 531–541 (2002).
297. Marschner, J. P. & Rietbrock, N. Oxygen release kinetics in healthy subjects and diabetic patients. I: The role of 2,3-diphosphoglycerate. *Int J Clin Pharmacol Ther* **32**, 533–535 (1994).
298. Nicolas, C. *et al.* Carbamylation and glycation compete for collagen molecular aging in vivo. *Sci Rep* **9**, 18291 (2019).
299. Abdul Zani, I. *et al.* Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells* **4**, 178–201 (2015).
300. Apostolov, E. O., Shah, S. V., Ray, D. & Basnakian, A. G. Scavenger Receptors of Endothelial Cells Mediate the Uptake and Cellular Proatherogenic Effects of Carbamylated LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **29**, 1622–1630 (2009).
301. Lam, M. C. W., Tan, K. C. B. & Lam, K. S. L. Glycoxidized low-density lipoprotein regulates the expression of scavenger receptors in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* **177**, 313–320 (2004).
302. Schmidt, A. M. *et al.* Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* **267**, 14987–14997 (1992).
303. PrabhuDas, M. *et al.* Standardizing Scavenger Receptor Nomenclature. *J Immunol* **192**, 1997–2006 (2014).
304. Kislinger, T. *et al.* N  $\epsilon$ -(Carboxymethyl)Lysine Adducts of Proteins Are Ligands for Receptor for Advanced Glycation End Products That Activate Cell Signaling Pathways and Modulate Gene Expression \*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31740–31749 (1999).
305. Xue, J. *et al.* Advanced Glycation End Product Recognition by the Receptor for AGEs. *Structure* **19**, 722–732 (2011).
306. Riuzzi, F. *et al.* RAGE in the pathophysiology of skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **9**, 1213–1234 (2018).
307. Kang, R. *et al.* The HMGB1/RAGE inflammatory pathway promotes pancreatic tumor growth by regulating mitochondrial bioenergetics. *Oncogene* **33**, 567–577 (2014).
308. Kumar, V. *et al.* Homeostatic nuclear RAGE–ATM interaction is essential for efficient DNA repair. *Nucleic Acids Research* **45**, 10595–10613 (2017).
309. Diamanti-Kandarakis, E. *et al.* Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochem Cell Biol* **127**, 581–589 (2007).



310. Teissier, T. & Boulanger, É. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging. *Biogerontology* **20**, 279–301 (2019).
311. van Zoelen, M. A., Achouiti, A. & van der Poll, T. The role of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in infection. *Crit Care* **15**, 208 (2011).
312. Palanissami, G. & Paul, S. F. D. RAGE and Its Ligands: Molecular Interplay Between Glycation, Inflammation, and Hallmarks of Cancer—a Review. *Hormones and Cancer* **9**, 295–325 (2018).
313. May, O. *et al.* The receptor for advanced glycation end products is a sensor for cell-free heme. *The FEBS Journal* **288**, 3448–3464 (2021).
314. Sorci, G., Riuzzi, F., Giambanco, I. & Donato, R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1833**, 101–109 (2013).
315. Singh, R., Barden, A., Mori, T. & Beilin, L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**, 129–146 (2001).
316. Wautier, M. P. *et al.* Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E685–694 (2001).
317. Tian, J. *et al.* Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* **8**, 487–496 (2007).
318. Zhong, H. *et al.* Interplay between RAGE and TLR4 Regulates HMGB1-Induced Inflammation by Promoting Cell Surface Expression of RAGE and TLR4. *The Journal of Immunology* **205**, 767–775 (2020).
319. Zong, H. *et al.* Homodimerization is essential for the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signal transduction. *J Biol Chem* **285**, 23137–23146 (2010).
320. Chuah, Y. K., Basir, R., Talib, H., Tie, T. H. & Nordin, N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *Int J Inflam* **2013**, 403460 (2013).
321. Body-Malapel, M. *et al.* The RAGE signaling pathway is involved in intestinal inflammation and represents a promising therapeutic target for Inflammatory Bowel Diseases. *Mucosal Immunol* **12**, 468–478 (2019).
322. Tsalamandris, S. *et al.* The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol* **14**, 50–59 (2019).
323. Piras, S. *et al.* RAGE Expression and ROS Generation in Neurons: Differentiation versus Damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, 1–9 (2016).
324. Grossin, N. *et al.* Dietary CML-enriched protein induces functional arterial aging in a RAGE-dependent manner in mice. *Molecular Nutrition & Food Research* **59**, 927–938 (2015).
325. Bartling, B., Zunkel, K., Al-Robaiy, S., Dehghani, F. & Simm, A. Gene doubling increases glyoxalase 1 expression in RAGE knockout mice. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1864**, 129438 (2020).
326. Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D. & Abumrad, N. A. Structure-Function of CD36 and Importance of Fatty Acid Signal Transduction in Fat Metabolism. *Annu Rev Nutr* **34**, 281–303 (2014).
327. Park, Y. M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med* **46**, e99–e99 (2014).
328. Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R. & McGregor, J. L. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **75**, 468–477 (2007).

329. Triantafilou, M. *et al.* Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting\*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 31002–31011 (2006).
330. Zhu, W., Li, W. & Silverstein, R. L. Advanced glycation end products induce a prothrombotic phenotype in mice via interaction with platelet CD36. *Blood* **119**, 6136–6144 (2012).
331. Wang, L. & Tang, C. Targeting Platelet in Atherosclerosis Plaque Formation: Current Knowledge and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* **21**, 9760 (2020).
332. Ohgami, N. *et al.* CD36, a Member of the Class B Scavenger Receptor Family, as a Receptor for Advanced Glycation End Products \*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 3195–3202 (2001).
333. Kuniyasu, A. *et al.* CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS Letters* **537**, 85–90 (2003).
334. Barreto, J., Karathanasis, S. K., Remaley, A. & Sposito, A. C. Role of LOX-1 (Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1) as a Cardiovascular Risk Predictor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **41**, 153–166 (2021).
335. Ohki, I. *et al.* Crystal structure of human lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to OxLDL. *Structure* **13**, 905–917 (2005).
336. Chen, X., Zhang, T. & Du, G. Advanced glycation end products serve as ligands for lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1(LOX-1): biochemical and binding characterizations assay. *Cell Biochemistry and Function* **26**, 760–770 (2008).
337. Shiu, S. W. M., Wong, Y. & Tan, K. C. B. Effect of advanced glycation end products on lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* **19**, 1083–1092 (2012).
338. Jono, T. *et al.* Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Letters* **511**, 170–174 (2002).
339. Lu, C. *et al.* Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11767–11772 (2004).
340. Vlassara, H. *et al.* Identification of Galectin-3 As a High-Affinity Binding Protein for Advanced Glycation End Products (AGE): A New Member of the AGE-Receptor Complex. *Mol Med* **1**, 634–646 (1995).
341. Hirai, M. & Shimizu, N. Purification of two distinct proteins of approximate Mr 80,000 from human epithelial cells and identification as proper substrates for protein kinase C. *Biochemical Journal* **270**, 583–589 (1990).
342. Pugliese, G. *et al.* The diabetic milieu modulates the advanced glycation end product-receptor complex in the mesangium by inducing or upregulating galectin-3 expression. *Diabetes* **49**, 1249–1257 (2000).
343. Trombetta, E. S., Simons, J. F. & Helenius, A. Endoplasmic Reticulum Glucosidase II Is Composed of a Catalytic Subunit, Conserved from Yeast to Mammals, and a Tightly Bound Noncatalytic HDEL-containing Subunit \*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 27509–27516 (1996).
344. Vlassara, H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* **17**, 436–443 (2001).

345. Zhuang, A. *et al.* Globally elevating the AGE clearance receptor, OST48, does not protect against the development of diabetic kidney disease, despite improving insulin secretion. *Sci Rep* **9**, 13664 (2019).
346. Zhuang, A. *et al.* Increased liver AGEs induce hepatic injury mediated through an OST48 pathway. *Sci Rep* **7**, 12292 (2017).
347. Jaisson, S. & Gillery, P. Impaired proteostasis: role in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetologia* **57**, 1517–1527 (2014).
348. Sixt, S. U. & Dahmann, B. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin — Incidence and relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1782**, 817–823 (2008).
349. Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal* **20**, 460–473 (2014).
350. Cooper, G. M. Protein Degradation. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* (2000).
351. Takahashi, A. *et al.* Autophagy Inhibits the Accumulation of Advanced Glycation End Products by Promoting Lysosomal Biogenesis and Function in the Kidney Proximal Tubules. *Diabetes* **66**, 1359–1372 (2017).
352. Rainero, E. Extracellular matrix endocytosis in controlling matrix turnover and beyond: emerging roles in cancer. *Biochemical Society Transactions* **44**, 1347–1354 (2016).
353. Gao, H., Shi, W. & Freund, L. B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 9469–9474 (2005).
354. Ben, J., Zhu, X., Zhang, H. & Chen, Q. Class A1 scavenger receptors in cardiovascular diseases. *British Journal of Pharmacology* **172**, 5523–5530 (2015).
355. Tamura, Y. *et al.* FEEL-1 and FEEL-2 Are Endocytic Receptors for Advanced Glycation End Products \*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12613–12617 (2003).
356. Bongarzone, S., Savickas, V., Luzi, F. & Gee, A. D. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem* **60**, 7213–7232 (2017).
357. Prasad, K. Is there any evidence that AGE/sRAGE is a universal biomarker/risk marker for diseases? *Mol Cell Biochem* **451**, 139–144 (2019).
358. Geroldi, D. *et al.* Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J Hypertens* **23**, 1725–1729 (2005).
359. Emanuele, E. *et al.* Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol* **62**, 1734–1736 (2005).
360. Fujisawa, K. *et al.* Circulating soluble RAGE as a predictive biomarker of cardiovascular event risk in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* **227**, 425–428 (2013).
361. Prasad, K. *et al.* AGEs/sRAGE, a novel risk factor in the pathogenesis of end-stage renal disease. *Mol Cell Biochem* **423**, 105–114 (2016).
362. Mentrup, T., Cabrera-Cabrera, F. & Schröder, B. Proteolytic Regulation of the Lectin-Like Oxidized Lipoprotein Receptor LOX-1. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **7**, (2021).
363. Szwergold, B. S., Howell, S. & Beisswenger, P. J. Human Fructosamine-3-Kinase: Purification, Sequencing, Substrate Specificity, and Evidence of Activity In Vivo. *Diabetes* **50**, 2139–2147 (2001).
364. Petersen, A., Kappler, F., Szwergold, B. S. & Brown, T. R. Fructose metabolism in the human erythrocyte. Phosphorylation to fructose 3-phosphate. *Biochem J* **284**, 363–366 (1992).
365. Delpierre, G., Collard, F., Fortpied, J. & Van Schaftingen, E. Fructosamine 3-kinase is involved in an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. *Biochem J* **365**, 801–808 (2002).

366. Thornalley, P. J. Glyoxalase I—structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans* **31**, 1343–1348 (2003).
367. Xue, M., Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Glyoxalase in ageing. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 293–301 (2011).
368. Kumagai, T. *et al.* Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **296**, F912–F921 (2009).
369. Brouwers, O. *et al.* Glyoxalase-1 overexpression reduces endothelial dysfunction and attenuates early renal impairment in a rat model of diabetes. *Diabetologia* **57**, 224–235 (2014).
370. Tamori, S. *et al.* Glyoxalase 1 gene is highly expressed in basal-like human breast cancers and contributes to survival of ALDH1-positive breast cancer stem cells. *Oncotarget* **9**, 36515–36529 (2018).
371. Lee, J. *et al.* Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases. *Human Molecular Genetics* **21**, 3215–3225 (2012).
372. Tissue expression of PARK7 - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000116288-PARK7/tissue>.
373. Jun, Y. W. & Kool, E. T. Small Substrate or Large? Debate Over the Mechanism of Glycation Adduct Repair by DJ-1. *Cell Chemical Biology* **27**, 1117–1123 (2020).
374. Andreeva, A. *et al.* The apparent deglycase activity of DJ-1 results from the conversion of free methylglyoxal present in fast equilibrium with hemithioacetals and hemiaminals. *J Biol Chem* **294**, 18863–18872 (2019).
375. Andres-Mateos, E. *et al.* DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14807–14812 (2007).
376. Clements, C. M., McNally, R. S., Conti, B. J., Mak, T. W. & Ting, J. P.-Y. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15091–15096 (2006).
377. Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T. & Abeliovich, A. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol* **2**, e362 (2004).
378. Chen, J., Li, L. & Chin, L.-S. Parkinson disease protein DJ-1 converts from a zymogen to a protease by carboxyl-terminal cleavage. *Hum Mol Genet* **19**, 2395–2408 (2010).
379. Kanazu, T. *et al.* Aldehyde reductase is a major protein associated with 3-deoxyglucosone reductase activity in rat, pig and human livers. *Biochem J* **279**, 903–906 (1991).
380. Fujii, J., Homma, T., Miyata, S. & Takahashi, M. Pleiotropic Actions of Aldehyde Reductase (AKR1A). *Metabolites* **11**, 343 (2021).
381. Tissue expression of AKR1A1 - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000117448-AKR1A1/tissue>.
382. Tissue expression of AKR1B1 - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000085662-AKR1B1/tissue>.
383. Wirth, H. P. & Wermuth, B. Immunohistochemical localisation of aldehyde and aldose reductase in human tissues. *Prog Clin Biol Res* **174**, 231–239 (1985).
384. Thornalley, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol* **27**, 565–573 (1996).
385. Schalkwijk, C. G. & Stehouwer, C. D. A. Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarbonyl Compound, in Diabetes, Its Vascular Complications, and Other Age-Related Diseases. *Physiological Reviews* **100**, 407–461 (2020).

386. Collard, F., Vertommen, D., Fortpied, J., Duester, G. & Van Schaftingen, E. Identification of 3-deoxyglucosone dehydrogenase as aldehyde dehydrogenase 1A1 (Retinaldehyde dehydrogenase 1). *Biochimie* **89**, 369–373 (2007).
387. Tissue expression of ALDH1A1 - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165092-ALDH1A1/tissue>.
388. Izaguirre, G., Kikonyogo, A. & Pietruszko, R. Methylglyoxal as substrate and inhibitor of human aldehyde dehydrogenase: comparison of kinetic properties among the three isozymes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **119**, 747–754 (1998).
389. Vander Jagt, D. L. & Hunsaker, L. A. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact* **143–144**, 341–351 (2003).
390. Lin, S. W., Chen, J. C., Hsu, L. C., Hsieh, C. L. & Yoshida, A. Human gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* **34**, 376–380 (1996).
391. Xu, N. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is associated with a poor prognosis of bladder cancer. *Cancer Epidemiol* **39**, 375–381 (2015).
392. Hsu, L. C., Chang, W.-C., Chang, C., Tsukamoto, N. & Yoshida, A. The Human Aldehyde Dehydrogenase 3 Gene (ALDH3): Identification of a New Exon and Diverse mRNA Isoforms, and Functional Analysis of the Promoter. *Gene Expr* **6**, 87–99 (2018).
393. Kern, T. S. & Engerman, R. L. Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy: aminoguanidine and aspirin. *Diabetes* **50**, 1636–1642 (2001).
394. Hammes, H. P., Martin, S., Federlin, K., Geisen, K. & Brownlee, M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11555–11558 (1991).
395. Thornalley, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* **419**, 31–40 (2003).
396. Ruggiero-Lopez, D. *et al.* Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol* **58**, 1765–1773 (1999).
397. Guilbaud, A. *et al.* The Effect of Lactobacillus fermentum ME-3 Treatment on Glycation and Diabetes Complications. *Molecular Nutrition & Food Research* **64**, 1901018 (2020).
398. Toprak, C. & Yigitaslan, S. Alagebrium and Complications of Diabetes Mellitus. *Eurasian J Med* **51**, 285–292 (2019).
399. Vaitkevicius, P. V. *et al.* A cross-link breaker has sustained effects on arterial and ventricular properties in older rhesus monkeys. *PNAS* **98**, 1171–1175 (2001).
400. Asif, M. *et al.* An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness. *PNAS* **97**, 2809–2813 (2000).
401. Frimat, M. *et al.* Kidney, heart and brain: three organs targeted by ageing and glycation. *Clinical Science* **131**, 1069–1092 (2017).
402. vTv Therapeutics. *Randomized, Double-blind, Placebo Controlled, Multi-center Registration Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Azeliragon (TTP488) in Patients With Mild Alzheimer’s Disease Receiving Acetylcholinesterase Inhibitors and/or Memantine*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02080364> (2021).
403. vTv Therapeutics Presents Positive Data on the Effect of Azeliragon in Patients with Alzheimer’s and Diabetes at the 11th Clinical Trials on Alzheimer’s Disease (CTAD) Conference. <https://www.businesswire.com/news/home/20181024005226/en/vTv-Therapeutics-Presents-Positive-Data-on-the-Effect-of-Azeliragon-in-Patients-with->

- Alzheimer%2%80%99s-and-Diabetes-at-the-11th-Clinical-Trials-on-Alzheimer%2%80%99s-Disease-CTAD-Conference (2018).
404. Yang, Q. *et al.* Effect of glycation degree on the structure and digestion properties of ovalbumin: A study of amino acids and peptides release after in vitro gastrointestinal simulated digestion. *Food Chemistry* **373**, 131331 (2022).
  405. Luz Sanz, M., Corzo-Martínez, M., Rastall, R. A., Olano, A. & Moreno, F. J. Characterization and in Vitro Digestibility of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin Glycated with Galactooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 7916–7925 (2007).
  406. Finot, P.-A. The absorption and metabolism of modified amino acids in processed foods. *J AOAC Int* **88**, 894–903 (2005).
  407. Alamir, I. *et al.* Digestibility of extruded proteins and metabolic transit of N $\epsilon$ -carboxymethyllysine in rats. *Amino Acids* **44**, 1441–1449 (2013).
  408. Rérat, A., Calmes, R., Vaissade, P. & Finot, P.-A. Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig: Significance for man. *Eur J Nutr* **41**, 1–11 (2002).
  409. Snelson, M. & Coughlan, M. T. Dietary Advanced Glycation End Products: Digestion, Metabolism and Modulation of Gut Microbial Ecology. *Nutrients* **11**, E215 (2019).
  410. Delgado-Andrade, C., Tessier, F. J., Niquet-Leridon, C., Seiquer, I. & Pilar Navarro, M. Study of the urinary and faecal excretion of N $\epsilon$ -carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino Acids* **43**, 595–602 (2012).
  411. Deppe, V. M., Bongaerts, J., O’Connell, T., Maurer, K.-H. & Meinhardt, F. Enzymatic deglycation of Amadori products in bacteria: mechanisms, occurrence and physiological functions. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**, 399–406 (2011).
  412. Bui, T. P. N. *et al.* Production of butyrate from lysine and the Amadori product fructoselysine by a human gut commensal. *Nat Commun* **6**, 10062 (2015).
  413. Hellwig, M. *et al.* Metabolization of the Advanced Glycation End Product N $\epsilon$ -Carboxymethyllysine (CML) by Different Probiotic E. coli Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2019) doi:10.1021/acs.jafc.8b06748.
  414. Xu, D. *et al.* Degradation of Peptide-Bound Maillard Reaction Products in Gastrointestinal Digests of Glyoxal-Glycated Casein by Human Colonic Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 12094–12104 (2019).
  415. Tessier, F. J. *et al.* Quantitative assessment of organ distribution of dietary protein-bound <sup>13</sup>C-labeled N $\epsilon$ -carboxymethyllysine after a chronic oral exposure in mice. *Molecular Nutrition & Food Research* **60**, 2446–2456 (2016).
  416. Koschinsky, T. *et al.* Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6474–6479 (1997).
  417. Grunwald, S., Krause, R., Bruch, M., Henle, T. & Brandsch, M. Transepithelial flux of early and advanced glycation compounds across Caco-2 cell monolayers and their interaction with intestinal amino acid and peptide transport systems. *Br J Nutr* **95**, 1221–1228 (2006).
  418. Hellwig, M. *et al.* Transport of free and peptide-bound glycated amino acids: synthesis, transepithelial flux at Caco-2 cell monolayers, and interaction with apical membrane transport proteins. *Chembiochem* **12**, 1270–1279 (2011).
  419. Hellwig, M. *et al.* Transport of Free and Peptide-Bound Pyrroline at Intestinal and Renal Epithelial Cells. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 6474–6480 (2009).
  420. Tuma, P. L. & Hubbard, A. L. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* **83**, 871–932 (2003).

421. Vaziri, N. D., Yuan, J., Nazertehrani, S., Ni, Z. & Liu, S. Chronic Kidney Disease Causes Disruption of Gastric and Small Intestinal Epithelial Tight Junction. *AJN* **38**, 99–103 (2013).
422. Qu, W. *et al.* Dietary advanced glycation end products modify gut microbial composition and partially increase colon permeability in rats. *Molecular Nutrition & Food Research* **61**, 1700118 (2017).
423. Snelson, M. *et al.* Processed foods drive intestinal barrier permeability and microvascular diseases. *Science Advances* (2021) doi:10.1126/sciadv.abe4841.
424. Garay-Sevilla, M. E. *et al.* THE POTENTIAL ROLE OF DIETARY ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS IN THE DEVELOPMENT OF CHRONIC NON-INFECTIOUS DISEASES. A narrative review. *Nutr Res Rev* 1–55 (2020) doi:10.1017/S0954422420000104.
425. Roncero-Ramos, I. *et al.* Metabolic transit of N(ε)-carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust. *Food Funct* **4**, 1032–1039 (2013).
426. He, C., Sabol, J., Mitsuhashi, T. & Vlassara, H. Dietary glycotoxins: inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. *Diabetes* **48**, 1308–1315 (1999).
427. Semba, R. D. *et al.* Dietary intake associated with serum versus urinary carboxymethyl-lysine, a major advanced glycation end product, in adults: the Energetics Study. *Eur J Clin Nutr* **66**, 3–9 (2012).
428. Birlouez-Aragon, I. *et al.* A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition* **91**, 1220–1226 (2010).
429. Tessier, F. J., Boulanger, E. & Howsam, M. Metabolic transit of dietary advanced glycation end-products - the case of Nε-carboxymethyllysine. *Glycoconj J* **38**, 311–317 (2021).
430. Qu, W. *et al.* Dietary advanced glycation end products modify gut microbial composition and partially increase colon permeability in rats. *Mol Nutr Food Res* **61**, (2017).
431. Reddy, M. B. & Love, M. The impact of food processing on the nutritional quality of vitamins and minerals. *Adv Exp Med Biol* **459**, 99–106 (1999).
432. Nearing, J. T., Comeau, A. M. & Langille, M. G. I. Identifying biases and their potential solutions in human microbiome studies. *Microbiome* **9**, 113 (2021).
433. Semba, R. D. *et al.* Dietary Intake of Advanced Glycation End Products Did Not Affect Endothelial Function and Inflammation in Healthy Adults in a Randomized Controlled Trial. *The Journal of Nutrition* **144**, 1037–1042 (2014).
434. Vlassara, H. *et al.* Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 4483–4491 (2009).
435. Lopez-Moreno, J. *et al.* Mediterranean Diet Supplemented With Coenzyme Q10 Modulates the Postprandial Metabolism of Advanced Glycation End Products in Elderly Men and Women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **73**, 340–346 (2018).
436. Lopez-Moreno, J. *et al.* Mediterranean Diet Reduces Serum Advanced Glycation End Products and Increases Antioxidant Defenses in Elderly Adults: A Randomized Controlled Trial. *Journal of the American Geriatrics Society* **64**, 901–904 (2016).
437. Angoorani, P., Ejtahed, H.-S., Mirmiran, P., Mirzaei, S. & Azizi, F. Dietary consumption of advanced glycation end products and risk of metabolic syndrome. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **67**, 170–176 (2016).
438. Mendoza-Herrera, K. *et al.* Association of Dietary Advanced Glycation End Products with Metabolic Syndrome in Young Mexican Adults. *Medicines* **5**, 128 (2018).

439. Uribarri, J. *et al.* Restriction of Advanced Glycation End Products Improves Insulin Resistance in Human Type 2 Diabetes: Potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care* **34**, 1610–1616 (2011).
440. Yacoub, R. *et al.* Advanced glycation end products dietary restriction effects on bacterial gut microbiota in peritoneal dialysis patients; a randomized open label controlled trial. *PLoS One* **12**, e0184789 (2017).
441. Macías-Cervantes, M. H. *et al.* Effect of an advanced glycation end product-restricted diet and exercise on metabolic parameters in adult overweight men. *Nutrition* **31**, 446–451 (2015).
442. Tantalaki, E. *et al.* Impact of dietary modification of advanced glycation end products (AGEs) on the hormonal and metabolic profile of women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hormones (Athens)* **13**, 65–73 (2014).
443. Pino, A. D. *et al.* Low advanced glycation end product diet improves the lipid and inflammatory profiles of prediabetic subjects. *Journal of Clinical Lipidology* **10**, 1098–1108 (2016).
444. Harcourt, B. E. *et al.* Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity. *Kidney International* **80**, 190–198 (2011).
445. Luévano-Contreras, C., Garay-Sevilla, M. E., Wrobel, K., Malacara, J. M. & Wrobel, K. Dietary advanced glycation end products restriction diminishes inflammation markers and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **52**, 22–26 (2013).
446. Baye, E. *et al.* Effect of dietary advanced glycation end products on inflammation and cardiovascular risks in healthy overweight adults: a randomised crossover trial. *Sci Rep* **7**, 4123 (2017).
447. de Courten, B. *et al.* Diet low in advanced glycation end products increases insulin sensitivity in healthy overweight individuals: a double-blind, randomized, crossover trial. *Am J Clin Nutr* **103**, 1426–1433 (2016).
448. Poulsen, M. W. *et al.* Effect of dietary advanced glycation end products on postprandial appetite, inflammation, and endothelial activation in healthy overweight individuals. *Eur J Nutr* **53**, 661–672 (2014).
449. Zhang, Q., Wang, Y. & Fu, L. Dietary advanced glycation end-products: Perspectives linking food processing with health implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **19**, 2559–2587 (2020).
450. Kim, Y., Keogh, J. B. & Clifton, P. M. Effects of Two Different Dietary Patterns on Inflammatory Markers, Advanced Glycation End Products and Lipids in Subjects without Type 2 Diabetes: A Randomised Crossover Study. *Nutrients* **9**, 336 (2017).
451. Borg, D. J. *et al.* Perinatal exposure to high dietary advanced glycation end products in transgenic NOD8.3 mice leads to pancreatic beta cell dysfunction. *Islets* **10**, 10–24 (2018).
452. Lubitz, I. *et al.* High dietary advanced glycation end products are associated with poorer spatial learning and accelerated A $\beta$  deposition in an Alzheimer mouse model. *Aging Cell* **15**, 309–316 (2016).
453. Yeh, W.-J., Yang, H.-Y., Pai, M.-H., Wu, C.-H. & Chen, J.-R. Long-term administration of advanced glycation end-product stimulates the activation of NLRP3 inflammasome and sparking the development of renal injury. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **39**, 68–76 (2017).
454. Chen, K., Zheng, X., Feng, M., Li, D. & Zhang, H. Gut Microbiota-Dependent Metabolite Trimethylamine N-Oxide Contributes to Cardiac Dysfunction in Western Diet-Induced Obese Mice. *Front Physiol* **8**, 139 (2017).



455. Hofmann, S. M. *et al.* Improved Insulin Sensitivity Is Associated With Restricted Intake of Dietary Glycoxidation Products in the db/db Mouse. *Diabetes* **51**, 2082–2089 (2002).
456. Guan, S.-S. *et al.* The pathological role of advanced glycation end products-downregulated heat shock protein 60 in islet  $\beta$ -cell hypertrophy and dysfunction. *Oncotarget* **7**, 23072–23087 (2016).
457. Nogueira Silva Lima, M. T., Howsam, M., Anton, P. M., Delayre-Orthez, C. & Tessier, F. J. Effect of Advanced Glycation End-Products and Excessive Calorie Intake on Diet-Induced Chronic Low-Grade Inflammation Biomarkers in Murine Models. *Nutrients* **13**, 3091 (2021).
458. Peppia, M. & Mavroeidi, I. Experimental Animal Studies Support the Role of Dietary Advanced Glycation End Products in Health and Disease. *Nutrients* **13**, 3467 (2021).
459. Thornton, K. *et al.* Dietary Advanced Glycation End Products (AGEs) could alter ovarian function in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* **510**, 110826 (2020).
460. Sowndhar Rajan, B. *et al.* Diet with high content of advanced glycation end products induces systemic inflammation and weight gain in experimental mice: Protective role of curcumin and gallic acid. *Food and Chemical Toxicology* **114**, 237–245 (2018).
461. Coughlan, M. T. *et al.* Advanced glycation end products are direct modulators of  $\beta$ -cell function. *Diabetes* **60**, 2523–2532 (2011).
462. Illien-Jünger, S. *et al.* Dietary Advanced Glycation End Products Have Sex- and Age-Dependent Effects on Vertebral Bone Microstructure and Mechanical Function in Mice. *Journal of Bone and Mineral Research* **33**, 437–448 (2018).
463. Peppia, M. *et al.* Fetal or Neonatal Low-Glycotoxin Environment Prevents Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Diabetes* **52**, 1441–1448 (2003).
464. Peppia, M. *et al.* Adverse Effects of Dietary Glycotoxins on Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. *Diabetes* **52**, 2805–2813 (2003).
465. Zheng, F. *et al.* Prevention of diabetic nephropathy in mice by a diet low in glycoxidation products. *Diabetes Metab Res Rev* **18**, 224–237 (2002).
466. Kandarakis, E. *et al.* Reduced ovarian glyoxalase-I activity by dietary glycotoxins and androgen excess: a causative link to polycystic ovarian syndrome. *Mol Med* **18**, 1183–1189 (2012).
467. Cai, W. *et al.* Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. *Am J Pathol* **173**, 327–336 (2008).
468. Grossin, N. *et al.* Dietary CML-enriched protein induces functional arterial aging in a RAGE-dependent manner in mice. *Mol Nutr Food Res* **59**, 927–938 (2015).
469. Nowotny, K., Schröter, D., Schreiner, M. & Grune, T. Dietary advanced glycation end products and their relevance for human health. *Ageing Research Reviews* **47**, 55–66 (2018).
470. Pellemounter, M. A. *et al.* Effects of the obese Gene Product on Body Weight Regulation in ob/ob Mice. *Science* **269**, 540–543 (1995).
471. Jawien, J. The Role of An Experimental Model of Atherosclerosis: apoE-knockout Mice in Developing New Drugs against Atherogenesis. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **13**, 2435–2439 (2012).
472. Park, L. *et al.* Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* **4**, 1025–1031 (1998).
473. Kottaisamy, C. P. D., Raj, D. S., Prasanth Kumar, V. & Sankaran, U. Experimental animal models for diabetes and its related complications—a review. *Lab Anim Res* **37**, 23 (2021).
474. Singh, V. K., Thrall, K. D. & Hauer-Jensen, M. Minipigs as models in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **11**, 1131–1134 (2016).

475. Radermacher, P. & Haouzi, P. A mouse is not a rat is not a man: species-specific metabolic responses to sepsis - a nail in the coffin of murine models for critical care research? *ICMx* **1**, 7 (2013).
476. Blais, E. M. *et al.* Reconciled rat and human metabolic networks for comparative toxicogenomics and biomarker predictions. *Nat Commun* **8**, 14250 (2017).
477. Hafizur, R. M., Momin, S. & Fatima, N. Prevention of advanced glycation end-products formation in diabetic rats through beta-cell modulation by *Aegle marmelos*. *BMC Complement Altern Med* **17**, 227 (2017).
478. Tomizawa, H., Yamazaki, M., Kunika, K., Itakura, M. & Yamashita, K. Association of elastin glycation and calcium deposit in diabetic rat aorta. *Diabetes Research and Clinical Practice* **19**, 1–8 (1993).
479. Turk, Z., Mišur, I., Turk, N. & Benko, B. Rat Tissue Collagen Modified by Advanced Glycation: Correlation with Duration of Diabetes and Glycemic Control. **37**, 813–820 (1999).
480. Soro-Paavonen, A. *et al.* Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Deficiency Attenuates the Development of Atherosclerosis in Diabetes. *Diabetes* **57**, 2461–2469 (2008).
481. Fan, J. *et al.* Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacol Ther* **0**, 104–119 (2015).
482. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim* **38**, 246–256 (2004).
483. Cai, W. *et al.* Reduced Oxidant Stress and Extended Lifespan in Mice Exposed to a Low Glycotoxin Diet. *Am J Pathol* **170**, 1893–1902 (2007).
484. Reddy, G. K. Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit achilles tendon. *Exp Diabesity Res* **5**, 143–153 (2004).
485. De Bruyne, S. *et al.* A Potential Role for Fructosamine-3-Kinase in Cataract Treatment. *Int J Mol Sci* **22**, 3841 (2021).
486. Ko, S.-Y. *et al.* The Possible Mechanism of Advanced Glycation End Products (AGEs) for Alzheimer's Disease. *PLOS ONE* **10**, e0143345 (2015).
487. Vidal, P. & Cabezas-Cerrato, J. The stable products of the non-enzymatic glycation of pig crystallins: new findings related to the pathogenesis of diabetic cataracts. *Diabetes Res* **8**, 183–187 (1988).
488. Sanchez, I., Martin, R., Ussa, F. & Fernandez-Bueno, I. The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **249**, 475–482 (2011).
489. Vasan, S., Foiles, P. & Founds, H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch Biochem Biophys* **419**, 89–96 (2003).
490. Heckler, K. & Kroll, J. Zebrafish as a Model for the Study of Microvascular Complications of Diabetes and Their Mechanisms. *Int J Mol Sci* **18**, 2002 (2017).
491. Fang, L., Liu, C. & Miller, Y. I. Zebrafish models of dyslipidemia: relevance to atherosclerosis and angiogenesis. *Translational Research* **163**, 99–108 (2014).
492. Olsen, A. S., Sarras, M. P. & Intine, R. V. Limb regeneration is impaired in an adult zebrafish model of diabetes mellitus. *Wound Repair Regen* **18**, 532–542 (2010).
493. Capiotti, K. M. *et al.* Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **171**, 58–65 (2014).

494. Li, Y., Zhao, Y., Sang, S. & Leung, T. Methylglyoxal-Induced Retinal Angiogenesis in Zebrafish Embryo: A Potential Animal Model of Neovascular Retinopathy. *Journal of Ophthalmology* **2019**, e2746735 (2019).
495. Verwilligen, R. a. F., Bussmann, J. & Eck, M. V. Zebrafish atherosclerosis: Experimental definitions and difficulties. *Atherosclerosis* **302**, 52–54 (2020).
496. Jin, S. & Cho, K.-H. Water extracts of cinnamon and clove exhibits potent inhibition of protein glycation and anti-atherosclerotic activity in vitro and in vivo hypolipidemic activity in zebrafish. *Food Chem Toxicol* **49**, 1521–1529 (2011).
497. Giacomotto, J. & Ségalat, L. High-throughput screening and small animal models, where are we? *British Journal of Pharmacology* **160**, 204–216 (2010).
498. Chaudhuri, J. *et al.* The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. *Cell Metabolism* **28**, 337–352 (2018).
499. Imler, J. L. & Hoffmann, J. A. Toll receptors in Drosophila: a family of molecules regulating development and immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**, 63–79 (2002).
500. Tsakiri, E. N. *et al.* Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces life span in Drosophila melanogaster. *Free Radical Biology and Medicine* **65**, 1155–1163 (2013).
501. Vicente Miranda, H. *et al.* Glycation potentiates  $\alpha$ -synuclein-associated neurodegeneration in synucleinopathies. *Brain* **140**, 1399–1419 (2017).
502. Liang, V. *et al.* Altered proteostasis in aging and heat shock response in C. elegans revealed by analysis of the global and de novo synthesized proteome. *Cell Mol Life Sci* **71**, 3339–3361 (2014).
503. Golegaonkar, S. *et al.* Rifampicin reduces advanced glycation end products and activates DAF-16 to increase lifespan in Caenorhabditis elegans. *Aging Cell* **14**, 463–473 (2015).
504. Chaudhuri, J. *et al.* A Caenorhabditis elegans Model Elucidates a Conserved Role for TRPA1-Nrf Signaling in Reactive  $\alpha$ -Dicarbonyl Detoxification. *Current Biology* **26**, 3014–3025 (2016).
505. Litke, R., Boulanger, É. & Fradin, C. Caenorhabditis elegans, un modèle d'étude du vieillissement. *Med Sci (Paris)* **34**, 571–579 (2018).
506. Nokin, M.-J. *et al.* Methylglyoxal, a glycolysis side-product, induces Hsp90 glycation and YAP-mediated tumor growth and metastasis. *eLife* **5**, e19375 (2016).
507. Brown, B. E., Dean, R. T. & Davies, M. J. Glycation of low-density lipoproteins by methylglyoxal and glycolaldehyde gives rise to the in vitro formation of lipid-laden cells. *Diabetologia* **48**, 361–369 (2005).
508. Kim, J. *et al.* Accumulation of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end product, increases apoptosis of lens epithelial cells both in vitro and in vivo. *Exp Mol Med* **44**, 167–175 (2012).
509. Bulteau, A.-L., Verbeke, P., Petropoulos, I., Chaffotte, A.-F. & Friguet, B. Proteasome Inhibition in Glyoxal-treated Fibroblasts and Resistance of Glycated Glucose-6-phosphate Dehydrogenase to 20 S Proteasome Degradation in Vitro \*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 45662–45668 (2001).
510. Misra, K., Banerjee, A. B., Ray, S. & Ray, M. Glyoxalase III from Escherichia coli: a single novel enzyme for the conversion of methylglyoxal into D-lactate without reduced glutathione. *Biochem J* **305 ( Pt 3)**, 999–1003 (1995).
511. Bankapalli, K. *et al.* Robust Glyoxalase activity of Hsp31, a ThiJ/DJ-1/PfpI Family Member Protein, Is Critical for Oxidative Stress Resistance in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **290**, 26491–26507 (2015).

512. Bui, T. P. N., Troise, A. D., Fogliano, V. & de Vos, W. M. Anaerobic Degradation of N-ε-Carboxymethyllysine, a Major Glycation End-Product, by Human Intestinal Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 6594–6602 (2019).
513. Taguchi, K., Fukami, K., Elias, B. C. & Brooks, C. R. Dysbiosis-Related Advanced Glycation Endproducts and Trimethylamine N-Oxide in Chronic Kidney Disease. *Toxins* **13**, 361 (2021).
514. ALJahdali, N. *et al.* Repeated Oral Exposure to Nε-Carboxymethyllysine, a Maillard Reaction Product, Alleviates Gut Microbiota Dysbiosis in Colitic Mice. *Dig Dis Sci* **62**, 3370–3384 (2017).
515. Patil, R. & Arvindkar, A. Glycation of gut proteins initiates microbial dysbiosis and can promote establishment of diabetes in experimental animals. *Microbial Pathogenesis* **152**, 104589 (2021).
516. Mao, Z. *et al.* Glycated fish protein supplementation modulated gut microbiota composition and reduced inflammation but increased accumulation of advanced glycation end products in high-fat diet fed rats. *Food Funct* **10**, 3439–3451 (2019).
517. Corzo-Martínez, M., Ávila, M., Moreno, F. J., Requena, T. & Villamiel, M. Effect of milk protein glycation and gastrointestinal digestion on the growth of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **153**, 420–427 (2012).
518. Fu, M. X. *et al.* The advanced glycation end product, Nεpsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* **271**, 9982–9986 (1996).
519. Ejtahed, H.-S., Angoorani, P., Asghari, G., Mirmiran, P. & Azizi, F. Dietary Advanced Glycation End Products and Risk of Chronic Kidney Disease. *J Ren Nutr* **26**, 308–314 (2016).
520. Stevens, A. The contribution of glycation to cataract formation in diabetes. *J Am Optom Assoc* **69**, 519–530 (1998).
521. Ishibashi, T. *et al.* Advanced glycation end products in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* **116**, 1629–1632 (1998).
522. Fournet, M., Bonté, F. & Desmoulière, A. Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. *Aging and disease* **9**, 880 (2018).
523. Egaña-Gorroño, L. *et al.* Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Diabetes and Cardiovascular Disease: Insights From Human Subjects and Animal Models. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **7**, (2020).
524. Horiuchi, S. *et al.* Pathological Roles of Advanced Glycation End Product Receptors SR-A and CD36. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043**, 671–675 (2005).
525. Xu, S. *et al.* CML/CD36 accelerates atherosclerotic progression via inhibiting foam cell migration. *Biomed Pharmacother* **97**, 1020–1031 (2018).
526. Shaye, D. D. & Greenwald, I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One* **6**, e20085 (2011).
527. Morcos, M. *et al.* Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **7**, 260–269 (2008).
528. van Dongen, K. C. W. *et al.* Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) increase their concentration in plasma and tissues, result in inflammation and modulate gut microbial composition in mice; evidence for reversibility. *Food Research International* **147**, 110547 (2021).

529. Chuyen, N. v, Arai, H., Nakanishi, T. & Utsunomiya, N. Are Food Advanced Glycation End Products Toxic in Biological Systems? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043**, 467–473 (2005).
530. Rupa, P. & Mine, Y. Comparison of Glycated Ovalbumin–Monosaccharides in the Attenuation of Ovalbumin-Induced Allergic Response in a BALB/C Mouse Model. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 8138–8148 (2019).
531. Oh, N. S. *et al.* Glycated milk protein fermented with *Lactobacillus rhamnosus* ameliorates the cognitive health of mice under mild-stress condition. *Gut Microbes* **11**, 1643–1661 (2020).
532. Shimizu, M. Food-derived peptides and intestinal functions. *BioFactors* **21**, 43–47 (2004).
533. Miller, A. & Jedrzejczak, W. W. [Albumin--biological functions and clinical significance]. *Postepy Hig Med Dosw* **55**, 17–36 (2001).
534. Dubois, C. *et al.* Exposure of *Caenorhabditis elegans* to Dietary Nε-Carboxymethyllysine Emphasizes Endocytosis as a New Route for Intestinal Absorption of Advanced Glycation End Products. *Nutrients* **13**, 4398 (2021).
535. Miersch, C. & Döring, F. Sex Differences in Carbohydrate Metabolism Are Linked to Gene Expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* **7**, e44748 (2012).
536. Garay-Sevilla, M. E. *et al.* The potential role of dietary advanced glycation endproducts in the development of chronic non-infectious diseases: a narrative review. *Nutr Res Rev* **33**, 298–311 (2020).
537. Monnier, V. M., Sell, D. R. & Genuth, S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. *Ann N Y Acad Sci* **1043**, 567–581 (2005).
538. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
539. Schlotterer, A. *et al.* *C. elegans* as Model for the Study of High Glucose– Mediated Life Span Reduction. *Diabetes* **58**, 2450–2456 (2009).
540. Spanier, B. Transcriptional and functional regulation of the intestinal peptide transporter PEPT1. *The Journal of Physiology* **592**, 871–879 (2014).
541. Nowotny, K., Schröter, D., Schreiner, M. & Grune, T. Dietary advanced glycation end products and their relevance for human health. *Ageing Res Rev* **47**, 55–66 (2018).
542. Thornalley, P. J. Endogenous alpha-oxoaldehydes and formation of protein and nucleotide advanced glycation endproducts in tissue damage. *Novartis Found Symp* **285**, 229–243; discussion 243-246 (2007).
543. Zimmer, K.-P., de Laffolie, J., Barone, M. V. & Naim, H. Y. Endocytosis in enterocytes. *Wien Med Wochenschr* **166**, 205–210 (2016).
544. Estey, T., Kang, J., Schwendeman, S. P. & Carpenter, J. F. BSA degradation under acidic conditions: a model for protein instability during release from PLGA delivery systems. *J Pharm Sci* **95**, 1626–1639 (2006).
545. Lai, S., Pangilinan, K., Sanjabi, K. & Savic, D. Starvation of adult *Caenorhabditis elegans* and its effect on health and reproduction. *The Expedition* **3**, (2013).
546. Amrit, F. R. G. *et al.* The longevity-promoting factor, TCER-1, widely represses stress resistance and innate immunity. *Nat Commun* **10**, 3042 (2019).
547. Kang, C., You, Y. & Avery, L. Dual roles of autophagy in the survival of *Caenorhabditis elegans* during starvation. *Genes Dev.* **21**, 2161–2171 (2007).
548. Clague, M. J. & Urbé, S. Ubiquitin: Same Molecule, Different Degradation Pathways. *Cell* **143**, 682–685 (2010).

549. Dubois, C. *et al.* Differential modification of the *C. elegans* proteome in response to acute and chronic gamma radiation: Link with reproduction decline. *Science of The Total Environment* **676**, 767–781 (2019).
550. van der Lugt, T., Opperhuizen, A., Bast, A. & Vrolijk, M. F. Dietary Advanced Glycation Endproducts and the Gastrointestinal Tract. *Nutrients* **12**, 2814 (2020).
551. López-Hernández, T., Haucke, V. & Maritzen, T. Endocytosis in the adaptation to cellular stress. *Cell Stress* **4**, 230–247 (2020).
552. Lundquist, P. & Artursson, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Adv Drug Deliv Rev* **106**, 256–276 (2016).
553. Lee, S.-J., Murphy, C. T. & Kenyon, C. Glucose Shortens the Life Span of *C. elegans* by Downregulating DAF-16/FOXO Activity and Aquaporin Gene Expression. *Cell Metabolism* **10**, 379–391 (2009).
554. Tauffenberger, A., Vaccaro, A., Aulas, A., Velde, C. V. & Parker, J. A. Glucose delays age-dependent proteotoxicity. *Aging Cell* **11**, 856–866 (2012).
555. Schulz, T. J. *et al.* Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metabolism* **6**, 280–293 (2007).
556. Tauffenberger, A., Vaccaro, A. & Parker, J. A. Fragile lifespan expansion by dietary mitohormesis in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)* **8**, 50–57 (2016).
557. Gusarov, I. *et al.* Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress. *Nat Commun* **8**, 15868 (2017).
558. Karnieli, E. & Armoni, M. Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **295**, E38–E45 (2008).
559. Kitaoka, S., Morielli, A. D. & Zhao, F.-Q. FGT-1 is a mammalian GLUT2-like facilitative glucose transporter in *Caenorhabditis elegans* whose malfunction induces fat accumulation in intestinal cells. *PLoS One* **8**, e68475 (2013).
560. Chess, D. J. & Stanley, W. C. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovascular Research* **79**, 269–278 (2008).
561. Crescenzo, R. *et al.* The effect of high-fat-high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats. *Eur J Nutr* **54**, 183–192 (2015).
562. Voziyan, P., Brown, K. L., Chetyrkin, S. & Hudson, B. Site-specific AGE modifications in the extracellular matrix: a role for glyoxal in protein damage in diabetes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **52**, 39–45 (2014).
563. Alsamad, F. *et al.* In depth investigation of collagen non-enzymatic glycation by Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **251**, 119382 (2021).

# Annexe I

## Résultats complémentaires

### Glycation de la BSA

Pour l'analyse du supplément protéique (BSA), nous avons tout d'abord glyqué cette protéine avec un taux de glycation faible et élevé (**Tableau 1**). La BSA a été incubée avec différentes concentrations d'acide glyoxylique qui modifie les lysines en CML<sup>563</sup>. La BSA incubée sans acide glyoxylique a servi de contrôle. Le protocole de glycation décrit dans l'étude précédente a été utilisé. Les taux de CML ont été quantifiés au laboratoire par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL/SM-SM) : collaboration avec le groupe de chimie analytique dirigé par Frédéric TESSIER. Nous avons obtenu des BSA avec différents taux de lysines modifiées en CML : très peu, 16% et 52% (**Tableau 1**).

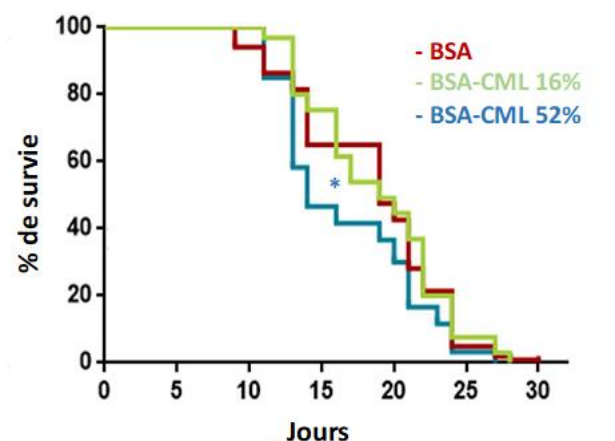
**Tableau 1** : Concentrations d'acide glyoxylique utilisées pour préparer de la BSA faiblement et fortement glyquée

Acide glyoxylique (mM)	CML (pmol/ $\mu$ g de BSA)	Taux de glycation
0	< 10	<1%
15	149	16%
60	485	52%

Nous avons comparé la longévité des vers incubés avec la BSA contrôle et les BSA présentant des taux de glycation différents. Pour cela, les vers adultes J1 synchrones de la souche sauvage N2 ont été incubés sur milieu NGM gélosé contenant 50  $\mu$ M de 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR, antimétabolite pour prévenir la croissance de la progéniture) et 0,4 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> et 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA ou BSA-CML. Les vers ont été cultivés à 20°C en triplicata à une densité d'environ 35 vers par boîte. La survie est mesurée tous les deux jours en comptant le nombre de vers vivants et morts. Pour chaque condition, 90 vers sont utilisés en moyenne. L'expérience a été répétée trois fois.

### **Impact de la BSA-CML sur la longévité des vers**

Aux deux plus faibles concentrations testées, aucune différence de longévité n'a été observée entre les différentes BSA (données non montrées). A 1,5 mg.mL<sup>-1</sup>, la BSA la plus glyquée (52%) a diminué faiblement mais significativement la longévité du ver : la médiane de survie et non le maximum de survie était diminuée (**Figure 1**).



**Figure 1** : Effet de l'ingestion de BSA-CML sur la survie de *C. elegans*.

Test de log-rank, \*p<0,05. Les données sont représentatives de 3 réplicats biologiques.

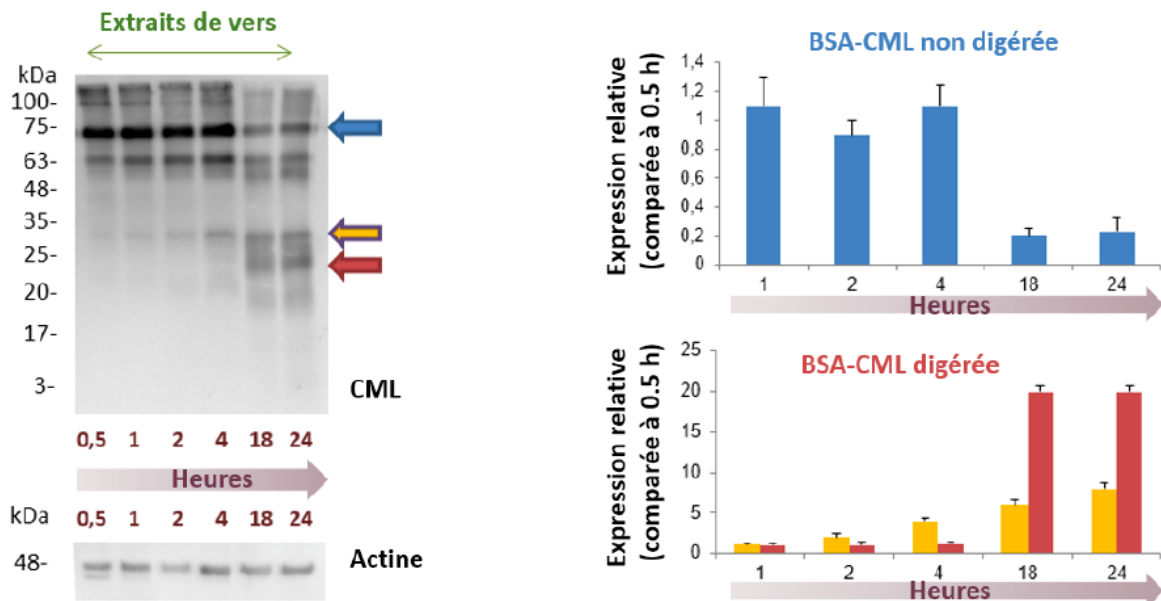
Des concentrations plus élevées de BSA ont été testées (3 mg.mL<sup>-1</sup>) mais dans ces conditions, la BSA non glyquée augmentait la longévité du ver par rapport à la condition sans BSA, compromettant l'interprétation des résultats.

### **Ingestion et digestion de la BSA-CML par les vers**

Nous avons tout d'abord vérifié l'ingestion de la BSA-CML par les vers en réalisant une cinétique sur 24h. Pour cela, environ 2500 vers adultes synchrones âgés de 1j ont été mis en culture dans du milieu liquide S contenant les bactéries inactivées à la chaleur, 50 µM de FUDR et 1,6 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA-CML 52%. Après les différents temps d'incubation, 500 vers sont prélevés et lysés comme nous l'avons décrit dans l'étude précédente. Les lysats ont été séparés par SDS-PAGE et détectés en western blot avec un anticorps anti-CML (Abcam ab27684) et un anticorps anti-actine (Sigma Aldrich Chimie SARL A2066). La BSA glyquée est très rapidement ingérée par le ver (dès 30min) et elle commence à être digérée par le ver après 4h d'incubation (**Figure 2**), des fragments de digestion commencent à être détectés alors que la quantité de protéine non digérée détectée

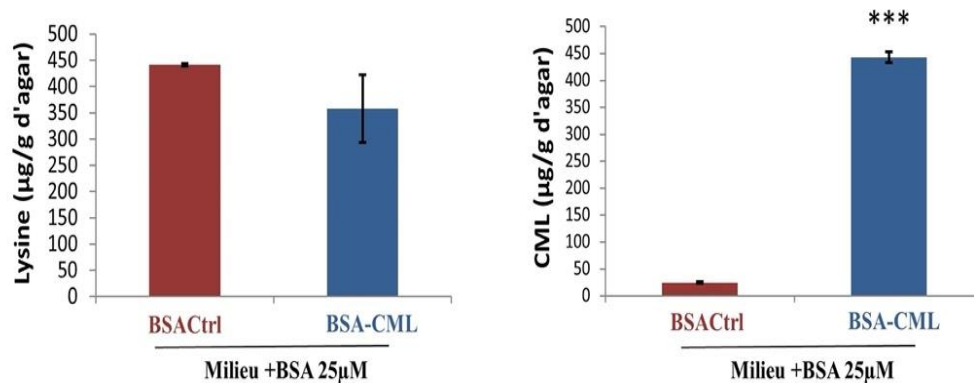


diminue après 18h d'incubation. Ces résultats montrent la digestion de la protéine glyquée par les vers.



**Figure 2 :** Cinétique de la digestion de la BSA-CML glyquée à 52% par le ver. La souche *C. elegans* N2 a été cultivée à 20°C sur milieu NGM en présence de BSA-CML glyquée à 52% durant 30 minutes et 1, 2, 4, 18 et 24 heures. Les épitopes CML ont été analysés par western blot. Des épitopes CML (flèches) ont été quantifiés en utilisant le logiciel ImageJ et les résultats sont exprimés en expression relative par rapport aux vers incubés 30 minutes (histogrammes à droite). Les résultats ont été normalisés avec l'actine. Les résultats de cette figure sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Les vers incubés 24h dans les mêmes conditions expérimentales avec 1,6 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA non glyquée ou de BSA glyquée (52%), puis lavés plusieurs fois en tampon M9, ont été traités pour analyse LC/MS:MS : hydrolyse acide puis reprise avec de l'acide nonafluoropentanoïque. Les surnageants des différents lavages ont été récupérés et analysés en LC/MS-MS (**Figure 3**).



**Figure 3 :** Dosage de la lysine et la CML dans les milieux de culture gélosés supplémentés en BSA Ctrl ou BSA-CML. Les résultats de cette figure sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. \*\*\*  $p < 0.001$  (tests de Fisher et de Student).

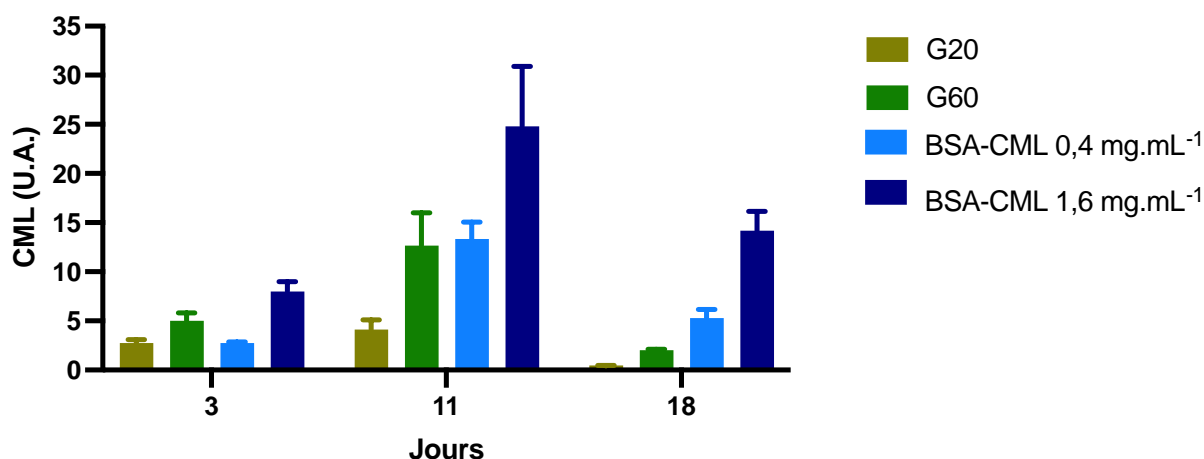
La figure 3 montre qu'il n'y a aucune différence de teneur en lysine entre les 2 échantillons. La teneur en CML est très faible lorsque les vers n'ont pas été exposés aux produits de glycation dans le milieu de culture. On observe une différence statistiquement significative de concentration en CML dans les vers entre les conditions de culture avec ou sans CML (BSA Ctrl et BSA-CML). Il y a environ 35 fois plus de CML dans les vers qui ont été cultivés 24 heures dans les milieux contenant de la BSA-CML que dans les vers cultivés dans les milieux sans CML ajoutée (BSA Ctrl).

### **Quantité relative d'épitopes CML détectés dans les lysats de vers incubés avec les bactéries ou la BSA glyquées**

Les mêmes conditions de culture que l'étude présentée précédemment ont été utilisées pour analyser la BSA-CML.

Nous avons réalisé quelques études comparatives entre les protéines alimentaires glyquées (bactéries) et le supplément protéique (BSA) glyqué. Nous avons tout d'abord comparé les quantités de CML ingérée dans les vers après incubation 4, 11 et 18 jours dans le milieu S en présence de bactéries ou de BSA glyquées. La quantité relative d'épitopes CML détectés a été réalisée en dot blot comme décrit dans l'étude précédente. Une plus grande quantité d'épitopes CML sont détectés dans les vers incubés avec la BSA-CML (**Figure 4**). La quantité relative de ces épitopes diminue avec le temps d'incubation. Des mesures analytiques seront bien sûr nécessaires et sont envisagées pour pouvoir mieux comparer les conditions de culture avec protéines alimentaires glyquées vs

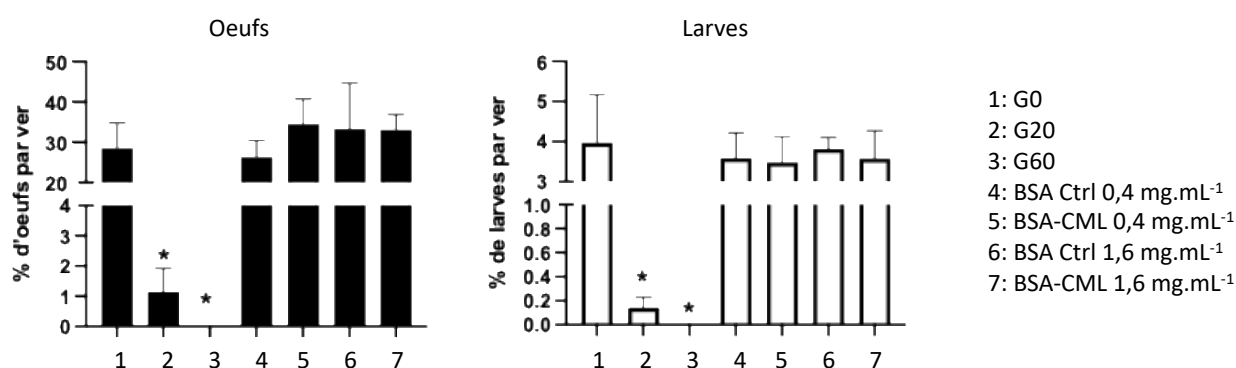
supplément protéique glyqué. Ces analyses permettront également de pouvoir mesurer la CML libre afin d'analyser la quantité de CML véritablement absorbée par le ver.



**Figure 4 :** Quantification, par dot blot, des épitopes CML de lysats de vers nourris 4, 11 et 18 jours avec des bactéries glyquées, avec 20 mM (G20) ou 60 mM (G60) d'acide glyoxylique, ou de la BSA glyquée (BSA-CML) avec 60 mM d'acide glyoxylique ont été détectés avec des anticorps anti-CML et anti-actine. Les épitopes de CML et d'actine ont été quantifiés avec le logiciel ImageJ et la quantification relative des épitopes CML a été normalisée par rapport à l'actine. Les données sont exprimées en unités arbitraires (U.A.) et présentées comme les moyennes  $\pm$  l'écart-type de 3 répétitions biologiques.

### Effets de la BSA-CML sur la reproduction des vers

Le défaut de reproduction observé chez les vers incubés avec les bactéries glyquées n'a pas été retrouvé lorsque ces derniers ont été incubés avec la BSA-CML (**Figure 5**). Ces résultats montrent que la CML alimentaire, n'est pas une cause directe de ce défaut de reproduction.



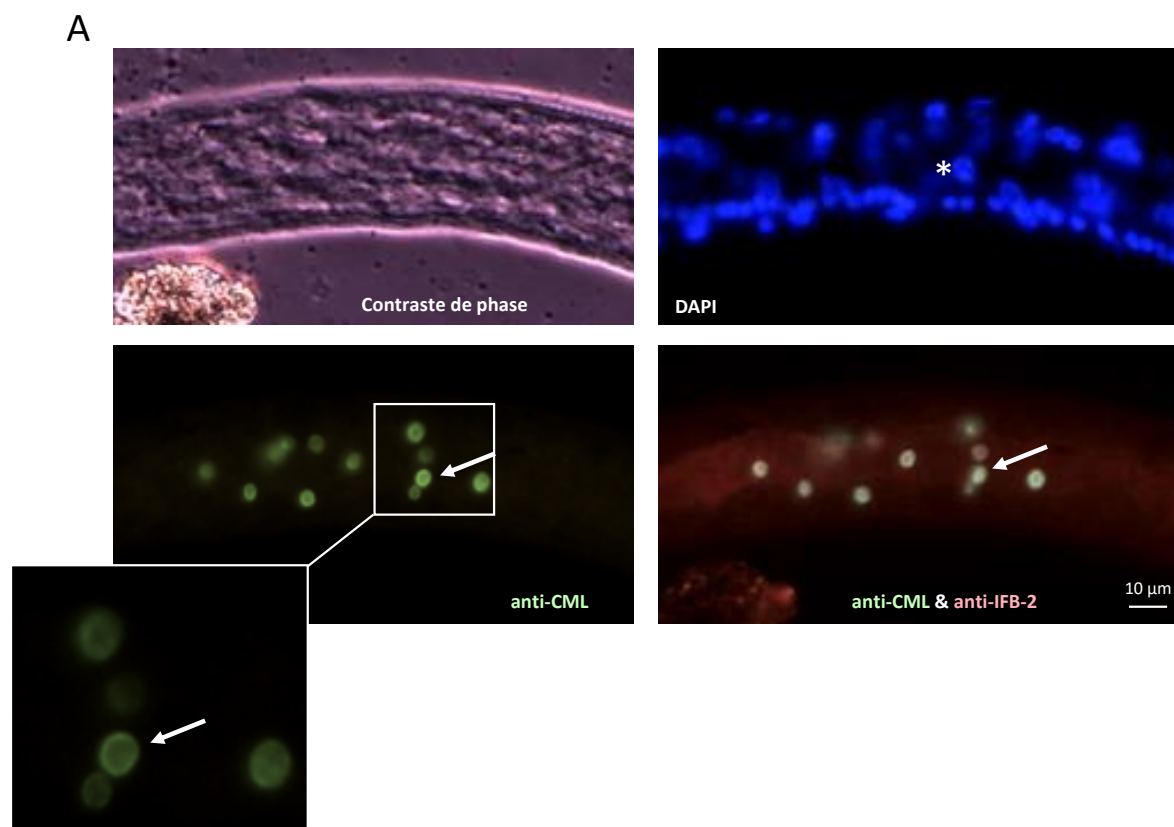
**Figure 5 :** Les vers jeunes adultes ont été nourris avec des bactéries, qui ont été prétraitées avec 0 mM (1), 20 mM (2) ou 60 mM (3) d'acide glyoxylique, ou de la BSA, glyquée avec 0 mM (BSA-Ctrl) ou 60 mM (BSA-CML), dans un milieu contenant de la 5-fluoro-2'-désoxyuridine (FUdR). Après 24 h d'incubation, les vers ont été cultivés pendant

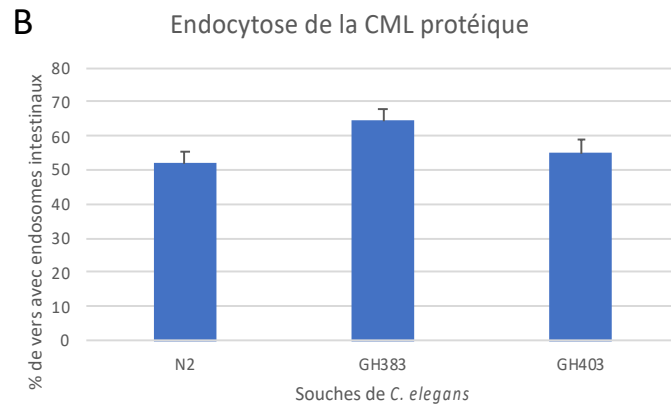
2 jours dans les mêmes conditions sans FUdR. Le pourcentage d'œufs et de larves par ver présents dans les milieux a été déterminé. Les données sont des moyennes  $\pm$  l'écart-type de 3 répétitions biologiques.

\*  $p \leq 0,05$  G20 ou G60 vs. G0 (test de Mann-Whitney).

### Analyse de l'endocytose de la CML alimentaire chez les mutants *glo-3*

La protéine GLO-3, dont la fonction n'est pas connue, participe à la formation des organites liés au lysosome (LRO, *lysosome-related organelles*) intestinaux qui sont localisés dans les entérocytes. Ces organites sont les granules autofluorescentes et biréfringentes qui permettent, entre autres, le stockage de graisse. Les mutants *glo-3* ont peu de LRO et ont des défauts de pinocytose, qui est une endocytose non sélective. Nous avons incubé les mutants *glo-3* et la souche sauvage avec la BSA-CML et la BSA non glyquée (même condition d'incubation que dans l'étude précédente). Après détection immunohistochimique avec l'anticorps anti-CML, nous avons observé la présence d'endosomes contenant des épitopes CML chez la souche sauvage et les 2 mutants *glo-3*. Le même pourcentage de vers contenait des endosomes avec la CML alimentaire (**Figures 7 et 8**). Ces résultats confortent notre hypothèse d'endocytose de la CML *via* un récepteur.



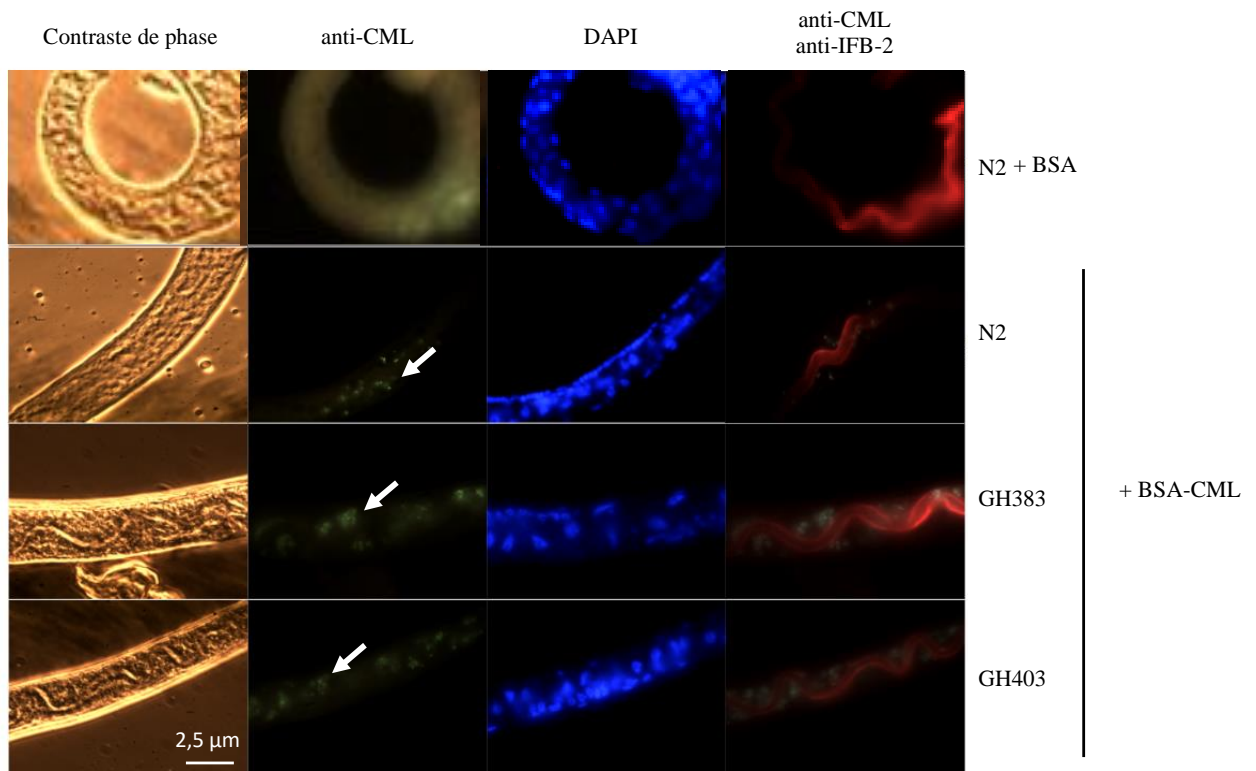


**Figure 7 :** Analyse immunohistochimique de la souche N2 de *C. elegans* incubée avec de la BSA-CML et détermination de la capacité des mutants *glo-3* (GH383 et GH403) à endocyter la BSA-CML par rapport à la souche sauvage N2.

A : la flèche montre un endosome contenant des épitopes CML. L'encadré montre un zoom de la photo prise avec le filtre vert pour montrer les endosomes. Le cortex apical de l'intestin du ver est visible (fluorescence rouge suite à la reconnaissance des épitopes IFB-2) sur la photo prise avec les filtres vert et rouge. Les endosomes avec la CML entourent le cortex apical. Les noyaux du ver, marqués au DAPI et visibles avec le filtre bleu, sont visibles dont un noyau intestinal (étoile).

B : Le pourcentage de vers ayant des endosomes contenant de la BSA-CML a été déterminé pour les 3 souches.

Les données sont représentatives de 3 réplicats biologiques.

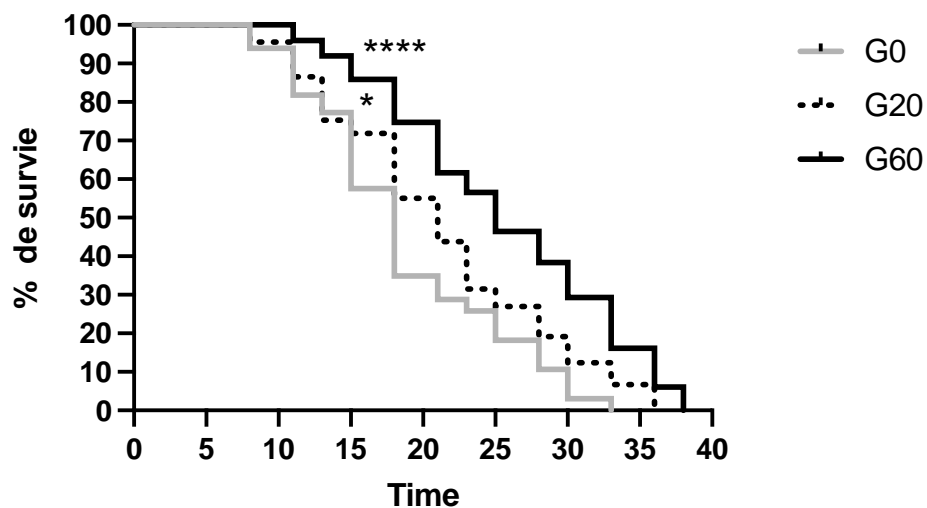


**Figure 12 :** Analyse immunohistochimique des souches N2 et mutantes *glo-3* (GH383 et GH403) de *C. elegans* incubées avec de la BSA-CML. Les images sont représentatives de 3 réplicats biologiques.

Le contrôle négatif (contrôle de spécificité de l'anticorps anti-CML) est la souche N2 incubé avec de la BSA non glyquée. La flèche montre les endosomes intestinaux contenant des épitopes CML (photos prises avec le filtre vert). Le cortex apical de l'intestin du ver est visible (fluorescence rouge suite à la reconnaissance des épitopes IFB-2) sur la photo prise avec les filtres vert et rouge. Les endosomes avec la CML entourent le cortex apical. Les noyaux du ver, marqués au DAPI et visibles avec le filtre bleu, sont visibles.

### Longévité des vers incubés avec les bactéries glyquées

Compte tenu des résultats obtenus sur la reproduction des vers avec les bactéries glyquées, nous étions intéressés de connaître leurs effets sur la longévité et de le comparer à celui de la BSA-CML qui a aucun effet sur la reproduction des vers. Les vers nourris avec les bactéries glyquées ont une longévité augmentée (**Figure 6**). Ce résultat peut paraître étrange quant à l'hypothèse de notre travail mais les défauts de reproduction induisent une augmentation de la longévité. Des analyses complémentaires seront indispensables pour caractériser les modifications nutritionnelles induites par la glycation.



**Figure 6** : Courbe de longévité des vers nourris avec des bactériesprétraitées avec 0 mM (G0), 20 mM (G20) ou 60 mM (G60) d'acide glyoxylique. Pour cela, les vers adultes J1 synchrones de la souche sauvage N2 ont été incubés en milieu liquide contenant 50 $\mu$ M de FUdR. Pour chaque condition, les vers ont été cultivés à 20°C dans 10 puits d'une plaque 96 puits à une densité d'environ 10 vers par puits. La survie est mesurée tous les deux-trois jours en comptant le nombre de vers vivants et morts. Pour chaque condition, 90 vers sont utilisés en moyenne. L'expérience a été répétée trois fois.

Test de log-rank, \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0005$

# Annexe II

## Article original collaboratif et revues

### Revue sans comité de lecture :

- **C. Dubois**, E. Schorter, E. Boulanger, F. J. Tessier, C. Fradin. non-RAGE AGE receptors: friends or foes? - Focus on CD36 and DDOST 48 kDa subunit, IMARS Highlights, 2021

### Article et revue à comité de lecture :

- C. Moretton, C. Gouttefangeas, **C. Dubois**, F. J. Tessier, C. Fradin, E. Prost-Camus, M. Prost, M. Haumont, H. Nigay, Investigation of the antioxidant capacity of caramels: combination of laboratory assays and *C. elegans* model, Journal of Functional Foods, 2021

- **C. Dubois**, C. Fradin, E. Boulanger, Axe AGE-RAGE : conséquences physiopathologiques et *inflammaging*, Médecine des maladies métaboliques, 2019



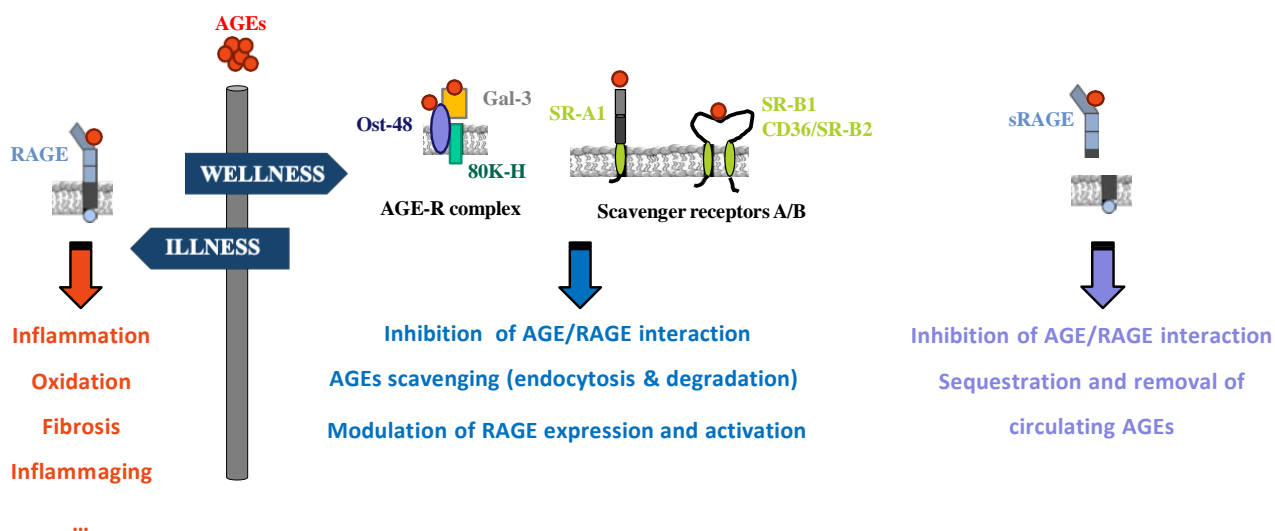
## non-RAGE AGE receptors: friends or foes? - Focus on CD36 and DDOST 48 kDa subunit -

*Constance Dubois, Etienne Schorter, Eric Boulanger, Frédéric J Tessier  
 and Chantal Fradin*

*Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs  
 de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000  
 Lille, France*

Email : [chantal.fradin@univ-lille.fr](mailto:chantal.fradin@univ-lille.fr)

Glycation is one of the rare protein post-translational modifications for which no human health benefit has been mentioned to date. On the other hand, various pathophysiological processes induced by this reaction have been described in numerous studies [1,2]. This pathogenicity is mainly linked to structural and functional modifications of endogenous glycated proteins and to the interaction of resulting advanced glycation end-products (AGEs) with the receptor for AGEs (RAGE), which is one of the first described AGE receptors [3].



**Figure 1: Generally accepted receptor-dependent effects of advanced glycation end-products (AGEs) on human physiology.** Activation of the receptor for AGEs (RAGE) leads to several pathophysiological effects whereas other AGE receptors and soluble RAGE (sRAGE) inhibit the AGE/RAGE axis. In a non-exhaustive manner, non-RAGE receptors include 1- the AGE-R complex composed of the dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit (Ost-48 or AGE-R1), the protein kinase C substrate (80K-H or AGE-R2) and the galectin-3 (Gal-3 or AGE-R3) and 2- the scavenger receptors (SR) including SR class A

*member 1 (SR-A1) and SR class B members 1 (SR-B1) and 2 (CD36/SR-B2). These receptors induce AGEs endocytosis and degradation and down regulate RAGE expression and activation. The soluble forms of RAGE (sRAGE) inhibit the AGE/RAGE axis by sequestering and removing circulating AGEs.*

The interaction of AGEs with RAGE induces several deleterious signaling pathways for cells and tissues which are notably involved in the pathophysiology of several pathologies such as diabetes, renal failure and chronic inflammation (Figure 1) [4–6]. The AGE-RAGE axis is also involved in vascular and physiological aging [7]. AGEs have other receptors characterized such as the scavenger receptor class B member 2 (SR-B2) or CD36 and dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase (DDOST) 48 kDa subunit (Ost-48). These receptors compete with RAGE for interaction with AGEs, thus inhibiting the AGE / RAGE axis. In addition, the interaction of AGEs with these receivers would lead to their elimination rather than the activation of deleterious signals (Figure 1) [1,8]. They would also modulate the expression of RAGE and its activation.

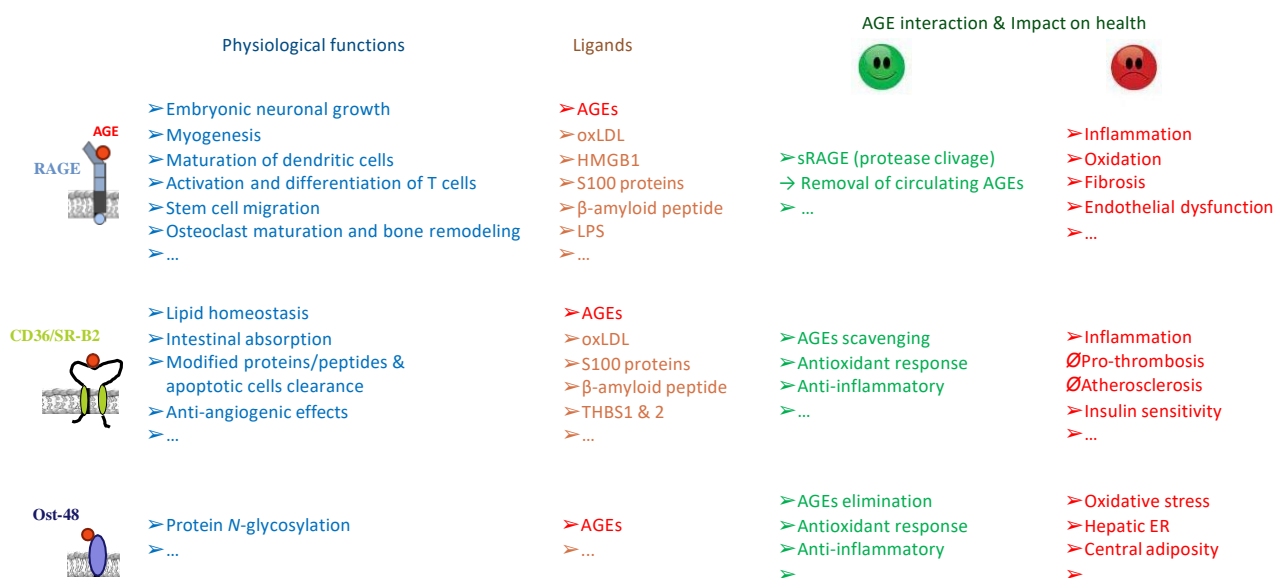
The soluble forms of RAGE (sRAGE), resulting from the alternative splicing of the AGER gene or the cleavage of membrane RAGE by metalloproteases, have also a protective role. Like other protective receptors, they inhibit the AGE / RAGE interaction and sequester and remove circulating AGEs [6]. However, the protective role of sRAGE depends on the stage of the pathology, including diabetes and cardiovascular diseases [9,10]. As with sRAGE, the detoxification of AGEs by the non-RAGE receptors is not exclusive and these receptors could participate in the pathophysiological processes of AGEs *via* distinct mechanisms.

### **AGE-CD36 interaction**

CD36 is the 2<sup>nd</sup> member of class B scavenger receptors (SR-B2) [11]. Like all scavenger receptors, it can bind a multitude of ligands including some RAGE ligands like AGEs (Figure 2). While the binding of AGEs to this receptor has been shown to induce their endocytosis and degradation [12], the interaction of CD36 with RAGE ligands such as oxidized low density lipoproteins and the  $\beta$ -amyloid peptide induce pathophysiological processes identical to those mediated by the interaction of these same ligands with RAGE, in particular the induction of sterile inflammation [13]. This mechanism involves the complexation of CD36 with 2 toll-like receptors (TLRs), TLR-4 and TLR-6, to induce microglial inflammation which could promote neurotoxicity. This is similar to the activation of some deleterious RAGE signals which depends on its interaction with TLR-4 [14].

Given the functional similarities between CD36 and RAGE, it seems unlikely that the interaction of CD36 with AGEs will result in the elimination of these ligands alone; especially since CD36 has an essential pathophysiological role in chronic kidney disease [15]. A recent study has indeed shown that the AGE / CD36 axis promotes atherosclerosis by inhibiting the migration of foam cells [16]. Other pathogenic

mechanisms dependent on CD36 had been shown in mice. Interaction of AGEs with CD36 expressed by platelets induces a pro-thrombotic state [17]. In adipocytes, activation of CD36 by AGEs induces oxidative stress and inhibits leptin expression which, *in vivo*, could exacerbate insulin sensitivity in the context of the metabolic syndrome [18]. The outcome of the AGE / CD36 axis depends very much on the organ and / or cell expressing this receptor. Although studies concerning the pathophysiological effects of AGEs *via* CD36 remain few in number, it seems essential to take this receptor into account in order to properly assess the global effects of AGEs on health.



**Figure 2: Non-exhaustive list of physiological functions, ligands and AGEs-dependent health impact of RAGE, CD36 and Ost-48 receptors [2,7,19–21].**

*oxLDL*, oxidized LDL; *HMGB1*, high mobility group box 1, *THBS*, thrombospondin; *LPS*, lipopolysaccharide; *ER*: endoplasmic reticulum.

### AGE-Ost-48 interaction

Ost-48 forms, with galectin-3 (Gal-3) and the protein kinase C substrate (80K-H), the AGE-R complex [22]. It is still unclear whether the entire complex is essential for interaction with AGEs. It seems not because individual interactions of Ost-48 and Gal-3 with AGEs have been described [8]. The presence of Ost-48 in the plasma membrane is rather unexpected as its main location within the cell is in the membrane of the endoplasmic reticulum (ER), unless 2 separate isoforms of the protein exist. In the ER, Ost-48 forms, with other molecules, the DDOST complex, a key ER membrane enzyme that initiates *N*-glycosylation of proteins (Figure 2) [23]. To our knowledge, no study has analyzed the mechanisms of expression and regulation of Ost-48 in the plasma membrane. On the other hand, the expression of this receptor in the ER membrane is undoubtedly ubiquitous because it has a key role in this organelle. In fact,

it is one of the non-catalytic subunits of the DDOST complex which, together with the DAD1 (Defender against cell death 1) subunit, is essential for the stability of the complex [24].

Despite the lack of information on its expression at the plasma membrane as a receptor for extracellular AGEs, it appears that Ost-48 has an essential role in the restoration of physiological homeostasis. This receptor induces antioxidant and anti-inflammatory mechanisms, in particular by inhibiting the expression and activation of RAGE, and it promotes endocytosis and therefore the degradation of AGEs [25–28]. However, few studies have shown that Ost-48 is not always effective in eliminating AGEs and that it can induce pathological processes, in particular in the liver [29,30].

It is difficult to accurately interpret all the studies made with Ost-48, in particular those using organisms or cells in which the expression of its gene is overexpressed or silenced. Indeed, the inhibition and overexpression of Ost-48 encoding gene are expected to significantly modulate glycosylation of proteins, leading, among other things, to the loss of ER homeostasis. Pathophysiological consequences, such as ER stress, may result and impact the interpretation of studies in which OST-48 modulation is genetically induced [25–30]. Further studies are essential to better understand the role of Ost-48 as AGE receptor because its role can be decisive in pathologies linked to AGEs.

## Conclusion

While the activation of RAGE by AGEs has been the subject of numerous studies, less literature concerns the interaction of AGEs with other AGE receptors. For some of them, additional analyzes, in particular on their expression in the plasma membrane as well as the regulation of this expression and their possible complexation with other molecules, are necessary to better define the exact role of these receptors in the pathophysiology induced by AGEs. For others, like scavenger receptors, their role is definitely broader than the elimination of AGEs. The example of CD36 is very interesting because it presents certain similarities (ligands and activation mechanisms *via* TLRs) with RAGE. This is not so surprising because RAGE, like CD36, is classified as a scavenger receptor, more precisely a member of the J family [11]. It is essential to consider the different AGE receptors to better characterized the pathophysiological effects of AGEs and to highlight their distinct or synergistic roles in those mechanisms.

## References

1. Zhang, Q.; Wang, Y.; Fu, L. Dietary Advanced Glycation End-Products: Perspectives Linking Food Processing with Health Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2020**, *19*, 2559–2587, doi:10.1111/1541-4337.12593.
2. Frimat, M.; Daroux, M.; Litke, R.; Nevière, R.; Tessier, F.J.; Boulanger, E. Kidney, Heart and Brain: Three Organs Targeted by Ageing and Glycation. *Clinical Science* **2017**, *131*, 1069–1092, doi:10.1042/CS20160823.
3. Neeper, M.; Schmidt, A.-M.; Brett, J.; Yan, S.D.; Elliston, K.; Stern, D.; Shaw, A. Cloning and Expression of a Cell Surface Receptor for Advanced Glycosylation End Products of Proteins. *The Journal of biological chemistry* **267**, 14998–15004.
4. Dubois, C.; Fradin, C.; Boulanger, É. Axe AGE-RAGE: Conséquences Physiopathologiques et Inflammaging. *Médecine des Maladies Métaboliques* **2019**, *13*, 595–601, doi:10.1016/S1957-2557(19)30182-8.
5. Barbezier, N.; Tessier, F.J.; Chango, A. Receptor of Advanced Glycation Endproducts RAGE/AGER: An Integrative View for Clinical Applications. *Annales de Biologie Clinique* **2014**, *72*, 669–680, doi:10.1684/abc.2014.1010.
6. Egaña-Gorroño, L.; López-Díez, R.; Yepuri, G.; Ramirez, L.S.; Reverdatto, S.; Gugger, P.F.; Shekhtman, A.; Ramasamy, R.; Schmidt, A.M. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Diabetes and Cardiovascular Disease: Insights From Human Subjects and Animal Models. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **2020**, *7*, 37, doi:10.3389/fcvm.2020.00037.
7. Frimat, M.; Teissier, T.; Boulanger, E. Is RAGE the Receptor for Inflammaging? *Aging (Albany NY)* **2019**, *11*, 6620–6621, doi:10.18632/aging.102256.
8. Ott, C.; Jacobs, K.; Haucke, E.; Navarrete Santos, A.; Grune, T.; Simm, A. Role of Advanced Glycation End Products in Cellular Signaling. *Redox Biology* **2014**, *2*, 411–429, doi:10.1016/j.redox.2013.12.016.
9. Heier, M.; Margeirsdottir, H.D.; Gaarder, M.; Stensæth, K.H.; Brunborg, C.; Torjesen, P.A.; Seljeflot, I.; Hanssen, K.F.; Dahl-Jørgensen, K. Soluble RAGE and Atherosclerosis in Youth with Type 1 Diabetes: A 5-Year Follow-up Study. *Cardiovascular Diabetology* **2015**, *14*, 126, doi:10.1186/s12933-015-0292-2.
10. Reichert, S.; Triebert, U.; Santos, A.N.; Hofmann, B.; Schaller, H.-G.; Schlitt, A.; Schulz, S. Soluble Form of Receptor for Advanced Glycation End Products and Incidence of New Cardiovascular Events among Patients with Cardiovascular Disease. *Atherosclerosis* **2017**, *266*, 234–239, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.015.
11. PrabhuDas, M.R.; Baldwin, C.L.; Bollyky, P.L.; Bowdish, D.M.E.; Drickamer, K.; Febbraio, M.; Herz, J.; Kobzik, L.; Krieger, M.; Loike, J.; et al. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol* **2017**, *198*, 3775–3789, doi:10.4049/jimmunol.1700373.
12. Ohgami, N.; Nagai, R.; Ikemoto, M.; Arai, H.; Miyazaki, A.; Hakamata, H.; Horiuchi, S.; Nakayama, H. CD36, Serves as a Receptor for Advanced Glycation Endproducts (AGE). *Journal of Diabetes and its Complications* **2002**, *16*, 56–59, doi:10.1016/S1056-8727(01)00208-2.
13. Stewart, C.R.; Stuart, L.M.; Wilkinson, K.; van Gils, J.M.; Deng, J.; Halle, A.;



- Rayner, K.J.; Boyer, L.; Zhong, R.; Frazier, W.A.; et al. CD36 Ligands Promote Sterile Inflammation through Assembly of a Toll-like Receptor 4 and 6 Heterodimer. *Nature Immunology* **2010**, *11*, 155–161, doi:10.1038/ni.1836.
14. Zhong, H.; Li, X.; Zhou, S.; Jiang, P.; Liu, X.; Ouyang, M.; Nie, Y.; Chen, X.; Zhang, L.; Liu, Y.; et al. Interplay between RAGE and TLR4 Regulates HMGB1-Induced Inflammation by Promoting Cell Surface Expression of RAGE and TLR4. *J. Immunol.* **2020**, ji1900860, doi:10.4049/jimmunol.1900860.
  15. Yang, X.; Okamura, D.M.; Lu, X.; Chen, Y.; Moorhead, J.; Varghese, Z.; Ruan, X.Z. CD36 in Chronic Kidney Disease: Novel Insights and Therapeutic Opportunities. *Nature Reviews Nephrology* **2017**, *13*, 769–781, doi:10.1038/nrneph.2017.126.
  16. Xu, S.; Li, L.; Yan, J.; Ye, F.; Shao, C.; Sun, Z.; Bao, Z.; Dai, Z.; Zhu, J.; Jing, L.; et al. CML/CD36 Accelerates Atherosclerotic Progression via Inhibiting Foam Cell Migration. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *97*, 1020–1031, doi:10.1016/j.biopha.2017.11.041.
  17. Zhu, W.; Li, W.; Silverstein, R.L. Advanced Glycation End Products Induce a Prothrombotic Phenotype in Mice via Interaction with Platelet CD36. *Blood* **2012**, *119*, 6136–6144, doi:10.1182/blood-2011-10-387506.
  18. Horiuchi, S.; Unno, Y.; Usui, H.; Shikata, K.; Takaki, K.; Koito, W.; Sakamoto, Y.I.; Nagai, R.; Makino, K.; Sasao, A.; et al. Pathological roles of advanced glycation end product receptors SR-A and CD36. In *The Maillard reaction: chemistry at the interface of nutrition, aging, and disease*; New York Academy of Sciences: New York, 2005; pp. 671–675 ISBN 1-57331-531-1.
  19. Zhou, Z.; Immel, D.; Xi, C.-X.; Bierhaus, A.; Feng, X.; Mei, L.; Nawroth, P.; Stern, D.M.; Xiong, W.-C. Regulation of Osteoclast Function and Bone Mass by RAGE. *J Exp Med* **2006**, *203*, 1067–1080, doi:10.1084/jem.20051947.
  20. Roboti, P.; High, S. The Oligosaccharyltransferase Subunits OST48, DAD1 and KCP2 Function as Ubiquitous and Selective Modulators of Mammalian N-Glycosylation. *Journal of Cell Science* **2012**, *125*, 3474–3484, doi:10.1242/jcs.103952.
  21. Silverstein, R.L.; Febbraio, M. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Sci Signal* **2009**, *2*, re3–re3, doi:10.1126/scisignal.272re3.
  22. Vlassara, H.; Li, Y.M.; Imani, F.; Wojciechowicz, D.; Yang, Z.; Liu, F.T.; Cerami, A. Identification of Galectin-3 as a High-Affinity Binding Protein for Advanced Glycation End Products (AGE): A New Member of the AGE-Receptor Complex. *Mol Med* **1995**, *1*, 634–646.
  23. Breitling, J.; Aebi, M. N-Linked Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, a013359–a013359, doi:10.1101/cshperspect.a013359.
  24. Wild, R.; Kowal, J.; Eyring, J.; Ngwa, E.M.; Aebi, M.; Locher, K. Structure of the Yeast Oligosaccharyltransferase Complex Gives Insight into Eukaryotic N-Glycosylation. *Science (New York, N.Y.)* **359**, 545–550, doi:https://doi.org/10.1126/science.aar5140.
  25. Torreggiani, M.; Liu, H.; Wu, J.; Zheng, F.; Cai, W.; Striker, G.; Vlassara, H. Advanced Glycation End Product Receptor-1 Transgenic Mice Are Resistant to Inflammation, Oxidative Stress, and Post-Injury Intimal Hyperplasia. *Am J Pathol* **2009**, *175*, 1722–1732, doi:10.2353/ajpath.2009.090138.

26. Lu, C.; He, J.C.; Cai, W.; Liu, H.; Zhu, L.; Vlassara, H. Advanced Glycation Endproduct (AGE) Receptor 1 Is a Negative Regulator of the Inflammatory Response to AGE in Mesangial Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 11767, doi:10.1073/pnas.0401588101.
27. Feng, H.; Hu, H.; Zheng, P.; Xun, T.; Wu, S.; Yang, X.; Mo, L. AGE Receptor 1 Silencing Enhances Advanced Oxidative Protein Product-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Human Kidney Proximal Tubular Epithelial Cells via RAGE Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2020**, *529*, 1201–1208, doi:10.1016/j.bbrc.2020.06.144.
28. Cai, W.; He, J.C.; Zhu, L.; Lu, C.; Vlassara, H. Advanced Glycation End Product (AGE) Receptor 1 Suppresses Cell Oxidant Stress and Activation Signaling via EGF Receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*, 13801, doi:10.1073/pnas.0600362103.
29. Zhuang, A.; Yap, F.Y.T.; Bruce, C.; Leung, C.; Plan, M.R.; Sullivan, M.A.; Herath, C.; McCarthy, D.; Sourris, K.C.; Kantharidis, P.; et al. Increased Liver AGEs Induce Hepatic Injury Mediated through an OST48 Pathway. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 12292, doi:10.1038/s41598-017-12548-4.
30. Zhuang, A.; Yap, F.Y.T.; McCarthy, D.; Leung, C.; Sourris, K.C.; Penfold, S.A.; Thallas-Bonke, V.; Coughlan, M.T.; Schulz, B.L.; Forbes, J.M. Globally Elevating the AGE Clearance Receptor, OST48, Does Not Protect against the Development of Diabetic Kidney Disease, despite Improving Insulin Secretion. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 13664, doi:10.1038/s41598-019-50221-0.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Functional Foods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jff](https://www.elsevier.com/locate/jff)

## Investigation of the antioxidant capacity of caramels: Combination of laboratory assays and *C. elegans* model

Cédric Moretton<sup>a,\*</sup>, Cécile Gouttefangeas<sup>a</sup>, Constance Dubois<sup>b</sup>, Frédéric Jacques Tessier<sup>b</sup>,  
Chantal Fradin<sup>b</sup>, Emmanuelle Prost-Camus<sup>c</sup>, Michel Prost<sup>c</sup>, Marc Haumont<sup>c</sup>, Henri Nigay<sup>a</sup>

<sup>a</sup> NIGAY SAS, F-42110 Feurs, France

<sup>b</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et d'eternnants mol'culaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France

<sup>c</sup> LARA-SPIRAL, F-21560 Couternon, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Caramel  
Antioxydant  
TEAC  
KRL  
*C. elegans*

### ABSTRACT

Caramel is one of the most current additive/ingredient obtained by controlled heat treatment of carbohydrates. A combination of *in vitro* and *in vivo* methods showed that aromatic caramels and caramel colours are anti-oxidant. The highest value is obtained for Class III caramel colours for *in vitro* TEAC and KRL tests (401 μmol Trolox equivalent/g and 5 366 mg gallic acid equivalent/100 g, respectively). *In vivo* test, caramels also increase the resistance of *C. elegans* to oxidant attack, with until 40% live worms after 18 h of treatment in the presence of caramels against no live worms after 12 h of treatment without. In conclusion, this study explore benefit effect of caramels and showed an antioxidant activity linked to their color intensity. The molecules involved remain to be explored.

### 1. Introduction

The word “caramel” refers to various products depending on recipes and applications (confectionaries, ingredients for flavouring, additives for colouring). Aromatic caramels and caramel colours are widely used in the food industry for their technological properties. Aromatic caramels are light to dark brown liquids or solids considered as food ingredients. Their main functionality is to enhance taste in diverse food applications including dairy products, ice creams, sauces or spirits. Caramel colours are used to provide a yellow to brown color in a large range of foodstuffs. These latter have been classified into 4 classes of food additives: Class I-IV (or E150a, b, c and d at the European Union level) according to the manufacturing reactants used. Caramels are produced by heating carbohydrates from vegetable sources (glucose, sucrose, invert sugar, etc.) in the presence or not of caramelization promoters (acids, alkalis, ammonium or sulfite compounds). The caramelization process includes a multitude of chemical reactions leading to the formation of a complex mixture of molecules, with low molecular weight ones responsible for the aromatic feature and high molecular

weight ones (melanoidins) responsible for the colourant feature of caramels (Golun & Kuhnert, 2012; Licht et al., 1992; Moretton, 2009; Sengar & Sharma, 2014). These reactions are specific in heat treatments and nature of the used sugar.

On the one hand, caramel colours are subject to specific monitoring due to the presence of adverse constituents at levels that may be of safety concern in a context of high-level exposure: 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole (THI) and 4-methylimidazole (4-MEI). These molecules are regulated by national and international authorities at levels of the ppm range. But on the other hand, some molecules of caramel have been associated with nutritional and health benefits. Studies have shown potential prebiotic effects for fructose dianhydrides and some other oligosaccharides, present in the order of several hundred grams/kg in some caramels (Arribas et al., 2010; Orban, Patterson, Sutton, & Richards, 1997; Peinado et al., 2013; Rubio et al., 2014; Saito & Tomita, 2000). Caramels have also been recently highlighted as potential antioxidants (Sengar & Sharma, 2014). Antioxidants are molecules that counteract the harmful effects of free radicals and other oxidants, responsible for causing a large number of diseases by oxidizing nucleic

**Abbreviations:** ABTS, 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); AC, Aromatic caramel; BS, Burnt Sugar; CC, Caramel Colour; EBC colour, European Brewing Convention colour; GAEq, Gallic Acid Equivalent; KRL, Kit Radicaux Libres; TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

\* Corresponding author.

E-mail address: [cedric.moretton@nigay.com](mailto:cedric.moretton@nigay.com) (C. Moretton).

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104308>

Received 12 August 2020; Received in revised form 9 November 2020; Accepted 21 November 2020

Available online 25 January 2021

1756-4646/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



acids, proteins, lipids and DNA. Antioxidants inhibit or delay the oxidative process by blocking both the initiation and propagation of oxidizing chain reactions. There are endogenous antioxidants (superoxide dismutase, glutathione peroxidase ...) and antioxidants from exogenous food sources (vitamins C and E, carotenoids,  $\beta$ -carotene, polyphenols ...) (Finley, Kong, Hintze, & Je, 2011).

Brenna et al. aimed to ascertain the contribution to the antioxidant activity of some caramel-containing soft drinks, such as cola drinks, and chinotto, an original Italian soft drink (Brenna, Ceppi, & Giovanelli, 2009). The results showed that even if soft drinks have a lower antioxidant activity than other beverages such as tea, coffee or chocolate, they may contribute to the antioxidant pool assumed with the diet. Tsai et al. heated 4 sugars (including monosaccharides and disaccharides) with different concentrations (1–40%) at pH 3, 7, and 10 at 90 °C for various durations (0–42 h). Results from 240 samples indicated that alkaline condition (pH 10 vs pH 3) as well as high sugar concentration (40% vs 20%) preferably enhance the antioxidant capacity of caramels, evaluated by ferric reducing antioxidant power (FRAP) method and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging ability (Tsai, Yu, Chen, Liu, & Sun, 2009). A correlation between browning intensity and antioxidant was also shown.

Compared to the caramels previously studied under experimental conditions, caramels manufactured by industrial processes are heated at higher sugar concentration and to higher temperatures but for shorter durations. In this context, the objective of this study was to evaluate the global antioxidant capacity of different types of caramels marketed as aromatic ingredients or food additives. To demonstrate the global antioxidant capacity of caramels, we used *in vitro* methods well validated; the TEAC/ABTS assay (Trolox equivalent antioxidant capacity / 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and the KRL™ (Kit Radicaux Libres) tests, respectively. The nematode *Caenorhabditis elegans* was used as an *in vivo* model for studying caramel-dependent resistance to oxidative stress.

## 2. Material and methods

### 1. Materials

#### 1. Samples

Aromatic caramels and caramel colours were provided by Nigay SAS (Feurs, France).

Table 1 shows composition and European Brewing Convention (EBC) colour of the caramel samples. Different raw materials were tested: sucrose for aromatic caramel and burnt sugars, sucrose or glucose for caramel colours with an addition of reactants such as alkali, sulfite or ammonia.

The colour intensity and the colouring power increase depending on the type of caramel and the raw materials used (EBC range from 570

(aromatic caramel) to 46 000 (class IV caramel colour)).

### 2. Chemicals

ABTS, potassium persulfate, ascorbic acid, di-potassium hydrogenophosphate and potassium dihydrogenophosphate were purchased from VWR chemicals (Fontenay sous bois, France). 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), Paraquat dichloride hydrate (PQ) and trivalent Arsenic chloride (AsIII) were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). Gallic acid and *tert*-Butyl hydroperoxide 70% aqueous solution (TBHP) were purchased from Alfa Aesar (Kandel, Germany), KRL™ test kit from Kirial International (Couteron, France).

### 3. *C. elegans* and bacterial strains

The Bristol N2 wild type strain and the OP50 *Escherichia coli* feeding strain were obtained from the Caenorhabditis Genetics Center ([cg.cmu.edu](http://cg.cmu.edu)).

## 2. Methods

### 1. Colour intensity EBC units

The EBC colour, initially used for beer, is a method developed by the Institute of Brewing and the European Brewing Convention to measure the colour of products. The caramel is diluted with a factor of dilution to obtain a colour visually comparable with a colour scale (colored standard discs from 6 to 27, from light yellow to dark brown). The EBC value is then calculated by the following formula:

$$EBC = \text{disc value} * 25 / (\text{solution concentration} * \text{optical pathlength})$$

### 2. Antioxidant capacity determinations

1. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC/ABTS assay). Various chemical methods are used for the evaluation of the antioxidant capacity of foods (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013; Pisoschi & Negulescu, 2012). Most of them use colorimetric technique. The absorbance of caramels in UV and visible region decrease as wavelength increases so the choice fell on the TEAC/ABTS method with a color measurement at high wavelength (734 nm).

The determination of ABTS radical inhibition was based on the method of Re et al. (Re et al., 1999). Stock water solutions of ABTS and potassium persulfate were prepared at 5 mmol/L and 2 mmol/L, respectively. The radical cation ABTS<sup>•+</sup> was obtained by reacting ABTS solution with potassium persulfate solution (50/50). Before use, the mix was kept at room temperature in darkness for 12–16 h.

One hundred and fifty microliters of ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted in 4.85 mL phosphate buffer 100 mM pH7 to obtain a blank absorbance around 0.8 at 734 nm. Absorbance was read using Thermo AquaMate spectrophotometer.

Antioxidants reduce the blue ABTS radical cation to its colorless neutral form. Trolox, a water-soluble analog of vitamin E, was used as a standard antioxidant to draw a linear correlation between the absorbance decrease and the concentration of Trolox in  $\mu\text{mol}$ . One hundred microliters of the sample solution were added to the ABTS<sup>•+</sup>/phosphate buffer mix. The sample is diluted appropriately to produce between 20% and 80% inhibition of the blank absorbance.

Results were expressed as  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalents /g of sample (TEAC).

2.2.2.2. Kit Radicaux Libres (KRL) test. The antioxidant activity of caramel solutions was tested using the patented KRL test (Phan-Thi, Durand, Prost, Prost, & Waché, 2016; Prost, 1992). The biological KRL™ test is based on the ability of blood cells to resist against free radicals. Initially used to allow the dynamic evaluation of the overall antioxidant defense potential of an individual, it is also used for the assessment of antioxidant capacity of plant extracts and many other antioxidants products (Brahmi et al., 2018; Cases et al., 2017; Phan-Thi et al., 2016).

**Table 1**  
Raw materials and EBC colour of caramel samples.

Caramel	Abbreviation	Raw materials	EBC colour
Aromatic caramel	AC	Sucrose	570
Burnt sugar	BS	Sucrose	11,000
Class I caramel colour	CC-I	Sucrose - alkali	17,000
Class II caramel colour	CC-II	Sucrose - sodium sulfite	19,000
Class III caramel colour	CC-III a	Glucose - ammonium hydroxide	22,000
Class III caramel colour	CC-III b	Glucose - ammonium hydroxide	35,000
Class IV caramel colour	CC-IV a	Glucose - ammonium sulfite	21,000
Class IV caramel colour	CC-IV b	Glucose - ammonium sulfite	46,000

A control blood was subjected to free radical attack under controlled and standardized conditions with the KRL Reader (37 °C, orbital shaking) in the presence of caramel.

A caramel solution (120 µL, 2250 mg/L) was mixed with whole horse blood solution (50 µL) and KRL Reagent solution (100 µL) in 96-wells plate. Gallic acid was used as a reference compound in antioxidant activity assessment.

Measuring the decrease in absorbance (620 nm) allows the monitoring of the progressive disappearance of the cells. The resistance of blood cells against free radical attack is expressed by the time necessary to lyse 50% of the blood cells (HT50 in min).

Results of antioxidant activity (KRL AO) were expressed in mg Gallic Acid Equivalent /100 g of caramel (GAEq mg/100 g).

### 3. *Caenorhabditis elegans* model

**1. *C. elegans* culture.** Worms were maintained at 20 °C on nematode growth medium (NGM) agar plates seeded with OP50 bacteria. Before each experiment, young adult worms were obtained after synchronization of eggs released from gravid worms by lysis with sodium hypochlorite. Except for maintenance and larval development, feeding bacteria were 10 times concentrated and heat-killed 30 min at 65 °C.

**2. Survival assays in severe oxidative stress.** Three days adults were incubated 24 h at 20 °C in 24-well plates (approximately 30 worms /well) plus NGM containing none, 0.04%, 0.2% and 1% caramel solution with FUDR (50 µM) (FUDR was used to inhibit the development of progeny) and heat-killed bacteria. Three different oxidizing chemicals, Paraquat (PQ), *tert*-Butyl hydroperoxide (TBHP) or trivalent Arsenic chloride (AsIII) in M9 buffer (NaCl 86 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM and MgSO<sub>4</sub> 1 mM), were then added to a final concentration of 200 mM, 15.4 mM or 5 mM, respectively. Worms grown without oxidant in medium with or without caramel served as additional controls. The worms were scored every hour and they were considered as dead when they did not move after repeated stimuli. Three independent experiments were performed with more than 50 animals each.

**2.2.2.3.3. Survival assays in moderate oxidative stress.** Synchronized young adults were incubated at 20 °C in 96-well plates (approximately 10 worms /well) plus NGM containing none or 0.2% caramel solution with FUDR (50 µM) and heat-killed bacteria. PQ was added to a final concentration of 4 mM. Control conditions contained none or 0.2% caramel solution without PQ. The worms were scored every other day and they were considered as dead when they did not move after repeated stimuli. Animals were censored when they crawled off the well, exploded or contained internally hatched larvae. Three independent experiments were performed with more than 60 animals each.

**2.2.2.3.4. Culture conditions and isolation of total RNA for gene expression analysis.** Day3 adult worms were grown 24 h at 20 °C in 6-well plates (approximately 1000 worms / well) containing NGM alone or NGM plus 0,04 or 1% caramel solutions. All the media were

supplemented with FUDR (50 µM) and heat-killed bacteria. PQ, TBHP or AsIII in M9 buffer were then added to a final of 200 mM, 15.4 mM or 5 mM, respectively. Worms were incubated 2 h at 20 °C in those oxidative conditions before to be pelleted and frozen in liquid nitrogen. The worms were then homogenized in Trizol (Ambion) with acid-washed glass beads (425–600 µm; B. Sigma-Aldrich) with Precellys@24 (Bertin Technologies) at full speed, 4 times 10 s, 3 cycles. Total RNA was extracted as previously described (Fradin et al., 2003).

**2.2.2.3.5. Gene expression analysis.** RNAs were treated with DNaseI (Thermo Scientific) prior to be reverse transcribed to cDNA (High-capacity cDNA reverse transcription kits, Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed using PowerUp™ SYBR® Green 2X Mater Mix (Applied Biosystems). Gene expression levels were normalized to *pmp-3* and relative expression was calculated by the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. The relative expression of genes was analyzed by comparing either the condition with oxidizing chemical to the same condition without the chemical or the caramel conditions to the condition without caramel. Primers are listed in Table S1.

### 2.3. Statistics

**KRL test and TEAC assay:** All experiments were performed in duplicate (KRL) or triplicate (TEAC) and the results were expressed as mean ± standard deviation (SD). Significant differences (P < 0.05) between the means were determined by the ANOVA test of software Graphpad Prism.

***Caenorhabditis elegans* model:** Kaplan-Meier survival curve and statistical analysis were generated by bioinformatics software GraphPad Prism. Survival analysis and P values for gene expression are based on log-rank and two-way ANOVA tests, respectively. P < 0.05 was considered statistically significant.

## 3. Results and discussion

For valid assessment, the antioxidant capacity of caramel samples was determined using three complementary methods: TEAC/ABTS assay, the KRL™ Test, and *Caenorhabditis elegans* model.

### 1. Results of the antioxidant capacity evaluated by in vitro assays

#### 1. TEAC assay

**1. Kinetic measurements.** Among chemical assays, TEAC was first developed as a simple and convenient method for assessment of the total antioxidant capacity. The first step was to examine the kinetic behavior of reactions between ABTS<sup>+</sup> and caramels or common antioxidants. Absorbance readings at 734 nm were taken during 20 min. Percentage of inhibition versus time graphs are shown in Fig. 1.

Trolox and ascorbic acid reacted immediately with ABTS<sup>+</sup> (Fig. 1A).

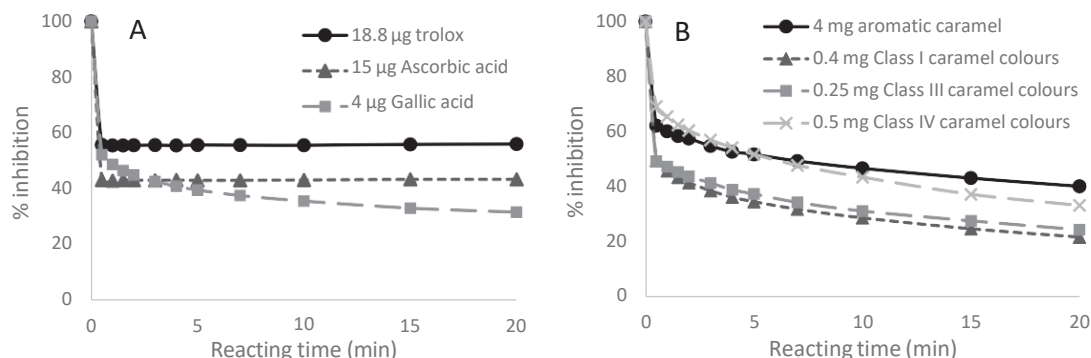


Fig. 1. Rate of reaction of antioxidants with ABTS<sup>+</sup>: A: common antioxidants - B: caramels.

The inhibition percentage was constant over time (56.0 and 43.5% inhibition, respectively). Gallic acid had a fast initial rate but the end point of inhibition was not reached after 20 min. Similar results of reaction rates were obtained by Walker and Everette using Trolox, ascorbic acid and plant polyphenols (Walker & Everette, 2009).

For aromatic caramel and caramel colours, the curves were comparable to the gallic acid curve (Fig. 1B). In the same way, the end point was not reached after 20 min. To compare different caramels, the reacting time / color measurement was fixed at 5 min as generally set in previous publications (Alam et al., 2013; Amigoni et al., 2017; Seeram et al., 2006).

**3.1.1.2. TEAC of well-known antioxidants.** As a quality control, the TEAC value of two well-known antioxidants were determined. TEAC of ascorbic acid was evaluated at  $6.2 \pm 0.6$  mmol Trolox equivalent/g, this result was comparable to previous studies which reported mean values between 4.6 and 6.0 mmol/g (Miller & Rice-Evans, 1997; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997; Walker & Everette, 2009).

TEAC of gallic acid was evaluated at  $24.0 \pm 2$  mmol/g, this result was also comparable to published studies indicating values between 15.3 and 34.4 mmol/g (Miller & Rice-Evans, 1997; Rice-Evans et al., 1997; Walker & Everette, 2009).

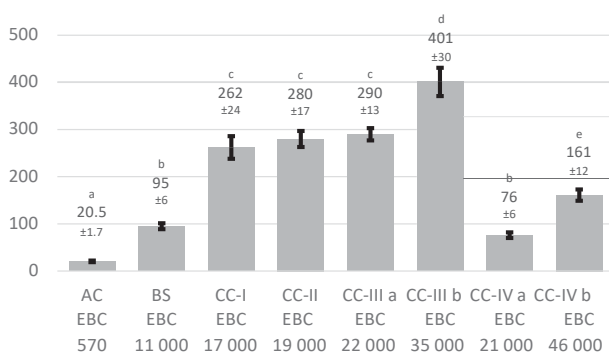
**3.1.1.3. TEAC of caramels.** As shown in Fig. 2, all the caramels tested exhibited antioxidant activity according to the TEAC test, between  $20.5 \pm 1.7$  for standard aromatic caramel to  $401 \pm 30$   $\mu$ mol Trolox equivalent /g for Class III caramel colour.

For caramels without ammonium or sulphite compounds (AC, BS, CC-I, CC-II), the antioxidant capacity increases significantly with EBC colour. In the same way, inside Class III and IV caramel colours (CC-III, CC-IV), the antioxidant capacity increases with colour intensity. Among caramel colours, Class IV type showed lower antioxidant capacity and Class III had the highest antioxidant activity. These results confirm those obtained by Brenna et al. on commercial caramel colours using the FRAP and DPPH\* methods (Brenna et al., 2009).

To compare, chocolates had a TEAC value between 10 and 100  $\mu$ mol Trolox equivalent /g, dark chocolates showed a greater antioxidant capacity (Laličić-Petronijević, 2016; Todorovic et al., 2015). Honey had a TEAC value between 0.3 and 8  $\mu$ mol/g (Marylenlid et al., n.d.; Sancho et al., 2016; Vít, 2009). Coffee was a well-known antioxidant. The TEAC value of ground coffee had been reported between 100 and 300  $\mu$ mol/g (Brezová, Šlebodová, & Staško, 2009; da Cruz et al., 2018).

### 3.1.2. Protection of red blood cells evaluated by the KRL™ test

TEAC test is a validated *in vitro* chemical method to evaluate the overall antioxidant capacity of foods. But among limitations, the TEAC assay has been challenged for its lack of biological relevance and lower



**Fig. 2.** Antioxidant activity of caramel samples by TEAC test data are expressed in Trolox equivalent ( $\mu$ mol/g of sample) and presented as the means  $\pm$  standard deviation. Bars with no letters in common are significantly different ( $p < 0.05$ , ANOVA test).

sensitivity compared to the ORAC test (Shahidi & Zhong, 2015). We decided then to evaluate the antioxidant activity of caramels with a biological test. For this method, whole blood is submitted to an oxidant stress induced by free radical attack. Haemolysis is recorded by optical density decay with the KRL microplate reader. The overall antioxidant effectiveness of caramels in biological conditions was determined.

Main results of the KRL™ test are presented in Fig. 3. We found that all the caramel samples (aromatic, burnt sugar, class I, II, III, IV) exhibited an antioxidant capacity from  $308 \pm 1$  to  $5366 \pm 147$  mg GAEq/100 g.

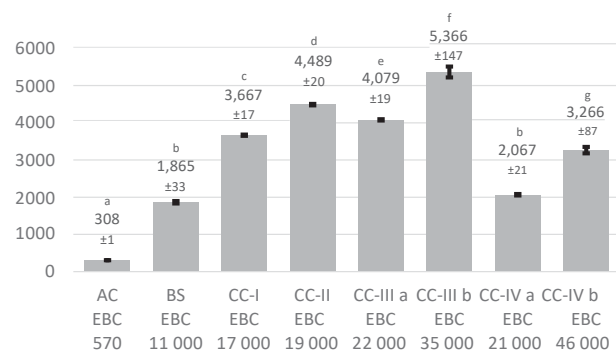
As for the TEAC test, CC-III b had the highest antioxidant activity and the antioxidant activity increases with the colour for each category of caramels.

Other food matrices were previously analyzed with the same KRL method. The results in wine were between 120 and 350 mg GAEq/100 g. In coffee beverage and orange juice, the antioxidant activity has been evaluated at 650–700 and 75–80 mg GAEq/100 g respectively (Unpublished data from LARA-SPIRAL and Prost et al., 2017).

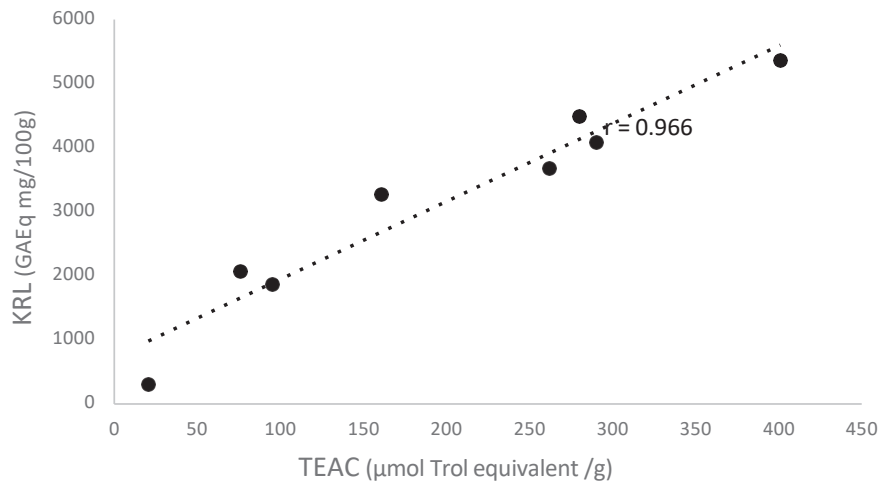
### 3.1.3. Comparison of results between methods and with other foods

To check the reliability of our data, the results obtained with the 8 marketed caramel samples using TEAC and KRL-test were compared. Fig. 4 shows a strong linear correlation between the two sets of results ( $r = 0.966$ ). Both methods, one rather chemical and one rather biological, confirm the antioxidant potential of caramels.

The antioxidant effects of caramels are equivalent or superior to those obtained with the same measurement techniques in other food products recognized as antioxidant. In Europe, the combined mean exposures to the four caramel colours (E 150a–150d) was evaluated from 15 to 57 mg/kg bw/day for adults, which could be equivalent to 1–4 g for a weight of 70 kg (EFSA, 2012). Based on our results, the antioxidant capacity from the daily ingestion of caramel colours is almost equivalent to a glass of orange juice (140 vs. 160 mg gallic acid equivalent for fruit juice) (Unpublished data from LARA-SPIRAL, Debabbi et al., 2017). The exposure to caramel colours would reach 41–165 mg/kg bw/day among the highest consumers (95th percentile), the equivalent of a 3–11 g daily intake. This consumption could be compared to a cup of coffee in term of antioxidant activity. The consumption of aromatic caramels is more difficult to assess but they also contribute to the exposure. Even when related to its level of consumption, caramels could consequently be a significant contributor to the daily intake of antioxidant compounds. As an interesting point about the risk/benefit balance, it should be noted that the level of consumption recorded in Europe remains below the group acceptable daily intake applicable to combined four colours (300 mg/kg bw/day (EFSA, 2012)).



**Fig. 3.** Antioxidant activity of caramel samples by KRL™ test data are expressed in gallic acid equivalent (mg/100 g caramel) and presented as the means  $\pm$  standard deviation (SD). Bars with no letters in common are significantly different ( $p < 0.05$ , ANOVA test).



**Fig. 4.** Comparison of results of the antioxidant activity obtained with the TEAC method ( $\mu\text{mol Trolox equivalent/g}$  of sample) and the KRL method ( $\text{mg GAEq}/100\text{ g}$  of sample).

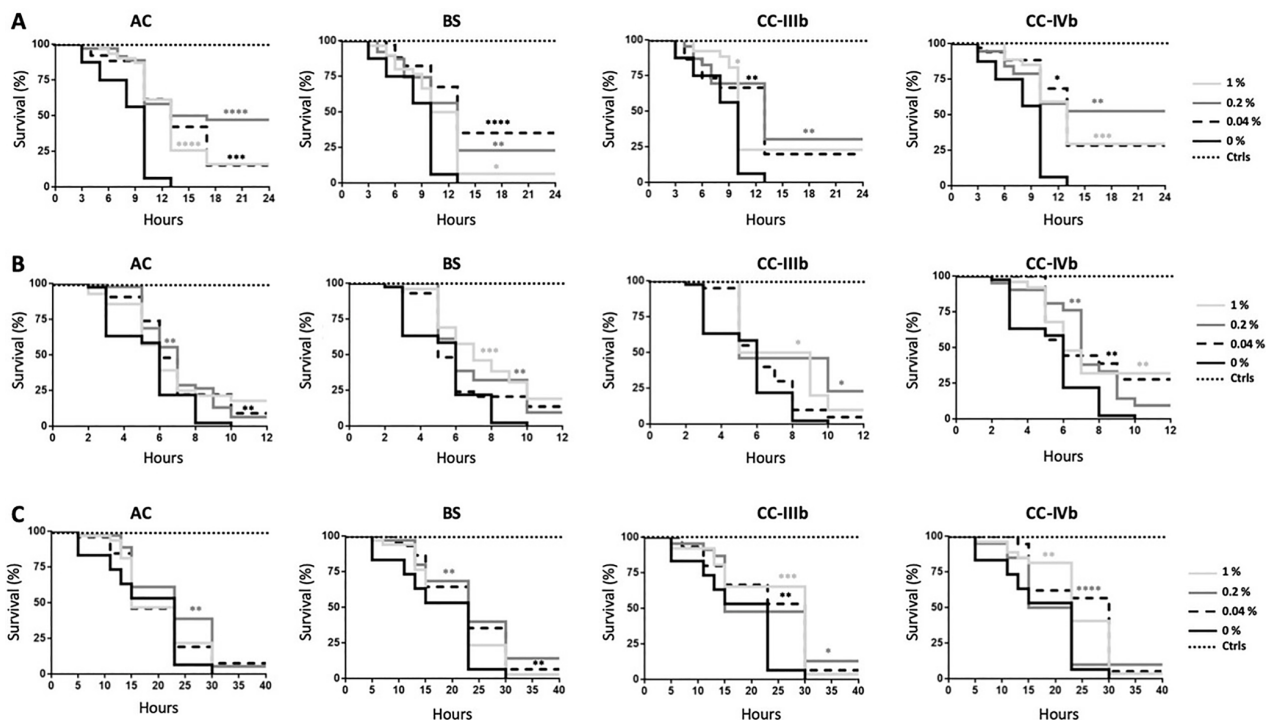
### 3.2. Effect of caramels on survival and gene expression in *C. Elegans* model

Four samples of the eight tested for KRL and TEAC studies were selected for our investigation on *C. elegans*. Thus, we performed analyses with aromatic caramel, burnt sugar and caramels colours class III and class IV, the latter showing the highest colour intensity (EBC 35 000 and 46 000, respectively).

#### 3.2.1. Caramel solutions increase survival of *C. Elegans* in response to severe oxidative conditions

In order to highlight any direct or indirect antioxidant property of caramels, we tested the resistance of worms to different oxidative stresses in the presence of caramel solutions. We scored the worms' survival during treatment with different chemicals at a concentration that generate severe oxidative stress.

Under physiological condition, the different concentrations of caramels didn't decrease the worms' survival, suggesting that no caramel has a toxic effect on *C. elegans* (Fig. 5). Consistent with this finding, non-toxicity of class IV caramels had been highlighted using *in vitro* assays



**Fig. 5.** Survival of worms to severe oxidative stresses in presence of caramels. Worms were pretreated with none (0%), 0.04%, 0.2% or 1% of caramel AC, caramel BS, caramel CC-IIIb or caramel CC-IVb before addition of oxidizing chemicals: paraquat/PQ (A), *tert*-Butyl hydroperoxide/TBHP (B) or trivalent Arsenic/AsIII (C). Worms incubated without oxidant in medium with or without caramel served as control (Ctrls): both survival curves are superimposed at 100% over the experimentation time. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$  compared to control survival.



and *Drosophila melanogaster* model (Mateo-Fernández et al., 2019). On the contrary, the different concentrations of caramels, whatever their nature, increased worm survival under the 3 oxidizing environments (PQ, TBHP and AsIII), the level of protection depends on the type of oxidative stress induced (Fig. 5).

PQ generates superoxide radicals after reduction in the mitochondria. No worm survived a 12-hour exposure to PQ without caramel. Caramels AC and CC-IVb showed higher resistance to PQ than caramels BS and CC-IIIb with more than 40% live worms after 18 h of treatment (Fig. 5A). The 0.2% concentration of caramel appeared to be the optimal concentration for PQ resistance.

TBHP is a strong oxidant, often more effective than hydrogen peroxide. All worms were killed after 10-hours treatment with TBHP without caramel (Fig. 5B). Although survival curves are significantly increased with the different caramels, the median survival of worms to TBHP is not changed with any of the different caramel solutions. By contrast, the maximum survival of worms at treatment is increased in the presence of the caramels. Whatever their concentrations, caramels BS, CC-IIIb and CC-IVb had the most positive effect.

Results similar to TBHP were obtained after treatment of worms with AsIII (Fig. 5C).

The antioxidant effects of each caramel *in vivo* depend on the oxidizing conditions tested, preventing the classification of the different caramels according to an antioxidant activity. It is therefore difficult to compare these results with those obtained with *in vitro* tests. In addition, the possible metabolism of caramels by the worm can certainly modify their antioxidant properties. The results show that caramels of class III and IV have an antioxidant effect *in vivo*.

### 3.2.2. Caramels induce resistance to moderate paraquat exposure

Knowing the positive effect of caramels on severe PQ exposure, we investigated the resistance of worms to moderate PQ exposure (4 mM) in

presence of the caramel solutions. The caramels were used at the optimal concentration of survival in severe oxidative conditions: 0.2%. Under physiological condition, caramels did not decrease the worms' lifespan, suggesting that no caramel has a toxic effect on *C. elegans* (Ctrl vs AC/BS/CC on Fig. 6). On the contrary, caramel AC significantly increased the longevity of the worms.

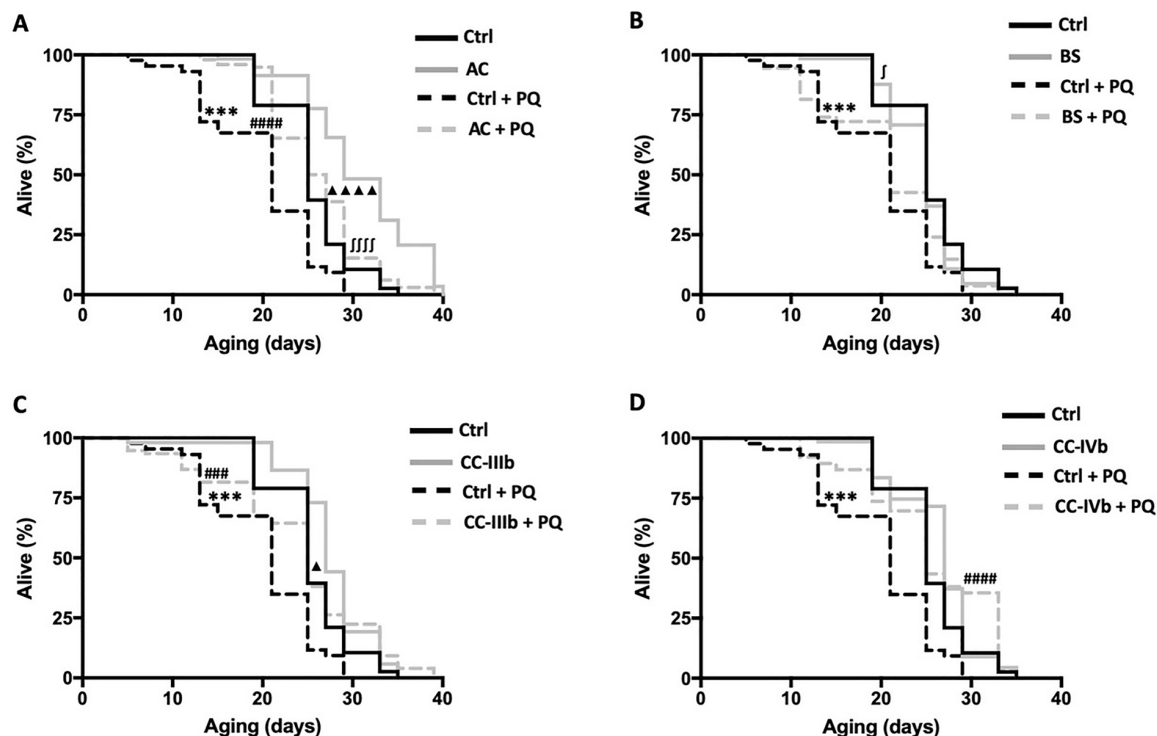
In moderate oxidative conditions and without caramels, the longevity of worms logically decreased (Ctrl vs Ctrl + PQ, Fig. 6). With caramels, the longevity of worms has not changed for burnt sugar, whereas the 3 other caramels significantly increased the lifespan of worms under this oxidizing condition (Ctrl + PQ vs AC/BS/CC + PQ, Fig. 6).

These results confirm the beneficial effect of those caramels to prevent damage caused by oxidants. The result with aromatic caramel suggests that this caramel has a positive effect on the longevity of worms which is independent of oxidative stress and/or which is partly dependent on physiological oxidative stress. Worms incubated with caramels CC-IIIb and CC-IVb have the same longevity whether they are incubated with or without PQ, showing that these caramels protect the worms from induced moderate oxidative stress.

Although surprising, the results obtained with burnt sugar show that the antioxidant properties of any molecule is conditioned by various factors including oxidative stress itself. Caramel BS either has oxidative properties which deteriorate over time or is metabolized by the worm, inducing an antioxidant effect in the short term (against severe stress) and not in the long term (against moderate stress). Whatever the cause, this result reinforces the antioxidant effect of the 3 other caramels tested against moderate oxidative stress which is induced by PQ.

### 3.2.3. Expression of genes coding response to severe oxidative stress is partially modulated by caramels

We further explored the antioxidant effects of the caramel solutions.



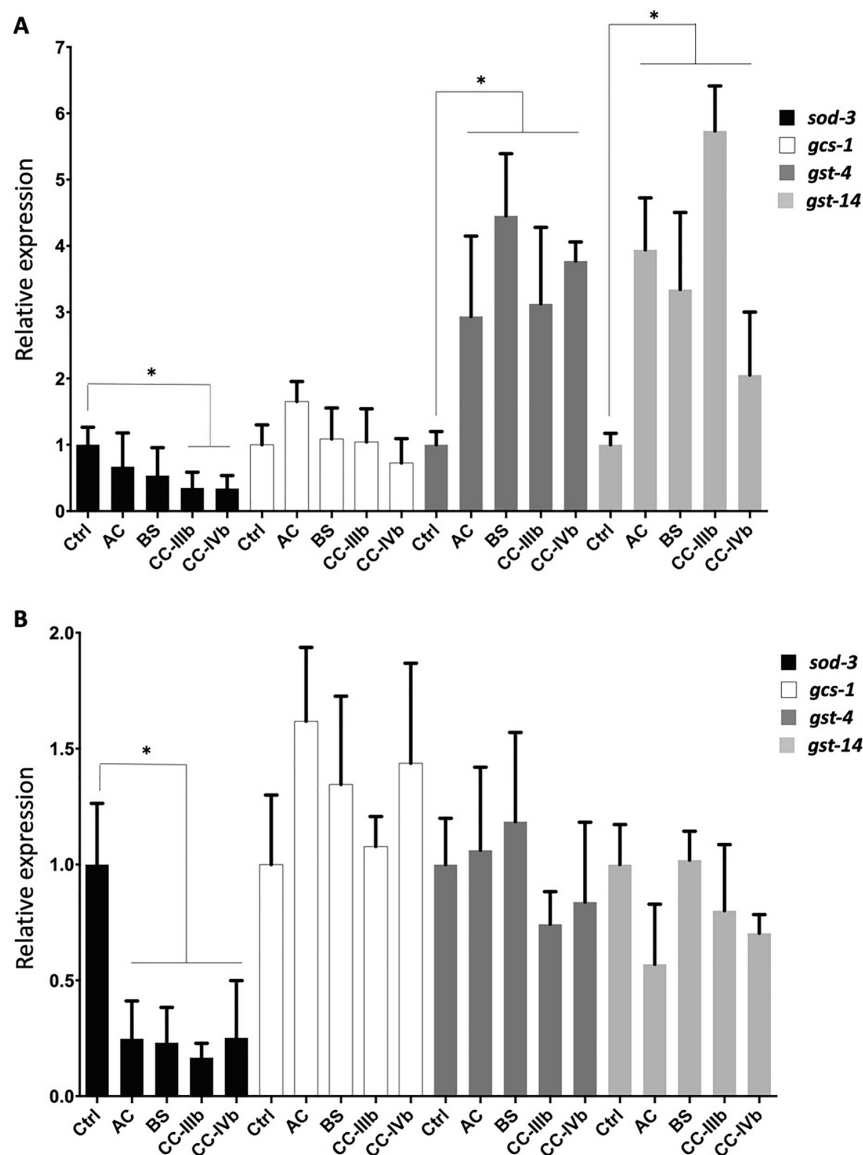
**Fig. 6.** Effects of caramels on lifespan of *C. elegans* in moderate oxidative stress. Young adults of N2 strain were grown on NGM plates containing none or 4 mM paraquat/PQ with no caramel (Ctrl) or 0.2% caramel AC (A), caramel BS (B), caramel CC-IIIb (C) or caramel CC-IVb (D) solutions. \*\*\*  $p < 0.001$ : Ctrl vs Ctrl + PQ. ####  $p < 0.0001$  and #  $p < 0.05$ : caramel vs caramel + PQ. ▲▲▲▲  $p < 0.0001$  and ▲  $p < 0.05$ : caramel vs Ctrl. #####  $p < 0.0001$  and ###  $p < 0.001$ : caramel + PQ vs Ctrl + PQ.

We verified if caramels could directly or indirectly modulate gene expression of enzymes involved in antioxidant response of *C. elegans*. Severe oxidative stress was then administered to the worms with the 3 oxidizing substances for 2 h with or without pretreatment with the caramel solutions.

Targeted antioxidant response was analyzed with the measurement of the relative expression of genes encoding some worm's key antioxidant enzymes: superoxide dismutase SOD-3 and glutathione-S-transferases GST-4 and GST-14 (40). GSTs have an important role in antioxidant recycling but also deactivate electrophilic xenobiotics or metabolites. Expression of the gene encoding glutamate-cysteine ligase GCS-1, an important enzyme for glutathione synthesis, was also measured (Ferguson & Bridge, 2019).

3.2.3.1. Modulation of oxidative stress response by severe oxidative stress or caramels. In the absence of caramel, exposure of worms with each oxidizing chemical induced the expression of genes coding for the antioxidant enzymes apart from *sod-3* whose expression is not enhanced by TBHP and AsIII (Control bars on Figs. 7 and S1), which is in line with the oxidizing species generated and their subcellular localization.

In a non-oxidative condition, the caramels did not influence the expression of the genes encoding the antioxidant enzymes (Fig. S2). These results suggest that caramels do not directly regulate the expression of these genes. Although non-significant, the highest concentration of caramel CC-IVb down-regulated expression of the genes *sod-3*, *gst-4* and *gst-14*, implying a possible effect of this caramel on the level of physiological stress of the worms.



**Fig. 7.** Relative expression of antioxidant genes induced by severe oxidative stress in presence of caramels. Worms were pretreated with none (Ctrl) or 0.04% (A) or 1% (B) of caramel AC, caramel BS, caramel CC-IIIb or caramel CC-IVb before addition of 200 mM paraquat/PQ. After 2 h of PQ exposure, relative expression of genes was analyzed by comparing the condition with caramel to the Ctrl condition. The *pmp-3* gene was used to normalize levels of gene expression. \*p < 0.05 (caramel vs Ctrl).

**3.2.3.2. Modulation of oxidative stress response by caramels in severe oxidative stress.** The caramels studied had very little effect on the transcriptional response induced after TBHP and AsIII treatments (Figs. S3 and S4) while they modulated the antioxidant response induced by PQ exposure (Fig. 7). PQ-induced *sod-3* expression was inhibited by at least one concentration of aromatic caramel, burnt sugar and class III and class IV caramels colours, suggesting an inhibition or a blocking of superoxide anion by the caramels. On the other hand, the genes coding for GST-4 and GST-14 were more expressed in the presence of the 4 caramels used at the lowest concentration (0.04%, Fig. 7A) while the highest concentration of caramels (1%, Fig. 7B) had no effect or decreased non-significantly the expression of these genes (caramel AC and CC-IIIb for the expression of *gst-14*). These results strongly suggest a direct effect of caramels on superoxide anions but also on the production of antioxidant recycling dependent on GST activities.

Induction of the *gst* genes shows that 0.04% caramels have a partial antioxidant effect. It is known that the expression of GSTs can also be regulated independently of oxidative stress (e.g. hormones, xenobiotics...). We cannot exclude such a regulation, but it would be partly dependent on oxidative stress since caramels do not induce the expression of these genes under physiological condition (Fig. S2). Caramels seem to have no effect on the upstream processes of antioxidant reactions because they had no significant effect on the expression of *gcs-1* whatever the induced oxidative stress (Figs. 7, S3 and S4).

Different studies have described the beneficial effects of different food compounds on different biological functions of *C. elegans* including the maintenance of protein homeostasis, mobility and longevity. These compounds such as coffee and orange extracts and thioalyls enhance the oxidative stress resistance of the worms (Amigoni et al., 2017; Dostal, Roberts, & Link, 2010; Ogawa, Koder, Hirata, Blackwell, & Mizunuma, 2016; Wang et al., 2020). In the present study, we show that, caramels are also able to improve the resistance of worms against oxidative stress, certainly thanks to the antioxidant properties demonstrated by *in vitro* tests. A future study will demonstrate whether these additives have other properties on the biological functions of *C. elegans*.

### 3.3. Conclusion

Three different methods used to evaluate the antioxidant activity of marketed aromatic caramels and caramel colours showed promising results that strongly support the hypothesis that the process of sugars heating leads to compounds with beneficial antioxidant properties.

*In vitro* TEAC and KRL assays have demonstrated that the antioxidant activity depends on the colour of the product and the caramelization promoters used. As caramels are metabolized *in vivo*, it therefore was essential to validate that this antioxidant effect is preserved *in vivo*. *C. elegans* is considered as a relevant animal model to evaluate the *in vivo* antioxidant effects of bioactive compounds (Ayuda-Durán, González-Manzano, González-Paramás, & Santos-Buelga, 2020). Results in this model confirmed that caramels are able to prevent damage caused by oxidative stress and this activity strongly depends on the dose and type of caramel tested.

The structure of most molecules in caramels remains actually unknown but the characterization of antioxidant molecules present in products obtained by the heat treatment of sugars would probably be a next topic of interest (Rodríguez et al., 2019). They probably differ depending on the reactants used and level of heating process. A better knowledge of their content and chemical composition in caramels would partly explain the different antioxidant properties observed in our study.

Our results open up a promising field of research on the antioxidant potential of heated-formed compounds present in caramels and bring new elements that highlight the potential beneficial health effects of caramels. From a more prospective point of view and with the support of additional studies, caramels could represent a significative source of antioxidants that may prevent the effects of free radical-induced physiological stages or diseases. Future applications would particularly be of

great interest in aging prevention, clinical or sports nutrition.

### Ethics statement

We have read and adhered to the Publishing Ethics regarding animal experiments.

### CRediT authorship contribution statement

**Cédric Moretton:** Investigation, Visualization, Writing - original draft. **Cécile Gouttefangeas:** Investigation, Supervision. **Constance Dubois:** Investigation. **Frédéric Jacques Tessier:** Investigation, Writing - review & editing. **Chantal Fradin:** Investigation, Writing - review & editing. **Emmanuelle Prost-Camus:** Investigation, Writing - review & editing. **Michel Prost:** Investigation, Writing - review & editing. **Marc Haumont:** Investigation, Writing - review & editing. **Henri Nigay:** Supervision, Resources.

### Declaration of Competing Interest

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

### Acknowledgements

We thank the Caenorhabditis Genetics Center for providing the *C. elegans* N2 wild-type and bacterial OP50 strain and Nutrifizz company for their editorial assistance.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104308>.

### References

- Alam, Md. N., Bristi, N. J., & Rafiqzaman, Md. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.
- Amigoni, L., Stuknyte, M., Ciaramelli, C., Magoni, C., Bruni, I., De Noni, I., et al. (2017). Green coffee extract enhances oxidative stress resistance and delays aging in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Functional Foods*, 33, 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.056>.
- Arribas, B., Suares-Pereira, E., Ortiz Mellet, C., García Fernánde, J. M., Buttersack, C., Rodríguez-Cabezas, M. E., et al. (2010). Di-D-fructose dianhydride-enriched caramels: Effect on colon microbiota, inflammation, and tissue damage in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58(10), 6476–6484. <https://doi.org/10.1021/jf100513j>.
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M., & Santos-Buelga, C. (2020). *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism to Evaluate the Antioxidant Effects of Phytochemicals. *Molecules*, 25(14). <https://doi.org/10.3390/molecules25143194>.
- Brahmi, F., Nury, T., Debbabi, M., Hadj-Ahmed, S., Zarrouk, A., Prost, M., et al. (2018). Evaluation of Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytoprotective Properties of Ethanolic Mint Extracts from Algeria on 7-Ketocholesterol-Treated Murine RAW 264.7 Macrophages. *Antioxidants*, 7(12), 184. <https://doi.org/10.3390/antiox7120184>.
- Brenna, O. V., Ceppi, E. L. M., & Giovannelli, G. (2009). Antioxidant capacity of some caramel-containing soft drinks. *Food Chemistry*, 115(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.059>.
- Brezová, V., Šlebodová, A., & Staško, A. (2009). Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*, 114(3), 859–868. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.025>.
- Cases, J., Romain, C., Marín-Pagan, C., Chung, L. H., Rubio-Perez, J. M., Laurent, C., et al. (2017). Supplementation with a Polyphenol-Rich Extract, PerLoad®, Improves Physical Performance during High-Intensity Exercise: A Randomized Trial. *Frontiers in Nutrition*, 4. <https://doi.org/10.3389/fnut.2017.000421>.
- Cruz, R. G. da, Vieira, T. M. F. de S., Lira, S. P. de, Cruz, R. G. da, Vieira, T. M. F. de S., & Lira, S. P. de. (2018). Potential antioxidant of Brazilian coffee from the region of Cerrado. *Food Science and Technology*, 38(3), 447–453. [10.1590/1678-457X.08017](https://doi.org/10.1590/1678-457X.08017).
- Debbabi, M. (2017). Etude comparative des profils anti-oxydants et de la composition en polyphénols de fruits et de légumes associés au régime méditerranéen. In Norbert Latruffe, Vin, nutrition méditerranéenne et santé, une association vertueuse. [https://doi.org/10.1007/978-2-291-14444-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-2-291-14444-4_1).

- [://eud.u-bourgogne.fr/sciences/521-vin-nutrition-mediterranee-et-sante-9782364411999.html](https://eud.u-bourgogne.fr/sciences/521-vin-nutrition-mediterranee-et-sante-9782364411999.html).
- Dostal, V., Roberts, C. M., & Link, C. D. (2010). Genetic mechanisms of coffee extract protection in a *Caenorhabditis elegans* model of  $\beta$  amyloid peptide toxicity. *Genetics*, 186(3), 857–866. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120436>.
- EFSA. (2012). Refined exposure assessment for caramel colours (E 150a, c, d). *EFSA Journal*, 10(12), 3030. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.3030>.
- Ferguson, G. D., & Bridge, W. J. (2019). The glutathione system and the related thiol network in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biology*, 24, Article 101171. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101171>.
- Finley, J. W., Kong, A.-N., Hintze, K. J., & Je, E. H. (2011). Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10.
- Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., D'Enfert, C., & Hube, B. (2003). Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Molecular Microbiology*, 47(6), 1523–1543. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03396.x>.
- Golon, A., & Kuhnert, N. (2012). Unraveling the chemical composition of caramel. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60(12), 3266–3274. <https://doi.org/10.1021/jf204807z>.
- Lalić-Petronjević, J. (2016). Effect of Chocolate Storage on Total Phenolics, Flavan-3-Ols, Proanthocyanidins, Oxidative Stability and Antioxidant Capacity. *Food Technology and Biotechnology*, 54(1). 10.17113/ftb.54.01.16.4014.
- Licht, B. H., Shaw, K., Smith, C., Mendoza, M., Orr, J., & Myers, D. V. (1992). Characterization of Caramel Colour IV. *Food and Chemical Toxicology*, 30(5), 365–373. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(92\)90062-p](https://doi.org/10.1016/0278-6915(92)90062-p).
- Marylenlid, I., Atilio, C., Lorena, D., Mariana, E., & Patricia, V. (n.d.). 19. Cosmetic properties of honey. 1. Antioxidant activity. 8.
- Mateo-Fernández, M., Alves-Martínez, P., Del Río-Celestino, M., Font, R., Merinas-Amo, T., & Alonso-Moraga, A. (2019). Food Safety and Nutraceutical Potential of Caramel Colour Class IV Using In Vivo and In Vitro Assays. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/foods8090392>.
- Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60(3), 331–337. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00339-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00339-1).
- Moretton, C. (2009). Analyse des caramels liquides: Développement et validation de nouvelles méthodes basées sur la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle (LC-LC) [PhD Thesis]. <http://www.theses.fr/2009LYO10279/document>.
- Ogawa, T., Kodera, Y., Hirata, D., Blackwell, T. K., & Mizunuma, M. (2016). Natural thioallyl compounds increase oxidative stress resistance and lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating SKN-1/Nrf. *Scientific Reports*, 6(1), 21611. <https://doi.org/10.1038/srep21611>.
- Orban, J. I., Patterson, J. A., Sutton, A. L., & Richards, G. N. (1997). Effect of sucrose thermal oligosaccharide caramel, dietary vitamin-mineral level, and brooding temperature on growth and intestinal bacterial populations of broiler chickens. *Poultry Science*, 76(3), 482–490. <https://doi.org/10.1093/ps/76.3.482>.
- Peinado, M. J., Echa'varri, A., Ruiz, R., Sua' rez-Pereira, E., Ortiz Mellet, C., García Ferna' ndez, J. M., et al. (2013). Effects of inulin and di-D-fructose dianhydride-enriched caramels on intestinal microbiota composition and performance of broiler chickens. *Animal*, 7(11), 1779–1788. <https://doi.org/10.1017/S17517311130001572>.
- Phan-Thi, H., Durand, P., Prost, E., & Waché, Y. (2016). Effect of heat-processing on the antioxidant and prooxidant activities of  $\beta$ -carotene from natural and synthetic origins on red blood cells. *Food Chemistry*, 190, 1137–1144. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.088>.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>.
- Prost et al. (2017). Colloque sous les auspices de la Chaire UNESCO, culture et tradition du vin. In Norbert Latruffe, Vin, nutrition m'editerran' eenne et sant' e, une association vertueuse. <https://eud.u-bourgogne.fr/sciences/521-vin-nutrition-mediterranee-et-sante-9782364411999.html>.
- Prost, M. (1992). Process for the determination by means of free radicals of the antioxidant properties of a living organism or a potentially aggressive age (United States Patent No. US5135850A). <https://patents.google.com/patent/US5135850A/en>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2).
- Rodríguez, A., Lema, P., Bessio, M. I., Moyna, G., Panizzolo, L. A., & Ferreira, F. (2019). Isolation and Characterization of Melanoidins from Dulce de Leche. A Confectionary Dairy Product. *Molecules*, 24(22), 4163. <https://doi.org/10.3390/molecules24224163>.
- Rubio, L. A., Peinado, M. J., Echa'varri, A., Ruiz, R., Sua' rez-Pereira, E., Mellet, C. O., et al. (2014). A Di-D-Fructose Dianhydride-Enriched Caramel Modulates Pig Fecal Microbiota Composition. *iAIM*, 04(5), 242–251. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.45031>.
- Saito, K., & Tomita, F. (2000). Diffructose anhydrides: Their mass-production and physiological functions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(7), 1321–1327. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1321>.
- Sancho, M. T., Pascual-Maté, A., Rodríguez-Morales, E. G., Osés, S. M., Escriche, I., Periche, Á., et al. (2016). Critical assessment of antioxidant-related parameters of honey. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(1), 30–36. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12988>.
- Seeram, N. P., Henning, S. M., Niu, Y., Lee, R., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1599–1603. <https://doi.org/10.1021/jf052857f>.
- Sengar, G., & Sharma, H. K. (2014). Food caramels: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1686–1696. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0633-z>.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.
- Todorovic, V., Redovnikovic, I. R., Todorovic, Z., Jankovic, G., Dodevska, M., & Sobajic, S. (2015). Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.018>.
- Tsai, P.-J., Yu, T.-Y., Chen, S.-H., Liu, C.-C., & Sun, Y.-F. (2009). Interactive role of color and antioxidant capacity in caramels. *Food Research International*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301623845>.
- Vit, P. (2009). Expanded parameters to assess the quality of honey from Venezuelan bees (*Apis mellifera*). *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(3), 72–81. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.3.03>.
- Walker, R. B., & Everette, J. D. (2009). Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1156–1161. <https://doi.org/10.1021/jf8026765>.
- Wang, J., Deng, N., Wang, H., Li, T., Chen, L., Zheng, B., et al. (2020). Effects of Orange Extracts on Longevity, Healthspan, and Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, 25(2), 351. <https://doi.org/10.3390/molecules25020351>.



**Axe AGE-RAGE : conséquences physiopathologiques et *inflammaging*.**

**C. Dubois, C. Fradin, É. Boulanger**

Université de Lille, Inserm U1167, Lille, France.

**Résumé**

L'impact des produits de glycation avancée (*advanced glycation end-products*, AGE) sur la santé est largement documenté dans la littérature. Les modifications structurales et fonctionnelles des protéines suite à la formation des AGE interviennent dans les complications de nombreuses pathologies comme le diabète. Les AGE peuvent également activer le récepteur aux AGE (RAGE), initiant un état inflammatoire et oxydant qui est maintenu par l'expression de RAGE et la formation des AGE dans ces conditions pathologiques. Des études récentes ont démontré l'implication de RAGE dans les processus de vieillissement notamment en lien avec un état inflammatoire à bas bruit systémique induit par des phénomènes de sénescence : l'*inflammaging*. L'axe AGE-RAGE représente ainsi une cible thérapeutique prometteuse pour lutter contre les complications de différentes pathologies et contrôler le vieillissement accéléré au cours des maladies chroniques, voire même le vieillissement physiologique.

**Mots clés :** Glycation - RAGE – inflammation – oxydation – vieillissement.

---

**Summary**

**The impact of advanced glycation end products (AGEs) on health has been widely studied. The structural and functional protein modifications induced by glycation are involved in the complications of many pathologies, such as diabetes. AGEs can also activate the AGE receptor (RAGE), initiating inflammation and oxidation that favor RAGE expression and AGE formation. Recent studies have demonstrated the involvement of RAGE in the aging processes, probably through its activation by AGEs and many other ligands, which induces a systemic low-level inflammatory state associated with aging : *inflammaging*. The AGE-RAGE axis represents a promising therapeutic target to reduce the complications of different pathologies and to control both pathological and physiological aging.**

**Key-words:** Glycation – RAGE – Inflammation – Oxidation – Aging

### **Les points essentiels**

- **La pathogénicité des AGE est exacerbée par les conditions physiopathologiques des maladies telles que l'hyperglycémie, un défaut de clairance ou la présence d'un état inflammatoire.**
- **L'activation du récepteur aux AGE (RAGE) induit un état inflammatoire et oxydant, participant à la formation d'AGE et à l'expression du RAGE eux-même.**
- **RAGE est au cœur d'une boucle induisant l'inflammation à bas bruit au cours du vieillissement : l'*inflammaging***
- **La modulation de RAGE est une piste sérieuse pour contrôler le vieillissement accéléré au cours des maladies chroniques afin d'améliorer l'espérance de vie en bonne santé**

## Introduction

Les produits de glycation avancée ou *advanced glycation end-products* (AGE) sont les produits d'une modification post-traductionnelle et non enzymatique des protéines, appelée glycation. Cette modification est initiée par une réaction entre une des fonctions amine libre d'une protéine et un sucre réducteur, comme le glucose. Les conditions oxydantes induisent la formation de produits dicarbonylés, comme le glyoxal et le méthylglyoxal, qui vont réagir avec les protéines pour également produire des AGE. La formation d'AGE est beaucoup plus rapide quand elle est initiée par la formation des composés dicarbonylés que par la « classique » glycation.

De nombreuses études ont mis en évidence une association entre la formation d'AGE et différentes maladies, telles que le diabète, l'insuffisance rénale, et l'inflammation chronique. La pathogénicité des AGE est liée aux modifications structurales et fonctionnelles des protéines glyquées. Les AGE formés peuvent également activer le récepteur aux AGE (RAGE) et activer plusieurs voies de signalisation délétères pour les cellules et les tissus [1]. L'activation de ces voies entraîne un état inflammatoire, ainsi qu'un stress oxydant, suite à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les conditions oxydantes favorisent la production d'AGE et l'inflammation qui induisent l'expression de RAGE. Un cercle vicieux se met alors en place et amplifie les dommages cellulaires et tissulaires.

Des études plus récentes ont mis en évidence l'implication de l'axe AGE-RAGE dans les processus mêmes du vieillissement. Une des hypothèses est que les AGE formés au cours du vieillissement seraient une des sources, *via* l'activation de RAGE, de l'inflammation à bas bruit favorisant les maladies liées au vieillissement. Les AGE et RAGE sont proposés comme cibles thérapeutiques dans différentes études expérimentales et cliniques aux résultats prometteurs.

## 1. Impact physiologique de la glycation

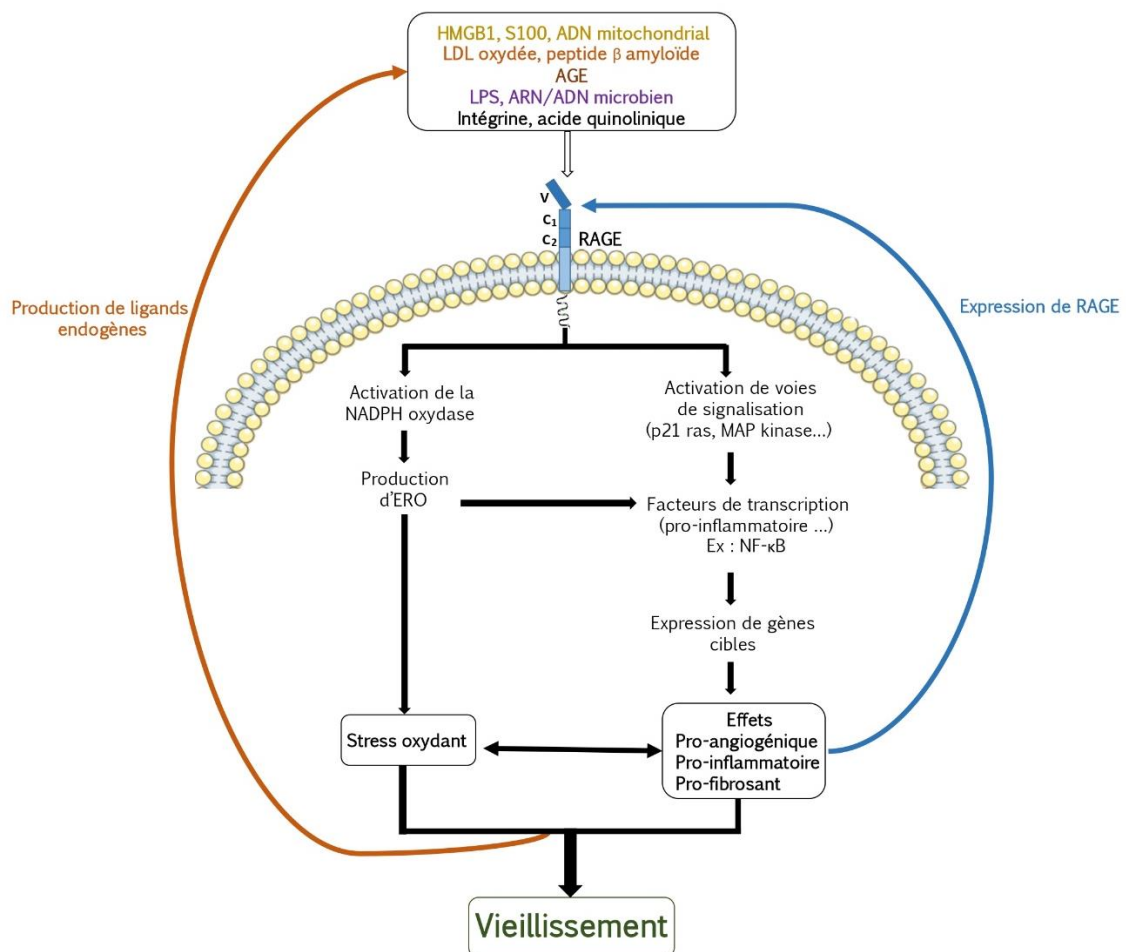
La glycation est une modification post-traductionnelle dont le processus est lent, c'est pourquoi les protéines ayant une longue demi-vie seront préférentiellement glyquées. En conditions oxydantes, la formation des AGE est accélérée et peut alors toucher les protéines à demi-vie plus courte. La glycation, modifiant structurellement les protéines, peut entraîner une mauvaise conformation de ces dernières. Les conséquences de ce changement conformationnel seront d'autant plus importantes que le nombre d'amines libres glyquées d'une même protéine sera important. De même, certains AGE sont formés entre deux amines libres d'une même protéine créant des pontages intramoléculaires, sources de changement structural important des protéines. La formation de cette classe d'AGE entre deux protéines engendrera des pontages intermoléculaires qui induiront une réticulation. Ce phénomène est observé au niveau de la matrice extracellulaire dont il augmente la rigidité.

Les modifications de la structure tridimensionnelle des protéines glyquées pourront compromettre leur prise en charge optimale par le protéasome. Au niveau des vaisseaux, les protéines glyquées non éliminées peuvent former des agrégats et obstruer les vaisseaux sanguins. Des vaisseaux obstrués sont à l'origine de nombreuses angiopathies. Chez les patients diabétiques, les *low-density lipoprotein* (LDL) glyquées participent à la formation de la plaque d'athérome. La glycation des protéines peut favoriser les agrégats peptidiques ou protéiques observés lors de complications vasculaires, rénales (néphropathie diabétique), et neuronales (plaques amyloïdes au cours de la maladie d'Alzheimer, corps de Lewy impliqués dans la maladie de Parkinson) [1].

Les changements structuraux des protéines glyquées peuvent également perturber la reconnaissance moléculaire, entraînant de sérieux dysfonctionnements cellulaires et tissulaires qui seront également favorisés lorsque les AGE sont formés au niveau ou à proximité d'un site actif enzymatique. À ce jour, aucun effet bénéfique de la glycation endogène sur les modifications structurales et fonctionnelles des protéines n'a été décrit.

La toxicité des AGE peut également être indirecte. Les AGE sont les ligands du RAGE. Ce récepteur est multi-ligand et appartient à la superfamille des immunoglobulines. Il est constitué d'une partie extracellulaire comprenant un domaine variable (V) et deux domaines constants (C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui permet la fixation de molécules adaptatrices pour coupler le récepteur aux voies de signalisation. Les AGE se fixent au domaine V de RAGE et activent différentes voies de signalisation faisant intervenir les protéines p21ras et les *mitogen-activated protein* (MAP) kinases. Ces voies induisent principalement l'activation du facteur de transcription *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) qui va

permettre l'expression de gènes codant pour des molécules 1) pro-inflammatoires, comme les interleukines 1 et 6 (IL-1 et IL-6) et le *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), 2) pro-angiogéniques, tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le *vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1), et l'*intercellular adhesion protein 1* (ICAM-1), et 3) pro-fibrosantes, tel que le *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) [1-3]. La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase est également activée et produit des ERO, amplifiant le stress oxydant induit par l'environnement inflammatoire qui stimule également l'expression de RAGE (*figure 1*).



**Figure 1. Mécanismes physiopathologiques de l'axe ligands-RAGE.** Le récepteur aux produits de glycation ou *advanced glycation end-products* - AGE (RAGE) possède plusieurs familles de ligands qui sont, soit endogènes : les motifs moléculaires associés aux dégâts ou *damage-associated molecular pattern* - DAMP (jaune), les protéines endommagées (orange), les produits issus des dommages protéiques (marron) et autres (noir) ; soit exogènes : les composés d'origine microbienne (violet). ERO : espèces réactives de l'oxygène ; LDL : *low-density lipoprotein* ; HMGB1 : *high mobility box 1* ; LPS : lipopolysaccharides ; NF- $\kappa$ B : *nuclear factor- $\kappa$ B* ; V : domaine variable ; C1/C2 : domaines constants.

L'activation de RAGE par les AGE peut être inhibée par deux isoformes solubles de RAGE qui sont constituées uniquement de la partie extracellulaire du récepteur : le *cleaved* RAGE (cRAGE) issu du clivage enzymatique de RAGE, et l'*endogenous secretory* RAGE (esRAGE) qui est un produit de l'épissage alternatif de l'ARN messager du gène *AGER* codant pour RAGE. En fixant les AGE, ces deux isoformes empêchent l'interaction de ces ligands avec RAGE et permettent leur élimination. L'activation de RAGE peut également être régulée par d'autres récepteurs aux AGE qui élimineraient les AGE : le récepteur CD36 et le complexe AGE-récepteur (AGE-R) comprenant AGE-R1 (ou OST-48), AGE-R2 (ou protéine 80K-H), et AGE-R3 (ou galectine-3). Ces récepteurs permettent l'endocytose et la dégradation des AGE et ils inhibent l'expression d'*AGER* par les cellules. Une balance entre activation de RAGE et élimination des AGE permet de maintenir une homéostasie physiologique favorable. Le déplacement de cet équilibre suite à un excès de production de ligands de RAGE et de RAGE lui-même induira des complications physiopathologiques discutées dans les prochains paragraphes de cette revue.

## **2. Impact physiopathologique de la glycation**

Les AGE sont impliqués dans différentes pathologies touchant de nombreux organes. Si le rôle direct des AGE dans ces différentes maladies est toujours sujet à discussion, de nombreuses études ont mis en évidence l'exacerbation de la pathogénicité des AGE par le contexte physiopathologique des maladies, comme une hyperglycémie, un défaut d'élimination des AGE, ou la présence d'un état inflammatoire.

Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique qui favorise la glycation. Les patients diabétiques présentent une plus forte concentration d'AGE que les sujets sains [4]. L'hémoglobine glyquée (HbA<sub>1c</sub>), permet d'ailleurs d'évaluer l'équilibre glycémique des patients diabétiques. L'HbA<sub>1c</sub> est un produit intermédiaire (non final, donc non AGE) de glycation. La glycémie est régulée par deux hormones majoritaires aux propriétés antagonistes : l'insuline, et le glucagon. Le maintien de l'homéostasie glucidique est indispensable pour le bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. Les complications les plus courantes du diabète sont, sur le plan microvasculaire, la néphropathie, la rétinopathie, et la neuropathie ; et sur le plan macrovasculaire, l'accident vasculaire cérébral, l'infarctus du myocarde, et l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs.

Aujourd'hui, les mécanismes liant l'hyperglycémie à ces complications ne sont pas clairement définis. La théorie de Brownlee suggère l'implication des différentes voies métaboliques du glucose activées suite à l'inhibition de la glycolyse : la voie des polyols, la voie du pentose phosphate, la voie de l'hexosamine, l'activation de la protéine kinase C, et la

glycation *via* la production de produits dicarboxylés (glyoxal et méthylglyoxal) [5]. L'ensemble de ces voies aboutit à la production d'ERO qui induisent un stress oxydant. Cette condition oxydante et l'hyperglycémie chez les sujets diabétiques favorisent la production de produits dicarboxylés, et donc la production d'AGE. Certaines voies métaboliques du glucose (voie des polyols et voie des pentoses phosphate) induisent également la production de sucres réducteurs plus réactifs que le glucose (respectivement, fructose et ribose), favorisant la formation d'AGE. Une association entre taux d'AGE et complications diabétiques a été mise en évidence. La concentration de carboxyméthyllysine (CML), un des AGE les plus étudiés cliniquement et expérimentalement, est plus forte chez les patients diabétiques avec complications que chez les patients diabétiques sans complications [4]. La glycation issue des produits dicarboxylés est en partie responsable des complications diabétiques. Des données expérimentales montrent que la surexpression du gène codant pour la glyoxalase I, enzyme responsable de l'élimination des produits dicarboxylés, protège les rats contre les complications du diabète [6].

L'élimination des AGE est un paramètre essentiel permettant de contrôler leur pathogénicité. Toute pathologie présentant un défaut de clairance des déchets de l'organisme favorisera l'accumulation d'AGE et les complications liées à la présence de ces molécules. C'est le cas de l'insuffisance rénale. En plus du défaut d'élimination des AGE, cette pathologie instaure un environnement oxydant suite à une altération des défenses antioxydantes, comme la glutathion peroxydase dont la concentration diminue lors d'une urémie [7]. Le déséquilibre de la balance *redox* dans le cadre des insuffisances rénales, d'origine diabétique ou non, favorise la production d'AGE qui vont s'accumuler et interagir avec RAGE dont l'activation va générer un stress oxydant et de l'inflammation. Ce processus oxydant et inflammatoire dépendant de RAGE est également observé dans la plupart des complications diabétiques.

L'activation de RAGE par ses ligands joue un rôle clé dans l'inflammation. Une étude récente a montré que des souris n'exprimant pas *AGER* (gène codant pour RAGE) sont moins susceptibles de développer des inflammations chroniques intestinales que des souris sauvages. L'expression de ce récepteur est plus élevée chez les souris atteintes de colites par rapport aux souris témoins [8]. De même, l'expression de RAGE est corrélée avec le niveau d'inflammation du côlon chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Comme l'activation de RAGE augmente sa propre expression ainsi que celles de ses ligands, l'état inflammatoire associé à ces maladies est maintenu.

RAGE a plusieurs ligands qui peuvent être impliqués dans la physiopathologie de différentes maladies. Comme les AGE, certains de ces ligands sont des molécules endogènes, mais synthétisées par les cellules comme le peptide  $\beta$  amyloïde. RAGE joue un rôle dans la

clairance de ce peptide. Il permet la transition du peptide  $\beta$  amyloïde du sang vers le système nerveux central à travers la barrière hémato-encéphalique, favorisant ainsi son agrégation qui est possiblement impliquée dans la maladie d'Alzheimer [9]. Les AGE retrouvés au niveau des plaques amyloïdes favoriseraient l'inflammation chez les patients atteints de cette maladie liée au vieillissement. De plus en plus d'études établissent un lien entre la glycation et les maladies liées au vieillissement, voire les processus mêmes du vieillissement.

### 3. Impact de la glycation sur le vieillissement physiologique et pathologique

Le vieillissement est défini comme la perte progressive de l'intégrité physiologique aboutissant à la mort de l'individu. Il est la résultante d'une multitude de facteurs qui vont favoriser le développement des maladies associées à l'âge, ou dont la fréquence augmente avec l'âge (*tableau I*).

**Tableau I. Exemples de maladies dont la fréquence augmente avec l'âge, ou directement liées à l'âge.**

Maladies dont la fréquence augmente avec l'âge (l'âge n'est pas le facteur de risque principal)	Maladies liées à l'âge (l'âge est le facteur de risque principal)
Cancer	Maladie d'Alzheimer
Diabète de type 2	Cataracte
Maladies rénales chroniques	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
Maladie coronarienne	(DMLA)
Accident vasculaire cérébral	Ostéoporose
...	Sarcopénie
	...

La perte structurale et fonctionnelle des protéines fait partie de ces facteurs [10]. Ce processus moléculaire, pouvant avoir différentes origines, dont la glycation, induit différents dommages cellulaires et tissulaires.

L'équipe de Vincent M. Monnier (Case Western Reserve University, Cleveland, États-Unis) a été la première à montrer, en 1996, une corrélation entre la durée de vie d'un organisme et la concentration en AGE. Ils se sont intéressés à la pentosidine, un AGE largement étudié, comme la CML [11]. La pentosidine s'accumule plus fortement chez les animaux ayant une longévité plus longue (singe, Homme, cochon) que chez les animaux ayant une longévité courte (musaraigne, vache, chien), suggérant une accumulation des AGE avec l'âge. Chez l'Homme, les AGE s'accumulent au cours du vieillissement dans les tissus et les organes. L'accumulation



d'AGE semble délétère, puisqu'une corrélation a été observée entre le premier tertile des concentrations les plus élevées en CML et le plus haut taux de mortalité chez des patients de 65 ans et plus, toutes causes confondues [12]. Le collagène, qui a une demi-vie longue, est fortement glyquée. Cette protéine représente 5 % du poids du corps humain, et les conséquences de ses modifications après glycation sont importantes : que ce soit au niveau esthétique, avec la perte de souplesse de la peau ; ou sur la qualité de vie, avec l'apparition d'arthrose et des douleurs qui l'accompagnent.

Au niveau oculaire, d'autres protéines à très longue demi-vie, les cristallines, sont fortement glyquées, avec risque de cécité, comme au cours de la cataracte. La glycation entraîne la réticulation des cristallines qui augmente l'opacité du cristallin [13]. Le stress oxydant favorisé par le réarrangement structural de ces protéines perturbera l'homéostasie radicalaire du cristallin, qui est un milieu particulièrement sensible à l'oxydation. Les AGE peuvent également s'accumuler au niveau de la rétine, plus particulièrement au niveau des *drusen* dans la macula, et favoriser sa dégénérescence au cours de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Les AGE, *via* RAGE, stimulent les cellules épithéliales de la rétine qui vont produire du VEGF et stimuler la formation de néovaisseaux par les cellules endothéliales.

De nombreuses études expérimentales ont mis en évidence un lien possible entre les produits de glycation et la maladie d'Alzheimer. La toxicité du peptide  $\beta$  amyloïde et son rôle dans la neurodégénérescence sont en partie associés à son niveau de glycation [14]. Le peptide  $\beta$  amyloïde étant un ligand de RAGE, la réponse associée à son interaction avec ce récepteur contribue au maintien de l'état inflammatoire et oxydant, de la dysfonction synaptique, de l'apoptose et de l'agrégation de ce peptide [15]. Des AGE sont également retrouvés au niveau du liquide céphalo-rachidien, de la microglie, des neurones et des plaques séniles, où ils participent à l'activation de RAGE [16]. En fonction de la quantité d'AGE présents, l'activation de RAGE peut entraîner une réponse antioxydante bénéfique (faible quantité d'AGE), ou un environnement inflammatoire et oxydant (forte quantité d'AGE).

Une balance AGE-RAGE identique a été observée dans la physiopathologie de l'ostéoporose. Ce déséquilibre dépendrait de la concentration en ligands de RAGE. Une faible concentration en AGE stimule l'autophagie des ostéoblastes, et donc leur fonction et viabilité. À l'inverse, une plus forte concentration en AGE induit, *via* l'activation de RAGE, une apoptose des cellules osseuses. Des études supplémentaires sont indispensables pour confirmer le rôle de l'axe AGE-RAGE dans le déséquilibre du remodelage osseux, puisque cet axe peut, par exemple, inhiber les effets destructeurs des ostéoclastes [17]. Le tissu conjonctif intramusculaire peut également perdre en souplesse suite à la réticulation de ses protéines. Ceci

va engendrer une diminution de la force et de la fonction musculaire associée à la sarcopénie [18].

Comme la glycation endogène, l'axe AGE-RAGE semble avoir un rôle physiopathologique essentiel au cours du vieillissement. Nos études expérimentales ont mis en évidence l'implication de cet axe dans le vieillissement artériel et rénal [19]. Au niveau artériel, des souris soumises à un régime riche en CML ont montré une dysfonction endothéliale, une perte de souplesse et un vieillissement prématuré par rapport aux souris sous régime contrôle. L'implication de RAGE a été confirmée grâce à l'utilisation de souris RAGE<sup>-/-</sup> n'exprimant pas ce récepteur. Ces animaux génétiquement modifiés sont protégés contre le vieillissement artériel accéléré induit par l'interaction CML-RAGE. En revanche, RAGE ne semble pas intervenir dans l'absorption de cet AGE, puisque les concentrations de CML urinaires sont les mêmes, que ce soit chez les souris sauvages ou modifiées.

En ce qui concerne les reins, les lésions liées à la néphrosclérose (hyalinose, atrophie tubulaire, fibrose et sclérose glomérulaire), ainsi que l'amylose sénile, sont réduites chez les souris RAGE<sup>-/-</sup>. Le ralentissement du vieillissement rénal chez ces souris est associé à une baisse des marqueurs inflammatoires et oxydants, suggérant le rôle de RAGE dans l'activation du processus inflammatoire lié au vieillissement, l'*inflammaging*.

#### **4. Implication de l'axe ligands-RAGE dans l'*inflammaging***

Le vieillissement est associé à l'apparition d'une inflammation à bas bruit systémique et stérile qui a un impact conséquent sur la qualité du vieillissement et l'apparition des maladies liées au vieillissement. Cet état inflammatoire, appelé *inflammaging*, est caractérisé principalement par la capacité des cellules à produire différentes cytokines, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6. Les concentrations plasmatiques de ces cytokines augmentent, ainsi que les principaux marqueurs inflammatoires, comme la protéine C réactive (CRP).

Différentes molécules dysfonctionnelles induisent la production de ces marqueurs inflammatoires après reconnaissance par des récepteurs de la réponse immunitaire innée. Elles sont donc des stimulants potentiels des réponses pro-inflammatoires, et sont considérées comme des signaux de danger exogènes et endogènes qui s'accumulent au cours du vieillissement et de conditions pathologiques. Ces molécules dysfonctionnelles comprennent aussi bien des produits microbiens, que des produits issus de cellules endommagées ou sénescents, ainsi que des débris cellulaires : ADN mitochondrial, protéines modifiées et non fonctionnelles, et ERO. Les récepteurs de la réponse immunitaire innée pouvant reconnaître ces molécules sont nombreux et présentent des spécificités plus ou moins larges, définissant

l'importance du rôle de ces récepteurs dans l'*inflammaging*.

Les récepteurs clés de l'*inflammaging* seront ceux qui reconnaîtront une plus grande variété de signaux de danger. RAGE fait partie de ces récepteurs. RAGE possède notamment une famille de ligands très variée contenant tous des feuillettes  $\beta$  et des charges négatives, ce qui permet leur reconnaissance par le récepteur, notamment au niveau des domaines V et C1, chargés positivement. Les ligands de RAGE sont des signaux de danger exogènes, comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif et l'ARN microbien, et endogènes comme :

1) les motifs moléculaires associés aux dégâts, ou *damage-associated molecular pattern* (DAMP) : la *high-mobility group box 1* (HMGB1), l'ADN mitochondrial, et les protéines S100 ;

2) les protéines endommagées/malformées : protéines oxydées, dont la LDL oxydée, et les fibrilles et agrégats amyloïdes ;

3) les produits issus des dommages protéiques : les AGE.

La fixation de ces ligands à RAGE active une réponse oxydante et inflammatoire qui est maintenue, car elle induit l'expression du récepteur, mais également la synthèse des DAMP, l'oxydation des protéines, et la formation d'AGE (*figure 1*).

L'implication de RAGE dans l'*inflammaging* est d'autant plus évidente que ce récepteur peut également induire la sénescence prématurée des cellules *via* la voie de signalisation p21 qui est dépendante du stress du réticulum [20]. Les cellules sénescents ont un rôle clé dans l'*inflammaging* en produisant des signaux de danger, mais également des molécules inflammatoires.

Le rôle essentiel de RAGE et de ses nombreux ligands - dont les AGE - dans l'inflammation, désigne ce récepteur comme une cible thérapeutique potentielle pour ralentir les processus physiopathologiques du vieillissement. Les souris RAGE<sup>-/-</sup> sont d'ailleurs protégées du vieillissement physiologique [21].

## 5. Stratégies thérapeutiques

Afin de limiter l'activation de RAGE, plusieurs stratégies peuvent être adaptées : le ciblage des ligands ou du récepteur, qui comprend l'inhibition de leur formation et/ou leur séquestration, ou l'activation de RAGE par ses ligands en recherchant des antagonistes.

RAGE étant un récepteur multi-ligand, il est impossible de cibler tous les ligands, sachant que certains ont des rôles essentiels dans le maintien des fonctions cellulaires, comme HMGB1 et les protéines S100. De même, le ciblage du récepteur peut entraîner une inhibition des

isoformes solubles qui ont un rôle essentiel dans l'élimination des molécules de danger.

Le ciblage des AGE, et plus particulièrement de la glycation, est pertinent, car la formation de ces composés est particulièrement délétère pour l'organisme et leur toxicité n'est pas uniquement dépendante de RAGE. Le stress oxydant ayant un rôle majeur dans la pathogénicité de la glycation, l'utilisation de composés antioxydants représente une piste pertinente. Une étude récente a testé le pouvoir anti-glyquant des polyphénols [22]. Ces molécules peuvent inhiber plusieurs étapes de la glycation : l'oxydation du produit d'Amadori, et la modification des protéines par les composés dicarbonylés en séquestrant ces derniers. Les polyphénols diminuent également l'expression de RAGE, certainement en réduisant l'oxydation, et donc l'inflammation. Plusieurs études ont examiné les effets de composés susceptibles d'inhiber la formation d'AGE, mais aucun n'est à ce jour suffisamment efficace et sans effet secondaire. Par exemple, l'aminoguanidine a présenté des résultats prometteurs chez le chien et le rat, mais elle a été abandonnée suite aux effets indésirables trop importants chez l'Homme [1]. Ces composés restent cependant des outils très importants en recherche. L'utilisation d'aminoguanidine a, par exemple, permis de démontrer l'importance de la glycation dans la neurotoxicité expérimentale du peptide  $\beta$  amyloïde [14].

En ce qui concerne l'activation de RAGE, différentes molécules naturelles, comme la papavérine, et de synthèse, comme FPS-ZM1 et azeliragon, sont des ligands de RAGE à forte affinité. La fixation de ces ligands sur la partie extracellulaire de RAGE bloque son activation par ses ligands. L'efficacité de ces antagonistes a été démontrée dans quelques études expérimentales murines prometteuses pour l'homme. Leur utilisation a d'ailleurs permis de confirmer l'implication de l'axe ligand-RAGE dans différents modèles de pathologies, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et la maladie d'Alzheimer [8]. Seul l'antagoniste azeliragon a été testé (36 mois) en essai clinique dans le cadre de la prévention de l'aggravation déclin cognitif léger à modéré au cours de la maladie d'Alzheimer. En analyse de sous-groupe, l'azeliragon prévient significativement ce déclin chez les patients diabétiques de type 2 [23].

Différentes études sont en cours pour évaluer et optimiser les effets d'autres antagonistes de RAGE. Certains de ces antagonistes ciblent la partie cytoplasmique de RAGE afin d'empêcher la fixation des molécules adaptatrices (comme mDiaphanous-1, mDia-1) qui permettent l'activation des voies de signalisation. La combinaison d'antagonistes ciblant les parties extracellulaire et cytoplasmique de RAGE pourrait permettre une meilleure prévention des pathologies associées à l'activation de RAGE.

## **Conclusion**

Les AGE sont formés sur les protéines après modification post-traductionnelle non enzymatique de ces protéines, ou en conditions oxydantes. De nombreuses études ont mis en évidence les dommages cellulaires et tissulaires induits par l'accumulation des AGE dans les tissus et organes. Les AGE sont impliqués dans différentes pathologies, et ils exercent leur toxicité en modifiant la structure et la fonction des protéines glyquées ou en activant RAGE. L'activation de RAGE induit un environnement inflammatoire et oxydant qui stimule, respectivement, l'expression du récepteur et la production d'AGE. Un cercle vicieux s'instaure et maintient l'état inflammatoire qui peut être observé dans les maladies inflammatoires chroniques ou l'inflammation liée au vieillissement, appelé *inflammaging*. Comme RAGE a d'autres ligands dont la plupart sont également des signaux de danger exogènes et endogènes, ce récepteur a certainement un rôle clé dans l'*inflammaging*, d'autant qu'il régule le vieillissement physiologique. Afin de limiter les pathologies associées au vieillissement, il est indispensable d'optimiser les stratégies préventives et thérapeutiques qui ciblent l'activation de RAGE.

---

## **Déclaration d'intérêt**

Les auteurs sont des consultants occasionnels pour différents laboratoires privés ou publiques dans les domaines de l'alimentation et la santé

## Références

1. Boulanger E, Puisieux F, Gaxatte C, Wautier JL. Vieillessement : rôle et contrôle de la glycation. *Rev Med Interne* 2007; 28:832-40.
2. Vazzana N, Santilli F, Cucurullo C, Davi G. Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Intern Emerg Med* 2009; 4:389-401.
3. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1498:99-111.
4. Wautier MP, Massin P, Guillausseau PJ, et al. N(carboxymethyl)lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2003; 29:44-52.
5. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813-20.
6. Brouwers O, Niessen PM, Miyata T, et al. Glyoxalase-1 overexpression reduces endothelial dysfunction and attenuates early renal impairment in a rat model of diabetes. *Diabetologia* 2014; 57:224-35.
7. Miyata T, Kurokawa K, Van Ypersele de Strihou C. Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1744-52.
8. Body-Malapel M, Djouina M, Waxin C, et al. The RAGE signaling pathway is involved in intestinal inflammation and represents a promising therapeutic target for Inflammatory Bowel Diseases. *Mucosal Immunol* 2019; 12:468-78.
9. Deane R, Du Yan S, Subramanyam RK, et al. RAGE mediates amyloid- $\beta$  peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 2003; 9:907-13.

10. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153:1194-217.
11. Sell DR, Lane MA, Johnson WA, et al. Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:485-90.
12. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; 65:963-75.
13. Tessier F, Moreaux V, Birlouez-Aragon I, et al. Decrease in vitamin C concentration in human lenses during cataract progression. *Int J Vitam Nutr Res* 1998;68:309-15.
14. Li XH, Du LL, Cheng XS, et al. Glycation exacerbates the neuronal toxicity of  $\beta$ -amyloid. *Cell Death Dis* 2013; 4:e673.
15. Cai Z, Liu N, Wang C, et al. Role of RAGE in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol* 2016; 36:483-95.
16. Frimat M, Daroux M, Litke R, et al. Kidney, heart and brain: three organs targeted by ageing and glycation. *Clin Sci (Lond)* 2017; 131:1069-92.
17. Plotkin LI, Essex AL, Davis HM. RAGE signaling in skeletal biology. *Curr Osteoporos Rep* 2019; 17:16-25.
18. Haus JM, Carrithers JA, Trappe SW, Trappe TA. Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* 2007; 103:2068-76.

19. Grossin N, Auger F, Niquet-Leridon C, et al. Dietary CML-enriched protein induces functional arterial aging in a RAGE-dependent manner in mice. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59:927-38.
20. Liu J, Huang K, Cai GY, et al. Receptor for advanced glycation end-products promotes premature senescence of proximal tubular epithelial cells via activation of endoplasmic reticulum stress-dependent p21 signaling. *Cell Signal* 2014; 26:110-21.
21. Teissier T, Quersin V, Gnemmi V, et al. Knockout of receptor for advanced glycation end-products attenuates age-related renal lesions. *Aging Cell* 2019; 18:e12850.
22. Crascì L, Lauro MR, Puglisi G, Panico A. Natural antioxidant polyphenols on inflammation management: Anti-glycation activity vs metalloproteinases inhibition. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018; 58:893-904.
23. Burstein AH, Sabbagh M, Andrews R, et al. Development of azeliragon, an oral small molecule antagonist of the receptor for advanced glycation endproducts, for the potential slowing of loss of cognition in mild Alzheimer's disease. *J Prev Alzheimers Dis* 2018; 5:149-54.