

DESCRIPTIF DU SUJET DE THESE

Nom et prénom du directeur de thèse : TESSIER Frédéric

Intitulé du sujet de thèse :

Rôle de l'alimentation dans l'inflammaging : accumulation endogène de produits de glycation et activation de récepteurs spécifiques

Role of diet in inflammaging: endogenous accumulation of glycation products and activation of specific receptors

Résumé du sujet de thèse

La carboxyméthyl-lysine (CML) et d'autres produits de glycation se retrouvent à des niveaux élevés dans plusieurs familles d'aliments transformés de consommation courante tels que le café, la chicorée, les produits céréaliers ultra-transformés, les laits infantiles etc... L'exposition à la CML dès la période périnatale et tout au long de la vie soulève des questions de sécurité sanitaire, notamment sa participation à l'inflammation chronique à bas bruit et au vieillissement.

L'objectif de ce projet est de comprendre par quels mécanismes biologiques la CML alimentaire s'accumule dans l'organisme et favorise l'inflammation. Notre équipe a déjà montré la toxicité de la CML alimentaire sur la fonction rénale et la santé vasculaire, mais l'originalité de cette étude sera de révéler les mécanismes biologiques à l'origine de l'accumulation de la CML dans différents tissus et organes.

Notre stratégie consistera à utiliser des modèles cellulaires et des souris transgéniques pour découvrir les mécanismes par lesquels la CML alimentaire s'installe dans les organes, mais aussi comment ce produit de glycation peut être éliminé après une exposition chronique.

Ce sujet de thèse s'inscrit dans un programme plus ambitieux de compréhension des facteurs de risques modifiables (alimentation) du vieillissement et de développement de cibles thérapeutiques anti-inflammaging.

Ce projet permettra aussi d'apporter un certain nombre de réponses aux inquiétudes des consommateurs à l'égard de la consommation croissante d'aliments ultra-transformés potentiellement riches en CML, et sera une aide à la décision pour les industriels du secteur agroalimentaire désireux de faire émerger des aliments plus sains.

Abstract

Carboxymethyl-lysine (CML) and other glycation products are found at high levels in several groups of commonly consumed processed foods such as coffee, chicory, ultra-processed cereal products, infant formula, etc. Exposure to CML in the perinatal period, and throughout life, raises health safety issues including its involvement in low-grade inflammation and aging.

The objective of this project is to understand by which biological mechanisms dietary CML accumulates in the body and promotes inflammation. Our team has already shown the toxicity of dietary CML on renal function and vascular health, but the originality of this study will be to reveal the biological mechanisms that cause the accumulation of CML in different tissues and organs.

Our strategy will be to use cell models and transgenic mice to discover the mechanisms by which dietary CML accumulates in some organs, but also how this glycation product can be eliminated after chronic exposure.

This thesis subject forms part of a larger, more ambitious program of understanding modifiable risk factors of aging (diet), and of developing anti-inflammaging therapeutic approaches.

This project aims to provide responses to mounting concerns surrounding the increasing consumption of ultra-processed foods potentially high in CML, and to be a decision aid for the agri-food industry to develop healthier foods

DESCRIPTIF DU SUJET

1) Le sujet de recherche choisi et son contexte scientifique et économique :

La glycation, aussi appelée réaction de Maillard est un sujet de recherche qui connaît actuellement un regain d'intérêt. Cette réaction non enzymatique entraîne la fixation de sucres réducteurs (glucose, fructose...) sur les groupements aminés des protéines. Elle conduit à la formation d'un groupe hétérogène et complexe de molécules appelé produits de glycation avancée (AGE). Ces AGE sont retrouvés dans de nombreux aliments après transformation domestique ou industrielle. La torréfaction, la cuisson au gril, la friture et d'autres procédés à haute température accélèrent, en particulier, la formation d'AGE alimentaires (également appelés AGE exogènes, exoAGE).

S'agissant des plus connus (fructoselysine, carboxyméthyllysine, pentosidine, acrylamide...) quelques travaux ont évalué leur digestion, métabolisme, excrétion et effets sur la santé. La classification de l'acrylamide comme molécule probablement cancérigène pour l'homme (Classe 2A selon le Centre International de Recherche sur le Cancer) mais aussi l'avis scientifique de l' *European Food Safety Authority* (EFSA) a conduit très récemment les autorités européennes à réglementer la teneur de ce produit de glycation dans les produits alimentaires et, en particulier, dans les aliments pour nourrissons et enfants en bas âge (Journal officiel de l'Union européenne, 2017). Cependant, les rôles physio-pathologiques d'autres AGE tels que la carboxyméthyl-lysine (CML), connus pour être présents à plus forte concentration que l'acrylamide dans certains aliments transformés, reste à élucider.

La CML est l'un des produits de la glycation les plus étudiés. On retrouve cet AGE non seulement dans les aliments (Niquet-Léridon & Tessier 2011) mais aussi *in vivo* chez l'homme. Une attention particulière est actuellement accordée aux laits infantiles contenant de la CML (Pischetsrieder & Henle, 2010). Il est bien établi que ces formules infantiles peuvent contenir jusqu'à 70 fois plus de CML que le lait maternel. L'autre groupe d'aliments qui contribue le plus à l'exposition à la CML dans la population, y compris les enfants, est le groupe des céréales. Le pain, les céréales de petit-déjeuner, les biscuits et les autres produits ultra-transformés figurent parmi les principales sources de CML alimentaire (Tessier & Birlouez 2012). La forte concentration de CML dans les préparations pour nourrissons et les aliments à base de céréales est clairement causée par le processus complexe de transformation utilisé par l'industrie et par la teneur élevée en protéines et en sucres qui interagissent pour former la CML.

Des études récentes, y compris les nôtres, montrent qu'après l'administration orale de CML à la fois chez l'animal et chez l'homme, ce composé est bien absorbé et s'accumule dans les organes et les tissus (Tessier et al. 2016). L'exposition à la CML alimentaire au cours de la période périnatale (période critique) et plus tard dans la vie adulte a récemment soulevé des questions quant à sa nocivité pour la santé humaine, en particulier le stress oxydatif, l'inflammation et le vieillissement. Des données récentes de notre équipe de recherche et d'autres équipes indiquent que la CML retrouvée dans les préparations pour nourrissons et d'autres aliments est un facteur de risque modifiable de vieillissement vasculaire et rénal (Grossin et al. 2015, Teissier et al. 2019), de syndrome métabolique, de démence (Cai et al. 2014), de dégénérescence maculaire (Semba et al. 2014) et d'allergie (Baskara et al. 2017). Une activation cellulaire induite par une liaison directe ou indirecte de la CML à un récepteur majeur des AGE (le RAGE) semble être l'élément central de l'action biologique de cet AGE alimentaire. L'interaction entre la CML et le récepteur RAGE semble aussi être contrôlée par d'autres récepteurs aux AGE (récepteur cellulaires dits « scavenger »).

Cependant, les mécanismes biologiques exacts par lesquels la CML alimentaire s'accumule dans les organes et affecte la santé restent inconnus. Notre projet de thèse sur 3 ans a donc pour objectif de révéler les principaux mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à l'accumulation et aux effets délétères de la CML alimentaires.

Ce projet suit les recommandations de l'Académie Nationale de Pharmacie (Conseil du 12 février 2014) mais s'inscrit aussi dans les priorités identifiées par la société savante FMarS (Francophone Maillard Reaction Society). Cette société savante a été créée en 2016 sous l'impulsion de la région Hauts-de-France.

2) L'état du sujet dans le laboratoire d'accueil :

Notre équipe est experte internationale sur la thématique de la glycation chez l'homme et, plus largement, sur la thématique de la réaction de Maillard. Le responsable du laboratoire d'accueil, le Pr Eric BOULANGER, a une expertise reconnue sur la glycation et l'implication du récepteur RAGE dans le vieillissement et l'inflammation. Le directeur de la thèse proposée, le Pr Frédéric TESSIER, a été récemment nommé « *président elect of the International Maillard reaction society* » et a une expertise autour de l'analyse des AGE aussi bien dans les aliments qu'in vivo.

Nous avons démontré que sous l'effet d'un régime (6 semaines) enrichi en CML marquée au carbone 13 (^{13}C -CML), il existe une accumulation importante de CML dans les tissus, avec une nette prédominance rénale, pulmonaire et intestinale chez la souris classiques C57BL/6 (Tessier et al. 2016).

Nous avons aussi montré chez des souris C57BL/6 qu'un régime enrichi en CML entraîne, via le récepteur RAGE et dès 9 mois, une dysfonction endothéliale et une augmentation de la rigidité aortique en lien avec un vieillissement vasculaire artériel accéléré (Grossin et al. 2015). Il faut préciser qu'il est admis que la CML représente l'AGE ayant la plus forte affinité pour le récepteur RAGE.

Très récemment, nous avons découvert de nouveaux effets délétères de la CML alimentaire sur la santé et plus précisément sur le vieillissement rénal. En effet, nous venons de montrer qu'après 24 mois de régime riche en CML, la glomérulosclérose rénale est significativement ($p < 0.01$) plus importante que chez les souris recevant un régime normal. Des souris (RAGE $^{-/-}$) dont le gène du récepteur RAGE, AGER, a été invalidé, sont protégées de cette accélération de la sclérose glomérulaire induite par la CML alimentaire (Teissier et al. 2019).

3) Les objectifs visés, les résultats escomptés

Objectifs

Notre projet de thèse sur 3 ans a donc pour objectif **1-** de comprendre par quels mécanismes biologiques la CML d'origine alimentaire s'accumule dans des organes et **2-** de comprendre comment une exposition précoce ou permanente à la CML alimentaire peut participer à l'installation d'une inflammation chronique à bas bruit et au vieillissement.

La nouveauté de ce projet de thèse est de révéler les principaux mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à l'accumulation et aux effets pro-inflammatoires de la CML alimentaires.

Résultats escomptés

Avec ce sujet de thèse, nous espérons pouvoir comprendre pourquoi la CML alimentaire s'accumule de manière préférentielle dans certains organes et quels sont les mécanismes à l'origine de cette accumulation. Plusieurs hypothèses ont été émises, mais tout reste à prouver.

Nous allons aussi, pour la première fois, valider ou invalider l'hypothèse d'une réversibilité de l'accumulation en cas de réduction de l'exposition alimentaire à la CML.

Enfin, l'induction d'une inflammation chronique par la fixation de la CML alimentaire sur le récepteur RAGE est très souvent évoquée dans la littérature. Il n'en demeure pas moins que plusieurs zones d'ombre subsistent. Cette thèse devrait répondre définitivement à la question des effets pro-inflammatoires de la CML alimentaire (sous forme d'acide aminé libre) médiée par le récepteur RAGE.

4) Le programme de travail avec les livrables et l'échéancier prévisionnel

Réversibilité de l'accumulation de la CML alimentaire dans les organes cibles – Implication du récepteur RAGE

Suite aux résultats de notre étude réalisée chez la souris C57BL/6 (Tessier et al. 2016) avec de la CML marquée au carbone 13 (^{13}C -CML), nous allons mesurer la concentration de CML libre (essentiellement d'origine alimentaire) et de CML protéique (essentiellement d'origine endogène) dans les reins, poumons et intestins de souris exposées à la CML alimentaire sur une période plus ou moins longue (**Fig.1**).

Nous allons observer la réversibilité de l'accumulation de la CML 4 et 8 semaines après l'exposition à la CML alimentaire. L'exposition sera elle-même d'une durée de 4 semaines (semaine 1 à 4), avec le sacrifice de plusieurs groupes de souris juste à la fin de l'exposition.

Cette expérience sera réalisée en parallèle sur des souris C57BL/6 WT et RAGE -/- de 10 semaines. Cela devrait nous permettre de confirmer l'accumulation RAGE indépendante de la CML dans les organes, et d'observer l'effet de RAGE sur l'élimination post-exposition de la CML.

Les souris RAGE -/- ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Ann-Marie SCHMIDT de l'université de New York.

La composition des deux régimes, dits « normal » et « riche en CML » sera optimisée avec la société Research Diet (NJ, USA).

	Semaine											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
8 souris WT				①								
8 souris WT				②								
6 souris WT								③				
8 souris WT								④				
6 souris WT												⑤
8 souris WT												⑥
8 souris RAGE KO				⑦								
8 souris RAGE KO				⑧								
6 souris RAGE KO								⑨				
8 souris RAGE KO								⑩				
6 souris RAGE KO												⑪
8 souris RAGE KO												⑫
Sacrifice		⑬										
Régime normal												
Régime riche en CML												

Figure 1 : protocole de l'expérimentation animale

En complément de l'objectif principal de cette tâche, certains marqueurs d'inflammation liée au vieillissement (TNF- α , Il-6), de stress oxydatif (SOD1, SOD2, 8-isoprostane, malondialdehyde) et de vieillissement (Klotho, ERR-1 α , Sirt1) seront évalués par différentes méthodes selon le biomarqueur considéré (qRT-PCR ; western blot ; ELISA ; HPLC). Ces biomarqueurs seront analysés dans les organes cibles de la CML alimentaire, mais aussi au niveau systémique lorsque cela sera approprié.

Devenir cellulaire de la CML alimentaire – Implication du récepteur RAGE

La CML alimentaire est portée essentiellement par les protéines, mais comme pour tous les acides aminés, la CML alimentaire est retrouvée dans la circulation uniquement sous forme d'acide aminé libre. L'accumulation de la CML alimentaire, mais aussi ses effets biologiques, ne semblent pouvoir être associés qu'à la forme libre de ce produit de glycation.

La deuxième partie du projet de thèse consistera à comparer le devenir de la CML libre avec celui d'une CML protéique en contact avec une lignée de cellules rénales embryonnaires humaines HEK, et à observer en quoi le récepteur RAGE peut influencer le transport cellulaire de la CML (**Fig.2**).

Nos données préliminaires non publiées ont permis de montrer que nous avons les moyens techniques pour quantifier la CML dans le cytoplasme et le noyau des cellules exposées à la CML.

Les cellules HEK de référence seront utilisées ainsi que des souches transfectées avec le gène AGER codant pour un des deux variants de RAGE : RAGE full-length (récepteur complet) et RAGE dominant negative (récepteur sans domaine cytoplasmique permettant la transduction du signal).

Ces différentes cellules seront exposées soit à de la CML libre, soit à de la CML protéique à des concentrations calculées sur la base de l'exposition réalisée sur le modèle murin (1^{ère} partie de cette thèse). La durée d'exposition sera estimée à l'aide de tests préliminaires sur des cellules HEK non transfectées.

Après exposition, les cytoplasmes et noyaux des différentes cellules seront séparés et analysés pour en déterminer la teneur en CML. Des études cinétiques d'apparition de la CML dans les deux compartiments seront envisagées.

Enfin, les effets pro-inflammatoires de la CML (libre et protéique) seront également mesurés sur les différentes lignées cellulaires avec les biomarqueurs précédemment décrits pour le modèle murin. Cette dernière tâche devrait permettre de clarifier le rôle de la CML libre versus CML protéique dans l'induction d'une inflammation médiée par RAGE, sur des cellules HEK.

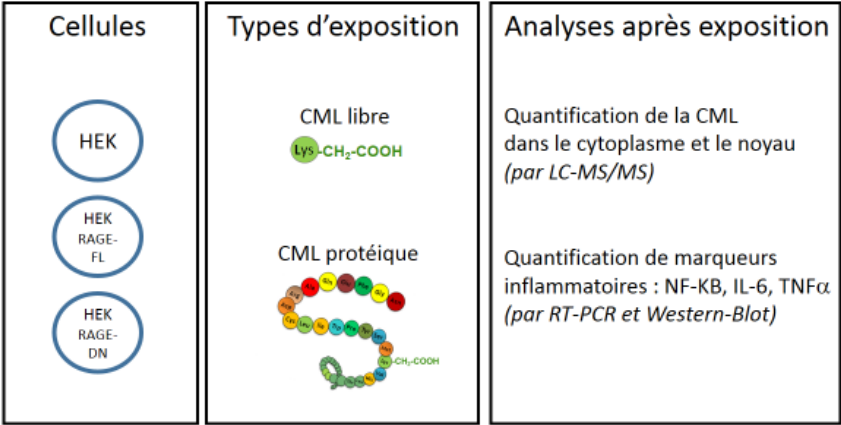


Figure 2 : Etude du devenir cellulaire de la CML alimentaire, cellules utilisées, type d'exposition à la CML et analyses prévues

Echéancier prévisionnel et livrables

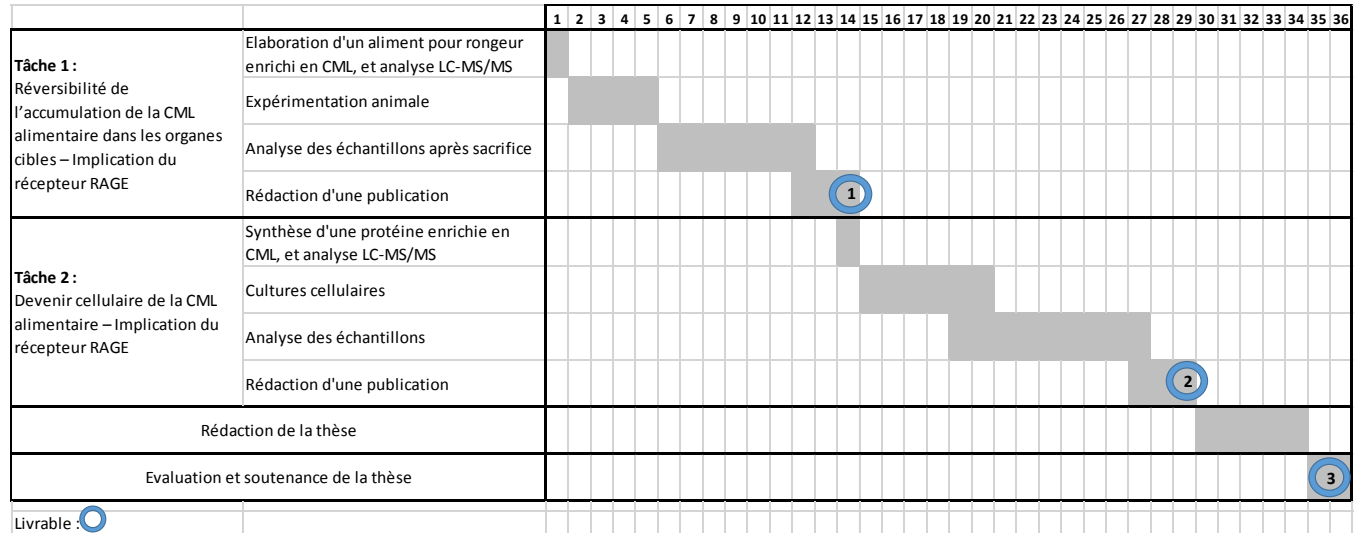


Figure 3 : Echéancier de la thèse sur 36 mois, avec 3 livrables (1 publication pour chaque tâche, et 1 manuscrit de thèse)

5) Les collaborations prévues (préciser le cadre, la nature des collaborations, l'ancrage national, international, la transdisciplinarité éventuellement)

Collaborations nationales :

L'équipe Innovations thérapeutiques (Dr Alina GHINET, HEI Lille), qui dispose d'une expertise en synthèse organique, sera en charge de la synthèse de la CML libre.

En lien étroit avec ce projet de thèse, une collaboration va être recherchée parmi nos contacts afin de mesurer l'effet de la forme de la CML (libre ou protéique) sur son affinité avec le récepteur RAGE. La résonance plasmonique de surface qui a déjà été utilisée pour étudier l'affinité de différents ligands de RAGE sera privilégiée.

Collaborations internationales :

Une collaboration est prévue avec la société Research Diets (NJ, USA), experte en synthèse à façon d'aliments pour rongeurs. Notre expertise sur la réaction de Maillard et l'analyse chimique des aliments sera partagée avec cette société afin de produire des aliments représentatifs des expositions faibles et élevées chez l'homme.

En fonction de nos besoins, d'autres échanges et collaborations pourront être envisagées avec les membres de FMaRS (francophones) et IMaRS (principalement européens et américains).

6) Une liste de 10 publications maximum portant directement sur le sujet en soulignant celles du laboratoire

Baskara I., Niquet-Léridon C., Anton P.M., Delayre-Orthez C. (2017) EMJ Allergy Immunol. 2(1), 87-98.

Cai W., Uribarri J., Zhu L., Chen X., Swamy S., Zhao Z., Grosjean F., Simonaro C., Kuchel G.A., Schnaider-Beeri M., Woodward M., Striker G.E., Vlassara H. (2014) Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 111(13), 4940-4945

Journal officiel de l'Union européenne. 21/11/2017. RÈGLEMENT (UE) 2017/2158 DE LA COMMISSION du 20 novembre 2017 établissant des mesures d'atténuation et des teneurs de référence pour la réduction de la présence d'acrylamide dans les denrées alimentaires.

Niquet-Léridon C., Tessier F.J. (2011) Quantification of Nε-carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 126, 655-663.

Pischetsrieder M., Henle T. (2012). Glycation products in infant formulas: chemical, analytical and physiological aspects. Amino Acids. 42(4):1111-1118.

Grossin N., Auger F., Niquet-Léridon C., Jacolot P., Durieux N., Montaigne D., Schmidt A.M., Susen S., Jacolot P., Beuscart J-B., Tessier F.J., Boulanger E. (2015). Dietary CML-enriched protein induces functional arterial aging in a RAGE-dependent manner in mice. Molecular Nutrition and Food Research. 59(5), 927-938.

Semba R.D., Cotch M.F., Gudnason V., Eiríksdóttir G., Harris T.B., Sun K., Klein R., Jonasson F., Ferrucci L., Schaumburg D.A. (2014) Serum carboxymethyllysine, an advanced glycation end product, and age-related macular degeneration: the Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik Study. JAMA Ophthalmol. 132(4), 464-470.

Teissier T., Quersin V., Gnemmi V., Daroux M., Howsam M., Delguste F., Lemoine C., Fradin C., Schmidt A-M, Cauffiez C., Brousseau T., Glowacki F., Tessier F.J., Boulanger E., Frimat M. (2018). Knockout of receptor for advanced glycation end-products attenuates age-related renal lesions. Aging Cell, in press.

Tessier F.J., Birlouez-Aragon I. (2012) Health effects of dietary Maillard reaction products – The results of ICARE and other studies. Amino Acids, 42, 1119-1131.

Tessier F.J., Niquet-Léridon C., Jacolot P., Jouquand C., Genin M., Schmidt A-M., Grossin N., Boulanger E. (2016). Quantitative assessment of organ distribution of dietary protein-bound 13C-labeled Nε-carboxymethyllysine after a chronic oral exposure in mice. Molecular Nutrition and Food Research, 60, 2446-2456.