

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Présentée et soutenue publiquement par

Axel GUILBAUD

Le 14 décembre 2018

**EFFET DU *Lactobacillus fermentum* ME-3
SUR LA GLYCATION ET LES DÉSORDRES MÉTABOLIQUES
DANS UN CONTEXTE DE DIABÈTE DE TYPE 2**

Thèse dirigée par le Professeur Frédéric TESSIER
et coencadrée par le Docteur Michael HOWSAM

Composition du Jury

Mme Dominique BONNEFONT-ROUSSELOT,	Professeur	Université Paris Descartes	Rapporteur
M. Vincent RIGALLEAU,	Professeur	Université de Bordeaux	Rapporteur
Mme Sophie LESTAVEL,	Professeur	Institut Pasteur de Lille	Examinatrice
M. Stéphane JAISSON,	Docteur	Université de Reims	Examineur
M. Frédéric TESSIER,	Professeur	Université de Lille	Directeur de thèse
M. Michael HOWSAM,	Docteur	Université de Lille	Coencadrant de thèse
M. Éric BOULANGER,	Professeur	Université de Lille	Invité

« *Tempora mori, tempora mundis recorda.* Voilà, eh ben ça par exemple, ça ne veut absolument rien dire, mais l'effet reste le même... »

Le roi Loth, *Kaamelott*, Livre III, tome I, épisode 27.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au sein de l'U995 LIRIC (Lille Inflammation Research International Center) de l'Université de Lille.

Je remercie sincèrement la société VF Bioscience dirigée par le **Dr. Marc Fremont** et **Maxime Vaeremans** de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de mon jury **Pr. Sophie Lestavel, Pr. Stéphane Jaisson, Pr. Dominique Bonnefont-Rousselot, Pr. Vincent Rigalleau** qui ont accepté de lire ce manuscrit et de juger l'ensemble de ce travail de thèse.

Je remercie infiniment le **Pr. Éric Boulanger**, le **Pr. Frédéric Tessier** et le **Dr. Michael Howsam**, pour m'avoir donné votre confiance, m'avoir encadré, conseillé et soutenu pendant l'ensemble de cette thèse. Vous avez cru en moi, m'avez fait prendre un peu plus confiance en moi et m'avez fait grandir.

Je remercie tout naturellement **Céline Niquet-Léridon, Philippe Jacolot, Hélène Duez, Wim Derave, Inge Everaert, Patrice Maboudou, Anne Garat, Aurore Thomas, Jérémy Thomas, Jean-François Goossens, Mostafa Kouach, Amandine Descat, Madjid Djouina**, pour m'avoir conseillé et m'avoir aidé techniquement à réaliser cette thèse de près ou de loin.

À partir de maintenant, je vais passer aux choses un peu plus sérieuses et un peu plus sentimentales (oui je ne suis pas totalement dénué d'émotions contrairement à ce que certains peuvent penser). Place aux remerciements personnels.

Je remercie chaleureusement **Fred** pour tout ce que tu m'as apporté pendant ces trois années. Je souhaite sincèrement à tous les futurs étudiants d'avoir cette qualité d'encadrement. Je n'aurais pas pu rêver mieux comme encadrants avec toi et **Mike**. Après trois ans, je vous avoue que je me suis vraiment attaché à notre trio. Merci pour ta patience inflexible, ton soutien, ton optimisme, ta pédagogie, ta bonne humeur, ton transfert de connaissance, ta disponibilité, ta passion pour les sciences. J'ai vraiment pris énormément de plaisir à travailler auprès de toi. Je t'admire énormément et si j'ai

pu faire tout ce chemin c'est en grande partie grâce à toi. J'espère cependant que travailler sur la glycation ne va pas me faire perdre mes cheveux.

Je remercie **Mike**, quelle fabuleuse surprise quand j'ai su que tu rejoignais l'équipe ! Merci pour toute ton aide, pour tes conseils, pour toutes ces discussions philosophiques, pour ton optimisme à toute épreuve, pour ta joie de vivre, pour tous tes mots, pour toutes ces pauses glaces et ces moments en dehors du labo ! Plus qu'un collègue, un ami, tu vas me manquer old bean ! Ces trois années auront été une affaire rondement menée.

Je tiens également à remercier **Éric** pour tous tes conseils, tes encouragements lors de nos réunions. Je suis dans l'obligation de te demander « Est-ce que tu vas au cinéma ? ». Je te souhaite à toi et à ton équipe un avenir le plus rayonnant possible.

Chantal, Reine du C. Elegans, merci pour ta bonne humeur, j'ai vraiment apprécié de pouvoir mieux te connaître lors de notre road trip américain.

Madame **Solenne**, je retiens ta proposition d'emploi dans ta future maison close si je ne trouve pas de travail. Merci de te préoccuper de notre sort à tous et merci pour ton esprit mal placé. Je retiendrai également que rire et boire en même temps ne font pas bon ménage.

Florian, désolé de te dire que tu n'es franchement pas inspirant. Jusqu'au bout tu vas m'e***** ?! Mon canard, tu m'auras fait rêver tout au long de cette thèse (les sacrifices, les bagarres, les olympiades, les mails, les rigolades, toutes les choses que je ne peux pas citer). Merci pour toute ton aide, ta bonne humeur, tes ronchonades, tes conneries, tes mails. Tu vas me manquer, vivement que vous déménagiez à Nantes et qu'on aille y boire des bières !!!

Thibault, collègue de bureau et avant tout un ami de longue date. Désolé de te décevoir mais je pense qu'Emma Watson ne répondra jamais à notre lettre... Nous suivrons séparément la quête du One Piece, mais il nous faudra en débriefer ! J'espère que tu supporteras la personne qui va prendre ma place (la connaissant cela risque d'être compliqué). Pour ma part, Einstein continuera de veiller sur moi.

Charles, le Messie qui a apporté sur nous la lumière du babyfoot !! Merci encore pour tous ces moments et je partirai sur une victoire contre toi ! Sans rancune Carlito.

Constance, je te souhaite de faire une très belle thèse. D'après ce que j'ai pu voir ces quelques mois, tu en es largement capable, rappelle-toi bien que tu mérites largement ta place. Je suis d'avance désolé pour l'équipe qui va devoir te supporter trois ans... Ah et aussi, pense à t'entraîner au babyfoot, ça ne peut que te faire du bien.

Merci à tous mes amis qui me comblent de bonheur depuis toutes ces années (**la Famille φ, les gayzous, la dream team**, chacun de vous se reconnaîtra).

Thibaud, mon frère, merci d'être là dans tous les évènements de ma vie. Pour tous ces soirs à geeker (en remerciant **Rockstar Games** au passage), tous ces week-end, tous ces voyages, tous ces plans foireux qu'on a pu faire depuis maintenant 8 ans. Ton paragraphe de thèse sur moi étant tout petit, je ne vais donc pas me faire chier non plus pour ta tronche. Comme tu le dis si bien, nous avons déjà un carnet, qui n'a pas de prix et qui est crade par ta faute, déjà bien garnis qui relate tous nos faits et gestes. J'ai hâte de voir vers quelles aventures la vie va nous mener. Combien de fois encore allons-nous sauver le monde ? INAPHNKWRT. Je t'aime bro'.

Un immense merci à **Ma Famille** que j'aime plus que tout même si je ne vous le dis pas assez. J'espère de tout cœur vous avoir rendu fier et j'espère un jour pouvoir vous rendre tout ce que vous m'avez apporté.

Merci également à ma belle-famille (**Blandine, Yann, Mazh** belle-sœur de moi et grosse paupiette, **Seb** beau-frère de moi, **Solal** mon petit canard de neveu) pour tous ces merveilleux moments passés à vos côtés dans les quatre coins du globe. Je n'aurais pas pu rêver mieux que vous comme belle famille.

Ces remerciements seraient largement incomplets si j'omettais de parler de mon amoureuse, **Clara**. Toi mon doudou, ma saucisse (surnom somme toute surprenant, mais tout autant que la personne à qui il est attribué), je ne te remercierai jamais assez pour tout le bonheur que tu m'apportes quotidiennement et qui grandit constamment. Au-delà de tout l'amour que je te porte et de manière totalement objective (oui madame), tu es une personne incroyablement bonne et douce. L'humanité se porterait incroyablement mieux avec plus de gens comme toi. En revanche (tu as vu **Fred**, je n'ai pas dit « du coups »), nous serions dans une société dictée par le dogme de la frite, des pancakes et des ratons laveurs... Merci de me soutenir, de me supporter et de me faire grandir depuis toutes ces années malgré ta petite taille. Je t'aime infiniment, actuellement et pour longtemps. Mamamama.

Résumé

Effet d'un *Lactobacillus fermentum* ME-3 sur la glycation et les désordres métaboliques dans un contexte diabétique

Le diabète de type 2 est une pathologie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique. Cette pathologie induit progressivement des dommages à l'organisme à travers plusieurs voies mécanistiques dont celle de la glycation. Cette réaction chimique conduit à une liaison entre un sucre réducteur et la fonction amine d'un acide aminé, d'un peptide ou d'une protéine. Plusieurs stratégies thérapeutiques visant à réduire la formation et l'accumulation des produits de glycation ont été testées au cours des 30 dernières années. Certaines équipes scientifiques ont cherché des molécules synthétiques ou naturelles capables de métaboliser ou séquestrer les précurseurs des produits de glycation. D'autres ont essayé d'inhiber le récepteur aux produits de glycation avancés (RAGE) avec des anticorps ou des inhibiteurs spécifiques. Malgré les efforts récemment déployés, aucun traitement « anti-glycation » ne s'avère aujourd'hui efficace pour réduire les produits de glycation dans l'organisme ou pour limiter leurs actions délétères sur la santé.

Depuis peu, les chercheurs étudient le microbiote intestinale et notamment l'action de probiotiques sur le contrôle de la glycémie et des complications chez le sujet diabétique. Des études précliniques et cliniques ont montrés les effets de certains probiotiques sur la prise de poids et le métabolisme du glucose. Même si ces études ont relevé les effets des probiotiques sur différents paramètres glucidiques, aucune n'a investigué leur effet sur la glycation.

Ainsi, le double objectif de cette thèse a été de comparer plusieurs modèles murins de glycation dans un contexte de diabète de type 2 (modèles génétiques et alimentaires), puis d'utiliser le modèle le plus pertinent pour étudier les effets d'une souche bactérienne spécifique, le *Lactobacillus fermentum* ME-3, sur la glycation et les désordres métaboliques dans un contexte diabétique. L'ensemble des mesures de produits de glycation, c'est-à-dire la furosine, la carboxyméthyllysine libre et protéique (CML), dans les organes et le plasma ont été réalisées par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem. En premier lieu, nous avons pu montrer que le modèle génétique de diabète $\text{LepR}^{db/db}$ permet d'obtenir une glycation significative des organes et fluides testés (reins, poumons, cœur, foie, plasma) contrairement aux modèles alimentaires de diabète (*High Fat Diet* et *High Fat High Sucrose*) qui, malgré une prise de poids importante et une intolérance au glucose induite par les régimes, n'ont montré aucune augmentation significative des teneurs en furosine et CML. Dans un second temps, en utilisant le modèle génétique de diabète, nous avons pu montrer qu'un traitement de trois mois à base de la souche ME-3 chez des souris normales ($\text{LepR}^{db/+}$) et $\text{LepR}^{db/db}$ avait des effets bénéfiques sur la prise de poids (-4.6% et -14% respectivement chez les souris $db/+$ et db/db) et la tolérance au glucose. Il a aussi été observé une réduction de la furosine rénale (-14.5% et -12.3% respectivement chez les souris $db/+$ et db/db) et une réduction de la CML libre dans les reins (-18% et -25% respectivement chez les souris $db/+$ et db/db) et les poumons (-10% et -19 % respectivement chez les souris $db/+$ et db/db). Cette étude préclinique a permis d'observer d'autres effets de la souche ME-3. Parmi ceux-ci, le plus marquant est celui d'une réduction du développement de la stéatose hépatique (-23% et -41% des triglycérides hépatiques, -12% et -21% du marqueur de souffrance hépatique ALAT respectivement chez les souris $db/+$ et db/db , et une baisse de 27% du TNF- α marqueur de l'inflammation chez les souris db/db).

En conclusion, ces travaux ont permis de caractériser un modèle murin de diabète de type 2 utile pour l'étude de la glycation et la mise en place de futures stratégies thérapeutiques « anti-glycation ». Ils ont aussi permis de mettre en évidence des effets bénéfiques de la souche ME-3 sur la glycation et sur les désordres métaboliques dans un modèle de diabète de type 2.

Mots clés : Diabète de type 2, glycation, foie, rein, microbiote, *Lactobacillus fermentum* ME-3

Abstract

The effect of a *Lactobacillus fermentum* ME-3 on glycation and metabolic disorders in a diabetic context

Type 2 diabetes is a metabolic pathology characterized by chronic hyperglycemia. The disease progressively induces organ damage through several mechanisms, one of the which is the glycation pathway. This chemical reaction results in a bond forming between a reducing sugar and the amine function of an amino acid, a peptide or a protein. Over the last 30 years several studies have described therapeutic strategies to reduce the formation and accumulation of glycation products. Scientists have investigated synthetic or natural molecules that can metabolize or sequester precursors of glycation products. Others have tried to inhibit the main receptor of advanced glycation endproducts (RAGE) with specific antibodies or receptors. Despite these efforts, there is still no effective “anti-glycation” treatment able to reduce glycation products in the organism or limit their deleterious effects on health.

Scientists have recently investigated the gut microbiota, and notably the actions of probiotics on glycemic parameters and the complications associated with diabetes. Preclinical and clinical trials have shown the effect of certain probiotics on weight gain and upon glucose metabolism. But while these studies have reported the effect of probiotics on different glucidic parameters, no one has yet investigated their effect on glycation.

Thus, the double goal of this thesis was to compare different rodent models of glycation in a type 2 diabetes context (genetic and dietary-induced obesity (DIO) models), and then to use the most pertinent model to study the effects of a specific bacterial strain, *Lactobacillus fermentum* ME-3, on glycation and metabolic disorders in this diabetic context. The ensemble of glycation products measured, namely furosine, free and protein-bound carboxymethyllysine (CML) in organs and in plasma, were performed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.

Firstly, we showed that the genetic LepR^{db/db} model of diabetes exhibited significantly greater glycation in tested organs and fluids (kidneys, lungs, heart, liver and plasma) compared with DIO models (*High Fat* and *High Fat High Sucrose Diet*) which, despite dietary-induced weight gain and glucose intolerance, showed no significant increase in furosine or CML levels.

Secondly, using the genetic model of diabetes, we showed that a treatment with ME-3 over three months in wild-type mice (LepR^{db/+}) and LepR^{db/db} had beneficial effects upon weight gain (-4.6% and -14% in *db/+* and *db/db* mice, respectively) and glucose tolerance. We also observed a reduction of furosine levels in kidneys (-14.5% and -12.3% in *db/+* and *db/db* mice respectively) and a reduction of free CML in both the kidneys (-18% and -25% in *db/+* and *db/db* mice, respectively) and the lungs (-10% and -19% in *db/+* and *db/db* mice, respectively). This preclinical study observed other effects of the ME-3 strain on health. Among these, the most marked was a reduction in development of hepatic steatosis (-23% and -41% of hepatic triglycerides, -12% and -21% of ALAT (a marker of liver injury) in *db/+* and *db/db* mice, respectively; and a 27% reduction in *db/db* mice of TNF- α , an inflammation marker).

To conclude, this work has characterized a rodent model of type 2 diabetes for the study of glycation and future development of therapeutic strategies against glycation. It has also highlighted the beneficial effects of the ME-3 strain on both glycation and metabolic disorders in a type 2 diabetes model.

Key words: Type 2 diabetes, glycation, liver, kidneys, microbiota, *Lactobacillus fermentum* ME-3

Sommaire

LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DE ABBRÉVIATIONS	16
AVANT-PROPOS.....	19
INTRODUCTION	22
I. La glycation	23
I.1. La réaction de Maillard ou glycation	23
I.1.I. La découverte de la réaction de Maillard.....	23
I.1.II. L'étape précoce de la réaction de Maillard	26
I.1.III. Des produits précoces jusqu'aux produits avancés de glycation	28
I.2. Mécanismes d'action des AGE sur l'organisme	30
I.2.I. Effets RAGE indépendants.....	31
I.2.II. Effets RAGE dépendants.....	34
I.3. La glycation exogène et ses effets	36
I.4. Liens entre glycation et diabète	37
I.4.I. Définition du diabète	37
I.4.II. Épidémiologie du diabète.....	38
I.4.III. Les caractéristiques et causes du diabète	40
I.4.IV. Un dysfonctionnement métabolique impliqué dans les complications du diabète de type 2	41
I.4.V. Rôle de la glycation dans les complications dégénératives du diabète	43
I.5. Les modèles d'étude du diabète et de la glycation	46
I.5.I. Les modèles murins d'étude du diabète.....	46
I.5.II. Les modèles de diabète appliqués à l'étude de la glycation	49
I.6. Moyens de lutte contre la glycation endogène	52
I.6.I. Systèmes organiques de défense contre la glycation	52
I.6.I.1. La fructoseamine-3-kinase.....	52
I.6.I.2. Le système glutathion / glyoxalase.....	54

I.6.II. Les stratégies thérapeutiques contre la glycation.....	57
I.6.II.1. Séquestrer les précurseurs de la glycation	57
I.6.II.2. Inhiber le récepteur aux AGE	59
I.6.II.3. Méthodes alternatives pour lutter contre la formation et l'accumulation des produits de glycation.....	61
II. Le microbiote.....	63
II.1. Généralités.....	63
II.2. Le microbiote : de l'homéostasie à la dysbiose.....	67
II.2.I. Homéostasie et rôles du microbiote intestinal.....	67
II.2.II. Dysbiose et désordres métaboliques.....	68
II.2.II.1. Définition, causes et conséquences.....	68
II.2.II.1.a. Dysbiose et diabète	72
II.2.II.1.b. Dysbiose et stéatose hépatique non alcoolique.....	74
II.2.II.1.c. Dysbiose et atteintes rénales	77
II.3. Utilisation de souches bactériennes comme traitement contre les complications du DT2.....	78
II.3.I. Généralité sur les probiotiques	78
II.3.II. La souche d'intérêt : <i>Lactobacillus fermentum</i> ME3.....	92
OBJECTIFS.....	94
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	97
I. Comment l'alimentation peut-elle affecter l'accumulation des produits avancés de la glycation dans le corps humain ?	98
II. Quel est le meilleur modèle murin pour étudier la glycation dans un contexte diabétique ?	125
III. Effet du <i>L. fermentum</i> ME-3 sur la glycation et les complications du diabète.	150
DISCUSSION.....	181
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	195
TRAVAUX PERSONNELS.....	199
BIBLIOGRAPHIE.....	202
ANNEXES.....	240

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Représentation des trois étapes de la réaction de Maillard *in vivo*.
- Figure 2** Étapes de formation des produits précoces de la réaction de Maillard.
- Figure 3** Étapes de formation de l'hémoglobine glyquée. Ici, seuls les dix premiers acides aminés de l'hémoglobine sont représentés.
- Figure 4** **A** : évolution de la glycation en fonction du vieillissement au sein de plusieurs espèces (homme, singe, vache, porc, chien, musaraigne) ; *d'après Sell et al.* **B** : mise en relation entre la survie chez l'homme et la concentration en CML plasmatique ; *d'après R. D. Semba et al.*
- Figure 5** Potentiels effets RAGE-indépendants de la glycation ; *d'après M. Bastos et al.*
- Figure 6** Représentation des différentes formes existantes du RAGE, *d'après E.J Lee et H. Park.*
- Figure 7** Potentiels effets RAGE- dépendants de la glycation ; *d'après N. Vazzana et al.*
- Figure 8** Nombre estimé de personnes atteintes de diabète au niveau mondial et par région en 2017 et 2045 (20-79 ans) ; *d'après la 8^{ème} édition de la Fédération Internationale du Diabète FID.*
- Figure 9** Potentiels mécanismes cellulaires à travers lesquels l'hyperglycémie peut induire des effets néfastes sur l'organisme sur le long terme ; *d'après M. Brownlee.*
- Figure 10** Mécanisme de déglycation induit par la FN3K ; *d'après V. Monnier et al.*
- Figure 11** Le système glutathion/ glyoxalase, impliqué dans la métabolisation du méthylglyoxal.
- Figure 12** Molécules pharmaceutiques utilisées pour inhiber le processus de glycation ; *d'après J.M. Forbes et al.*

- Figure 13** Représentation de l'arbre phylogénique du microbiote intestinal. Les phyla sont représentés à gauche, tandis que les niveaux taxonomiques inférieurs sont à droite ; *d'après D.N. Frank et al.*
- Figure 14** Répartition des bactéries intestinales dans le tractus digestif.
- Figure 15** Composition bactérienne dans un microbiote sain (en haut) et dans le cas d'une dysbiose (en bas). Trois phénomènes peuvent être observés dans un cas d'une dysbiose : une augmentation du nombre de bactéries pathogènes ; un amoindrissement de la diversité bactérienne ; une baisse des espèces bactériennes bénéfiques ; *d'après C. Petersen et al.*
- Figure 16** Rôles du microbiote intestinal dans la stéatose hépatique non alcoolique *d'après J. Ma et al.* NAFLD : stéatose hépatique non alcoolique, FIAF : facteur adipocytaire induit par le jeûne, LPL : lipoprotéine lipase, FFA : acide gras libre, IR : insulino résistance, TMA : triméthylamine, TMAO: triméthylamine oxyde, UBA : acide biliaire non conjugué, FXR : récepteur farnésioïde X, GR5 : protéine G couplée à un récepteur Takeda 5, BA : acide biliaire ; LPS : lipopolysaccharide, TLR : récepteur Toll like, CD14 : antigène de différenciation des monocytes, NF- κ B : facteur nucléaire- κ B ; MyD88 : facteur 88 de différenciation myéloïde, IRS: substrat du récepteur à l'insuline.
- Figure 17** Nombre de publications relatives à l'utilisation de souches probiotiques depuis les deux dernières décennies après avoir utilisé le mot clé « probiotique » dans la base de données pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** Données de marqueurs de la glycation précoce et avancée dans le plasma de sujets sains et diabétiques.
- Tableau 2** Données de marqueurs de la glycation précoce et avancée dans le plasma de rats-STZ.
- Tableau 3** Données de marqueurs de la glycation précoce et avancée dans le plasma, les reins et le foie de rats-STZ obtenues par LC-MS/MS.
- Tableau 4** Données de marqueurs de la glycation avancée dans les tendons d'Achille et de queue de souris sous régime normal diet (ND) ou high fat high diet (HFD) obtenues par LC-MS/MS.
- Tableau 5** Présentation des études sur les effets de différentes souches de probiotiques sur le profil métabolique de modèles murins de diabète ou de maladies rénales.
- Tableau 6** Présentation des études sur les effets de différentes souches de probiotiques sur le profil métabolique de patients diabétiques ou atteints de maladies rénales.

LISTE DE ABBRÉVIATIONS

3-DG :	<i>3-DéoxyGlucosone</i>
4-HNE :	<i>4-hydroxynonéal</i>
ADA :	<i>American Diabetes Association</i>
AG :	<i>Aminoguanidine</i>
AGE :	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
AL :	<i>ad libitum-fed</i>
ALE :	<i>Advanced Lipoxidation Endproducts</i>
ARE :	<i>Antioxidant-Response Element</i>
BAL :	<i>Bactérie Acides Lactiques</i>
BB :	<i>Biobreeding</i>
CEL :	<i>CarboxyÉthylLysine</i>
CFU :	<i>Colony-forming unit</i>
CML :	<i>CarboxyMéthylLysine</i>
CR :	<i>Caloric Restriction</i>
DAG :	<i>Diacylglycérol</i>
DIO :	<i>Diet-induced obesity</i>
DMA :	<i>Diméthylamine</i>
DMAO :	<i>Diméthylamine oxydée</i>
DOLD :	<i>3-Deoxyglucosone-lysine Dimer</i>
DR :	<i>Dietary Restriction</i>
DT1 :	<i>Diabète de Type 1</i>
DT2 :	<i>Diabète de Type 2</i>
eNOS :	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ET :	<i>Endothelin - 1</i>
FAO :	<i>Organisation des Nations Unis pour l'alimentation et l'agriculture</i>
FAF :	<i>Facteur adipocytaire induit par le jeûne</i>
FN3K :	<i>Fructosamine-3-Kinase</i>
GCK :	<i>Glucokinase</i>
GF :	<i>Germ-free</i>
GFAT :	<i>Glutamine Fructose-6-phosphate AmidoTransferase</i>

GI :	<i>Glycemic Index</i>
GK :	<i>Goto-Kakizaki</i>
Glo1 :	<i>Glyoxalase 1</i>
Glo2 :	<i>Glyoxalase 2</i>
GLP-1 :	<i>Glucagon Like Peptide 1</i>
GO :	<i>Glyoxal</i>
GOLD :	<i>Glyoxal-lysine Dimer</i>
GSH :	<i>Glutathion</i>
GSSG :	<i>Glutathion Oxydé</i>
HbA1c :	<i>Hémoglobine glyquée</i>
HESI :	<i>Heated Electrospray Ionization source</i>
HFCS :	<i>High-Fructose Corn Syrup</i>
HFD :	<i>High Fat Diet</i>
HF-HS :	<i>High Fat High Sucrose</i>
HMGB1 :	<i>High-Mobility Group Box 1</i>
HNF :	<i>Hepatocyte Nuclear Factor</i>
HPLC-MS/MS :	<i>High Performance Liquid Chromatography- Tandem Spectrometry</i>
IFN- γ :	<i>Interferon gamma</i>
IL :	<i>Interleukine</i>
INS :	<i>Insulin</i>
kDa :	<i>Kilo-Dalton</i>
KO :	<i>Knock-out</i>
LDL :	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LPS :	<i>Lipopolysaccharide</i>
MDA :	<i>Malondialdehyde</i>
MEC :	<i>Matrice Extracellulaire</i>
MG-H1 :	<i>Methylglyoxal-Hydroimidazolone 1</i>
MGO :	<i>MethylGlyoxal</i>
MODY :	<i>Maturity Onset of the Young</i>
MOLD :	<i>Methylglyoxal-lysine Dimer</i>
NADPH :	<i>Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate</i>
NAFLD :	<i>Non Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
ND :	<i>Normal Diet</i>
NFPA :	<i>Perfluoropentanoic acid</i>

NF- κ B :	<i>Nuclear Factor – Kappa B</i>
NOD :	<i>Non Obese Diabetic</i>
Nrf2 :	<i>Nuclear factor-erythroid 2 p45 subunit-Related Factor 2</i>
OGTT :	<i>Oral Glucose Tolerance Test</i>
OLETF :	<i>Otsuka Long-Evans Tokushima</i>
OMS :	<i>Organisation Mondiale de la Santé</i>
PAI-1 :	<i>Plasminogen Activator Inhibitor - 1</i>
PCR :	<i>Protein-C-reactive</i>
PKC :	<i>Protéine Kinase C</i>
PM :	<i>Pyridoxamine</i>
PYY :	<i>Peptide YY</i>
RAGE :	<i>Récepteur aux AGE</i>
ROS :	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SCFA :	<i>Acides Gras à Chaines Courtes</i>
Sp1 :	<i>Specificity protein 1</i>
sRAGE :	<i>Soluble RAGE</i>
STZ :	<i>Streptozotocine</i>
TCA :	<i>Trichloroacetic acid</i>
TG :	<i>Triglycérides</i>
TGF- β :	<i>Transforming Growth Factor - β</i>
TMA :	<i>Triméthylamine</i>
TMAO :	<i>Triméthylamine oxydée</i>
TNF- α :	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
VEGF :	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT :	<i>Wild-Type</i>
ZO-1 :	<i>Zona Occludens-1</i>



AVANT-PROPOS

La réaction de Maillard ou glycation a été étudiée pour la première fois en 1912 par le scientifique qui lui a donné son nom, Louis-Camille Maillard. ¹ Cette réaction correspond à la condensation de sucres réducteurs avec des groupements amines issus d'acides aminés, de peptides ou de protéines. Elle conduit à la formation de produits précoces (e.g. fructoselysine) et avancés (e.g. carboxyméthyllysine) de la glycation. *In vivo*, ces produits sont générés de façon physiologique au cours du temps. Cependant, la formation et l'accumulation des produits de glycation peuvent s'accroître lors de désordres métaboliques tels que ceux observés dans le diabète et l'insuffisance rénale. ^{2,3}

En raison de sa forte incidence mondiale, le diabète de type 2 représente actuellement un problème de santé publique majeur. Rien qu'en France, le nombre de sujets diabétiques est estimé à 3,2 millions. ⁴ A cela, il faut ajouter 600 000 à 700 000 personnes qui seraient diabétiques sans le savoir. Cette pathologie est observée plus fréquemment chez des personnes obèses ayant un mode de vie sédentaire et une mauvaise hygiène alimentaire. L'accumulation de tissu adipeux abdominale conduit à une baisse de la sensibilité des tissus et organes à l'insuline (insulino-résistance). ⁴ Dans ces conditions, le glucose n'est pas suffisamment pris en charge par les organes et s'accumule au niveau circulant, conduisant à une hyperglycémie chronique. Cette altération du métabolisme du glucose induit des dommages cellulaires et tissulaires sur le long terme. ⁵ Une des principales voies mécanistiques des effets délétères de l'hyperglycémie est la glycation. En effet, de nombreuses études ont rapporté des niveaux supérieurs en produits précoces et avancés de la glycation dans le plasma et les organes de patients diabétiques par rapport à ceux de sujets en bonne santé.

Il existe, au sein des organismes cellulaires et des mammifères supérieurs, des moyens de lutte contre la formation et l'accumulation des produits de glycation (e.g. fructosamine- 3 kinase et glyoxalase). ^{6,7} Mais ces moyens enzymatiques « anti-glycation » ne semblent pas très efficaces chez les patients atteints de désordres métaboliques. Depuis plusieurs décennies, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été développées afin de tenter de neutraliser les précurseurs des produits de glycation ou encore d'inhiber le récepteur aux produits de glycation avancés (appelé RAGE). ⁸ Cependant, à ce jour, les différentes interventions thérapeutiques testées n'ont montré que des effets modestes sur les complications du diabète.

Parallèlement, depuis plusieurs décennies, les chercheurs ont démontré que les patients obèses ou atteints d'un diabète de type 2 avaient un microbiote altéré, communément appelée dysbiose. Une dysbiose est caractérisée par une perturbation de la balance microbienne (augmentation du nombre de bactéries pathogènes, réduction du nombre de bactéries bénéfiques pour l'organisme, et baisse de la diversité bactérienne).⁹ Certaines études ont pu mettre en évidence une altération des niveaux de *Firmicutes* et de *Bactéroidetes* au niveau des phylums dans des modèles murins d'obésité ou chez des patients diabétiques ou obèses.¹⁰ Il a été montré par diverses études qu'une dysbiose était associée à des désordres physiologiques (altérations du système immunitaire, diabète de type 2 et ses complications, syndrome du côlon irritable, maladie de Crohn).¹¹ De ce fait, les scientifiques développent depuis quelques années de nouvelles stratégies thérapeutiques à base de souches bactériennes, plus communément appelées probiotiques, visant à prévenir l'apparition de l'obésité et des complications du diabète. Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, après ingestion, procurent des effets bénéfiques sur la santé de l'organisme hôte. Les effets de diverses souches probiotiques (e.g. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*) sur le métabolisme du glucose, la tolérance au glucose et le profil antioxydant ont été observés non seulement dans des modèles murins d'obésité ou de diabète de type 2, mais aussi chez des patients obèses ou diabétiques.¹²

Bien que la plupart de ces études ait démontré l'efficacité de certaines probiotiques sur le métabolisme glucidique, aucune ne s'est intéressée aux effets potentiels de ces bactéries commensales sur la glycation.

L'objectif principal de cette thèse a donc été d'étudier les effets d'une souche bactérienne, le *Lactobacillus fermentum* ME-3, sur la glycation et les désordres métaboliques dans un contexte de diabète de type 2.



INTRODUCTION



La glycation

I.1. La réaction de Maillard ou glycation

I.1.1. La découverte de la réaction de Maillard

La première description de la glycation remonte au début du XX^{ème} siècle, en 1908, avec la citation suivante proposée par Arthur Robert Ling ¹³ : « When these amino-compounds are heated at 120–140° with sugars such as ordinary glucose or maltose, which are produced at this stage of the process, combination occurs. The precise nature of the compounds produced is unknown to me, but they are probably glucosamine-like bodies ».

C'est ensuite Louis Camille Maillard qui a étudié cette même réaction chimique entre les sucres et les acides aminés. En 1912, il a montré que l'incubation d'une solution aqueuse de D-glucose et de glyco-colle (ancienne appellation de la glycine) dans un bain-marie induisait un brunissement. ¹ Cette réaction chimique porte depuis le nom de réaction de Maillard.

À partir de ses observations faites en 1912, L.C. Maillard proposa deux hypothèses – 1) cette réaction serait impliquée dans la modification des nutriments au cours de la cuisson des aliments – 2) l'hyperglycémie chronique des patients diabétiques pourrait catalyser la modification post-traductionnelle des protéines, *in vivo*, par réaction de Maillard.

Depuis lors, il a été prouvé, en effet, que cette réaction chimique est impliquée dans des processus chimiques observés dans la transformation thermique des aliments ¹⁴ mais également à plus basse température (37°C) dans des processus physiopathologiques *in vivo*. Afin de distinguer la réaction de Maillard alimentaire de celle qui est observée *in vivo*, cette dernière a tout d'abord été définie comme « glycosylation non enzymatiques ». Le terme « glycation » est apparu quelques années plus tard afin de distinguer clairement cette réaction chimique de la glycosylation enzymatique. ¹⁵

La réaction de Maillard ou glycation, est généralement décrite en plusieurs étapes, même si elle correspond à un enchaînement de réactions en équilibre et non dissociées (**Fig. 1**).

La première étape, dite précoce, correspond à une réaction entre un sucre réducteur et la fonction amine d'un acide aminé, d'un peptide ou d'une protéine. *In vivo*, les acides nucléiques peuvent aussi être touchés, mais cette réaction reste peu décrite. ^{16,17} L'étape suivante est dite « de propagation ». C'est à cette étape que les produits précoces se fragmentent pour générer des molécules de petites tailles telles que les composés dicarbonylés aussi appelés oxoaldéhydes. Ces composés hautement réactifs, pouvant également provenir de l'auto-oxydation des sucres, de la lipoxydation, de l'oxydation des produits d'Amadori et de la glycolyse, sont à l'origine de la formation des produits avancés de la réaction de Maillard, aussi appelés *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) en anglais. Dans les conditions physicochimiques de transformation des matrices alimentaires, la réaction de Maillard va plus loin. Elle peut en effet conduire à la formation de polymères bruns appelés mélanoïdines. Ces polymères sont par exemple retrouvés dans le café torréfié et la croûte du pain. La formation des mélanoïdines ne sera pas abordée dans cette thèse.

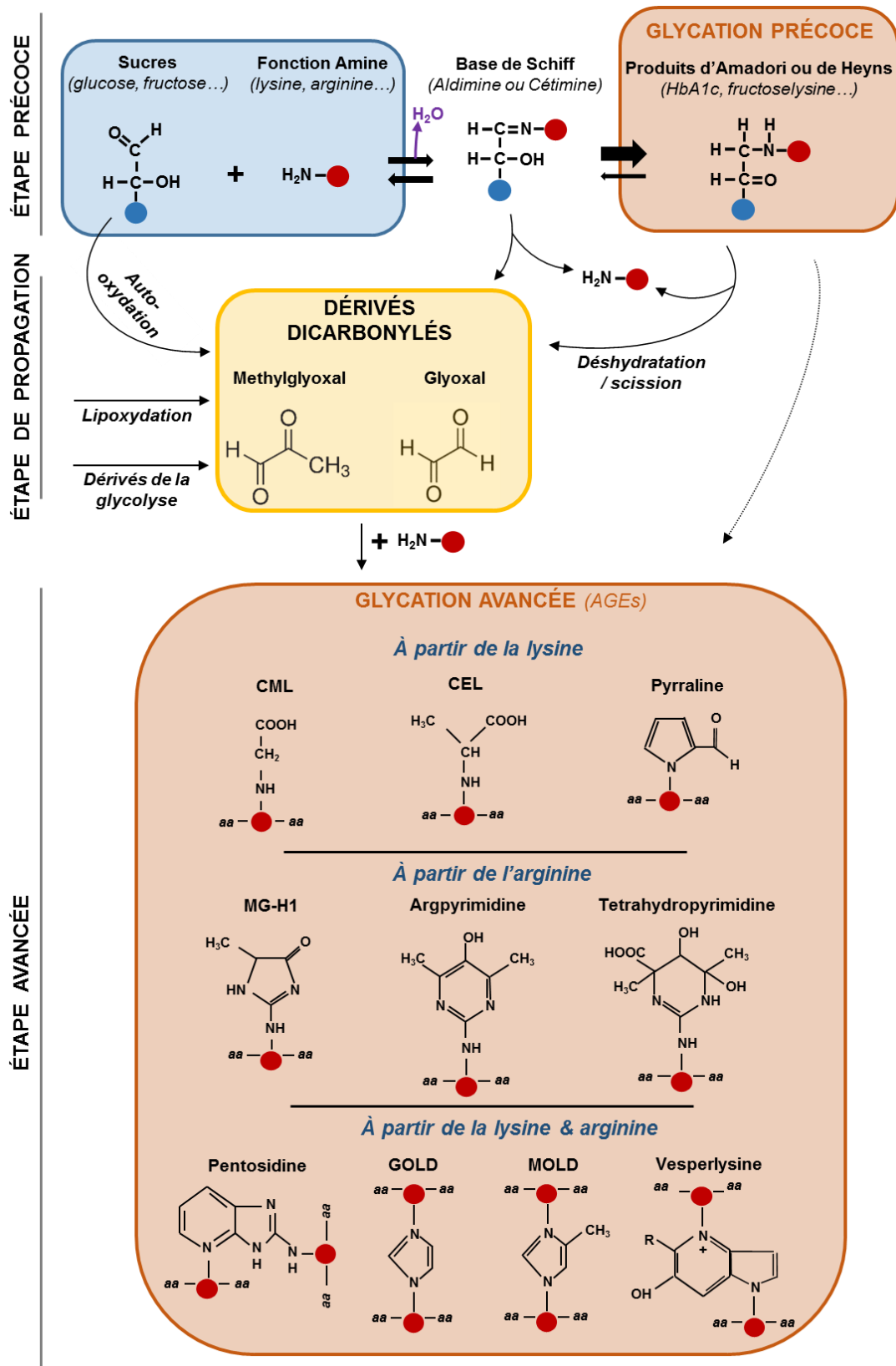


Figure 1 Représentation des trois étapes de la réaction de Maillard *in vivo*, avec pour chacune quelques exemples de molécules.

I.1.II. L'étape précoce de la réaction de Maillard

M. Amadori, R. Kuhn et A. Dansi ont apporté entre 1929 et 1936 des informations complémentaires sur la réaction de Maillard (**Fig. 2**).¹⁸ Ils ont alors démontré que la condensation d'un sucre réducteur, plus particulièrement d'un aldose (e.g. glucose) ou d'un cétose (e.g. fructose), avec la fonction amine d'un acide aminé, d'un peptide ou d'une protéine (principalement une lysine ou une arginine) conduit à la formation d'une base de Schiff labile aussi appelée imine. Dans le cas d'un aldose, une aldimine est formée et dans le cas d'un cétose, c'est une cétimine qui se forme.

Après réarrangement, les imines peuvent se transformer en produits stables : les produits d'Amadori (ou cétosamines) à partir des aldoses et les produits de Heyns (ou aldosesamines) à partir des cétoles. La formation de ces produits d'Amadori et de Heyns est dépendante de plusieurs facteurs : la concentration des substrats, la taille de la chaîne carbonée du sucre réducteur (plus un sucre aura une chaîne carbonée longue, comme le glucose, moins il sera réactif et inversement),^{19,20} le nombre de carbonyles (les dicarboxyles sont plus réactifs que de simples aldéhydes ou cétones), le temps, l'oxygène, la température et le pH.²¹

C'est en 1953 que J. E. Hodge décrit de manière exhaustive, et dans un contexte plutôt alimentaire, les différentes réactions chimiques de la réaction de Maillard allant du produit d'Amadori jusqu'à la formation des mélanoidines en passant par différents intermédiaires plus ou moins stables.²²

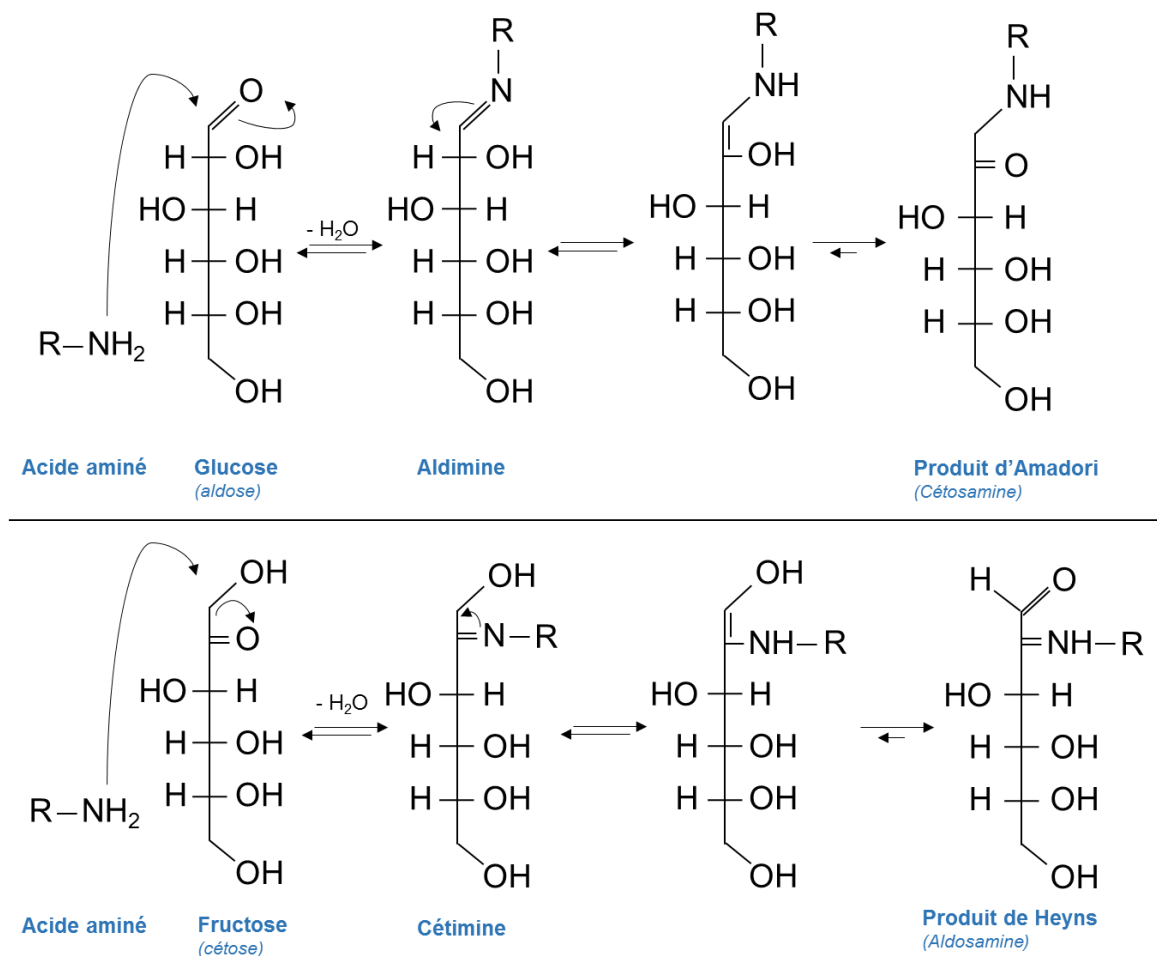


Figure 2 Étapes de formation des produits précoces de la réaction de Maillard.

L'hypothèse de L.C. Maillard portant sur la modification des protéines *in vivo* se verra validée à partir de 1955, grâce à H. G. Kunkel et G. Wallenius, qui découvrent alors une nouvelle forme de l'hémoglobine dans les globules rouges humains.²³ D. W. Allen *et al.*, démontreront rapidement l'implication de la glycation dans cette nouvelle forme de l'hémoglobine. La fixation d'une molécule de glucose sur la valine N-terminal de l'hémoglobine forme un produit d'Amadori stable, et constitue ce qui est appelé l'hémoglobine glyquée (**Fig. 3**).²⁴ Il existe de nombreuses formes d'hémoglobines glyquées (HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b}),²⁵ mais la forme majoritaire en concentration est l'HbA_{1c}.²⁶ Une étude montrera par la suite que le niveau d'HbA_{1c}, constituant entre 4 et 6% de l'hémoglobine total chez un sujet sain, est multiplié par deux, soit 8 à 12% chez des sujets diabétiques.²⁷ La quantification de l'HbA_{1c} est aujourd'hui considérée

comme un outil de routine en clinique et comme un biomarqueur majeur du contrôle de la glycémie sur les trois derniers mois chez les sujets diabétiques. ²⁸

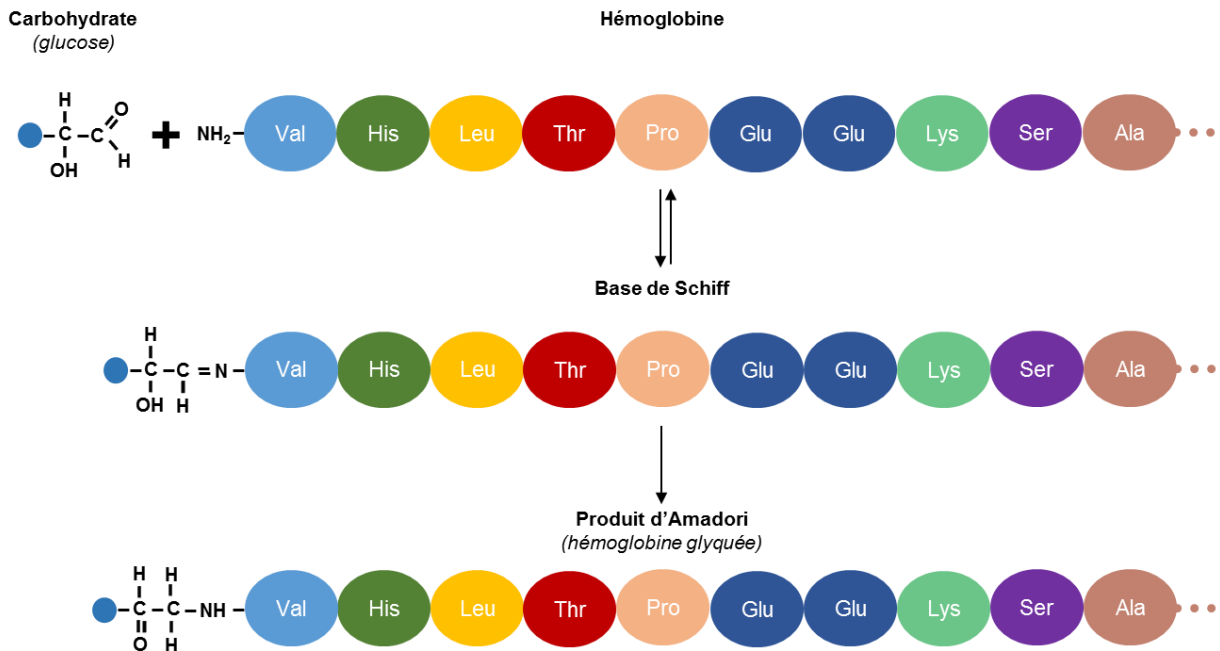


Figure 3 Étapes de formation de l'hémoglobine glyquée. Ici, seuls les dix premiers acides aminés de l'hémoglobine sont représentés.

I.1.III. Des produits précoces jusqu'aux produits avancés de glycation

Si la réaction de glycation persiste dans le temps, les produits d'Amadori et de Heyns pourront aboutir à la formation de produits terminaux de la glycation (AGE). Les produits précoces peuvent en effet se dégrader et former, entre autres, des dérivés dicarbonylés tels que le 3-déoxyglucosone (3-DG), le méthylglyoxal (MGO) et le glyoxal (GO), qui pourront se lier à de nouvelles amines (essentiellement lysine et arginine) et former des AGE.

Il est important de préciser que ces intermédiaires dicarbonylés ne proviennent pas uniquement de la dégradation des produits précoces de la réaction de Maillard. Par

exemple, le 3-DG peut provenir de la peroxydation lipidique, le MGO peut être synthétisé de manière non enzymatique par dégradation des trioses phosphates (glycéraldéhyde-3-phosphate et dihydroxyacétone phosphate), et enfin le GO peut provenir de l'auto-oxydation des sucres, catalysée par les métaux de transition.^{5,29}

C'est dans les années 1980 qu'ont été découverts et décrits les premiers produits terminaux de la glycation. Ils porteront tout d'abord le nom d'*Advanced Glycosylation End-products* (AGE), puis finalement d'*Advanced Glycation End-products*^{20,30} afin de distinguer la glycosylation qui est un processus enzymatique de la glycation qui décrit une réaction chimique non enzymatique.

Le processus de glycation peut être très important dans le vieillissement et implique plus particulièrement les protéines à longue durée de vie (*i.e.* peu renouvelées au cours de la vie d'un individu) telles que certains collagènes retrouvés entre autres dans la peau et les cristallines retrouvées dans le cristallin.^{31,32} La N^ε-carboxyméthyllysine (CML) est le premier AGE à avoir été découvert³³ et caractérisé dans le cristallin,³⁴ la peau³⁵ et les urines.³⁶ Cet AGE est actuellement l'un des biomarqueurs les plus étudié dans les tissus humains.

Aujourd'hui, il ne fait plus aucun doute que la glycation peut altérer la structure et la fonction des protéines, *in vivo*. Peu de temps après la CML, la pentosidine fut le premier AGE constitué de cycles aromatiques découvert dans les tissus humains.³⁷ Cet AGE est issu de la glycation d'une lysine et d'une arginine, créant ainsi des liaisons covalentes entre ces deux acides aminés. Ces liaisons post-traductionnelles entre deux acides aminés tels que la lysine et l'arginine conduisent à un certain nombre de réticulations qui peuvent se créer aussi bien au sein d'une protéine qu'entre deux protéines. En anglais, le terme de cross-links est généralement utilisé pour décrire ces types d'AGE qui impliquent deux acides aminés. À la suite de la découverte de la pentosidine et de ses propriétés de fluorescence caractéristiques, de nombreux autres AGE possédant des cycles aromatiques et émettant de la fluorescence ont été découverts (Vesperlysine A, glucosepan, argpyrimidine, GOLD, MOLD, DOLD, etc). C'est ainsi que la fluorescence aux longueurs d'ondes caractéristiques de la glycation est aujourd'hui utilisée comme marqueur global des AGE pour de la recherche fondamentale en laboratoire mais aussi comme marqueur non invasif de la glycation à la surface de la peau.³⁸ L'utilisation de l'AGE Reader, qui est un instrument mesurant la fluorescence des AGE au niveau de la peau, a montré que l'augmentation de la

fluorescence chez des patients atteints d'insuffisance rénale était corrélée avec la durée de la pathologie.³⁹ Une autre étude a également montré une association significative entre l'augmentation de la fluorescence de la peau, des accidents macrovasculaires et une augmentation de la filtration glomérulaire chez des patients atteints de diabète de type 1.⁴⁰

Certains AGE comme la CML ne sont pas formés exclusivement par réaction de Maillard, c'est-à-dire par réaction chimique entre un acide aminé et un sucre réducteur. En effet, ils peuvent également être formés à partir de produits d'oxydation des lipides tels que le malondialdéhyde (MDA), les isoprostanes et le 4-hydroxynonéal (4-HNE).⁴¹ Dans ce cas, les produits qui en résultent sont appelés des *Advanced Lipoxidation End-products* (ALE).⁴² La CML est donc à la fois un AGE et un ALE. Mais la contribution relative des deux voies de synthèse de la CML *in vivo* n'est pas véritablement connue.

Les AGE retrouvés *in vivo* dans la circulation, les organes et les tissus ont non seulement diverses origines endogènes (sucres réducteurs, dicarbonyls, produits de peroxydation lipidique...) mais aussi, pour certains d'entre eux, une origine exogène. C'est l'équipe d'H. Vlassara qui, la première, a fait le lien entre les AGE endogènes et ceux apportés par l'alimentation. Considérant que les AGE alimentaires avaient des effets délétères sur la santé, H. Vlassara les a alors nommés les glycotoxines.^{43,44} T. Henle quant à lui parle plutôt d'acides aminés non physiologiques.⁴⁵ La toxicité de ces AGE faisant l'objet de controverses, le terme d'AGE exogène paraît aujourd'hui plus approprié pour décrire les AGE issus de l'alimentation.

I.2. Mécanismes d'action des AGE sur l'organisme

Les conséquences physiopathologiques de la glycation semblent principalement liées à deux mécanismes : la modification structurale et fonctionnelle des protéines et l'interaction entre les AGE et le récepteur aux AGE, le RAGE. Ceci peut être résumé par des effets qu'on appelle « RAGE indépendants » et « RAGE dépendants ».

I.2.I. Effets RAGE indépendants

Avant de parler des mécanismes d'action de la glycation dans les différentes pathologies, il faut savoir que celle-ci augmente avec l'âge. Il est admis que le vieillissement se caractérise par une accumulation progressive de dommages de l'organisme, aboutissant à l'apparition de pathologies et au décès de l'individu.⁴⁶ Une étude a mis en évidence une augmentation de la pentosidine, présente dans le collagène de la peau (protéine extracellulaire), au cours du vieillissement dans plusieurs espèces animales (homme, singe, vache, porc, chien, musaraigne) (**Fig. 4A**).⁴⁷ Cette étude conclut également par le fait que la longévité des espèces est inversement proportionnelle à la teneur en pentosidine mesurée dans la peau. Au niveau intracellulaire, la senescence est aussi corrélée à une augmentation de la glycation des protéines.¹⁶ Enfin, cette augmentation de la glycation avec l'âge est également associée à une baisse de la survie chez l'homme (**Fig. 4B**).⁴⁸

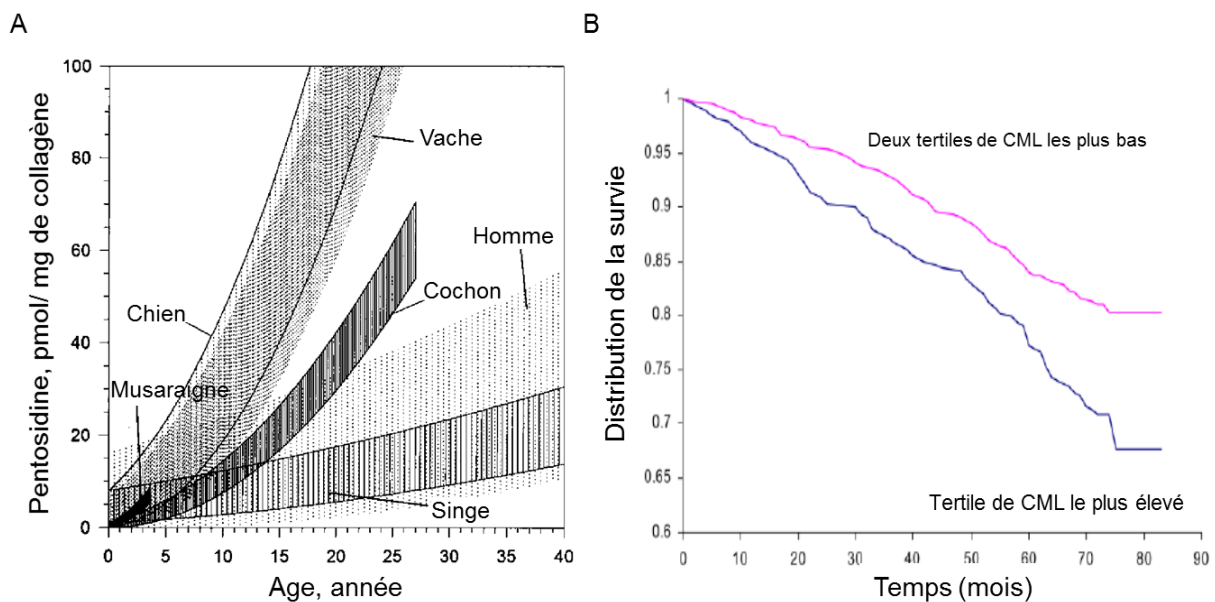


Figure 4 **A** : évolution de la glycation en fonction du vieillissement au sein de plusieurs espèces (homme, singe, vache, porc, chien, musaraigne) ; d'après D. R. Sell et al.⁴⁷. **B** : mise en relation entre la survie chez l'homme et la concentration en CML plasmatique ; d'après R. D. Semba et al.⁴⁸

La glycation est une des voies majeures impliquées dans le développement des différentes complications du diabète. ⁴⁹ Il s'agit finalement d'un processus lent et long pouvant altérer la structure et la fonction de nombreuses protéines intra- et extracellulaires de manière RAGE-indépendante (**Fig. 5**). La demi-vie de ces protéines est un paramètre primordial qui contrôle les concentrations des produits de glycation. En effet, il a été montré que plus la demi-vie d'une protéine est élevée, plus celle-ci est susceptible d'être touchée par la glycation, et plus les AGE peuvent s'accumuler sur cette protéine. S. Thorpe et J. Baynes ont été les premiers à démontrer que la demi-vie était un paramètre majeur pour la glycation de certains types de collagène. Ils ont entre autres montré que le collagène provenant du cartilage avait une demi-vie élevée (cent dix-sept années) et contenait une teneur bien plus élevée en pentosidine que le collagène de la peau qui n'a qu'une demi-vie de quinze années. ⁵⁰

La pentosidine mais aussi d'autres AGE formant des cross-links peuvent s'accumuler sur les protéines à longue durée de vie constituant la matrice extracellulaire (MEC) et induire un dysfonctionnement des organes touchés. Des cross-links issus de la glycation ont été retrouvés, par exemple dans la peau, ⁵⁰⁻⁵³ la dentine, ⁵⁴ les cartilages, ^{50,55} les muscles squelettiques, ⁴⁸ les tendons, ⁵⁶ les cristallins, ^{3,57} le système cardiovasculaire, ⁵⁸ les reins ⁵⁸ et les poumons. ⁴⁸

Les AGE peuvent également se former sur les protéines circulantes à courte durée de vie (e.g. albumines, hémoglobines, immunoglobulines, lipoprotéines). L'albumine est la protéine plasmatique la plus abondante puisqu'elle représente environ 50% de l'ensemble des protéines circulantes. ⁴⁹ Cette protéine de 66 kilodaltons (kDa) régule la pression osmotique sanguine et aide au transport des lipides, des hormones et de certains médicaments. ⁵⁹ Sa forte concentration plasmatique (30 à 50g/L), sa demi-vie de 21 jours, et son abondance en lysine (61 résidus sur 585) en font une protéine cible de la glycation. ⁶⁰ Différentes études ont montré que la glycation de l'albumine induit – 1) une baisse de son activité de transporteur des lipides, d'hormones ⁶¹ et de certains médicaments ⁶⁰ – 2) une activation des plaquettes et une induction de l'agrégation plaquettaire ⁶² – 3) une altération du métabolisme du glucose. ⁶³

La seconde famille de protéines circulantes les plus abondantes est celle des immunoglobulines (environ 35% des protéines circulantes) qui jouent un rôle important dans les interactions impliquant les cellules immunitaires. Lorsque ces protéines sont glyquées, des processus inflammatoires se mettent en place. ⁶⁴

L'hémoglobine présente dans les globules rouges a pour rôle de transporter l'oxygène à l'ensemble de l'organisme. La glycation de cette protéine diminue son affinité pour l'oxygène. ⁶⁵

Finalement, la glycation des lipoprotéines de basse densité (LDL), réduit la clairance, augmente l'oxydation et diminue la reconnaissance de ces particules par leur récepteur. La glycation des LDL semble être impliquée dans l'étiologie de l'athérosclérose. ⁶⁶

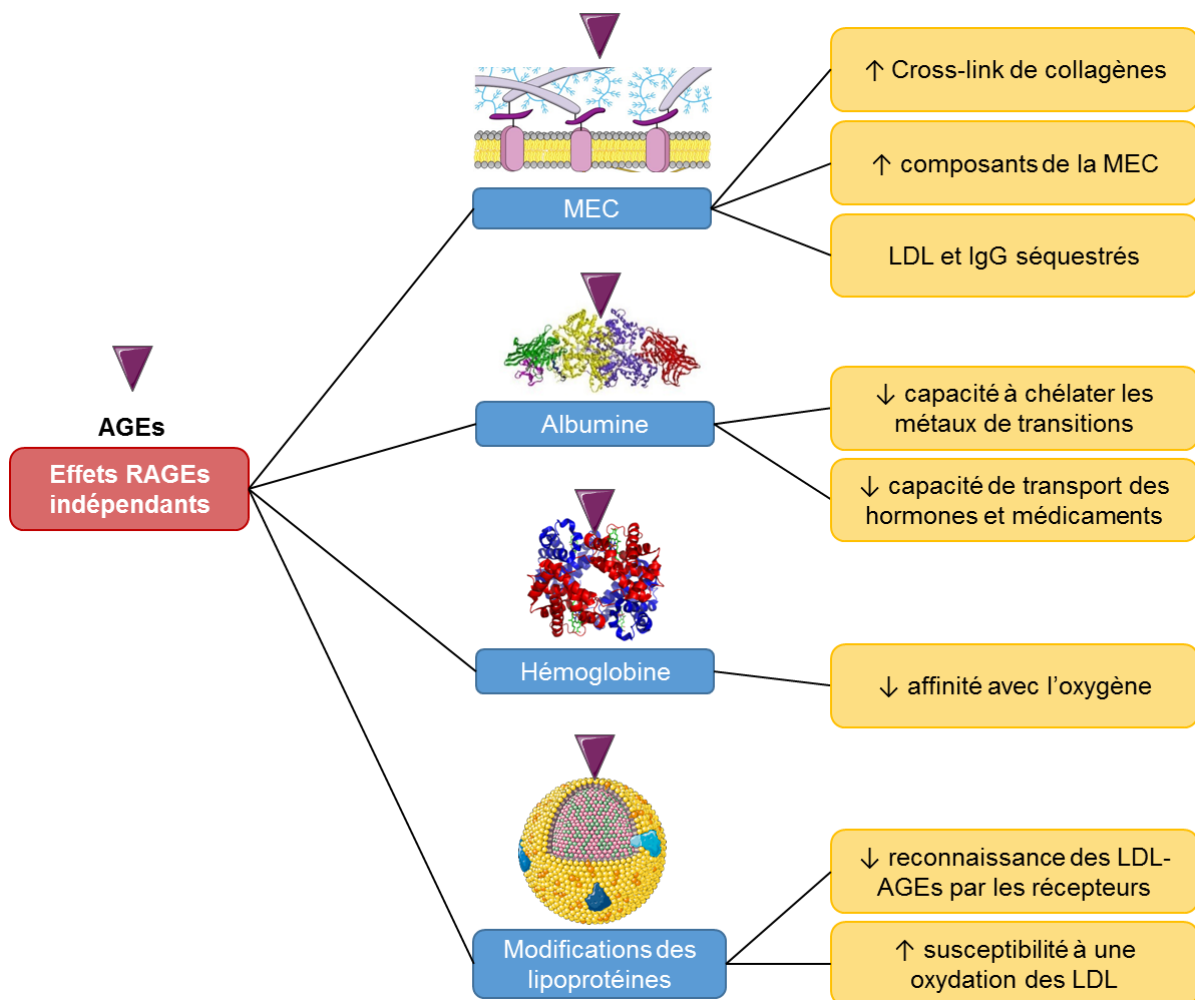


Figure 5 Potentiels effets RAGE-indépendants de la glycation ; d'après M. Bastos et al. ^{67,68}

I.2.II. Effets RAGE dépendants

Le récepteur RAGE, mis en évidence en 1992, ⁶⁹ est un récepteur transmembranaire, multi-ligands (e.g. High-mobility group protein B1, HMGB1 ; S-100 calcium-binding protein ; amyloid- β -protein ; Mac-1 et les AGE), ⁷⁰ appartenant à la famille des immunoglobulines. Ce récepteur dispose de plusieurs variantes génétiques (**Fig. 6**). Sa forme mature possède un domaine variable « v », deux domaines constants « c », un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Il existe deux formes immatures : l'une a son domaine « v » tronqué, empêchant les ligands de s'y fixer ; l'autre a son domaine cytoplasmique tronqué et ne permet pas la transduction du signal. ⁷¹ Enfin, le RAGE existe aussi sous forme soluble (sRAGE), et dans ce cas il a été décrit comme pouvant neutraliser les effets cellulaires des ligands du RAGE mature par compétition. ⁷² Hormis RAGE, les AGE peuvent se fixer à de nombreux autres récepteurs tels que AGER1/2/3 ainsi qu'à des récepteurs scavenger SR-AI, SR-AII, SR-BI, CD36, LOX-1, FEEL-1/2. ⁷³

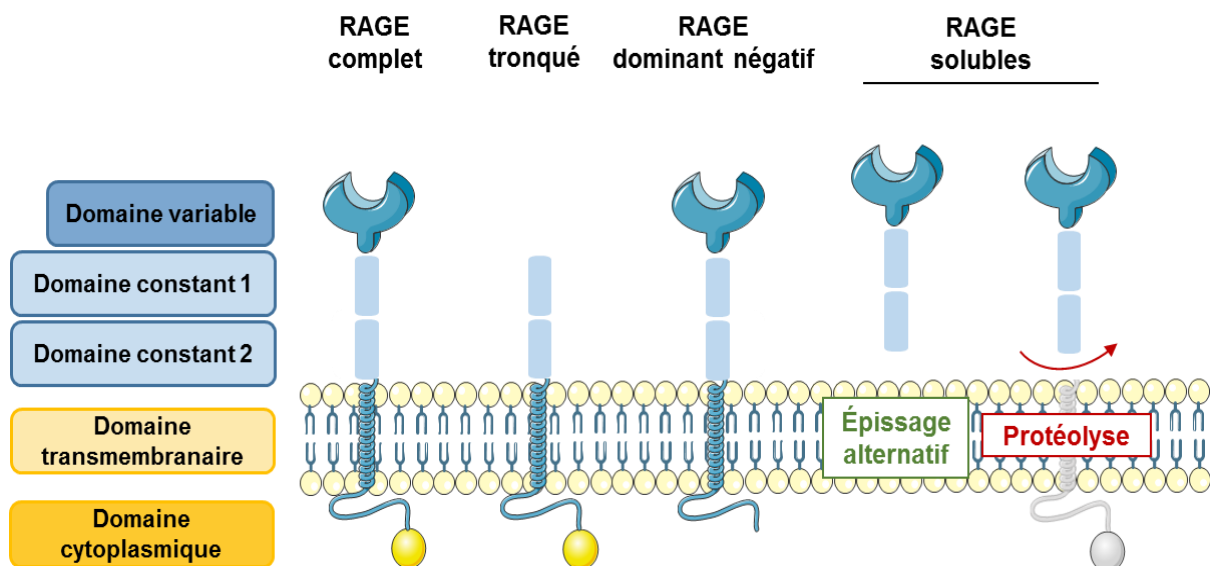


Figure 6 Représentation des différentes formes existantes du RAGE, d'après E.J Lee et H. Park. ⁷⁰

Le vieillissement ainsi que les pathologies associées, dont la maladie d'Alzheimer, le diabète, ⁷⁴ les troubles cardiovasculaires ⁷⁵ et la dégénération maculaire, ⁷⁶ sont

associés à une augmentation des concentrations d'AGE mais également de RAGE dans différents organes dont le cerveau, le cœur et les yeux.

La CML est connue pour être l'un des AGE les plus affins pour le RAGE.⁷⁷ La fixation de cet AGE sur le RAGE conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation (**Fig. 7**) avec, entre autres, une synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une activation du système NADPH oxydase, une augmentation des molécules d'adhésion et une augmentation des marqueurs de l'inflammation (TNF- α , IL-6, protéine C-réactive) à travers la stimulation du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*).⁷⁸ Le promoteur de RAGE possède un site spécifique reconnu par le facteur de transcription NF- κ B qui permet d'augmenter l'expression du RAGE et de maintenir un cercle vicieux d'inflammation.

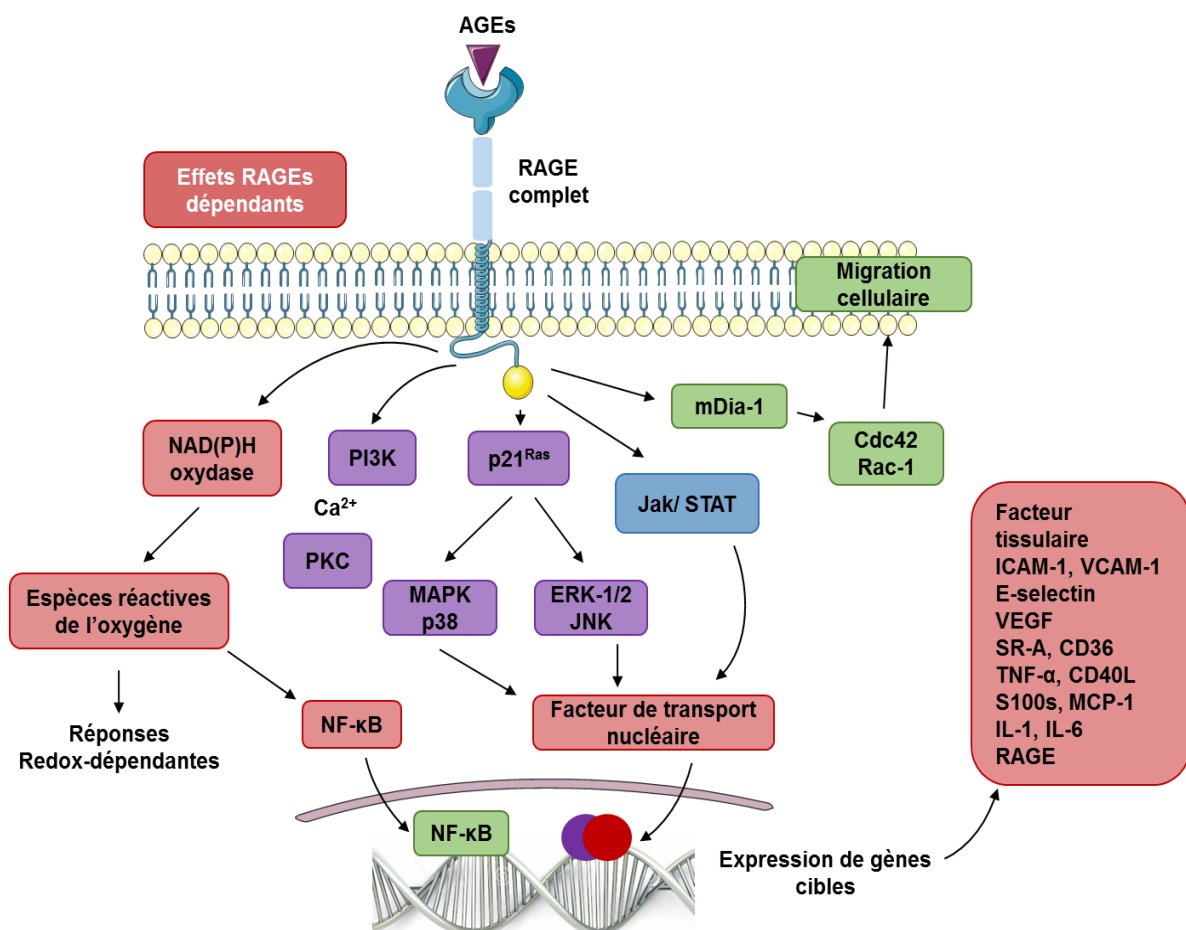


Figure 7 Potentiels effets RAGE- dépendants de la glycation ; d'après N. Vazzana et al.⁷⁹

I.3. La glycation exogène et ses effets

En dehors de la synthèse d'AGE dans l'organisme, nous sommes exposés quotidiennement à une deuxième source d'AGE : les AGE alimentaires aussi appelés AGE exogènes ou glycotoxines.

Les régimes dits « occidentaux » sont riches en produits de glycation du fait des fortes températures utilisées lors de la cuisson des aliments (aliments grillés, rôtis, frits, toastés, ...).⁴⁸ Des études ont mesuré par HPLC-MS/MS les AGE contenus dans différents types d'aliments. F. Tessier *et al.* ont observé des teneurs en CML allant de 7 à 28 mmol de CML/ mol de lysine dans diverses boissons chocolatées ou de céréales.⁸⁰ Ils ont montré également dans une autre étude des variations allant de $1,0 \pm 12,0$ à $24,4 \pm 12,4$ mmol de CML/ mol de lysine dans vingt-et-une sortes de café de substitut ou des valeurs allant de $12,1 \pm 0,9$ à $21,8 \pm 1,9$ mmol de CML/ mol de lysine dans des cafés instantanés.⁸¹ D'autres études ont dosé la CML dans divers aliments (pommes de terre, poissons, céréales, fruits, légumes, sauces, beurre de cacahuète, sucreries, ...).^{82,83}

Au début des années 1990, l'importance donnée à l'alimentation comme source de produits de glycation était modérée. En 1997, une étude réalisée par T. Koschinsky *et al.* a montré qu'après l'administration orale d'une solution d'AGE par des souris, 10% de ceux-ci étaient absorbés et seulement 30% étaient éliminés dans les urines.⁴⁴ Les précurseurs des AGE comme le 3-DG, le MGO et le GO sont aussi retrouvés dans l'alimentation,^{84,85} mais n'atteignent pas la circulation du fait de leur dégradation rapide lors du processus de digestion.⁸⁶

Une étude récente menée par F. Tessier *et al.* apporte de nouveaux éléments intéressants sur la biodistribution de la CML alimentaire (dCML pour dietary CML). Cette étude réalisée à partir de dCML marquée au carbone 13 a montré une accumulation de la dCML dans la majorité des organes analysés chez la souris (reins, côlon, poumons, cerveau, ...).⁸⁷ De manière plus générale mais aussi moins précise, T. Henle⁴⁵ estime que les AGE provenant de l'alimentation contribuent d'avantage à l'accumulation des AGE retrouvés *in vivo* que les AGE formés de manière endogène. Ce même auteur estime qu'un individu moyen consomme entre 25 et 75 mg d'AGE par jour (majoritairement de la CML et de la pyrraline).

Il existe aujourd'hui de plus en plus d'évidences prouvant le rôle de l'exposition aux AGE exogènes dans le développement de certaines pathologies (maladie d'Alzheimer, cataracte, hypertension, anémie, sarcopénie, néphropathie, ...).⁴⁸

Un essai clinique de type cross-over, réalisé sur 67 volontaires sains pendant 3 mois, a récemment comparé les effets santé d'une exposition plus ou moins élevée en AGE alimentaires. Cette étude a montré qu'un régime riche en AGE augmentait les concentrations de CML circulantes, de triglycérides et de cholestérol. À l'inverse cette exposition aux AGE alimentaires réduisait certaines défenses antioxydantes et baissait la sensibilité à l'insuline.⁸⁸

Des études épidémiologiques font aussi état de corrélations entre l'accumulation plasmatique, cellulaire ou tissulaire d'AGE et le développement de pathologies.⁴⁸ Même si de nombreuses études chez l'animal semblent confirmer la toxicité des AGE alimentaires^{89,90} il reste difficile de conclure quant au rôle direct des AGE exogènes sur la santé.

I.4. Liens entre glycation et diabète

I.4.1. Définition du diabète

Le diabète est une pathologie connue depuis 1500 avant J.C par les égyptiens qui le diagnostiquaient par le goût sucré des urines.⁹¹ C'est en 1675, après avoir noté un goût sucré dans les urines de ses patients, que le médecin T. Wallis décrit pour la première fois le diabète sucré avec le terme « *mellitus* ».

Cette pathologie est définie depuis 1998 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'association américaine du diabète ou « American Diabetes Association » en anglais (ADA) de la manière suivante : « Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées. L'hyperglycémie chronique est associée à terme avec des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux ». ⁹² Un profil glycémique est considéré comme normal lorsque la glycémie à jeun est comprise entre 70 et 110 mg/dL (3,0 et 6,0 mmol/L), et lorsque la glycémie postprandiale est comprise entre 110 et 140 mg/dL (6,0 et 8,0 mmol/L). ⁹³ En

complément, un test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT pour Oral Glucose Tolerance Test) peut être réalisé. Ce test d'OGTT permet de suivre la cinétique de la concentration du glucose sanguin pendant deux heures, suite à l'ingestion d'un bolus d'une solution aqueuse de glucose (0,75 à 1 g de glucose/kg de poids corporel).

Un profil glucidique anormal est caractérisé par une glycémie supérieure à 200 mg/dL (11,1 mmol/L). Le 2^{ème} critère pouvant être observé indépendamment du 1^{er} est une glycémie à jeun supérieure à 126 mg/dL (7,0 mmol/L) observée après une absence d'ingestion calorique d'au moins 8 heures. Enfin le dernier critère mesurable est une glycémie supérieure à 200 mg/dL (11,1 mmol/L) observée 2h après l'ingestion du dernier repas. ⁹⁴ Cette hyperglycémie chronique est due soit à un défaut de sécrétion de l'insuline par le pancréas soit à une baisse de sensibilité des organes cibles à l'insuline (muscles squelettiques, tissu adipeux, foie). ⁹⁵ Il est associé à une polyurie (urine excessive), se traduisant par une polydipsie (soif intensive) ainsi que des atteintes micro et macro-vasculaires à long terme sur différents organes (majoritairement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et le système cardiovasculaire).

93,96

I.4.II. Épidémiologie du diabète

Le diabète est un véritable problème de santé publique car de nombreuses personnes en sont atteintes. L'OMS estimait à 108 millions le nombre de personnes diabétiques dans le monde en 1980 (2,4% de la population mondiale totale). En 2017, il y avait 425 millions de diabétiques (5,6% de la population totale) et les experts (**Fig. 8**) estiment à pas moins de 642 millions le nombre de personnes qui seront atteintes par le diabète en 2045 (6,7% de la population totale). ⁴ La prévalence augmente de manière plus rapide dans les pays en voie de développement que dans les pays développés. Ainsi, l'OMS prévoit que le diabète deviendra alors la septième cause de décès dans le monde (4 millions de décès en 2017). ⁴

En France et en 2017, le nombre de sujets diabétiques est de 3,2 millions, auxquels il faut ajouter 600 à 700 000 personnes qui seraient diabétiques sans le savoir. ⁹⁷

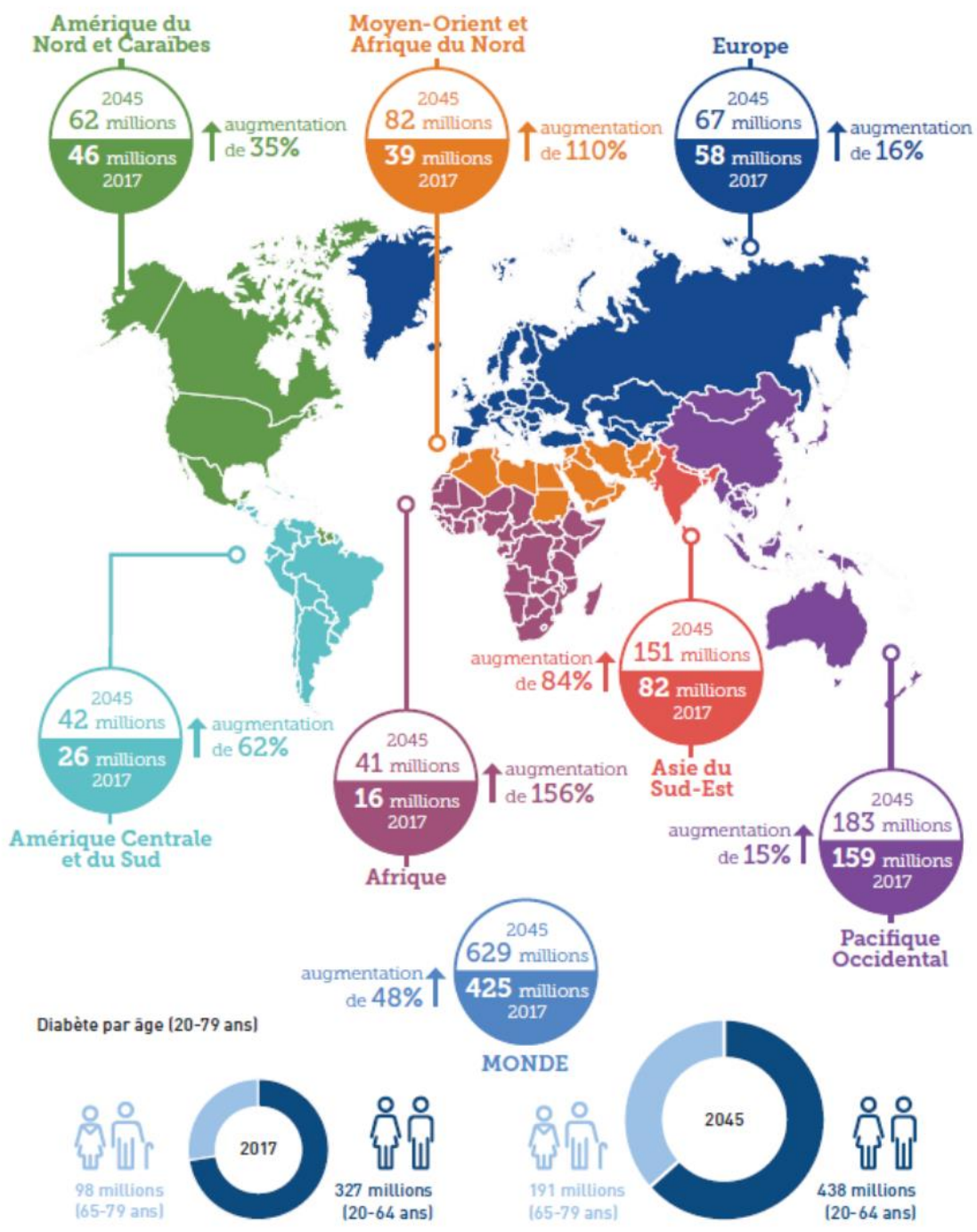


Figure 8 Nombre estimé de personnes atteintes de diabète au niveau mondial et par région en 2017 et 2045 (20-79 ans) ; d'après la 8^{ème} édition de la Fédération Internationale du Diabète FID.

I.4.III. Les caractéristiques et causes du diabète

La classification du diabète est complexe puisqu'un patient diabétique peut faire partie de plusieurs catégories. Cependant, l'ADA a mis en place en 1997 la classification suivante, allant de la catégorie la moins représentée à la plus commune : le diabète de type *maturity onset diabetes of the young* (MODY) ; le diabète gestationnel ; le diabète de type 1, DT1 (5 à 10% des diabétiques) et le diabète de type 2, DT2 (90 à 95% des diabétiques).⁹³

Le diabète de type MODY est dû à des mutations génétiques principalement sur les gènes *Hepatocyte Nuclear Factor* (HNF1A)⁹⁸ et *Glucokinase* (GCK),⁹⁹ et de façon moindre sur les gènes HNF4A,¹⁰⁰ HNF1B,¹⁰¹ et le gène de l'insuline (INS).¹⁰¹ Ce type de diabète peut être découvert et pris en charge lorsqu'un sujet possède des antécédents familiaux de diabète sur deux ou plusieurs générations.¹⁰² Il se développe chez l'enfant dont l'âge est compris entre 9 et 14 ans en moyenne. Les patients atteints de MODY ne sont pas nécessairement obèses, mais développent une hyperglycémie chronique ainsi qu'une insulino-pénie.

Le diabète gestationnel se déclare dans environ 5% des grossesses et se caractérise par une hyperglycémie. La prévalence est en plein essor du fait d'une prévalence de l'obésité toujours plus prononcée. La mère ainsi que l'enfant auront par la suite un risque plus élevé de développer un DT2.¹⁰³

Le DT1, qui débute plus tôt dans la vie que le DT2, est caractérisé par une déficience totale d'insuline, expliquée par une réponse auto-immune de l'organisme contre les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

Jusqu'à peu, et contrairement au DT1, la littérature associait le DT2 à un âge adulte. Cependant, de plus en plus de jeunes enfants sont sujets à développer un DT2¹⁰⁷ du fait d'un mode de vie sédentaire et d'une alimentation déséquilibrée.⁹⁵ Même si l'étiologie de cette pathologie n'est pas précisément connue, la majorité des patients atteints sont obèses, ce qui entraîne une insulino-résistance périphérique. Pour contrebalancer la baisse de sensibilité des organes périphériques à l'insuline, l'organisme va produire en plus grande quantité de l'insuline et induire une hyper-insulinémie.¹⁰⁸ Cette hausse du niveau d'insuline est corrélée avec une hausse de la glycémie. Après plusieurs années, les cellules β des îlots de Langerhans vont s'épuiser et se détruire graduellement, réduisant, de ce fait, le niveau d'insuline produite et augmentant fortement la glycémie, que ce soit à jeun ou après un repas.¹⁰⁹ Les études

actuelles semblent conforter le fait que la composition du microbiote intestinal serait impliquée dans le développement du DT2. ¹¹⁰ Dans le cas d'une dysbiose, ou l'équilibre du microbiote intestinal est perturbé, la présence de bactéries à Gram négatif induirait une insulino-résistance par l'intermédiaire d'une inflammation chronique à bas bruit. ^{111,112} Cette partie sera exposée plus en détails dans le chapitre 2.

I.4.IV. Un dysfonctionnement métabolique impliqué dans les complications du diabète de type 2

L'élévation chronique de la glycémie est impliquée directement dans les complications du diabète telles que les rétinopathies, les neuropathies, les néphropathies et les cardiomyopathies. Selon M. Brownlee, quatre voies métaboliques seraient à l'origine des effets physiopathologiques de l'hyperglycémie (**Fig. 9**). ⁵

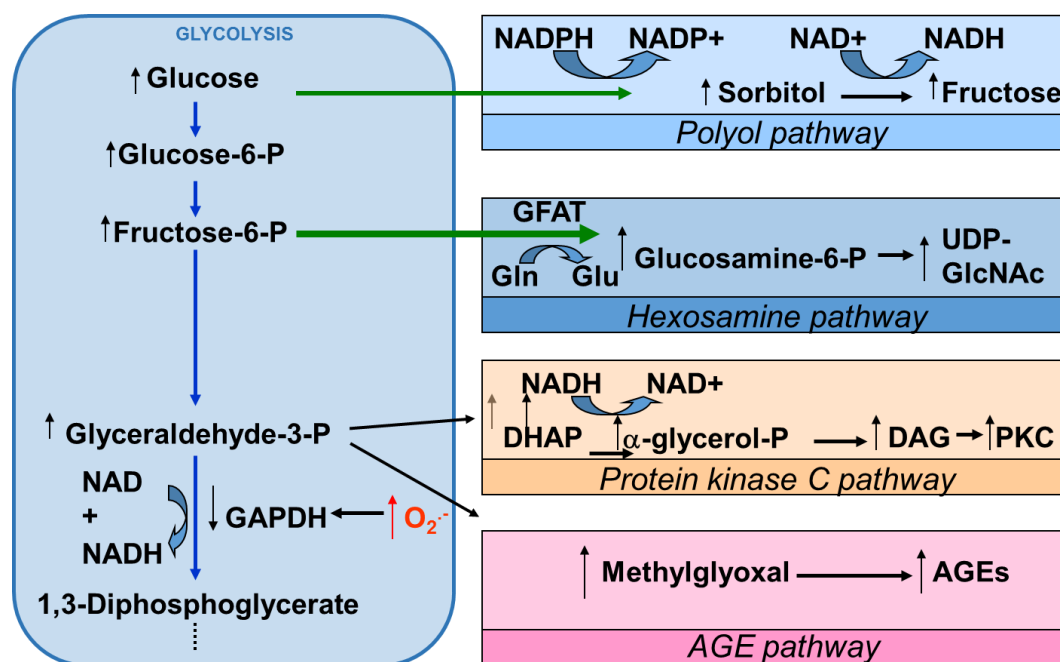


Figure 9 Potentiels mécanismes cellulaires à travers lesquels l'hyperglycémie peut induire des effets néfastes sur l'organisme sur le long terme ; d'après M. Brownlee. ⁵

Dans un premier temps, la voie des polyols implique une enzyme cytosolique, l'aldose réductase qui catalyse les réactions de dégradation de groupements carbonyles

dépendantes du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Dans un organisme avec une glycémie normalement régulée, l'affinité de l'aldose réductase avec le glucose est faible. Mais en cas d'hyperglycémie, cette affinité augmente, réduisant en conséquence la biodisponibilité du NADPH. Ce cofacteur d'oxydoréduction participe à la régénération du disulfure de glutathion (GSSG) en glutathion réduit (GSH). Ainsi, une baisse du NADPH serait en partie responsable du développement d'un stress oxydant chez le sujet diabétique. Même si certaines études remettent en cause la pertinence de ce mécanisme chez l'homme, ¹¹³ d'autres ont montré des effets positifs d'une inhibition de l'aldose réductase sur la neuropathie diabétique. ¹¹⁴

La voie des hexosamines est une voie mineure de la glycolyse, catalysée par la *glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase* (GFAT). Le produit final de cette voie métabolique, l'UDP-GlcNAc, glycosyle les résidus thréonine et sérine de facteurs de transcriptions, tels que la *specificity protein-1* (sp1), ¹¹⁵ impliquée dans l'augmentation de différentes molécules telles que le *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1) et le *transforming growth factor β* (TGF β -1). ¹¹⁶ Ces molécules sont impliquées dans les atteintes vasculaires observées au cours du DT2.

Un fort apport de glucose dans les cellules peut également induire une augmentation du niveau du diacylglycérol (DAG), qui est le second messager lipidique de la protéine kinase C (PKC) et qui *in fine* l'active. Dans ce contexte, les isoformes β et δ de la PKC qui sont les plus activées, vont être impliquées dans de nombreux processus pathologiques clés, parmi lesquels : 1) un flux sanguin anormal dû à une baisse de l'expression de l'*endothelial nitric oxide synthetase* (eNOS) et une augmentation de l'*endothelin-1* (ET-1), ¹¹⁷ 2) une néo-angiogenèse ainsi qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire du fait d'une augmentation du niveau de *vascular endothelial growth factor* (VEGF), ¹¹⁸ 3) une occlusion vasculaire induite par une augmentation des concentrations de TGF- β , de collagène, de fibronectine et de PAI-1, 4) une augmentation des marqueurs de l'inflammation par l'intermédiaire du NF- κ B. ¹¹⁹

L'hyperglycémie chronique favorise une augmentation de la concentration de plusieurs α -oxoaldéhydes. Parmi ces derniers, le 3-DG peut être formé par dégradation des produits d'Amadori, le MGO peut être issu de la dégradation des trioses phosphates,

intermédiaires de la glycolyse, ¹²⁰ et le GO formé par auto-oxydation du glucose intracellulaire. ¹²¹ Ces composés dicarbonylés nettement plus réactifs que le glucose (200 à 50 000 fois) ¹²² contribuent à la formation de divers AGE intra et extracellulaires ¹²³ dont la CML et le Méthylglyoxal-hydroimidazolone 1 (MG-H1). Le fructose produit par dégradation du sorbitol dans la voie des polyols peut également être source de glycation précoce (produits de Heyns) et avancée.

I.4.V. Rôle de la glycation dans les complications dégénératives du diabète

Des études montrent que le plasma de sujets diabétiques est plus riche en produits précoces (HbA1c et fructoselysine) et avancés de la glycation (CML, pentosidine, fluorescence) comparé à celui de sujets sains (**Tableau 1**). ^{2,124} Des tendances similaires sont observées chez des animaux de laboratoire rendus diabétiques (**Tableau 2**). ^{2,125,126}

<i>Molécule</i>	<i>Groupe</i>	<i>Concentration</i>
CML (pg/mL)	ND	171 (81-298)
	T2D	440 (383-601) ^{***}
Pentosidine (pg/mL)	ND	53 (36-60)
	D	211 (69-380) ^{**}
HbA1c (%)	ND	5,1 ± 0,3
	T2D	9,6 ± 2,3 ^{***}

Tableau 1 Données de marqueurs de la glycation précoce et avancée dans le plasma de sujets sains et diabétiques. ND : non diabétique (âge moyen : 57 ans) ; T2D : diabétique de type 2 (âge moyen : 59 ans). Données exprimées en médiane (minimum-maximum) pour la CML et pentosidine. ¹²⁴ Les étoiles représentent les différences significatives, ** p<0.01, *** p<0.001.

<i>Molécule</i>	<i>Groupe</i>	<i>Concentration</i>	<i>Référence</i>
CML (µmol/mol lys)	ND	33 ± 4	2
	D	62 ± 8***	
CML (U/mL)	ND	1,5 ± 0,4	125
	D	2,2 ± 0,6*	
CEL (µmol/mol lys)	ND	8 ± 3	2
	D	17 ± 6**	
MG-H1 (mmol/mol arg)	ND	1,5 ± 0,3	2
	D	2,2 ± 0,4**	
HbA1c (%)	ND	2,8 ± 0,1	125
	D	8,9 ± 0,8*	
Fructoselysine (mmol/mol lys)	ND	1,8 ± 0,4	2
	D	7,4 ± 1,6***	

Tableau 2 Données de marqueurs de la glycation précoce et avancée dans le plasma de rats-STZ (streptozotocine). ND : non diabétique ; D : diabétique ; lys : lysine ; arg : arginine. Les étoiles représentent les différences significatives, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

De plus en plus d'études montrent des liens entre la glycation et le développement des complications macro- et micro-vasculaires du diabète. ¹²⁷⁻¹²⁹ La rétinopathie qui est une complication micro-vasculaire, se caractérise par une augmentation de la prolifération des vaisseaux sanguins, une occlusion vasculaire mais également une néo-angiogenèse. ¹³⁰ Une accumulation de produits de glycation précoce (fructosamines) ainsi que d'AGE (e.g. CML) au niveau de la rétine a été observée chez des patients diabétiques. ¹³¹ Des études *in vitro* ont montré que la surexposition de cellules de rétine à des AGE induisait une augmentation de l'expression de VEGF, impliquée dans l'angiogenèse. De plus, la liaison AGE-RAGE stimule les mécanismes pro-inflammatoires et pro-oxydants, se traduisant par une dysfonction micro-vasculaire. ¹³² Une forte accumulation de produits de glycation a aussi été observée dans les cristallins de personnes diabétiques. Il est aujourd'hui admis que cette accumulation de modifications post-traductionnelles des cristallines participe au développement de l'opacification du cristallin, et donc au développement de la cataracte. ³

Lorsque les produits de glycation s'accumulent au niveau des reins des sujets diabétiques, ils participent au développement de néphropathies par l'intermédiaire d'une hyperfiltration (albuminurie) ainsi que par le développement d'anomalies structurales (glomérulosclérose, fibrose, altération tubulaire). Comme nous l'avons décrit dans le **chapitre 1.2.1**, les AGE forment des cross-links entre les fibres de collagène, rigidifiant alors la MEC.¹³³ Par ailleurs, d'autres études montrent qu'en inhibant le RAGE, les dommages tubulaires et l'albuminurie sont réduits du fait d'une baisse du niveau d'inflammation et de stress oxydant.¹³⁴

Parmi les 4 voies pathologiques induites par l'hyperglycémie proposée par M. Brownlee, la voie des polyols et de la glycolyse participent à l'accumulation de produits de la glycation au niveau des nerfs périphériques. En effet, plusieurs études ont non seulement rapporté une augmentation des produits d'Amadori, CML, carboxyéthyllysine (CEL) et du MG-H1 dans les nerfs périphériques de rats-STZ^{135,136} mais aussi chez des sujets diabétiques.^{125,137} La glycation des cellules nerveuses entraîne une baisse du flux sanguin et une hypoxie neuronale. En parallèle, l'interaction AGE-RAGE va induire sur les cellules de Schwann une démyélinisation conduisant à une perte neuronale. Cette même interaction AGE-RAGE sur les cellules endothéliales va conduire à une vasodilatation des micro-vaisseaux dans les nerfs périphériques et à une angiogenèse se traduisant par une microangiopathie.¹³⁸

Enfin, la glycation participe également au développement des cardiomyopathies chez les sujets diabétiques, puisqu'une accumulation d'AGE a été observée dans des cardiomyocytes de ces patients. Les interactions AGE-protéines et AGE-RAGE vont induire des changements intracellulaires de ces cellules musculaires cardiaques, conduisant ainsi à une augmentation de la rigidité de la MEC et à une baisse de la contractilité des cardiomyocytes.¹³⁹

L'ensemble des études citées ci-dessus et bien d'autres démontrent l'implication de la glycation dans le développement des complications du diabète. C'est pourquoi, ces dernières décennies, de nombreuses études ont porté sur le développement de stratégies thérapeutiques visant à limiter la formation et l'accumulation des produits précoces, des intermédiaires dicarbonylés et des produits avancés de la glycation.

I.5. Les modèles d'étude du diabète et de la glycation

I.5.1. Les modèles murins d'étude du diabète

Afin de mieux comprendre l'étiologie et les complications du diabète, de nombreux modèles expérimentaux murins ont été développés depuis plusieurs décennies.

Chaque modèle possède ses avantages et limites, et ne développe généralement pas toutes les complications du diabète. Il est donc important de bien choisir un modèle en fonction des questions posées. Les modèles animaux de diabète (type 1 ou 2) les plus couramment utilisés sont les rongeurs (rats et souris), pour lesquels différents protocoles d'induction du diabète sont proposés (chimique, génétique, environnemental, viral).

Les modèles murins visant à étudier le DT1 sont constitués d'au moins 4 familles :

- Le modèle murin le plus communément utilisé pour l'étude du DT1 est le modèle de diabète spontané auto-immun. Les souris *non-obese diabetic* (NOD) ¹⁴⁰ et les rats *biobreeding* (BB) sont connus pour développer une insulite qui correspond à une inflammation des îlots pancréatiques conduisant à une destruction des cellules β . Le mécanisme pathologique de ces modèles est très proche de celui développé chez l'humain, ce qui permet d'étudier précisément la mécanistique du DT1 et de développer des thérapies visant à moduler le système immunitaire. ¹⁴⁰⁻¹⁴²
- L'utilisation de molécules chimiques est couramment réalisée lors de l'étude du diabète. La streptozotocine (STZ – administrée par injection d'une dose unique élevée ou par répétition de doses faibles) ou l'alloxane induisent une destruction partielle ou totale des cellules β de Langerhans, ¹⁴³⁻¹⁴⁷ réduisant ou supprimant totalement la production d'insuline et provoquant une perte de poids. ¹⁴² Les animaux soumis à ce traitement chimique développent une hyperglycémie chronique importante ainsi qu'une intolérance au glucose et nécessitent d'être régulièrement traités avec de l'insuline. Ces modèles sont surtout utilisés pour étudier l'effet de molécules sur la réduction de l'hyperglycémie ou pour tester des transplantations de pancréas. ¹⁴⁸

- Le DT1 peut également être induit de manière sévère en réalisant une mutation spontanée sur le gène de l'insuline, la rendant non fonctionnelle. C'est le cas de la souris AKITA, qui développe une hyperglycémie chronique, une hypoinsulinémie, une polydipsie et une polyurie.¹⁴² Ce modèle est couramment utilisé pour développer des thérapies contre le stress du réticulum des cellules β .¹⁴⁹
- Le DT1 peut enfin être induit par voie virale (*coxsackie B*, encéphalomyocarditis, *kilham rat virus*), afin de détruire les cellules β de Langerhans de façon directe ou par initiation d'une réponse immunitaire dirigée contre celles-ci.¹⁵⁰

Il existe d'autres modèles animaux non murins qui permettent d'étudier le DT1, parmi lesquels la pancréatectomie ou encore l'ablation chimique des ilots β chez le porc,¹⁵¹ le chien¹⁵² et le primate non humain.¹⁵³ Cependant, les chirurgies réalisées pour ces modèles sont très invasives et rendent ceux-ci moins communs.

Les modèles animaux utilisés pour l'étude du DT2 sont majoritairement des modèles d'obésité qui tentent de se rapprocher des conditions environnementales d'induction du DT2 chez l'homme.

Tout comme pour les modèles de DT1, ceux de DT2 peuvent être classés en différentes familles :

- Les modèles monogéniques d'obésité, qui font partie des plus utilisés pour le développement de thérapies contre le DT2, ont un défaut dans la voie de signalisation de la leptine (hormone responsable de la satiété). Les souris *Lep^{ob/ob}*, par exemple, sont déficientes en leptine, tandis que les souris *LepR^{db/db}* et les rats Zucker sont déficients pour le récepteur à la leptine.^{142,154,155} L'ensemble de ces animaux développe rapidement une hyperphagie qui se traduit par une obésité sévère. Après quelques semaines, ces animaux obèses développent une hyperinsulinémie, une hyperlipidémie, une hyperglycémie chronique ainsi qu'une intolérance au glucose. Ces différents modèles monogéniques d'obésité diffèrent de par les complications qu'ils développent. Ainsi, les modèles murins *Lep^{ob/ob}* et rats Zucker sont plutôt employés pour étudier les complications précoces du

diabète, tandis que le modèle de souris *LepR^{db/db}* est préférable pour suivre les complications avancées. ¹⁵⁶

- Il existe, en plus des modèles monogéniques, des modèles polygéniques d'obésité tels que la souris KK, le rat *Otsuka Long-Evans Tokushima* (OLETF) ou encore la souris TallyHo/Jng. Ces modèles développent une insulino-résistance modérée, des néphropathies ainsi que des stéatoses hépatiques non alcooliques. Cependant, contrairement aux modèles monogéniques, il n'existe pas de souris contrôles de type sauvage (wild-type en anglais, WT) pour les modèles polygéniques. ¹⁴²
- Chez L'Homme, en dehors des formes monogéniques, l'obésité est principalement due aux conditions de vie (sédentarité, mauvaise alimentation, tabac, stress). Afin de se rapprocher au mieux de l'étiologie du DT2, des modèles d'induction de l'obésité par l'alimentation ont été mis en place. Différents régimes sont couramment utilisés, comme les régimes riches en graisse (high fat diet, HFD) et les régimes riches en graisse et saccharose (high fat high sucrose, HF-HS). ¹⁵⁷⁻¹⁶¹ Contrairement aux modèles monogéniques, ces modèles sont beaucoup plus longs à mettre en place, puisque selon les protocoles, les animaux soumis à ces régimes développent une obésité plus ou moins rapidement (de 10 à 55 semaines de régime). De plus, malgré le développement d'une intolérance au glucose, il est difficile de mettre en place une hyperglycémie notable. Cependant les modèles d'obésité HFD et HF-HS sont souvent utilisés afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à prévenir l'apparition des complications du DT2. ¹⁶²
- Enfin, le rat *Goto-Kakizaki* (GK) est un modèle atypique, puisque c'est un modèle de DT2 non obèse caractérisé par une intolérance au glucose ainsi qu'une insulino-résistance due à une anomalie de fonction des cellules β . ¹⁶³

Les modèles d'études du diabète sont donc nombreux. Le choix d'un modèle dépend de la question à laquelle les chercheurs souhaitent répondre.

Afin d'étudier la glycation, ses associations avec les complications du diabète, et la mise en place de stratégies thérapeutiques, différents modèles animaux parmi ceux qui ont été décrits ci-dessus ont déjà été utilisés.

I.5.II. Les modèles de diabète appliqués à l'étude de la glycation

Pour pouvoir caractériser la glycation dans un contexte diabétique proche de l'Homme, la plupart des études se sont basées sur les modèles murins existants (modèles de diabète de types 1 et 2).

Parmi les études les plus récentes, celles qui ont utilisé des modèles murins de diabète de type 1 induit par la STZ montrent une accumulation d'AGE dans le plasma, ^{164,165} les reins, ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ le foie, ¹⁶⁶ le cœur ¹⁶⁶ et les cristallins. ^{169,170} Ces concentrations élevées d'AGE étaient en lien avec le développement de complications diabétiques chez les animaux (néphropathie, stéatose hépatique non alcoolique, troubles cardiovasculaires, cataracte).

Une accumulation d'AGE a aussi été observée dans les muscles squelettiques, ¹⁷¹ le plasma ^{172,173} et le cortex cérébral ¹⁷⁴ de modèles murins génétiques *Lep^{ob/ob}* et *LepR^{db/db}*. C. H. Park *et al.* ont finalement mis en évidence par western blot, une accumulation de CML, CEL et pentosidine dans le foie ¹⁷⁵ et les reins ¹⁷⁶ de souris *LepR^{db/db}*.

Les quelques études réalisées sur des souris soumises à des régimes obésogènes (HFD, HF-HS) ont montré une accumulation de MGO et de GO dans le tissu adipeux ¹⁷⁷ ainsi que d'AGE dans le sérum, ^{173,178} les reins, ¹⁷⁹ le cœur ¹⁷⁹ et le foie. ¹⁸⁰

Les méthodes analytiques utilisées dans les études de la glycation décrites ci-dessus ont été le western blot, le dosage ELISA ou encore la fluorescence. Ces méthodes - très accessibles de par leurs faibles coûts, leur simplicité et leur rapidité d'utilisation - ne sont cependant que semi-quantitatives. Elles sont aussi considérées comme peu spécifiques et sensibles aux interférences matricielles. ¹⁸¹

Par ailleurs, un nombre limité d'études a utilisé la Chromatographie Liquide de haute performance couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem (LC-MS/MS) pour caractériser la glycation sur les modèles animaux. Bien que coûteuse, cette méthode a l'avantage d'être quantitative. Elle peut aussi être répétable, reproductible et hautement spécifique. De manière générale, la LC-MS/MS est considérée comme étant la méthode de référence pour la quantification des produits de glycation.¹⁸² En utilisant la LC-MS/MS, quelques résultats intéressants ont été obtenus, dont certains sont présentés dans le **tableau 3**.

Par exemple, une accumulation du MGO a été observée dans les cristallins, les globules rouges et les nerfs sciatiques de rats-STZ.¹⁸³ Avec ce même modèle, il a été observé une augmentation de furosine (dérivé d'hydrolyse acide d'un produit d'Amadori, la fructoselysine) et de CML dans les foies tandis que les niveaux de CEL et de MG-H1 restaient inchangés.¹⁸⁴ Toujours chez le rats-STZ, P. J. Thornalley *et al.* ont rapporté une augmentation des produits d'Amadori, de la CML, de la CEL et du MG-H1 dans les glomérules, les urines, les rétines, le plasma, les nerfs sciatiques et squelettiques,² tandis qu'une autre équipe a montré une augmentation de la CML dans le plasma, les tendons et l'aorte.¹⁸⁵ D. W. Lai *et al.* ont mesuré, par LC-MS/MS, une augmentation significative de la CML dans le sérum de rats et souris-STZ, de souris sous régime HFD ainsi que de souris LepR^{db/db}.¹⁸⁶

<i>Molécule</i>	<i>Groupe</i>	<i>Plasma</i>	<i>Rein</i>	<i>Foie</i>	<i>Référence</i>
CML ($\mu\text{mol/mol lys}$)	Rats ctrl	-	-	100 \pm 3	184
	Rats-STZ	-	-	170 \pm 2**	
	Rats ctrl	33 \pm 4	269 \pm 10	-	2
	Rats-STZ	62 \pm 8***	501 \pm 186*	-	
	Rats ctrl	302 \pm 20	-	-	185
	Rats-STZ	390 \pm 100*	-	-	
Produits d'Amadori (mmol/mol lys)	Rats ctrl	-	-	0,8 \pm 0,4	184
	Rats-STZ	-	-	2,1 \pm 0,6**	
	Rats ctrl	1,8 \pm 0,4	0,2 \pm 0,1	-	2
	Rats-STZ	7,4 \pm 1,6***	1,0 \pm 0,1***	-	
	Rats ctrl	0,4 \pm 0,1	-	-	185
	Rats-STZ	0,8 \pm 0,4*	-	-	

Tableau 3 Données de marqueurs de la glycation précoce et avancée dans le plasma, les reins et le foie de rats-STZ obtenues par LC-MS/MS. Les étoiles représentent les différences significatives, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

De manière peut être surprenante, il a été montré que des souris soumises à un régime HFD accumulaient moins de CML et de MG-H1 dans les tendons de queue et les tendons d'Achille que des souris sous un régime classique A04 (Normal Diet, ND) (**Tableau 4**).¹⁸⁷ Les auteurs de cette étude attribuent la faible accumulation d'AGE chez les souris HFD à une plus faible exposition aux AGE venant de l'alimentation HFD comparée à l'exposition des souris témoins. En effet, il apparaît que l'alimentation HFD est constituée de protéines de meilleure qualité et moins glyquées que celles qui sont utilisées pour la constitution du régime classique A04. Cette étude, qui montre les effets indirects d'une exposition alimentaire aux AGE, sera reprise et discutée dans les travaux de cette thèse (**Partie expérimentale - Chapitre I**).

<i>Molécule</i>	<i>Groupe</i>	<i>Tendon d'Achille</i>	<i>Tendon de queue</i>
CML (nmol/mol hydroxyproline)	Souris	53±3**	36±1**
	ND		
	Souris	42±2	26±1
	HFD		
MG-H1 (nmol/mol hydroxyproline)	Souris	175±4**	375±10**
	ND		
	Souris	150±2	300±5
	HFD		

Tableau 4 Données de marqueurs de la glycation avancée dans les tendons d'Achille et de queue de souris sous régime normal diet (ND) ou high fat high diet (HFD) obtenues par LC-MS/MS. Les étoiles représentent les différences significatives, ** p<0.01. ¹⁸⁷

I.6. Moyens de lutte contre la glycation endogène

Afin de lutter contre la glycation, les organismes cellulaires et supérieurs ont développé des stratégies de défense visant entre autres à déglyquer le produit d'Amadori (*i.e.* la fructosamine-3-kinase) et à métaboliser divers dérivés dicarbonylés tels que le MGO et le GO (*i.e.* le système glyoxalase).

Parallèlement à cela, les chercheurs ont développé au cours des dernières décennies des stratégies thérapeutiques dans le but de : 1) limiter et empêcher la formation des produits précoces de la glycation ; 2) séquestrer ou métaboliser les précurseurs de la glycation ; 3) inhiber le récepteur aux AGE (RAGE).

I.6.1. Systèmes organiques de défense contre la glycation

I.6.1.1. La fructosamine-3-kinase

Les moyens de lutte contre la glycation vont être présentés en fonction de l'étape de la glycation pendant laquelle ils interviennent. Pour rappel, la première étape de la glycation consiste en une réaction entre un sucre réducteur et la fonction amine d'un

acide aminé, d'un peptide ou d'une protéine afin de former dans un premier temps des produits précoces tels que les fructosamines.

L'activité de la fructosamine-3-kinase (FN3K) a été découverte dans les années 1990 avec l'observation d'une phosphorylation du fructose dans des cristallins et des érythrocytes diabétiques murins.¹⁸⁸ Lorsque cette enzyme a été découverte, il a alors été montré que l'affinité enzymatique était plus forte envers la fructoseamine qu'envers le fructose seul.¹⁸⁹ En phosphorylant la fructosamine au niveau intracellulaire, la FN3K libère la fonction amine qui était glyquée et génère par la même occasion une molécule de 3-déoxyglucosone (**Fig. 10**). Cette enzyme est donc capable d'inverser la glycation précoce.¹⁸⁹

Afin d'étudier les effets biologiques directs de la FN3K, des chercheurs ont créé un modèle murin *knock-out* (KO) pour cette enzyme. Bien qu'aucun paramètre biologique ne semble affecté par cette mutation génétique, les souris issues de ce modèle montrent bien une augmentation du niveau de fructosamine dans plusieurs tissus (cerveau, foie, cœur, muscles squelettiques).¹⁹⁰ Cette étude a permis de démontrer l'effet déglyquant de la FN3K chez la souris. La FN3K a également été observée dans les érythrocytes humains.¹⁹¹ Bien que son expression reste inchangée en fonction du poids, de l'âge, la teneur en cholestérol sanguin, la glycémie, son activité est augmentée dans les érythrocytes de patients atteints de troubles rénaux.¹⁹² De plus, il a été montré une corrélation entre l'augmentation de la FN3K dans les valves aortiques de sujets âgés et l'apparition de pathologies de la valve aortique.¹⁹³ Aujourd'hui, aucun essai clinique à base de FN3K n'a été mis en place.

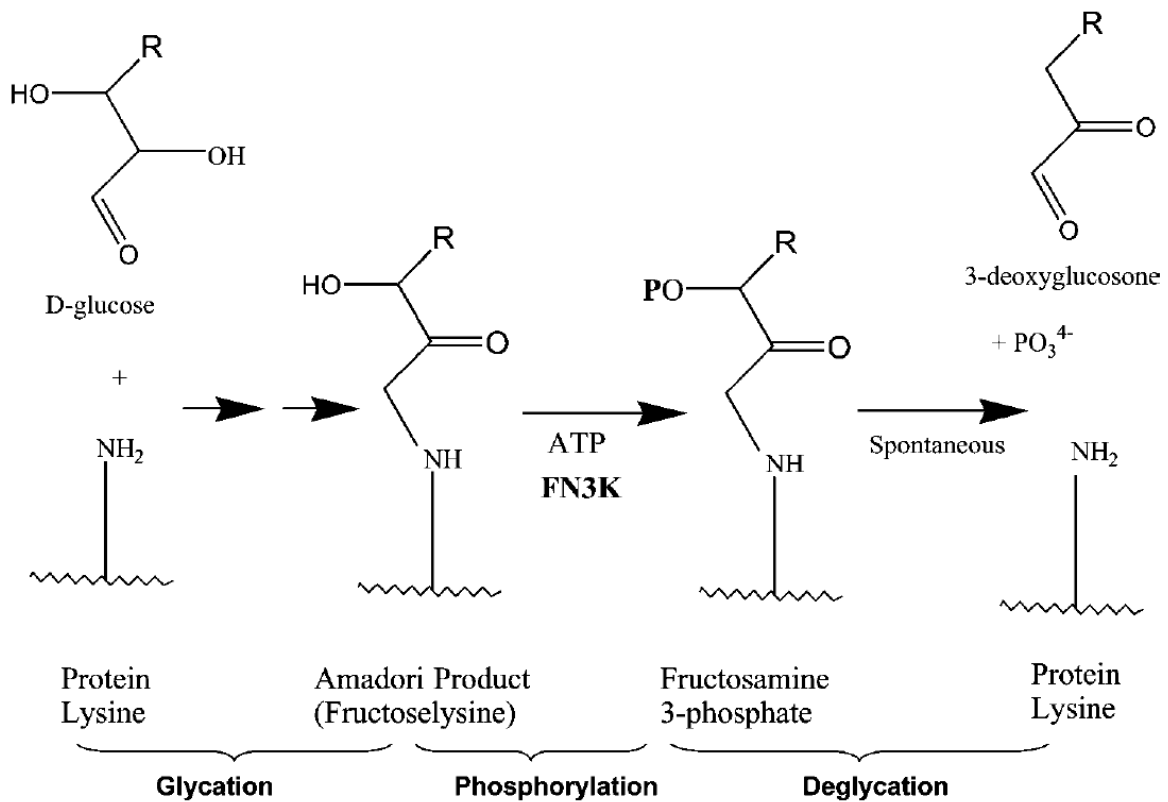


Figure 10 Mécanisme de déglycation induit par la FN3K ; d'après V. Monnier et al. ⁶

Le vieillissement est un processus pendant lequel les produits de glycation précoce s'accumulent au niveau extracellulaire, notamment sur les protéines à longue durée de vie (crystallin, collagène de la peau, ...). L'activité de la FN3K se cantonne à un niveau intracellulaire, mais il existe des enzymes capables de dégrader les produits d'Amadori au niveau extracellulaire. Il s'agit des Amadoriases, ¹⁹⁴ cependant aucun résultat concluant n'a été observé chez les mammifères.

1.6.1.2. Le système glutathion / glyoxalase

Au cœur du cytosol de toutes les cellules eucaryotes et procaryotes, le système cétone-aldéhyde mutase, plus communément appelé système glyoxalase, est un second mécanisme de défense contre la glycation. ¹⁹⁵ Ce système enzymatique, qui permet de métaboliser certains dérivés dicarbonylés (principalement le MG) en D-lactate, a été mis en évidence pour la première fois en 1913 par H. D. Dakin, H. W.

Dudley et C. Neuberg. ¹⁹⁶ L'activité de la glyoxalase était alors mesurée en analysant la formation de lactate dans des extraits cellulaires auxquels était ajouté du MG. En 1932, K. Lohmann a mis en évidence une certaine complexité du système enzymatique en montrant que le GSH en était un cofacteur primordial. Les études qui ont suivi ont montré que le MGO réagissait avec le GSH pour être ensuite métabolisé en D-lactate par la glyoxalase 1 (Glo-1). ¹⁹⁷ C'est enfin en 1951 que E. Racker complètera la compréhension de ce système de détoxification des composés dicarbonylés en montrant qu'il n'existait pas une mais deux glyoxalases : les Glo-1 et Glo-2. ^{198,199} Il est aujourd'hui admis que la Glo-1 catalyse la formation d'un hémitioacétale S- lactoylglutathion à partir du MGO et du GSH, tandis que la Glo-2 permet d'hydrolyser le S- lactoylglutathion en D-lactate puis de régénérer le GSH qui sera de nouveau disponible pour l'étape précédente (**Fig. 11**). ²⁰⁰

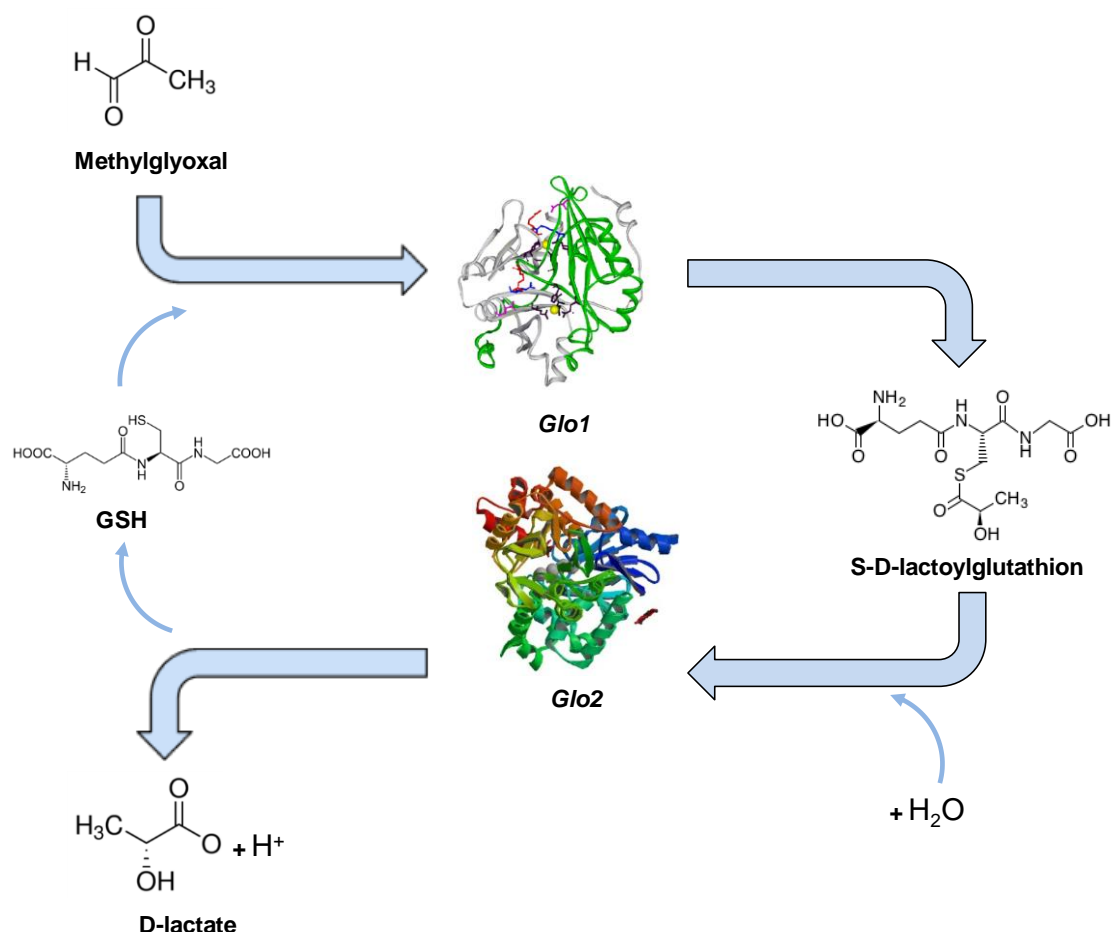


Figure 11 Le système glutathion/ glyoxalase, impliqué dans la métabolisation du méthylglyoxal.

La Glo-1 est retrouvée dans divers organismes comme les levures, les plantes et les mammifères.¹⁹⁵ Elle est exprimée au niveau du cytosol de toutes les cellules de l'organisme mais très peu retrouvée dans les noyaux cellulaires et les mitochondries.²⁰¹ L'enzyme humaine existe sous forme de dimère et sous trois formes d'allozymes différentes (enzymes codées par différents allèles d'un même gène) : Glo 1-1, Glo 1-2 et Glo 2-2. Son poids moléculaire est estimé à environ 44 kDa.²⁰² La Glo-2, d'environ 24 kDa, est quant à elle exprimée majoritairement dans le cytosol et les mitochondries. Une défaillance de ce système de défense, et notamment de la Glo-1, est associée à de nombreuses pathologies parmi lesquelles le diabète,^{203–205} les pathologies cardiovasculaires,²⁰⁶ les désordres hépatiques,²⁰⁷ le cancer.^{208,209} Une baisse de l'activité de ce système enzymatique est aussi observée au cours du vieillissement physiologique.²¹⁰

Afin d'étudier plus en détails le rôle physiologique du système glyoxalase, de nombreux travaux scientifiques ont cherché à moduler la Glo-1, soit en l'inhibant, soit en augmentant son expression et son activité. La surexpression du gène de la Glo-1 prévenait la prise de poids et réduisait l'inflammation chez des souris transgéniques qui consommaient un régime riche en graisse HFD.²¹¹ De manière complémentaire, les effets de la glyoxalase ont été étudiés au niveau rénal en étudiant en parallèle des souris diabétiques qui surexprimaient la Glo-1 ou à l'inverse des souris non diabétiques KO pour la Glo-1.²¹² La surexpression de la Glo-1 permettait de prévenir l'augmentation du MGO rénal et de développer des pathologies rénales, tandis qu'en parallèle, les souris KO pour la Glo-1 montraient des concentrations en MGO et un stress oxydant rénal plus important que les souris contrôles.²¹² Du point de vue du vieillissement, une surexpression de la Glo-1 chez le ver *Caenorhabditis elegans* réduisait les niveaux de MGO, le stress oxydant et prolongeait la durée de vie de ceux-ci.²¹³ T. Fleming *et al.* ont observé une baisse du transcrits, de la protéine et de l'activité de la Glo-1 chez des souris âgées de plus d'un an. Ils ont pu observer une corrélation entre ces baisses et une baisse de la capacité de cicatrisation.²¹⁴

Une étude clinique réalisée en 2016 a montré qu'une surexpression de la Glo-1 par l'intermédiaire de *trans*-resvératrol combiné à de l'hespérétine diminuait les niveaux plasmatiques de MGO, réduisait la glycémie à jeun, améliorait la tolérance au glucose et améliorait la fonction vasculaire chez des patients obèses.⁷

Cependant il existe un risque d'effets secondaires puisque la surexpression de la Glo-1 pourrait être responsable d'effets carcinogènes, et pourrait induire une résistance aux chimiothérapies. ^{215,216}

I.6.II. Les stratégies thérapeutiques contre la glycation

I.6.II.1. Séquestrer les précurseurs de la glycation

La deuxième étape de la glycation (étape de propagation) génère différents dérivés dicarboxylés qui sont des précurseurs majeurs des AGE. De nombreuses études ont porté sur le développement de molécules capables de piéger les produits d'Amadori ou les dérivés dicarboxylés afin de les empêcher de former des AGE. La plupart des molécules qui vont être présentées ci-dessous possèdent des groupements aminés (**Fig. 12**). Ces fonctions amines ont donc la capacité de réagir avec les composés dicarboxylés et ainsi de rentrer en compétition avec les amines des protéines de l'organisme.

C'est dans les années 1980 que l'action anti-glyquante de l'aminoguanidine (AG) a été découverte *in vitro* par M. Brownlee *et al.* ²¹⁷ Ces mêmes auteurs ont aussi montré que l'accumulation d'AGE au niveau du collagène d'aortes de rats diabétiques pouvait être limitée par l'AG, confirmant par la même occasion le lien entre la glycation et le diabète. D'autres études sur le même thème ont montré que l'AG pouvait prévenir l'apparition de dysfonctions épithéliales en réduisant les niveaux de pentosidine et de fluorescence dans l'aorte et la peau. ²¹⁸ De plus, l'AG retarderait la progression des complications rénales en réduisant l'albuminurie chez le rat-STZ. ²¹⁹ Cependant l'utilisation de méthodes analytiques spécifiques et quantitatives n'ont pas permis d'observer d'effet de l'AG sur les concentrations de pentosidine et de CML au niveau de la peau chez le rat-STZ. ²²⁰ Les différences d'efficacité de l'AG observées entre les publications peuvent s'expliquer par des temps de traitement variables entre les différents protocoles. En effet il a été montré que les effets de l'AG sont positivement corrélés à la durée de traitement. ²²¹ Malgré des effets anti-glyquants de l'AG relativement concluants, cette molécule n'a pas été retenue en raison d'effets secondaires indésirables et potentiellement graves. Il a par exemple été observé une apparition de tumeurs chez les rats diabétiques ²²² ou encore une baisse d'enzymes telles que la

catalase plasmatique ainsi qu'une augmentation d'auto-anticorps dans des essais cliniques.²²³

Du fait du coût élevé du design de certaines molécules et des effets néfastes induits par ces dernières, les études se basent de plus en plus sur des molécules aux propriétés homologues, telles que des dérivés des vitamines du groupe B. Parmi ces dérivés, il a été montré que la pyridoxamine, qui est un dérivé de la vitamine B6, induit une réduction des niveaux de MGO, d'AGE et d'ALE dans le plasma²²⁴ et la peau de rats diabétiques.^{225,226} Une étude de 2007 sur des sujets diabétiques montre que la pyridoxamine diminue les teneurs en CML et CEL urinaires.²²⁷

La thiamine et la benfotiamine (S-benzoylthiamine-O-monophosphate) sont quant à elles des dérivés de la vitamine B1 qui vont stimuler et augmenter l'activité d'une enzyme dépendante de la thiamine, la transcétolase. Cette enzyme joue un rôle dans la réduction des dérivés glycolytiques et en particulier dans la réduction des dérivés dicarbonylés.⁸ Il a été montré que la thiamine et la benfotiamine réduisaient, *in vitro*,²²⁸ la fluorescence induite par les AGE dans des cellules endothéliales de cordon ombilical humains (HUVEC), tandis que seule la benfotiamine prévenait l'accumulation de la CML et du 3-DG *in vivo* dans des neurones de rats-STZ.¹³⁵ L'utilisation de la thiamine²²⁹ (300mg/ jour pendant trois mois) ou de la benfotiamine²³⁰⁻²³² (600, 300 ou 900mg/ jour pendant deux, vingt-quatre ou trois mois) comme traitement anti-glyquant sur des patients diabétiques de type 1 et 2, n'a pas montré d'effet concluant sur la réduction des dérivés dicarbonylés ou des AGE au niveau circulant.

Finalement, le chlorure 4,5-diméthyl-3-(2-oxo-2-phényléthyl)-thiazolium, plus communément appelé alagebrium ou ALT-711, est une molécule étudiée plus récemment sur laquelle beaucoup d'espoirs ont été fondés. Cette molécule entre dans la catégorie des « casseurs d'AGE », puisqu'elle a la capacité de casser les liaisons carbone-carbone des dérivés dicarbonylés, notamment le MGO.²³³ Cette hypothèse a pu être vérifiée par l'apparition de fragments plus petits issus des AGE lors d'analyses LC-MS/MS de lentilles de patients diabétiques incubées avec l'ALT-711.²³⁴ L'ALT-711 permet également de séquestrer les dérivés dicarbonylés.⁸ Une étude clinique lors de laquelle était réalisée une ingestion d'ALT-711 pendant huit semaines par des sujets hypertendus, avec ou sans diabète de type 2 a montré une baisse de la tension artérielle ainsi qu'une amélioration de la compliance artérielle par rapport

aux patients sous placebo. ²³⁵ De nombreux autres essais cliniques ont été réalisés mais n'ont pas abouti du fait de problèmes économiques. ⁸ En plus de son effet anti-glyquant, l'ALT-711 réduit le niveau d'expression du RAGE chez la souris ¹²⁸ et le rat diabétique ²³⁶ au niveau cardiovasculaire.

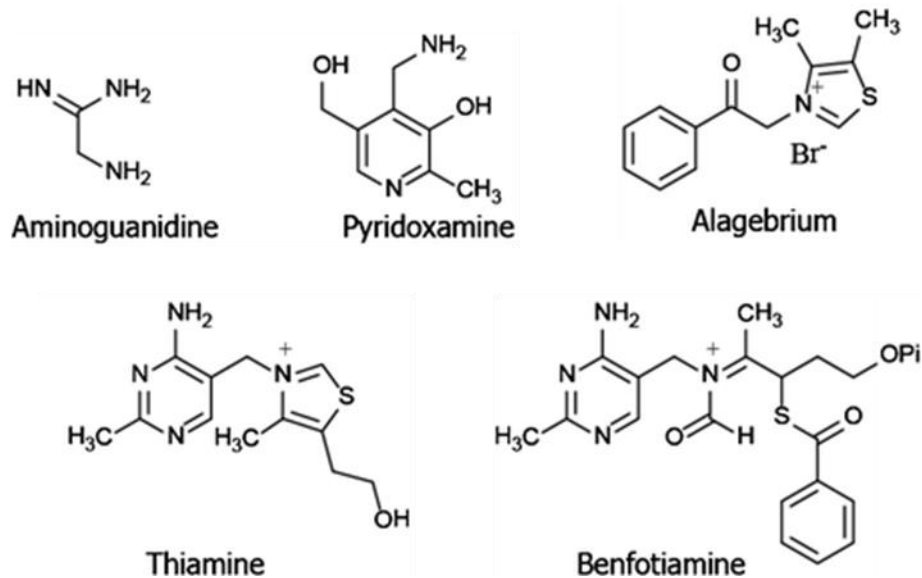


Figure 12 Molécules pharmaceutiques utilisées pour inhiber le processus de glycation ; d'après J.M. Forbes et al. ⁸

1.6.II.2. Inhiber le récepteur aux AGE

L'ensemble des études présentées ci-dessus a porté sur des molécules agissant directement sur les produits de glycation. Mais ce n'est pas le seul moyen de lutter contre les effets de la glycation. En effet, d'autres travaux ont tenté de prouver que l'inhibition du récepteur aux AGE, le RAGE, pouvait réduire l'inflammation, le stress oxydant et les complications du diabète.

L'inhibition de RAGE fait donc partie des stratégies thérapeutiques visant à réduire les dommages cellulaires et tissulaires causés par l'interaction entre les produits de glycation et le RAGE (e.g. genèse de radicaux libres et de NF- κ B, augmentation et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires).

Comme décrit précédemment, le sRAGE qui est une des variantes génétiques du RAGE, permet, par compétitivité, d'empêcher la fixation des ligands au RAGE membranaire.⁷²

Le sRAGE est caractérisé comme étant un régulateur endogène négatif et compétitif du RAGE membranaire et empêche l'activation des voies de signalisation induisant les dommages cellulaires et tissulaires.²³⁷ Le fait que la concentration de sRAGE soit plus élevée chez les sujets centenaires ou les sujets jeunes et sains par rapport aux sujets ayant des troubles cardiovasculaires, suggère, dans un premier temps que cette molécule pourrait être un bon marqueur de longévité.²³⁸ De plus, sRAGE semble pouvoir devenir aussi un bon marqueur physiopathologique puisque, selon plusieurs études, sa modulation serait en lien avec l'avancée de plusieurs pathologies (Alzheimer,²³⁹ diabète de type 1²⁴⁰ et 2,²⁴¹ maladies cardiovasculaires,²⁴² cancers,²⁴³ atteintes rénales,²⁴⁴ atteintes pulmonaires,²⁴⁵ arthrite rhumatoïde,²⁴⁶ stéatose hépatique non alcoolique²⁴⁷).

L'ensemble de ces travaux laisse à penser que le sRAGE pourrait être une stratégie thérapeutique à l'encontre des conséquences pathologiques de la glycation. Il a été montré que l'utilisation de sRAGE *in vitro* empêche la genèse d'un stress oxydant et de molécules d'adhésion par les AGE.^{248,249} *In vivo*, l'administration pendant vingt-huit jours de sRAGE (100µg/ jour en intrapéritonéale) chez des souris diabétiques, déficientes en apoE, prévient l'apparition des complications macro-vasculaires,²⁵⁰ l'évolution de l'athérosclérose,²⁵¹ l'apparition de glomérulosclérose²⁵² ou encore permet d'améliorer la cicatrisation.²⁵³

D'autres approches pour bloquer l'axe AGE-RAGE ont été tentées. Des anticorps anti-RAGE ont par exemple été utilisés avec succès pour réduire des marqueurs de souffrance rénale et améliorer les fonctions rénales chez des souris-STZ.¹³⁴ Chez le rat-STZ, la vitesse de cicatrisation est réduite à cause d'une activation du RAGE à la surface des macrophages lors de la phase précoce d'inflammation. Ainsi, l'inhibition de l'axe AGE-RAGE améliore la cicatrisation chez ces animaux.²⁵⁴ Cependant, à notre connaissance, aucun essai clinique n'a été réalisé à ce jour.

Enfin, la dernière stratégie vise à inhiber directement le RAGE avec des molécules de faible poids moléculaire comme l'Azélicagon ou encore le FPS-ZM1. De nombreuses molécules semblables à l'Azélicagon ont été développées. Elles présentent toutes une ou deux régions hydrophobiques, un atome d'azote sensible à la protonation et un

corps central hétéro-aromatique capable de créer des liaisons hydrogènes.²⁵⁵ Chacune de ces molécules est capable de se lier au RAGE et de l'inhiber et d'empêcher l'activation des voies de signalisation. La plupart des études menées à ce jour chez l'animal et chez l'homme se sont plutôt focalisées sur les effets anti-Alzheimer de ces principes actifs. En effet, le peptide A β est aussi un ligand de RAGE. Il n'est donc pas surprenant que les scientifiques aient tenté d'utiliser ces molécules contre la formation des plaques séniles. Par exemple, l'administration d'Azeliragon chez des souris transgéniques (0.3-3mg/kg/ jour pendant trois mois) développant des plaques séniles a permis de réduire l'inflammation ainsi que le nombre de plaques amyloïdes.²⁵⁶ Des essais cliniques ont été développés chez des patients atteints d'Alzheimer. Les patients étaient divisés en deux groupes dont l'un recevait une faible dose d'Azeliragon (30 mg/ jour pendant six jours puis 10 mg/ jour pendant vingt semaines) et l'autre recevait une forte dose (60 mg/ jour pendant six jours puis 20 mg/ jour pendant vingt semaines). Aucune modification des niveaux plasmatiques A β , des marqueurs inflammatoires ou cognitifs n'a été observée.²⁵⁷ Un essai clinique en phase III de 2015 à 2018 chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer n'a cependant montré aucun effet notable de l'Azeliragon (*ClinicalTrials.gov* identifier : NCT02916056).

1.6.II.3. Méthodes alternatives pour lutter contre la formation et l'accumulation des produits de glycation

Prévenir l'accumulation, la formation et les effets de la glycation peut également passer par une limitation de l'exposition aux AGE alimentaires ou bien par l'utilisation de molécules anti-glycation issues de l'alimentation (e.g. vitamines, acides aminés, antioxydants, ...).²⁵⁸ Ce thème sera largement décrit dans le premier article de la partie expérimentale, et nous ne reprenons ici qu'un bref résumé des stratégies mises en place dans le secteur agroalimentaire.

La prise de conscience des effets délétères associés à une exposition importante aux AGE a conduit de nombreux industriels du secteur agroalimentaire à améliorer les conditions de transformation de leurs aliments (e.g. réduction de la température ou du temps de cuisson, utilisation d'ingrédients de meilleure qualité).²⁵⁸ L'utilisation d'aliments à faible index glycémique semblerait également limiter l'exposition et

l'accumulation de produits de la glycation. C'est tout au moins ce qui a été prouvé chez l'animal. ²⁵⁹

Comme décrit précédemment, certaines molécules pharmaceutiques testées contre la glycation (e.g. AG, pyridoxamine, benfotiamine), n'ont pas débouché sur des résultats cliniques concluants. Aujourd'hui, plusieurs laboratoires cherchent à développer des stratégies alternatives à partir de molécules issues de l'alimentation ou facilement incorporable dans une matrice alimentaire. Parmi ces molécules, on peut citer la créatine, ²⁶⁰ la carnosine, ²⁶¹ le *trans*-resveratrol et l'hespéritine ⁷.

Le DT2 étant une pathologie souvent associée à une dysbiose du microbiote intestinale, ¹¹ de nombreux scientifiques cherchent à développer de nouvelles thérapies anti-diabétiques à partir de souches bactériennes, appelées probiotiques. En modulant la flore bactérienne, ces probiotiques semblent pouvoir induire des changements métaboliques tels que le contrôle de la glycémie ou encore la gestion du stress oxydant. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a décrit les effets de ces probiotiques sur la glycation.



Le microbiote

II.1. Généralités

Depuis leurs origines il y a 3,5 milliards d'années, ²⁶² les bactéries sont omniprésentes sur Terre. Ces organismes procaryotes ont été découverts au cours du XVII^{ème} siècle par Antonio van Leeuwenhoek à l'aide de microscopes qu'il avait lui-même conçus. Certaines bactéries peuvent s'adapter aux milieux les plus extrêmes connus sur terre, ²⁶³ comme l'archéobactérie *Sulfolobus acidocaldarius* capable de proliférer dans les lacs de Yellowstone aux États-Unis avec un pH acide de 3 et dont les températures avoisinent les 80°C. Cette bactérie ne représente qu'un très faible échantillonnage de l'ensemble des bactéries dites « extrémophiles ». Certaines bactéries sont capables de proliférer dans des conditions de températures extrêmes (*Pyrolobus fumarii*), ou dans des milieux ventilés avec du CO₂ pur (*Cyanidium*). D'autres sont résistantes à de fortes radiations (*D. radiodurans*, les espèces *Rubrobacter* et l'algue verte *Dunaliella bardawil*), ou encore à des pH très acides (l'algue rouge *Cyanidium caldarium* et l'algue verte *Dunaliella acidophila*). Si certaines bactéries sont capables de vivre dans des conditions extrêmes, ces dernières ne représentent qu'une minorité. En effet, bon nombre de bactéries profitent des conditions de vie avenantes proposées par les organismes supérieurs. C'est le cas des bactéries constituant le tractus digestif des animaux et de l'homme, où règne des conditions favorables à la prolifération bactérienne (température stable de 37°C et une alimentation abondante). Le tractus digestif, ou gastro-intestinal, représente une des interfaces les plus importantes entre l'environnement extérieur et l'environnement interne. Les bactéries présentes dans ce tractus digestif (entre 500 et 1000 espèces bactériennes différentes), ²⁶⁴ forment avec les protozoaires, les levures, les champignons, les virus et les archéas, un véritable écosystème anaérobie (viable en absence d'oxygène) intégré, appelé « microbiote intestinal ». ^{265,266} Les méthodes

de séquençage modernes, ont permis de mettre en évidence le fait qu'environ 90% des espèces bactériennes appartenaient à seulement deux phyla, correspondant au deuxième niveau de classification classique des espèces vivantes : les *Firmicutes* et les *Bactéroïdètes* (Fig. 13).²⁶⁴ Les 10% restants appartiennent à des phyla autres tels que les *Protéobactéries*, *Verrucomicrobia*, *Actinobactéries*, *Fusobactérie* et *Cyanobactéries*.²⁶⁷

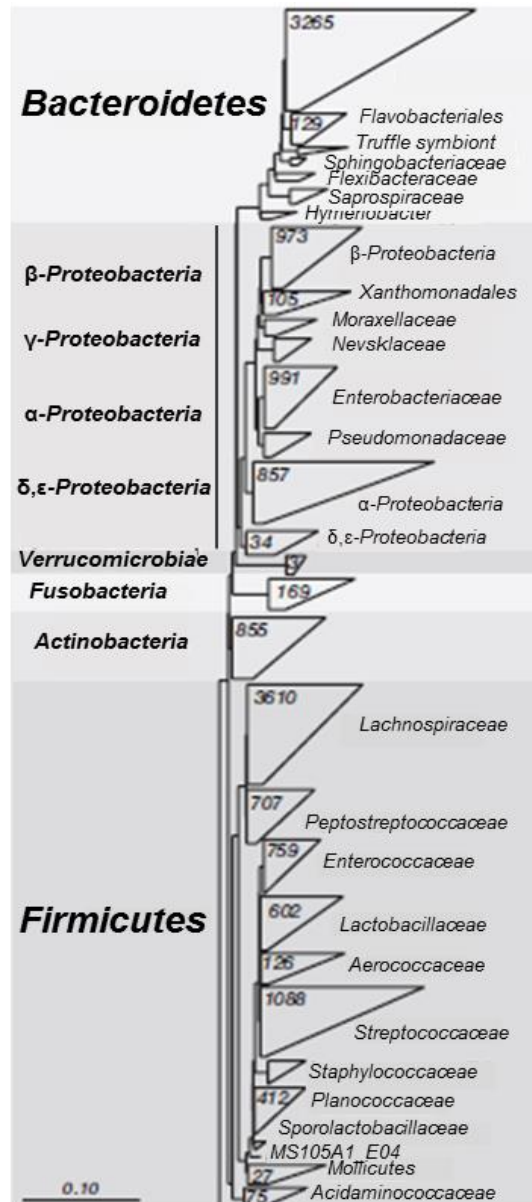


Figure 13 Représentation de l'arbre phylogénique du microbiote intestinal. Les phyla sont représentés à gauche, tandis que les niveaux taxonomiques inférieurs sont à droite ; d'après D.N. Frank et al.²⁶⁸

Le microbiote est hiérarchisé en bactéries anaérobies dites dominantes ($>$ à 10^9 unités formant colonies, ou *Colony Forming Unit* en anglais, CFU) comme les *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Propionibacterium*; des bactéries aérobies sous dominantes ($<$ à 10^9 CFU) représentées par des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, notamment *E. Coli*, ou d'autres bactéries telles que les *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio* et *Methanobrevibacter*, et les *Lactobacillus*.^{269,270} Ces dernières sont utilisées de plus en plus comme probiotiques (**voir chapitre II.2.III**).

En plus d'une diversité bactérienne, il existe au sein du tractus digestif un gradient de concentration bactérien en fonction de la localisation intestinale (**Fig. 14**).^{265,271} L'estomac, du fait de son pH qui est chroniquement très acide et de ses enzymes de digestion, est très peu colonisé par les bactéries (seulement 10^1 à 10^3 CFU).²⁷² Cependant, les concentrations bactériennes croissent dans les parties duodénale, jéjunale et iléale (10^3 à 10^7 CFU) pour atteindre une confluence maximale dans le côlon et les fèces (10^{12} à 10^{14} CFU). Cette différence de concentration bactérienne entre l'intestin grêle et le colon est essentiellement due à deux conditions particulières : 1) après un repas, les sécrétions d'acides biliaires sont élevées au niveau du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, alors qu'elles sont fortement réduites au niveau colique où les bactéries trouvent de meilleures conditions de pH pour proliférer, 2) un péristaltisme important dans les parties supérieures du tractus digestif limite l'adhérence des bactéries, contrairement au côlon qui permet une bien meilleure adhérence.²⁷³

En plus d'un gradient de concentration des bactéries, il existe une répartition géographique des espèces, et donc une composition bactérienne différente en fonction de la localisation dans le tube digestif.^{268,273} En comparant différentes biopsies de sujets sains, les chercheurs ont observé un plus fort enrichissement en *Bacilles*, de la famille des *Firmicutes*, et en *Actinobactéries* dans le petit intestin, tandis que les *Bactéroidetes* et la famille *Lachnospiraceae* des *Firmicutes* sont plus représentées dans les biopsies coliques.²⁶⁸ Finalement, l'ensemble des bactéries (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, les membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et enfin les *Ruminococcus*) sont retrouvées dans les fèces.

Au total, le tractus digestif est colonisé par environ cent mille milliards de bactéries, soit dix fois plus que le nombre total de cellules de l'organisme. ²⁷⁴ De plus, le génome de l'ensemble de cette biomasse contient plus de cinq millions de gènes pouvant conduire à la transduction de nombreuses voies de signalisation jouant un rôle dans la physiologie de l'hôte.

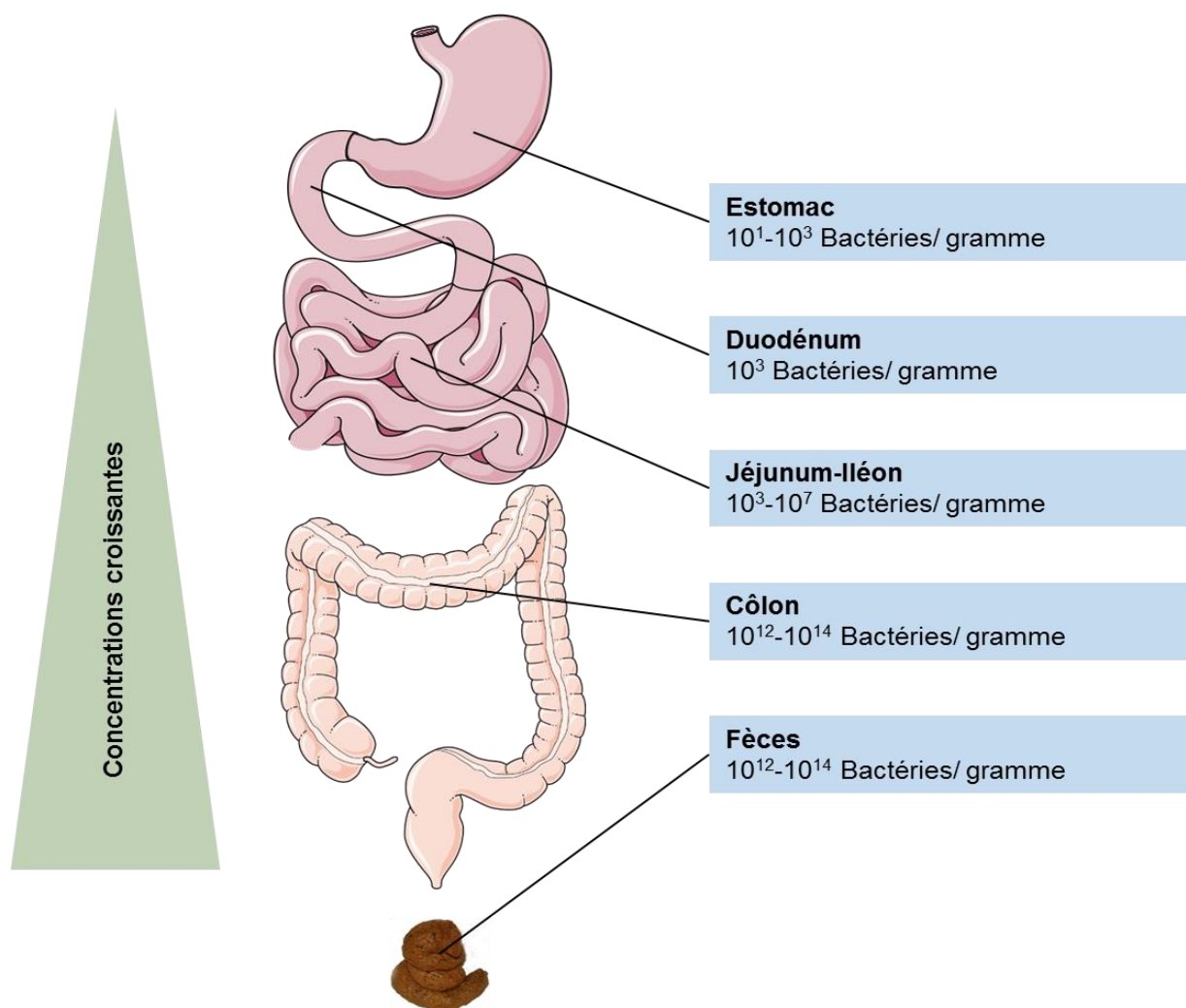


Figure 14 Répartition des bactéries intestinales dans le tractus digestif.

II.2. Le microbiote : de l'homéostasie à la dysbiose

Il existe une véritable symbiose entre l'organisme hôte et les différents microorganismes qui le constituent. Diverses études ont pu démontrer certains liens qui existent entre le microbiote et la physiologie de l'organisme hôte. Ces études ont généralement été menées à l'aide de modèles animaux. Par exemple, des souris élevées de manière stérile sans microbiote (dites souris axéniques ou germ free, GF) ont été comparées avec des souris dont le microbiote était naturellement colonisé (dites souris conventionnelles).²⁷⁵

Depuis, de nombreuses études ont observé une implication cruciale des bactéries commensales du tube digestif dans de nombreux processus physiologiques tels que – 1) la prise en charge des nutriments et leurs métabolites – 2) la protection contre les invasions pathogènes – 3) la synthèse de certaines vitamines du groupe B et de la vitamine K – 4) la stimulation du système immunitaire.²⁷⁶

II.2.1. Homéostasie et rôles du microbiote intestinal

La physiologie de plusieurs organes dont le système digestif, le système cardiovasculaire et le cerveau, a été montrée altérée chez les souris GF. Ceci a alors constitué les premiers éléments de preuve de l'implication du microbiote sur la santé.²⁷⁷ Il a été montré que ces dérèglements physiologiques étaient principalement dus à une réduction significative de la dégradation des aliments et donc à une baisse de l'absorption des nutriments.

Le microbiote est constitué de nombreuses souches bactériennes capables de délivrer à l'organisme des vitamines parmi lesquelles la vitamine K, la riboflavine (B2), la biotine (B8), l'acide folique (B9), la cobalamine (B12) ainsi que d'autres vitamines du groupe B.²⁷⁸ Les bactéries intestinales sont aussi capables de dégrader les fibres alimentaires en acides gras à chaînes courtes (SCFA) : butyrate, propionate et acétate ; comptant pour une part importante de l'énergie absorbée par l'organisme.²⁷⁹ L'acide butyrique ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOH}$) est utilisé majoritairement au niveau du côlon, là où il servira de source d'énergie pour l'organisme. Ce métabolite joue aussi un rôle favorable dans la sensibilité à l'insuline.²⁸⁰ D'un point de vue moléculaire, il permet

d'accroître l'expression de nombreuses protéines en inhibant les histones déacétylases.²⁸¹ L'acide propionique est utilisé par le foie comme substrat de la gluconéogenèse et de la lipogenèse²⁸² et l'acide acétique transite à travers la circulation sanguine périphérique où il sera métabolisé par les tissus environnants pour entrer dans la synthèse du cholestérol.²⁸³ Bien que l'énergie produite par la fermentation bactérienne des aliments soit nécessaire pour le bien-être de l'organisme, une partie est également utilisée pour maintenir le nombre et la viabilité des bactéries intestinales. Ainsi la composition du microbiote intestinal peut s'avérer grandement modifiée lorsque l'ingestion des trois familles de macronutriments (glucides, protéines, lipides) n'est pas équilibrée.²⁸⁴

Le microbiote est également impliqué dans le développement du système digestif ainsi que dans celui de l'immunité humorale et mucosale.²⁸⁵ Les métabolites générés par la flore bactérienne intestinale peuvent être reconnus par les cellules du système immunitaire innée et conduire à des réponses physiologiques et à la régulation de l'écologie microbienne.²⁸⁶ Ainsi une perturbation de la communication entre le système immunitaire et le microbiote peut être responsable du développement de pathologies. Ces données ont pu être acquises par l'intermédiaire de souris GF dont un défaut dans la structure lymphoïde locale et systémique (rate et nœuds lymphoïdes peu développés) a été observé. De plus, ces animaux ont une hyperplasie des plaques de Payer (follicules lymphoïdes contenant des lymphocytes B et T), ce qui conduit à une baisse du nombre de follicules matures isolés. Enfin, il a été rapporté une baisse du nombre de cellules plasmiques productrices d'IgA, du nombre d'immunoglobuline sécrétée ainsi qu'une irrégularité dans la genèse de cytokines.²⁷⁷

II.2.II. Dysbiose et désordres métaboliques

II.2.II.1. Définition, causes et conséquences

Un nombre croissant d'études s'accordent à démontrer l'influence du microbiote intestinal sur la santé animale et humaine.¹¹ Le terme « dysbiose » est employé

lorsque la composition et la diversité bactérienne intestinale est dérégulée par rapport à un microbiote de sujet sain (**Fig. 15**).⁹ Il existe différents types de dysbioses : une augmentation des espèces bactériennes qualifiées de pathogènes ; une réduction de la diversité bactérienne et enfin une baisse du nombre des bactéries aux propriétés bénéfiques pour la santé. Cette dérégulation est en lien avec le développement de nombreuses pathologies aussi bien intestinales (syndrome du côlon irritable, rectocolite...) qu'extra-intestinales (obésité, syndrome métabolique, allergies, troubles cardiaques...).¹¹

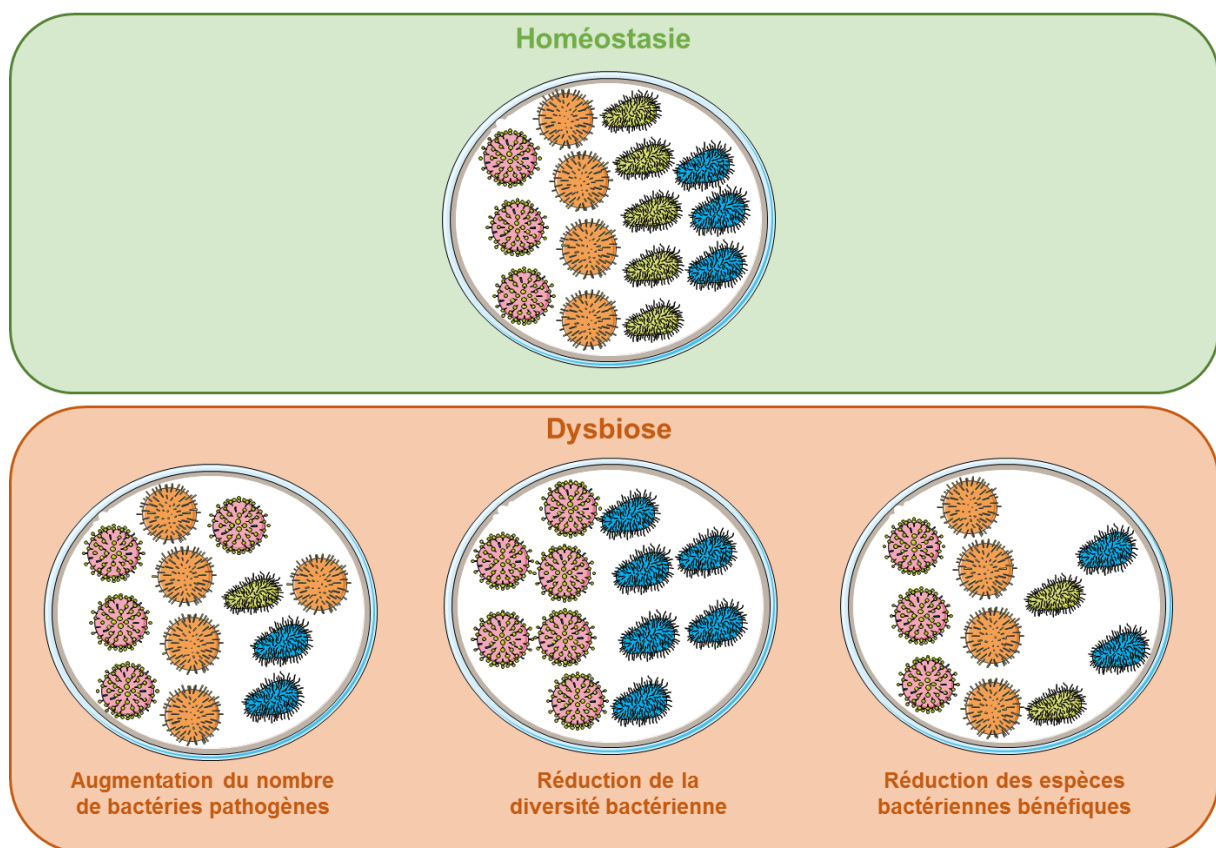


Figure 15 Composition bactérienne dans un microbiote sain (en haut) et dans le cas d'une dysbiose (en bas). Trois phénomènes peuvent être observés dans un cas d'une dysbiose : une augmentation du nombre de bactéries pathogènes ; un amoindrissement de la diversité bactérienne ; une baisse des espèces bactériennes bénéfiques ; d'après C. Petersen et al.⁹

La dysbiose peut être induite par l'administration d'antibiotiques mais aussi plus couramment par la consommation d'un régime déséquilibré.

L'utilisation d'antibiotiques peut en effet conduire à une réduction de la diversité bactérienne ainsi qu'à une augmentation des bactéries pathogènes résistantes. Ces altérations sont en lien avec une augmentation de la susceptibilité à développer des infections et à perturber l'homéostasie immunitaire.²⁸⁷ L'exposition précoce des enfants aux antibiotiques conduit au développement d'une résistance aux antibiotiques et ainsi à l'augmentation du risque de développer des maladies infectieuses ou des allergies.^{288,289} Une courte exposition d'enfants aux antibiotiques peut modifier la composition du microbiote sur le long terme.²⁹⁰ Dans ce sens, la théorie hygiénique voudrait que la baisse de l'exposition aux microbes de notre environnement induise une augmentation de la prévalence à développer des pathologies auto-immunes au sein de la population (rhinite allergique, eczéma, asthme, allergies diverses, ...).²⁹¹

La relation entre l'alimentation et le microbiote est complexe. En effet le microbiote participe activement à la digestion des aliments, mais à l'inverse l'alimentation peut influencer la composition bactérienne du tractus digestif.

Le rôle du microbiote dans sa capacité à puiser l'énergie des aliments a pu être étudié par l'intermédiaire de souris GF. N'ayant pas de microbiote, ces souris sont dans l'incapacité de dégrader les aliments et absorbent moins de nutriments que des souris avec un microbiote naturel.^{292,293} Les études sur le microbiote démontrent par la même occasion que les sujets obèses ont une plus grande capacité à pouvoir extraire l'énergie des aliments et à absorber les nutriments, à les transformer et à les stocker sous forme de graisses. Les premiers liens entre l'obésité et la dysbiose ont été observés chez la souris génétiquement modifiée *Lep^{ob/ob}*.¹⁰ En étudiant le microbiote constituant le tractus digestif de ces souris, les scientifiques se sont rendu compte d'une dérégulation de la balance bactérienne aux dépens du phylum des *Bactéroidetes* et en faveur du phylum des *Firmicutes*.¹⁰ Lorsqu'elle n'est pas d'origine monogénique, l'obésité chez l'homme est majoritairement due à l'alimentation (ingestion d'une grande quantité de calories d'origines lipidiques et glucidiques) et à la sédentarité. Afin de compléter les précédentes études sur les souris *Lep^{ob/ob}*, des

chercheurs ont étudié le microbiote sur des souris soumises à un régime riche en graisse et en saccharose (HF-HS) et ont aussi observé une baisse des *Bactéroidetes* et une augmentation des *Firmicutes*.²⁹⁴ Les mêmes chercheurs ont par la suite étudié le microbiote de sujets obèses et ont montré une augmentation du ratio *Firmicutes* / *Bactéroidetes* confirmant les résultats obtenus sur les modèles murins.²⁹⁵ Cependant toutes les études ne vont pas dans ce sens. En effet, l'étude de A. Schwartz *et al.* montre l'inverse, c'est-à-dire une baisse du ratio *Firmicutes* / *Bactéroidetes* chez des sujets obèses par rapport à des sujets sains.²⁹⁶ Dans cette étude, les concentrations de SCFA et particulièrement du propionate, sont augmentés chez les patients obèses et il est connu qu'une variation des concentrations de SCFA est accompagnée d'un changement dans la constitution des groupes bactériens.²⁹⁷ S. H. Duncan *et al.* trouvent également des résultats inverses et estiment que des changements au niveau des phylums n'a pas de conséquence majeur sur l'organisme.²⁹⁸ Au vu de leur étude, ils concluent qu'il est encore trop tôt pour associer avec certitude un type de microbiote intestinal avec l'obésité, et que des études complémentaires sont nécessaires.

Quand les aliments passent au niveau du côlon, ceux-ci sont en partie métabolisés par les bactéries coliques, absorbés par l'organisme et alors impliqués dans l'activation de différentes voies de signalisation. Lors d'une dysbiose, une baisse de la diversité microbienne conduit à des désordres métaboliques. Par exemple, une baisse de souches bactériennes générant des SCFA peut conduire à une augmentation de bactéries pathogènes. À l'inverse, une plus forte teneur en bactéries (e.g. *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium*) productrices de métabolites de la choline (di / triméthylamine), serait impliquée dans l'apparition de la stéatose hépatique non alcoolique, de l'obésité et du diabète.²⁹⁹

De manière intéressante dans le cadre de cette thèse, il est à noter que la consommation de régimes riches en AGE et autres produits de glycation a été montrée associée à une modification de la composition du microbiote. Après digestion des protéines dans l'estomac, les acides aminés glyqués semblent moins bien absorbés que les acides aminés natifs.³⁰⁰ Ces acides aminés considérés comme non physiologiques par certains experts du domaine transitent alors jusqu'au côlon où ils subissent la fermentation bactérienne. Une expérimentation chez le rat a montré, entre autres, que la consommation d'un régime riche en AGE pendant dix-huit semaines

réduisait la diversité et l'abondance du microbiote intestinal. Dans un second temps, la présence d'acides aminés glyqués induisait une baisse de la fermentation des glucides, réduisant *in fine* la synthèse des SCFA et leurs effets bénéfiques sur la santé.³⁰¹ Des résultats identiques et plus prononcés ont été observés lors d'une exposition chronique de huit mois d'un régime riche en AGE chez la souris.³⁰² Comme décrit dans la première partie de cette revue bibliographique, la réaction de Maillard se termine par la synthèse de mélanoidines. Une étude *in vitro* réalisée par C. Helou *et al.*, semble indiquer que la consommation de mélanoidines pourrait avoir une action anti-inflammatoire en inhibant la croissance des entérobactéries.³⁰³ De nombreux autres travaux ont montré des actions prébiotiques des mélanoidines.³⁰⁴

Comme décrit précédemment, une dysbiose peut être impliquée dans de nombreuses pathologies (intestinales, cérébrales, cardiaques, ...). Cependant ce qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de cette thèse est l'implication du microbiote dans le DT2, la stéatose hépatique non alcoolique et les maladies rénales. Le DT2 se développe majoritairement chez des personnes obèses (**voir Chapitre I.4.III**), dont la mauvaise alimentation en est généralement la cause.

II.2.II.1.a. Dysbiose et diabète

J. I. Gordon *et al.* sont les premiers à avoir décrit une augmentation de l'insulino-résistance associée à une augmentation de la masse grasse chez des souris GF ayant reçu une transplantation de microbiote fécal de souris conventionnelles. Il est important de préciser que l'apport d'un microbiote n'a pas augmenté la prise alimentaire des souris transplantées.

L'une des théories reliant le microbiote, l'obésité et le diabète passe par une plus grande extraction de l'énergie alimentaire par le microbiote d'animaux ou de sujets obèses par rapport à des animaux ou sujets sains.³⁰⁵

La dysbiose serait également impliquée dans la dérégulation du métabolisme glucidique. Il a entre autres été montré qu'une intolérance au glucose pouvait se développer chez des souris GF après transplantation de microbiote fécal provenant de souris intolérantes au glucose. Chez l'homme, il a été montré une amélioration de la sensibilité à l'insuline ainsi qu'une augmentation de la diversité du microbiote

intestinale lorsque des patients atteints de syndrome métabolique recevaient une transplantation de microbiote fécale provenant de sujets sains.³⁰⁶ D'après cette étude, l'augmentation de souches bactériennes qui synthétisent le butyrate (e.g. *E. hallii*) pourrait expliquer l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. De plus, ces résultats permettent d'appuyer la théorie selon laquelle il existerait un lien entre la diversité bactérienne et l'insulino-résistance chez le sujet diabétique.

Les sujets obèses ou atteints d'un diabète de type 2 sont soumis à une inflammation chronique à bas bruit due à une augmentation du lipopolysaccharide (LPS) et des protéines sériques liant le LPS (LBP pour LPS Binding Protein) provenant des bactéries gram négatifs.³⁰⁷ Chez la souris, un régime HFD est responsable de l'apparition d'une dysbiose, de l'augmentation du LPS circulant, d'une inflammation, d'un stress oxydant et d'un syndrome métabolique. L'utilisation d'antibiotiques chez ces animaux permet de bloquer la plupart de ces dérèglements physiologiques.³⁰⁸ Il a en plus été montré qu'un régime HFD conduisait à une baisse des *Bifidobacterium* associée à une augmentation du LPS chez la souris.³⁰⁹ En parallèle, dans cette étude, un groupe de souris a été nourri avec une alimentation HFD enrichie en oligofructose qui a un pouvoir prébiotique reconnu. Dans ce dernier groupe, la concentration de *bifidobacterium* était augmentée, celle de LPS circulant était réduite, le métabolisme du glucose était amélioré et enfin l'inflammation était réduite.³⁰⁹

La dysbiose est également accompagnée d'une augmentation de la perméabilité intestinale favorisant le transit du LPS vers la circulation, conduisant à une inflammation systémique et à certaines dysfonctions métaboliques. À l'inverse certaines souches de probiotiques semblent pouvoir limiter la perméabilité intestinale. C'est par exemple ce qui a été montré par S. Resta-Lenert et K.E. Barrett en incubant des cellules épithéliales intestinales humaines (HT29/cl.19A et Caco-2) en présence de souches probiotiques telles que le *Lactobacillus acidophilus* ou le *Streptococcus thermophilus*.³¹⁰ Dans ce cas les auteurs ont observé une réduction des niveaux de TNF- α et de IFN- γ produits par les cellules intestinales, et impliqués dans l'augmentation de la perméabilité intestinale. À partir de modèles murins diabétiques soumis à un régime HFD ou HF-HS ou de modèles génétiques *Lep^{ob/ob}* et *LepR^{db/db}*, il a été observé une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale, due à une réduction des protéines constituant les jonctions serrées (ZO-1, Occludine), et accompagnée d'une augmentation du LPS circulant, comparé à des souris saines.³⁰⁹

Des résultats similaires ont été observés chez des sujets atteints d'un diabète de type 2. ³¹¹⁻³¹³ Une étude clinique a montré récemment que la consommation quotidienne d'un yaourt à base de *Lactobacillus johnsonii* La1 (10^9 CFU/jour) pendant quatre semaines chez des sujets âgés permettait de réduire la concentration de LPS circulant. ³¹⁴ Bien que les études cliniques sur ce sujet soient encore trop peu nombreuses, les résultats déjà obtenus *in vitro*, dans des modèles animaux et chez l'homme semblent indiquer des effets anti-inflammatoires d'une flore intestinale saine en contrôlant l'homéostasie et de l'intégrité intestinale. ³¹⁵

De façon générale, d'après les études présentées ci-dessus, il semblerait qu'une dérégulation du microbiote soit associée au développement de l'obésité et du diabète de type 2. Nous allons voir dans la partie qui suit, l'implication d'une dysbiose dans le développement de la stéatose hépatique non alcoolique et des maladies rénales qui sont des affectations hépatiques et rénales chroniques couramment retrouvées chez le sujet diabétique.

II.2.II.1.b. Dysbiose et stéatose hépatique non alcoolique

La stéatose hépatique non alcoolique est une des complications du diabète de type 2 faisant partie du spectre des pathologies hépatiques (stéatose, stéato-hépatite non alcoolique, fibrose, cirrhose, carcinomes hépatiques). ³¹⁶ Une étude comparative a montré sur un ensemble de huit millions d'individus provenant de plus de 20 pays différents que la prévalence de la stéatose hépatique était de 25.2% dans la population générale et atteignait 51.3% chez les patients obèses, 69.2% chez les patients hyperlipidémiques, 42.5% chez les patients avec un syndrome métabolique et 22.5% chez les diabétiques de type 2. ³¹⁷ En 1998, C. P. Day et O. F. James ³¹⁸ ont établi deux voies possibles conduisant à la stéatose hépatique. La première voie suggère une inflammation hépatique consécutive à une lipotoxicité. La seconde voie décrit un accroissement de la peroxydation lipidique ainsi qu'une accumulation de radicaux libres dans le foie.

À ces deux pistes étiologiques, s'ajoute celle du microbiote (**Fig. 16**). Lors d'une dysbiose, la perméabilité intestinale, assurée par des protéines de jonctions serrées (ZO-1 et Occludine), est fortement augmentée provoquant un passage de

macronutriments. Ces derniers induisent des changements progressifs dans les voies de signalisation relatives au métabolisme des lipides et du glucose. Une baisse du facteur adipocytaire induit par le jeûne (FIAF) au niveau intestinal est alors observée. Une accumulation des triglycérides (TG) dans les adipocytes est aussi associée à l'augmentation de la perméabilité intestinale, favorisant l'inflammation ainsi que la résistance à l'insuline. ³¹⁹

Lors d'une dysbiose, la désorganisation des jonctions serrées provoque également une augmentation de la perméabilité intestinale vis à vis du LPS bactérien et donc une augmentation du LPS circulant. Au niveau hépatique, le LPS stimule l'expression des récepteurs Toll-like 4 (TLR4) et se fixe au complexe CD14/ TLR4 pour provoquer une réponse inflammatoire puis une insulino-résistance. ³²⁰ D'après P. Cani *et al.*, un régime riche en graisse chez la souris permet d'augmenter la proportion des bactéries à gram négatif en stimulant leur croissance. Cela induit une augmentation du relargage de LPS circulant pouvant accentuer l'inflammation à bas bruit et conduire à une insulino-résistance. ^{112,321,322}

La dysbiose est également impliquée dans l'altération du métabolisme de la choline et des acides biliaires. La choline est un composant de l'acétylcholine (neurotransmetteur) et de la membrane phospholipidique des cellules, mais elle joue également un rôle clé dans le métabolisme des lipides. ³²³ Certaines bactéries (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium*) dégradent la choline en métabolites tels que les di- et tri-méthylamines (D/TMA), qui sont transportées dans le foie et oxydées (D/TMAO). Lorsque le métabolisme de la choline est accentué, cela conduit à – 1) une déficience en choline et donc à une accumulation des TG dans le foie – 2) une inflammation et des dommages hépatiques dus à l'augmentation des niveaux de D/TMAO. ³¹⁶ Certaines bactéries (*Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Clostridium*) vont également accroître le métabolisme des acides biliaires (responsables de la digestion et de l'absorption des graisses) en acides biliaires non conjugués (UBA). Ces UBA reconnaissent et stimulent un récepteur farnésoïde X complexé à une protéine G couplée à un récepteur Takeda 5. Ce complexe conduit à la métabolisation des acides biliaires, réduisant la digestion des TG, qui s'accumulent dans le foie et conduisent à une stéatose hépatique.

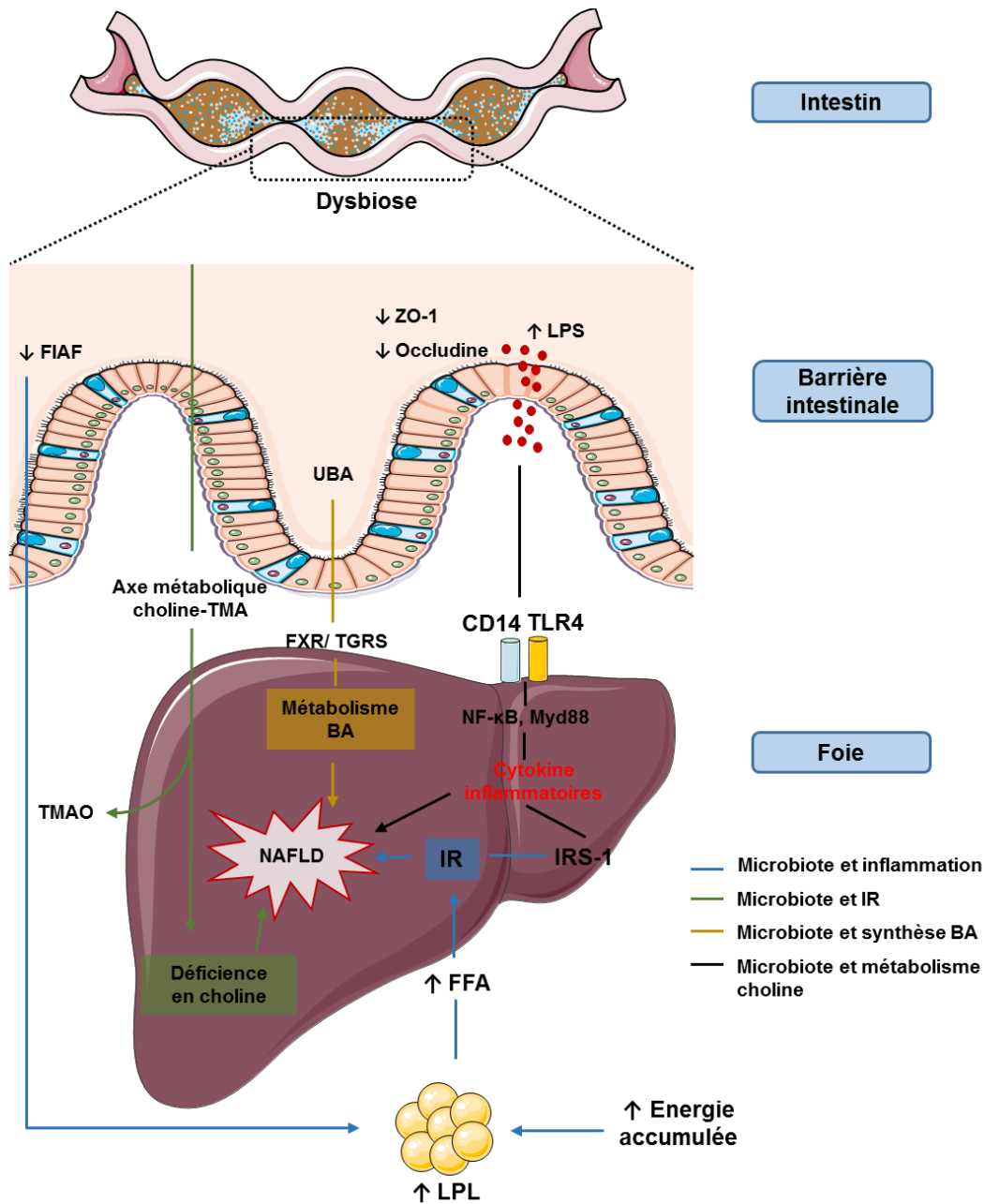


Figure 16 Rôles du microbiote intestinal dans la stéatose hépatique non alcoolique d'après J. Ma et al. ³¹⁶ NAFLD : stéatose hépatique non alcoolique, FIAF : facteur adipocytaire induit par le jeûne, LPL : lipoprotéine lipase, FFA : acide gras libre, IR : insulino-résistance, TMA : triméthylamine, TMAO: triméthylamine oxyde, UBA : acide biliaire non conjugué, FXR : récepteur farnésioïde X, GR5 : protéine G couplée à un récepteur Takeda 5, BA : acide biliaire ; LPS : lipopolysaccharide, TLR : récepteur Toll like, CD14 : antigène de différenciation des monocytes, NF-κB : facteur nucléaire-κB ; MyD88 : facteur 88 de différenciation myéloïde, IRS: substrat du récepteur à l'insuline.

II.2.II.1.c. Dysbiose et atteintes rénales

Comme décrite précédemment, une dysbiose peut altérer la structure et la fonction du foie. Mais d'autres organes périphériques tels que le rein (organe clé impliqué dans la pathologie du diabète) sont également concernés. Il a par exemple été montré que des patients atteints de souffrances rénales chroniques avaient une plus grande proportion de bactéries dans le compartiment duodénale et jujénale (10^6 bactéries aérobies /mL et 10^7 bactéries anaérobies /mL) que des sujets sains.³²⁴ Les effets d'une dysbiose sur le rein et ses complications sont encore peu décrites. Nous avons pu voir dans la partie précédente (*II.II.2.1.b.*) que lors d'une dysbiose, la perméabilité intestinale était augmentée et permettait le passage d'endotoxines (LPS). Des études sur des modèles murins de lésions rénales ou chez des patients hémodialysés ont permis de mettre en évidence une augmentation de la perméabilité intestinale associée à une baisse de la fonction de la barrière intestinale et un passage de bactéries, de toxines et d'endotoxines dans la circulation.^{325,326} Une association a pu être faite entre une augmentation de la mortalité, une baisse de la fonction rénale et de la concentration du sCD14 (récepteur aux endotoxines) dans le plasma des patients atteints de maladie rénale.^{327,328} De plus, des données scientifiques suggèrent que les toxines urémiques synthétisées par un microbiote dysbiotique, dont les plus connues sont le sulfate p-cresyle et le sulfate d'indoxyle, seraient associées à un plus haut risque de développer des complications cardiovasculaires chez ces mêmes patients.^{329,330} Des études complémentaires ont montré chez des souris urémiques que ces toxines endommagent les cellules des tubules rénales.³³¹ Des études cliniques montrent enfin qu'une endotoxémie résultant d'une dysbiose est responsable d'une inflammation chez les patients atteints de maladie rénale aggravant le phénotype.^{332,333} D'après l'ensemble de ces études, il semblerait qu'un microbiote altéré agisse de façon négative sur les organes périphériques conduisant au développement de pathologies et aux complications associées. Il apparaît donc crucial de développer des traitements visant à restaurer un microbiote sain.

II.3. Utilisation de souches bactériennes comme traitement contre les complications du DT2.

II.3.I. Généralité sur les probiotiques.

Au vu de l'influence du microbiote sur la physiologie des organismes hôtes et des dérégulations que peut induire une dysbiose, les scientifiques cherchent à mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques dirigées contre les désordres métaboliques, en modulant la balance bactérienne dans le tube digestif.

L'étymologie du terme « probiotique » vient de la préposition latine pro, « pour » et d'un adjectif grec βιωτικός, « biotique » provenant du nom βίος, « la vie ». Ce terme a évolué au cours des décennies en même temps que l'intérêt grandissant porté à ces microorganismes. Comme l'illustre la **figure 17**, le nombre de publications sur la thématique des probiotiques est passé à moins de 100 sur l'année 1998 à plus de 1800 sur l'année 2017.

À l'origine, les probiotiques étaient définis comme des substances actives synthétisées par un unique microorganisme permettant la croissance d'autres bactéries. Par la suite, la communauté scientifique a utilisé ce terme pour définir tout extrait tissulaire pouvant induire la croissance de certaines souches bactériennes pouvant exercer un ou plusieurs effets bénéfiques sur un organisme en modulant sa flore bactérienne.³³⁴ Actuellement, l'Organisation des Nations Unis pour l'alimentation et l'agriculture (la FAO) définit un probiotique comme un « microorganisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité suffisante, confère des effets bénéfiques à l'hôte ». ³³⁵

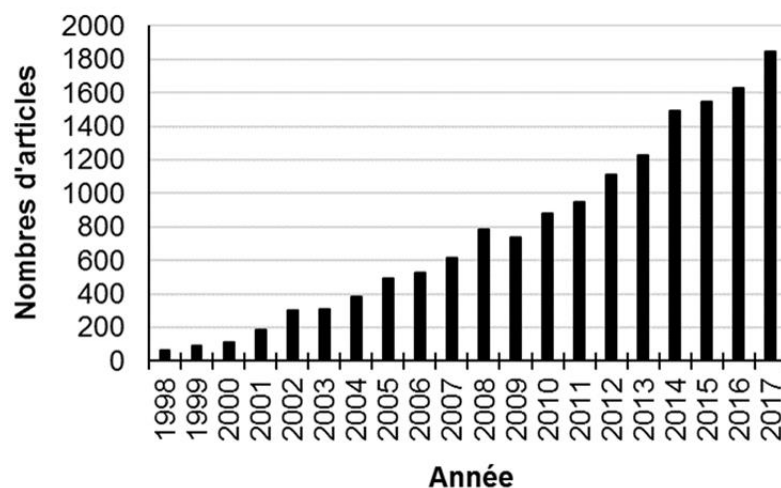


Figure 17 Nombre de publications relatives à l'utilisation de souches probiotiques depuis les deux dernières décennies après avoir utilisé le mot clé « probiotique » dans la base de données pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Il existe un grand nombre de bactéries, isolées et identifiées, pouvant exercer des effets positifs sur les organismes supérieurs. Parmi celles-ci, les plus étudiées sont des bactéries du genre *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*), des *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*). Quelques autres espèces faisant également partie de la famille des bactéries dites « acides lactiques » sont étudiées (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus insulinus*, *Streptococcus thermophilus*). Enfin des bactéries « non acides lactiques » montrent aussi un certain bénéfice (*Bacillus cereus var. toyoi*, la souche nissle d'*Escherichia coli*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii*).

Afin de pouvoir être utilisée comme probiotique, une souche bactérienne doit remplir certains critères qui sont mis en évidence lors de tests *in vitro*. Un probiotique doit avoir une bonne tolérance aux acides biliaires et être capable de les hydrolyser, doit pouvoir adhérer aux surfaces muqueuses et épithéliales et, enfin, doit posséder une activité microbienne contre les agents pathogènes. ³³⁶

Ces dernières décennies, de nombreux scientifiques ont cherché à développer des traitements à base de probiotique afin de prévenir l'apparition du diabète et ses complications.

Le **tableau 5** présenté ci-dessous regroupe vingt et une études précliniques réalisées de 2003 à 2017 sur six souches bactériennes différentes (*Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*), isolées ou en combinaison. Pour réaliser ces études précliniques, différents modèles murins de DT2 induit génétiquement, par l'alimentation, ou bien encore chimiquement, ont été utilisés. Les modulations observées sur les modèles murins semblent peu dépendantes de la souche utilisée. En effet, les différents probiotiques testés (**Tableau 5**) montrent tous les mêmes effets, c'est-à-dire principalement une réduction de la masse corporelle, une baisse de la glycémie et de l'HbA1c et une amélioration de la tolérance au glucose. L'administration de *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. reuteri* GMNL-263, *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus subtilis* B10, *Bifidobacterium animalis* sp. *Lactis* 420, *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ou de *Pediococcus pentosaceus* LP28 chez des souris ou des rats obèses ou diabétiques diminue la prise de poids de façon significative après une durée de traitements comprise entre quatre et quatorze semaines. L'utilisation de ces probiotiques a également permis d'améliorer le métabolisme glucidique (baisse de la glycémie à jeun et de l'HbA1c, amélioration de la tolérance au glucose) comme par exemple après l'administration de *L. gasseri* BNR17 (10^{10} CFU) à des souris LepR^{db/db} après 12 semaines de traitement.

La baisse de la masse corporelle chez l'animal peut s'expliquer par une augmentation des SCFA, produits de fermentation des bactéries, qui permettraient de réduire la prise alimentaire par l'intermédiaire d'une stimulation de molécules anorexigènes telles que la GLP-1 ou le peptide PYY.²⁸² D'après la littérature, le microbiote intestinal joue un rôle majeur dans la régulation de l'énergie et de la glycémie par l'intermédiaire des SCFA. Une plus faible absorption des calories et donc de l'énergie issues de la fermentation des aliments, ou encore une augmentation de la dépense énergétique peuvent aussi expliquer la réduction de la masse corporelle observée chez les animaux traités par les probiotiques.³³⁷

Une augmentation des LPS circulants est observée lors du phénomène de dysbiose. Ces LPS accélèrent l'apoptose des cellules β de Langerhans provoquant une insulino-résistance et donc une augmentation de la glycémie. Il a été montré que

l'ingestion de certains probiotiques pouvait réduire le niveau de LPS, améliorer le métabolisme glucidique,³²⁶ et améliorer la perméabilité intestinale.³³⁸

Des actions bénéfiques sur la santé hépatique ont été observées après le traitement par de nombreux probiotiques (*L. Rhamnosus*, *L. johnsonii* BS15, *L. paracasei*, *L. reuteri* GMNL-263, *Bacillus subtilis* B10, *Bifidobacterium animalis* sp. *Lactis* 420, *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ou de *Pediococcus pentosaceus*). D'un point de vue mécanistique, il est proposé que le rétablissement de l'homéostasie microbienne par les probiotiques permettrait de réduire les concentrations circulantes d'un certain nombre de molécules impliquées dans l'étiologie de la stéatose hépatique non alcoolique (e.g. la concentration de TG) et de l'inflammation (e.g. endotoxines, métabolites toxiques tels que l'éthanol, le phénol et l'indole).³³⁹

Concernant la santé rénale, des études ont rapporté des effets bénéfiques de différentes souches bactériennes (*Bacillus pasteuris*, *L. acidophilus*, *E. coli* DH5, *B. longum*, *L. casei shirota*, ...) chez le rongeur (**Tableau 5**) mais également chez l'homme (**Tableau 6**).^{271,340} Ces études suggèrent que les probiotiques réduiraient les concentrations circulantes de toxines urémiques (e.g. sulfate d'indoxyle) et des cytokines pro-inflammatoires. Une étude de 1996 chez des rats urémiques montrait qu'un traitement d'un mois avec une souche d'*E. coli* DH5 modifiées réduisait significativement l'urée sérique.³⁴¹ Plus tard une autre étude a montré, chez des rats néphrécotomisés traités pendant deux mois avec différents cocktails de probiotiques (*B. pasteuris*, Sporolac[®]), un ralentissement de la progression des atteintes rénales et un prolongement de la durée de vie des rats.³⁴² Des études cliniques d'intervention publiées de 1996 à 2015 et réalisées chez des patients hémodialysés ou atteints de maladie rénale chronique ont rapporté qu'un traitement à différents probiotiques entraînait une réduction sérique des toxines urémiques,^{324,343-346} de l'homocystéine,³⁴⁴ de la di-méthylamine,³²⁴ des cytokines pro-inflammatoires,³⁴⁶ de l'urée^{341,347-349} ou encore une augmentation des cytokines anti-inflammatoires.³⁴⁶

Toutes les études chez l'animal ne montrent pas un effet bénéfique évident des probiotiques. Certaines souches bactériennes semblent en effet induire des effets plus modestes. C'est par exemple le cas de la souche *L. rhamnosus* administrée chez des souris LepR^{db/db}³⁵⁰ pour laquelle seule une amélioration de la tolérance au glucose a été observée. Il est important de préciser que l'étude réalisée à partir de *L. rhamnosus* chez des souris LepR^{db/db} n'a duré que quatre semaines contrairement à trois autres

études qui ont utilisé ce même probiotique pendant huit,³⁵¹ douze³⁵² et treize semaines.³⁵³ La première hypothèse d'un effet modéré du probiotique *L. rhamnosus* consiste à considérer que cette bactérie nécessite un certain temps de colonisation pour pouvoir exercer ses effets positifs. La seconde explication de la différence observée entre ces quatre études réside dans le choix du modèle animal. L'effet modéré du probiotique a été observé sur un modèle génétique sévère de diabète alors que les effets plus prononcés ont été observés sur des modèles alimentaires de diabète.³⁵¹⁻³⁵³ La troisième hypothèse est que le probiotique *L. rhamnosus* agit plutôt de manière préventive que de manière curative.

Des études basées sur l'utilisation de la souche *L. casei* montrent des résultats similaires à ceux décrits pour la souche *L. rhamnosus*. L'administration dans un modèle HFD pendant quatre semaines a eu pour seul effet d'améliorer la tolérance au glucose.³⁵⁴ De la même manière, l'administration de cette souche (10^9 CFU) chez des souris-STZ pendant quatre semaines n'a induit qu'une baisse de la glycémie.³⁵⁵ À l'inverse l'administration de cette souche chez des souris HFD-STZ pendant douze semaines (10^9 CFU) a conduit à de nombreux effets dont une baisse de la glycémie à jeun et post-prandiale, de l'HbA1c, une amélioration de la tolérance au glucose, une réduction du TNF- α , de l'IL-6, des TG, du MDA, des ROS et une augmentation de la SOD, du GSH et du HDL.^{356,357} Ces différences peuvent s'expliquer premièrement par le temps d'administration, qui est plus long dans les deux dernières études. Deuxièmement, l'administration du probiotique, dans la première étude,³⁵⁴ passe par l'alimentation, il est donc possible que le probiotique se dégrade au cours du temps ou que les animaux n'ingèrent pas tous les mêmes quantités de probiotique.

Des études ont regardé l'effet de l'administration d'une combinaison de plusieurs souches bactériennes. L'effet synergique attendu n'a pas forcément été observé dans les études qui ont utilisé une combinaison de plusieurs souches bactériennes (**Tableau 5**). En effet l'administration d'une combinaison de 3 souches (*L. rhamnosus* CNCM I-4036, *L. paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035) à des rats Zucker Lepr^{fa/fa},³⁵⁸ n'a induit qu'une baisse des TG hépatiques tandis que l'ingestion d'une seule de ces souches (*L. paracasei*) chez des souris HFD a induit une baisse de la masse corporelle, de l'insuline, de la glycémie à jeun, en plus d'une diminution des TG hépatiques.³⁵³ La première différence majeure est l'utilisation d'un modèle génétique sévère de diabète dans le premier cas contre un modèle alimentaire dans

le second cas. La seconde différence entre ces deux études est le temps d'administration qui est de quatre semaines chez le rat Zucker Lep^{fa/fa} ³⁵⁸ et de douze ³⁵³ semaines chez la souris HFD. Du fait de la courte durée d'administration de cette combinaison de probiotiques, il est difficile de conclure quant à une efficacité de celle-ci dans un contexte de diabète.

En parallèle, la combinaison *L. curvatus* HY7601 et *L. plantarum* KY1032 ³⁵⁹ administrée pendant dix semaines à des animaux HFD induisait plusieurs effets tels qu'une diminution du poids corporel (masse grasse), du cholestérol, de l'insuline, de la leptine, de l'inflammation hépatique et adipocytaire.

Le **tableau 6** présenté ci-dessous regroupe neuf études cliniques réalisées de 2012 à 2017 sur trois souches différentes (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*), isolées ou en combinaison. Les effets des différents probiotiques ont été étudiés dans de nombreux cas pathologiques (obésité, DT2, maladies infectieuses, syndrome du côlon irritable, asthme, allergie, sclérose amyotrophique latérale, ...) mais seules les études relatives à l'obésité, aux atteintes rénales et au diabète seront décrites ci-dessous.

Le nombre d'essais cliniques portant sur l'étude des effets d'un ou plusieurs probiotiques dans un contexte diabétique est nettement plus faible que le nombre d'études précliniques. Comme souvent lors de l'étude d'une nouvelle substance à potentiel thérapeutique, les effets observés entre les modèles *in vitro*, les expérimentations animales et les essais cliniques peuvent être très différents. Les effets d'une administration de probiotiques chez des sujets obèses et diabétiques de type 2 sont généralement moindres que ceux observés sur les modèles murins. Mais contrairement aux modèles murins, l'effet synergique de plusieurs souches bactériennes semble plus prometteur chez l'homme. Il a par exemple été montré chez des patients diabétiques de type 2 qui ont reçu une combinaison de deux souches bactériennes (*L. curvatus* HY7601 et *L. plantarum* KY1032) pendant six semaines, une amélioration du métabolisme glucidique (baisse de l'HbA1c et de la glycémie), un renforcement des défenses antioxydantes (augmentation des concentrations de superoxyde dismutase, SOD, et de la glutathion peroxydase), ainsi qu'une baisse de la peroxydation lipidique. ³⁶⁰

Lors d'essais cliniques avec une seule souche administrée, les seuls effets notables observés ont été les suivants : une augmentation de la sécrétion d'insuline avec *L. reuteri* administrée à 10^{10} CFU/ capsule pendant quatre semaines, ³⁶¹ et une baisse du MDA avec *L. sporogenes* administrée à 10^8 CFU/ 40 g de pain trois fois par jour pendant huit semaines. ³⁶² D'autres essais cliniques n'ont montré aucun ou peu d'effet des probiotiques testés sur l'amélioration du profil métabolique des patients. ^{363,364}

En conclusion, les données scientifiques sur les effets bénéfiques des probiotiques ne sont pas toutes concordantes, et leur utilisation chez l'homme est régulièrement remise en cause. Il existe en particulier une polémique autour de l'utilisation abusive de certains probiotiques et de leur implication dans l'épidémie mondiale d'obésité. ³⁶⁵ Il est bien connu des experts de la nutrition animale que l'utilisation de certains probiotiques permet d'augmenter la croissance des animaux d'élevage. ³⁶⁶ La supplémentation en *Saccharomyces cerevisiae* est, par exemple, utilisée chez les bovins et les porcelets afin d'augmenter leur prise alimentaire ainsi que leur masse corporelle. ³⁶⁷ Le choix et la durée de traitement du/ des probiotiques visant à restaurer un équilibre bactérien sain au niveau du tractus digestif est donc primordial.

Souche probiotique	Temps traitement (semaines)	Effet(s) observé(s)	Modèle étudié	Références
<i>L. gasseri</i> BNR17 (10 ^{7/8/9/10} CFU)	12	↓ glycémie à jeun et post-prandiale ↓ prise alimentaire ↓ HbA1c	Souris LepR ^{db/db}	368
<i>L. rhamnosus</i> (10 ⁸ CFU) (5.10 ⁷ CFU)	4	Amélioration de la tolérance au glucose	Souris LepR ^{db/db}	350
	8	↓ des TG hépatiques ↓ inflammation hépatiques	Souris HF ¹	351
(10 ⁸ CFU)	12	↓ de la masse corporelle ↓ glycémie à jeun ↓ de l'insuline Amélioration de la tolérance au glucose ↓ des TG hépatiques	Souris HFD	352
(10 ⁸ CFU)	13	↓ de la masse corporelle ↓ de la graisse mésentérique ↓ des TG hépatiques ↑ de l'adiponectine	Souris HFD ²	353
<i>L. casei</i> (0,05% de la quantité de nourriture)	4	Amélioration de la tolérance au glucose	Souris HFD	354
(10 ⁹ CFU)	4	↓ glycémie à jeun ↑ insuline	Souris STZ	355

(10 ⁹ CFU)	12	<ul style="list-style-type: none"> ↓ glycémie à jeun et post-prandiale ↓ HbA1c ↓ TNF-α ↓ TG, LDL ↓ ROS, MDA ↑ SOD, GSH 	Souris HFD-STZ	356
(10 ⁹ CFU)	12	<ul style="list-style-type: none"> ↓ glycémie à jeun et post-prandiale ↓ TNF-α et IL-6 ↑ GLP-1 	Souris HFD-STZ	357
<i>L. johnsonii</i> BS15 (10 ^{7/8} CFU)	17	<ul style="list-style-type: none"> ↓ glycémie ↓ des TG hépatiques ↓ peroxydation lipidique 	Souris HFD	369
<i>L. paracasei</i> (10 ⁸ CFU)	12	<ul style="list-style-type: none"> ↓ de la masse corporelle ↓ glycémie à jeun ↓ de l'insuline Amélioration de la tolérance au glucose ↓ des TG hépatiques 	Souris HFD	353
<i>L. reuteri</i> GMNL-263 (10 ⁹ CFU)	4	<ul style="list-style-type: none"> ↓ HbA1c ↓ glycémie ↑ de la masse corporelle 	Rats STZ ³	370

	(10 ⁹ CFU)	14	↓ glomérulosclérose ↓ de la masse corporelle Amélioration de la tolérance au glucose ↓ de l'insuline ↓ de la leptine Amélioration activité anti-oxydante hépatique ↓ des TG sériques et hépatiques	Rats HF	371
L. GG (2% de la nourriture)		9	Amélioration de la tolérance au glucose ↓ HbA1c ↓ peroxydation lipidique hépatique	Rats STZ	372
Saccharomyces boulardii (120 mg)		4	↓ de la masse corporelle ↓ de la masse grasse adipeuse Prévention stéatose hépatique	Souris LepR ^{db/db}	373
Bacillus subtilis B10 (0,1% de la nourriture)		4	↓ glycémie à jeun ↓ de la masse corporelle ↓ des TG hépatiques	Souris HFD	374
Bacillus pasteurii (10 ⁹ CFU)		8	Ralentissement de la progression des atteintes rénales Augmentation de la durée de vie	Rats néphrécotomisés	342
Bifidobacterium animalis ssp. Lactis 420		12	↓ de la masse corporelle	Souris HFD	337

(10 ⁹ CFU)		↓ glycémie à jeun Amélioration de la tolérance au glucose		
(10 ⁸ CFU)	12	↓ de la masse corporelle ↓ de l'insuline Amélioration de la tolérance au glucose ↓ des TG hépatiques	Souris HFD	353
<i>Bacteroides uniformis</i> CECT 7771 (5.10 ⁸ CFU)	7	↓ de la masse corporelle Amélioration de la tolérance au glucose ↓ du cholestérol sérique et hépatique ↓ des TG sériques et hépatiques ↓ de l'insuline ↓ de la leptine	Souris HFD	375
<i>E. coli</i>- DH5	4	↓ urée sérique	Rats urémiques	341
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LP28 (10 ⁹ CFU)	8	↓ de la masse corporelle ↓ du cholestérol hépatique ↓ des TG hépatiques	Souris HFD	376
Combinaison de : <i>L. curvatus</i> HY7601 et <i>L. plantarum</i> KY1032 (5.10 ⁹ CFU)	10	↓ de la masse corporelle ↓ de la masse grasse adipeuse ↓ du cholestérol ↓ de l'insuline	Souris HFD	359

		↓ de la leptine		
		↓ inflammation hépatique et adipocytaire		
Combinaison de : <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. paracasei</i> TMC0409, <i>Streptococcus thermophilis</i> TMC1543 (1-2% de la nourriture)	6	↓ de la masse corporelle Améliore le métabolisme lipidique	Souris aP2-agouti	377
Combinaison de : <i>L. plantarum</i> et <i>L. curvatus</i> (10 ¹⁰ CFU)	9	↓ du cholestérol sérique et hépatique ↑ des TG sériques ; ↓ Hépatiques	Souris HFCD ⁴	378
Combinaison de : <i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036, <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034, <i>Bifidobacterium breve</i> CNCM I-4035 (10 ¹⁰ CFU)	4	↓ des TG hépatiques	Rats Lepr ^{fa/fa}	358

¹ : High Fructose

² : High Fat Diet

³ : Streptozotocine

⁴ : High Fat High Cholesterol Diet

Tableau 5 Présentation des études sur les effets de différentes souches de probiotiques sur le profil métabolique de modèles murins de diabète ou de maladies rénales.

Souche probiotique	Temps traitement (semaines)	Effet(s) observé(s)	Patients	Références
<i>L. reuteri</i> (10 ¹⁰ CFU)	4	↑ sécrétion insuline	Obèses	361
<i>L. acidophilus</i> (10 ⁹ CFU)	26	↓ di-méthylamine sérique ↓ toxines urémiques	Patients hémodialysés	324
<i>B. longum</i> (10 ⁹ CFU)	5	↓ toxines urémiques	Patients hémodialysés	343
Combinaison de : <i>S. thermophilus</i> KB19, <i>L. acidophilus</i> KB27, <i>B. longum</i> KB31 (10 ⁹ CFU de chaque souche)	24	Amélioration qualité de vie ↓ glucuronide d'indoxyle	Patients hémodialysés	345
Combinaison de : <i>B. bacterium</i> A218, <i>B. catenulatum</i> A302, <i>B. longum</i> A101, <i>L. plantarum</i> A87 (3.10 ¹⁰ CFU)	24	↓ cytokines pro-inflammatoires ↑ cytokines anti-inflammatoires ↓ endotoxines Préserve les fonctions rénales	Patients avec dialyse péritonéale	346
Combinaison de : <i>S. thermophilus</i> KB19, <i>L. acidophilus</i> KB27, <i>B. longum</i> KB31 (10 ⁹ CFU de chaque souche)	24	↓ urée sérique Amélioration qualité de vie	Patients avec maladie rénale chronique	347
Combinaison de : <i>S. thermophilus</i> KB19, <i>L. acidophilus</i> KB27, <i>B. longum</i> KB31 (1,5.10 ¹⁰ CFU)	24	↓ urée sérique Amélioration qualité de vie	Patients avec maladie rénale chronique	348
<i>L. casei shirota</i> (8 ou 16.10 ⁹ CFU)	8	↓ urée sérique	Patients avec maladie rénale chronique	349
<i>L. sporogenes</i> (10 ⁸ CFU)	8	↓ MDA	Diabétiques de type II	362

(10 ⁸ CFU)	8	↓ insuline	Diabétiques de type II	379
<i>L. helveticus</i> (300mL de yaourt)	12	Pas de résultat	Diabétiques de type II	363
Combinaison de : <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 and <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 (300mL de yaourt)	6	↓ HbA1c ↓ glycémie ↑ SOD et ↑ GSH ↓ MDA	Diabétiques de type II	360
Combinaison de : <i>L. acidophilus</i>, <i>L. bulgaricus</i>, <i>L. bifidum</i> et <i>L. casei</i> (500mg)	16	↓ insuline ↓ MDA	Diabétiques de type II	380
Combinaison de : <i>L. acidophilus</i>, <i>L. casei</i>, <i>L. rhamnosus</i>, <i>L. bulgaricus</i>, <i>Bifidobacterium breve</i>, <i>B. lengum</i>, <i>Streptococcus thermophilus</i> (2.10 ⁹ , 7.10 ⁹ , 1,5.10 ⁹ , 2.10 ⁸ , 2.10 ¹⁰ , 7.10 ⁹ , 1,5.10 ⁹ CFU)	18	↓ glycémie à jeun ↑ glutathion sérique	Diabétiques de type II	381
Combinaison de : <i>L. acidophilus</i>, <i>Bifidobacterium lactis</i> (300 mL de yaourt)	8	↑ HDL	Diabétiques de type II	382
Combinaison de : <i>Lactobacillus</i> et <i>Bifidobacterium</i> (300 mL de yaourt)	12	Variations modestes de l'HbA1c et de l'insuline	Diabétiques de type II	364

Tableau 6 Présentation des études sur les effets de différentes souches de probiotiques sur le profil métabolique de patients diabétiques ou atteints de maladies rénales.

II.3.II. La souche d'intérêt : *Lactobacillus fermentum* ME3

C'est en 1994 à l'université de Tartu en Estonie, que le *Lactobacillus fermentum* ME-3 du genre *Lactobacillus*, a été isolée à partir des fèces d'enfants sains. ³⁸³

Lors de sa mise en culture, il a pu être montré que la souche ME-3 avait différentes propriétés intéressantes. *In vitro*, il a été montré que la souche ME-3 était capable de synthétiser du monoxyde d'azote, de réduire les processus inflammatoires et de stimuler les défenses antioxydantes. ³⁸³ D'autres analyses ont permis de mettre en évidence un effet anti-microbien, notamment contre les bactéries à Gram négatif (e.g. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* ou encore *E. coli*). ³⁸⁴ Les propriétés antioxydantes (réduction de la peroxydation lipidique et du ratio GSSG/GSH) et anti-inflammatoires de la souche ME-3, premièrement montrées en boîte de pétri, ont ensuite été confirmées *in vivo* chez la souris lors de l'analyse du plasma et de deux organes (foie et intestin). ^{385,386}

La souche ME-3 a très peu été étudiée chez l'homme. Le premier essai clinique a porté sur une ingestion de la souche ME-3 par des sujets sains afin de tester la viabilité de la souche dans le tractus digestif. Les résultats ont montré une bonne tolérance de la bactérie par l'Homme ainsi qu'une bonne efficacité de la formule d'ingestion du probiotique qui était sous forme de capsule contenant 10⁹ CFU de bactéries avec 250 mg de saccharose). De plus, le profil antioxydant (GSH/ GSSG) a été amélioré chez les individus consommant le probiotique quotidiennement pendant trois semaines (10⁹ CFU/ capsule) par rapport à ceux recevant uniquement un placebo. ³⁸⁷ Des résultats similaires ont été observés dans le sang et la peau de patients atteints d'une dermatite atopique après avoir consommé pendant 12 semaines ce probiotique (3. 10⁹ CFU/ mL de lait de chèvre fermenté). ³⁸⁸ Un essai clinique regroupant des patients ayant survécu à un accident vasculaire cérébral et ayant consommé le probiotique pendant 3 semaines a montré des résultats semblables aux études précédentes. ³⁸³ Enfin, l'étude de ce probiotique sur la santé de sujets diabétiques n'a pas encore été réalisée, mais pourrait apporter de nouvelles pistes d'applications thérapeutiques.

Bien qu'un bon nombre d'études précliniques et quelques essais d'intervention, portant sur l'utilisation de probiotiques, aient démontré une amélioration du métabolisme glucidique, une réduction du stress oxydant (GSSG) et une réduction de la glycation

précoce (HbA1c), aucune n'a étudié les potentielles propriétés anti-glyquantes de leur(s) probiotique(s).



OBJECTIFS

Comme décrits à travers la littérature, les produits de glycation précoce (e.g. produits d'Amadori) et avancée (e.g. CML) sont en concentrations particulièrement élevées dans le plasma, les tissus et organes des patients diabétiques. Bien qu'une controverse persiste, de plus en plus d'études confirment le rôle majeur de la glycation dans les complications du diabète (néphropathie, rétinopathie, cardiopathie, désordres hépatiques, ...).

De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été développées afin de prévenir et de réduire la glycation *in vivo*. Cependant, aucune n'a été en mesure d'apporter *in fine* des résultats satisfaisants.

Le premier article de la partie expérimentale de cette thèse est consacré à une revue détaillée des effets bénéfiques ou délétères des aliments et certains de ses composants sur l'accumulation des produits de glycation dans le corps humain. Cet article a pour objectif d'apporter un éclairage nouveau sur les stratégies non médicamenteuses qui sont actuellement testées, ou qui pourraient l'être, pour réduire la glycation *in vivo*.

Aujourd'hui, avec une meilleure maîtrise de l'analyse du microbiote intestinal mais aussi et surtout avec une meilleure connaissance des fonctions physiologiques de cette flore commensale, de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des souches bactériennes isolées ont vu le jour. À notre connaissance, aucune étude n'a recherché à démontrer les effets protecteurs d'une souche bactérienne contre la glycation et les complications du diabète.

Notre premier objectif a été de comparer différents modèles murins de glycation et de diabète (génétique et alimentaire). À la lecture de la littérature, il apparaît que les modèles murins de diabète ne sont que très partiellement caractérisés en ce qui concerne la glycation. Pour cela, nous avons utilisé la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPL-MS/MS) afin d'obtenir des données quantitatives et justes. Les résultats et interprétations sont présentés dans le deuxième article de la partie expérimentale.

Cet objectif était un prérequis au **second objectif qui visait à utiliser le modèle de glycation le plus pertinent pour pouvoir étudier les effets de la souche bactérienne *Lactobacillus fermentum* ME-3 sur la glycation et certaines complications du diabète.** Des données préliminaires sur la souche ME-3 ont démontré des effets antioxydants et anti-inflammatoires dans des modèles cellulaires ainsi que lors d'essais cliniques et précliniques. Cependant l'étude de ses effets sur la glycation et dans un contexte diabétique n'a pas été investiguée. Les résultats et interprétations relatifs à ce deuxième objectif sont présentés dans le troisième et dernier article de la partie expérimentale.



PARTIE EXPÉRIMENTALE



**Comment l'alimentation peut-elle affecter
l'accumulation des produits avancés de la
glycation dans le corps humain ?**

How Can Diet Affect the Accumulation of Advanced Glycation End-Products in the Human Body?

Published in Foods, 2016

Axel Guilbaud ^{1,2}, Celine Niquet-Leridon ³, Eric Boulanger ¹ and Frederic J. Tessier ¹

¹ University Lille, Inserm, CHU Lille, U995-LIRIC-Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France

² VF Bioscience SAS, Parc Eurasanté, 310 Rue Jules Vallès, 59120 Loos-lez-Lille, France

³ Institut Polytechnique UniLaSalle, Transformations & Agroresources Unit, 19 rue Pierre Waguet, 60000, Beauvais, France

Abstract

The accumulation of advanced glycation end products (AGEs) is associated with the complications of diabetes, kidney disease, metabolic disorders and degenerative diseases. It is recognized that the pool of glycation products found in the human body comes not only from an endogenous formation, but also from a dietary exposure to exogenous AGEs. In recent years, the development of pharmacologically-active ingredients aimed at inhibiting endogenous glycation has not been successful. Since the accumulation of AGEs in the human body appears to be progressive throughout life, an early preventive action against glycation could be effective through dietary adjustments or supplementation with purified micronutrients. The present article provides an overview of current dietary strategies tested either *in vitro*, *in vivo* or both to reduce the endogenous formation of AGEs and to limit exposure to food AGEs.

KEYWORDS

Glycation; Maillard; advanced glycation end products; carboxymethyllysine; calorie restriction; fructose; probiotics; vitamins; diabetes; ageing

1. INTRODUCTION

Advanced glycation end-products (AGEs) are a complex group of molecules that have been found almost everywhere among tissues and organs of the human body. ¹ Their concentration increases with age, but is also closely related to renal failure and diabetes. ² Whether they are just a consequence of some metabolic and chemical disorders or etiologically responsible for some age-related diseases is still being debated. However, data have been accumulating for the last 20 years demonstrating more convincingly the pathophysiological role of AGEs mainly in relation to ageing and metabolic disorders.

AGEs are formed in the human body essentially by glycation. ³ This non-enzymatic reaction condenses a molecule of glucose or other reducing sugars with an amine from free amino acids or proteins, to form a Schiff base that rearranges into a ketoamine called the Amadori product. This relatively stable product can undergo further chemical reactions, such as oxidation and dehydration, to give rise to diverse AGEs. These are found on the long-lived proteins of the extracellular matrix, on short-lived plasma proteins, such as serum albumin, and on intra-cellular proteins. In all of those cases, the glycation is classified as a non-enzymatic post-translational modification of proteins. AGEs are also found as free adducts in the circulation and in the urine. ⁴ In this latter situation, they derive either from the proteolysis of *in vivo* proteins or from the absorption of dietary AGEs. ⁵

Helen Vlassara and her group were among the first scientists who postulated that the total load of AGEs of the human body could derive from both *in vivo* synthesis and dietary exposure. ⁶ Since then, glycation products have been classified as endogenous and exogenous AGEs, respectively. The contribution of the dietary AGEs to the total AGE load *in vivo* and their potentially deleterious effect on health have recently attracted considerable interest. The chemical structures of AGEs and other Maillard reaction products formed in foods during processing (mainly during heat treatment) are more heterogeneous and more complex than those formed in physiological conditions. ⁷ Because of this chemical diversity and other issues, estimating the contribution of dietary AGEs has been difficult. Based on a rodent study, Koschinsky *et al.* have

estimated that 10% of the orally-ingested AGEs was absorbed, and only 30% of that was eliminated in the urine. ⁶ This first study revealed that a significant part of the dietary AGEs is likely to be retained in the body. Our recent studies based on exposures to dietary carboxymethyllysine (CML), one of the best studied AGEs, indicate that its chronic intake leads to an increase of its content in most organs and tissues tested. ⁸⁻¹⁰ Therefore, there is no doubt that exogenous AGEs contribute to the pool of AGEs found in vivo.

The term “glycotoxin” was created when the new link between the fields of the Maillard reaction in medicine (i.e., glycation) and in food science was first detected. ⁶ This term, which defines any reactive glycation products having a potential toxic effect in vivo, includes essentially the precursors of AGEs, among which are diverse dicarbonyl compounds. Although some reactive dicarbonyls have been found in significant amounts in foods, ¹¹ recent data revealed that it is unlikely that they can reach the circulation. ¹² For instance, a study on methylglyoxal, one of the most studied intermediates, indicates that methylglyoxal coming from the diet is rapidly degraded in the gastrointestinal tract. ¹² It is therefore unlikely that the exposure to food dicarbonyls will influence the methylglyoxal level in vivo or contribute to the formation of endogenous AGEs.

2. How Can the Presence of AGEs Be Reduced in the Human Body?

Since the discovery that the presence of AGEs in the human body could be involved in the ageing process, ¹³ many studies have been conducted to find dietary ways to limit the accumulation of early and advanced glycation products throughout the body and eventually to slow down the potentially associated degenerative diseases.

Figure 1 shows that several constituents of foods can affect the in vivo AGE load. First of all, an overall caloric restriction was found to affect the accumulation by different amounts, some greater, some smaller, of both early and advanced glycation products. The reduction of the exposure to dietary AGEs and the reactive precursors was also

found to limit the accumulation or the formation of AGEs *in vivo*. As a result of this, food scientists and technologists have long been exploring how potentially deleterious AGEs and other Maillard reaction products (MRPs) could be mitigated in processed foods. A more adapted heat treatment during food processing and a better selection of the raw food ingredients are known to be the two main courses of action for limiting the exposure to dietary AGEs. Special attention was given in particular to the selection of raw foods because of the influence of their carbohydrate composition on the *in vivo* AGE load (e.g. the amount of fructose or the proportion of complex carbohydrates in food).

Figure 1 also shows that another strategy to lessen the accumulation of AGEs was to use active ingredients derived from foods or other biological material. Numerous molecules isolated from foods (e.g. vitamins, amino acids, antioxidants) and generally tested at pharmacological doses seem to provide protection against the *in vivo* formation of AGEs.

The current review will not attempt to provide an exhaustive overview of the anti-AGE strategies. Instead, a couple of examples will be considered in depth.

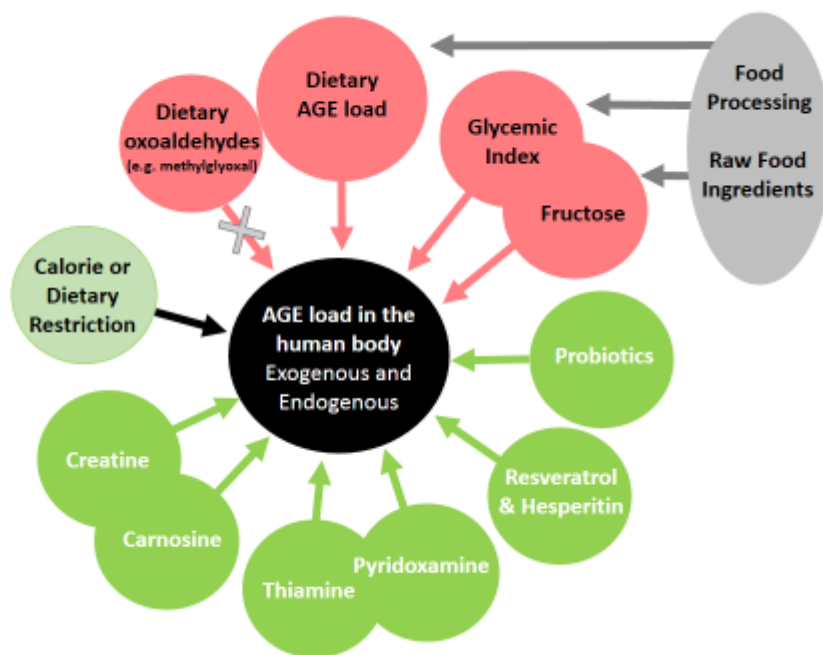


Figure 1. Diets and food components that affect the load of advanced glycation end-products (AGEs) in the human body.

3. Effects of Calorie/Dietary Restriction on the AGE Load

Caloric restriction (CR) is known to increase life span in rodents and non-human primates.^{14, 15} Although it would not be acceptable to apply such dieting to humans in the long term, it is used as a laboratory dietary model to study ageing mechanisms. Different CR protocols have been tested, but as far as glycation research is concerned, a 60% restriction of caloric intake was generally used. It is important to realize that the micronutrient intake was not always re-equilibrated to compensate for the restriction when the animals were calorie-restricted to 40% less than other animals given free access to food. Therefore, the term “dietary restriction” (DR) seems to be more appropriate to describe such a protocol than the term “caloric restriction”.

Studies showed that the intervention DR maintains lower blood glucose and glycated hemoglobin than ad libitum-fed rats (AL).^{16, 17} These early studies led to the assumption that DR may also slow down the glycation of proteins in the body if it could reduce blood glucose and improve glucose tolerance. Some studies have been carried out to verify this hypothesis.

Rats receiving 60% of AL diet for 25 months showed an 18% to 33% reduction in the early glycation of hemoglobin, plasma proteins and skin collagen. The age-associated rate of accumulation of AGEs (CML, pentosidine and AGE-related fluorescence) was also slowed down in the skin collagen from DR rats compared to that of AL rats.¹⁸

Other studies on rodents indicated that the glycation-lowering effect of DR differed between tissues¹⁹ and was mainly observed at advanced ages (around 24 months).²⁰ The beneficial effects of CR were not only tissue- and age-dependent, but also dependent on the strain of the animal.¹⁹ One of the very few studies on nonhuman primates confirmed the inhibitory action of DR on the early glycation assessed by measuring furosine content in skin collagen. However, the DR did not show any effect on the advanced process assessed by CML and pentosidine quantification.²¹ Evidence from this study, and others, suggests that long-term DR can inhibit early glycation (i.e., the formation of the Amadori product). This is highly dependent on the concentration of blood glucose though not advanced glycation (e.g. CML and pentosidine), which is

more likely dependent on conditions other than just glycaemia, such as the lipoxidation and the overall oxidative stress.

None of the studies presented above established a causal relationship between CR intervention and the reduction of AGEs throughout the body. At present, it remains important to understand whether the effects observed in animals were related only to an indirect better control of blood glucose or if other actions of the CR, such as a decrease in oxidative stress, were involved. Furthermore, there is no evidence that a DR lower than the ones that have been tested in animals, which would be more representative of a life-long diet suitable for humans, would significantly slow down glycation and delay associated complications in humans.

A typical DR diet is likely to be a diet that will also result in a low exposure to dietary AGEs. In addition, it is known that both DR intervention^{14, 15} and dietary AGE restriction intervention increase lifespan.²² In light of these observations, it has become important to study the link between DR and AGE restrictions. For instance, Cai *et al.*²³ found that increasing the intake of AGEs in calorie-restricted mice erases the advantages of the CR intervention, such as a longer lifespan and lower tissue and circulation AGE levels. This observation suggests that the glycation-lowering effect of DR in the body may be partly due to a low exposure to dietary AGEs.

Studies on dietary AGEs and their impact on the in vivo AGE load are numerous. Some of the most important ones will be presented in the next paragraph.

4. Exposure to Dietary AGEs and Their Precursors

AGEs such as pyrraline and CML have been found at the same time in food and in vivo.²⁴⁻²⁶ It was then believed, therefore, that AGEs originating from food, also called exogenous or dietary AGEs, could be partly responsible for their presence in serum and tissues. One of the first studies on this subject was conducted by He *et al.*²⁷ who fed rats with protein-bound labeled AGEs using an AGE model system with ¹⁴C and ¹²⁵I. The radioactive measurement proved that the orally-absorbed AGEs, derived from an ovalbumin-glucose mixture, were distributed in several organs and tissues.

Our more recent studies, based either on exposures to dietary CML or its ¹³C-isotopologue, indicate that the chronic intake of this AGE by mice leads to an increase of its content in the kidneys, gut, lungs, brain, heart, blood vessels and other tissues.⁸⁻¹⁰ The use of a specific isotopologue of CML confirmed unequivocally the causal relationship between the CML supplied via foods and its accumulation in organs and tissues.

Apart from animal studies, some observational or interventional human studies have been conducted to confirm the contribution of exogenous AGEs to the in vivo pool of AGEs.²⁸ For instance, an increased serum level of AGEs was observed after the intake of a meal composed of egg white glycated with glucose.⁶ Another intervention study on 64 healthy subjects confirmed that the plasma CML was slightly higher (+7%) when the volunteers ate a high MRP diet compared to a low one.²⁹ Although statistically significant, this increase of plasma CML was lower than expected. In addition, an observational study found an absence of correlation between dietary intake and circulating CML.³⁰ The low correlation or lack thereof found in those last two studies may be accounted for by the fact that the analyses were performed on fasting blood samples instead of postprandial blood samples and have, in addition, detected and quantified protein-bound CML rather than free CML. We believe, on the basis of the existing data and our own studies, that only the meals consumed within 24 h before a test will affect the level of free CML in the serum of healthy subjects.

While the influence of dietary intake of AGEs on human serum level has been proven, the same cannot be said for the relationship between dietary AGEs and tissue accumulation. Since the use of research biopsies is highly limited in clinical trials, it will be difficult to prove a causal relationship between AGE consumption and their level in the major organs and tissues. The different dietary AGE restriction studies recently published can at best only estimate the biological consequences of an oral exposure to AGEs, but not their long- or even short-term retention in the body.^{28, 31}

Unlike the findings on AGEs derived from food, the contribution of dietary methylglyoxal and other oxoaldehydes to the neo-formation of AGEs in the body appears to be negligible. As presented in the Introduction, recent data from Degen *et al.*¹² revealed

that methylglyoxal cannot reach the circulation, probably because of its high reactivity with amino groups in the intestinal tract.

What creates a great deal of confusion in the literature is the misuse of terms, such as “methylglyoxal-supplemented diet”²³ or “methylglyoxal⁺-diet”,³² which do not define diets supplemented directly with methylglyoxal, but diets high in BSA glycated with methylglyoxal. In this case, the terms “methylglyoxal derivatives” or “methylglyoxal-derived AGEs” would have been more appropriate.

Strategies to reduce the intake of AGEs and other MRPs have been presented in the literature pending confirmation that a dietary AGE restriction is beneficial to health. For healthy or diseased individuals who cook, it is recommended “to use mild cooking techniques instead of high-heat cooking”.³³ They may also select foods low in AGEs using available databases. There are two drawbacks here: their validity, in certain cases,³⁴ and their accessibility to the general public, among others.³⁵

A better control of the Maillard reaction in products from the food industry allows desirable neoformed compounds, such as aromas and colors, to be maintained while limiting the formation of unwanted AGEs and other potentially toxic neoformed compounds.³⁶ Different strategies are currently being used depending on the food concerned and on the available means of improvement. These means to limit the formation of unwanted AGEs/MRPs depend as much on the selection of new raw ingredients as on the process parameters that are used.^{37, 38}

5. Dietary Glycemic Index and Tissue Levels of AGEs

The glycemic index (GI) is a scale that ranks foods according to how much they raise the blood glucose level after consumption.³⁹ It depends not only on the quantity of carbohydrates present in a food, but also on the quality of the carbohydrates (proportion of simple and complex carbohydrates), on the overall composition of the food and on its cooking level. To put it simply, the intake of a low GI food will induce a lower increase in the blood glucose level than the intake of a high GI food. A low glycemic diet then is a diet that selects a high proportion of foods on the basis of their low GI.

Taylor and his colleagues have postulated recently that a low GI diet could limit spikes in blood glucose and consequently lower the AGE levels *in vivo*⁴⁰ in the same way as a long-term good glycemic control decreases AGE levels in patients with type 1 diabetes.⁴¹ This group found that 11-month-old mice fed a high GI diet, compared to mice fed a low GI diet, had an impaired glucose tolerance. However, more importantly for our concern, these mice had at least a three-fold higher accumulation of AGEs (using protein-bound methylglyoxal-derived hydroimidazolone, MG-H1, as a marker of AGEs) in the retina, liver lens and brain.⁴² The authors concluded that a high GI diet can induce what they termed a “systemic glycative stress” with pathological consequences. More work needs to be done to confirm the association between the accumulation of AGEs in the body and the intake of high-GI foods, especially with the quantification of different AGEs using accurate analytical methods. Other aspects of the carbohydrate quality should also be investigated, such as the glycemic load, the presence of dietary fibers and the proportion of sucrose, fructose and other simple carbohydrates in foods. The ability of fructose to produce more AGEs *in vivo* than other simple carbohydrates will be discussed in the next paragraph.

6. Fructose Consumption and AGE Accumulation *In Vivo*

The regulation of the factors that affect the Maillard reaction in food has been considered and studied for a long time. One major factor affecting the rate of the reaction is the type of carbohydrates selected in food preparation. It is well known that not all sugars have the same reactivity and lead to the formation of various MRPs in different proportions. The relationship between the type of sugars and the kinetics of the Maillard reaction has been studied in model systems to understand the formation of MRPs in foods. At least two studies found that fructose was no more reactive than glucose when browning development and sugar degradation were considered as markers of the reaction.^{43, 44} Another study by Kwak *et al.*,⁴⁵ who tested the sugar reactivity on 12 amino acids, found that fructose was the least reactive among the five sugars compared.

The same research has been carried out to compare the reactivity of glucose and fructose with proteins under physiological conditions. ¹ Among 12 aldoses and four ketoses tested, Bunn and Higgins found that glucose was the least reactive.⁴⁶ Compared to glucose, the authors measured a seven-fold increase in the reactivity of fructose to form Schiff bases with amino groups of hemoglobin. Another in vitro comparative study found that the fructation (i.e., glycation by fructose) of bovine serum albumin generated 10-times more fluorescence than the glycation of the same protein with glucose. ⁴⁷ Since fluorescence is a marker of the advanced stage of the chemical reaction in vivo, it was then suggested that the fructation could push forward the chemical reaction to advanced products more rapidly than glycation with glucose.

The question that we would like to address here is not only whether fructose is more reactive than glucose in physiological conditions, but more importantly, whether a high consumption of fructose is an important factor contributing to the accumulation of AGEs in vivo.

It is commonly assumed that fructose consumption has increased in the Western diet over the past five decades, mainly in the U.S., where high-fructose corn syrup (HFCS) is frequently used to replace sucrose in beverages and foods. However, Anderson explained in 2007 that the replacement of sucrose by HFCS in many products did not necessarily change the ratio of glucose and fructose consumed from sugars. Indeed, HFCS used in beverages contributes 55% percent of fructose compared with 50% of fructose from sucrose. ⁴⁸

Regardless of the real situation, the belief in a high intake of fructose has gained an interest among epidemiologists and other scientists who have attempted to prove a causal correlation between dietary fructose and metabolic disorders, such as obesity, diabetes and metabolic syndrome. Some studies have confirmed a risk associated with the intake of fructose, whereas other have not reached such a conclusion. ⁴⁹

The effect of a high consumption of fructose on the accumulation of AGEs in vivo was tested on rodents. The first study published in 1998 found that rats fed for one year with a normal diet and water enriched with fructose (250 g/L) had no elevated plasma glucose concentration compared to rats fed without extra fructose in the water.⁵⁰ However, the fructose-fed rats showed higher glycated hemoglobin, fructosamine and fructose levels in blood, and the collagen-linked fluorescence (a marker of AGEs) in

bones was also found to be elevated in those rats compared to the control group. This was one of the first animal studies that presented evidence that a long-term intake of fructose increases the level of early glycation products in the circulation and the accumulation of AGEs in tissue. This study is nevertheless open to criticism on one particular point, which is the high dose of fructose provided in drinking water for the animals. Even so-called regular soda does not contain such a high concentration of fructose (usually <60 g/L, far below 250 g/L).

A second study aiming to understand the effects of caloric restriction also focused on the effect of different simple carbohydrates on the formation and accumulation of AGEs in vivo.⁵¹ Tested at different ages of the animals, with or without food restriction, the source of carbohydrate was found to have almost no effect on serum glucose, glycated hemoglobin and pentosidine in collagen. It was then concluded that the total caloric intake, but not the type of carbohydrate used, had an influence on the accumulation of AGEs.

Three recent mice studies conducted by Mastrocola *et al.* reopened the debate about the potential toxic effect of dietary fructose. The exposure to free fructose was either via drinking water (150 g/L)⁵² or animal food enriched with fructose (60% of energy coming from fructose instead of corn starch and maltodextrin for the standard food).⁵³⁵⁴ Here, again, the relevance of such a high fructose dietary intake in mice to human exposure may be questioned. Bearing this limitation in mind, those studies showed a larger accumulation of CML in plasma, liver, muscle and hippocampus for the mice fed a high-fructose diet compared to mice fed a standard diet. This high CML synthesis in vivo was partly inhibited when the mice received an oral dose of pyridoxamine, an anti-glycative compound that will be described in the last paragraph of this review.

The intake of foods for which fructose is the main sugar produces a low glycemic response. For that reason, dietary fructose is often used as an alternative to other carbohydrates despite the controversy around the effect of the intake of fructose on lipemia.⁵⁵ There can be little doubt that a moderate intake of fructose significantly limits early glycation. A meta-analysis of intervention studies confirmed that the intake of fructose below 90 g per day can improve glycated hemoglobin (HbA1c) concentration in a dose-response manner.⁵⁶ With respect to the control of early glycation, a moderate substitution of fructose for sucrose or other simple sugars appears to be beneficial. A recent dietary intervention study showed that a moderate consumption of a fructose

drink (60 g fructose/day) for four weeks in overweight women did not affect the urinary levels of CML and MG-H1.⁵⁷ However, the effect of a long-term intake of fructose on the accumulation of AGEs in tissues remains to be studied on healthy volunteers.

7. Effects of Probiotic Supplementation on Glucose Metabolism and Glycation

The gastrointestinal tract is one of the most important interfaces between the external environment and the internal human environment. It consists of a truly integrated ecosystem named the microbial flora or microbiota. This flora consists of various microorganisms, among which are the bacteria, archaea, viruses and bacteriophages.⁵⁸ These microorganisms are known to be involved in many physiological processes, such as (1) the intake of nutrients and their metabolism; (2) the protection against any pathogen invasion; (3) the synthesis of vitamins and (4) the stimulation of the immune system.⁵⁹

Many studies have shown the importance and influence of the gut microbiota on human health.⁶⁰ A disruption of this microbiota, also called dysbiosis, can lead to physiological disorders and promote the development of some metabolic diseases, such as obesity and type 2 diabetes.⁶¹ In recent years, studies have shown that a dysbiosis is frequently observed among people with diabetes. This is characterized by a decrease in butyrate-producing bacteria and an increase in opportunistic bacteria (*Bacteroides* and *Clostridium*).⁶¹ This observation led scientists to develop new antidiabetic therapies using bacterial strains, also called probiotics, such as *Lactobacillales*. Probiotics can actually induce changes in the gut microbiota, stabilize microbial communities and exert beneficial effects on the health of the host.

Studies show that the ingestion of some bacterial strains, mainly lactic acid bacteria, can reduce blood glucose levels in rodent models, such as LepR^{db/db} mice (mice homozygous for the diabetes spontaneous mutation which is a result of a mutation in the leptin receptor gene lepR),⁶² streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice fed a high-fat diet,⁶³ STZ-induced diabetic rats⁶⁴ and rats fed a high-fructose diet.⁶⁵ Some of these studies have also demonstrated an effect of the probiotics on the early glycation since the HbA1c content was decreased after a long-term exposure to

Lactobacillus strains. Similar results were reported in clinical trials where volunteers consumed probiotics over a period of four to eight weeks.^{66, 67} These clinical studies showed a decrease in blood sugar level, oxidative stress and early glycation (HbA1c concentration). However, none of them attempted to study the potential protective effect of probiotics against the accumulation of AGEs in vivo.

8. Inhibition of Glycation with Isolated Products from Foods

A number of AGE inhibitor compounds have been discovered in the last 20 years of which perhaps the best known is aminoguanidine (pimagedine, AG) (Figure 2). This pharmaceutical agent was the first to prove its effectiveness in inhibiting the AGE formation in vitro and in rats.⁶⁸ There are now more than 570 publications referenced in the MEDLINE database of life sciences publications when the search is based on the two keywords “glycation and AG”. This clearly demonstrates the active research around this AGE inhibitor and the high expectations created by this discovery. Unfortunately, AG has proven to be unsuitable for clinical use due to adverse side effects.⁶⁹

Some naturally-occurring compounds or their derivatives have also been tested for their potential effects against the formation of AGEs in vivo. Like AG, some of them are thought to compete with amino groups on proteins. In other words, by “sacrificing” themselves for others, they have the potential to preserve the chemical integrity of the proteins in vivo and, thus, limit the accumulation of AGEs in tissues.

Creatine is one of these compounds. It is a nitrogenous organic acid that is not only synthesized in vivo, but also derives from the diet (mainly meat and fish) (Figure 2). Just like AG, creatine is able to trap highly reactive dicarbonyl compounds and, as a consequence, may slow down the formation and the accumulation of dicarbonyl-derived AGEs.⁷⁰ The natural occurrence of creatine in vivo and the possibility of increasing its blood concentration with the consumption of animal foods or supplements are two of the positive elements that should encourage scientists to continue along this path.

Carnosine is another molecule that can act as an AGE inhibitor (Figure 2). Like most AGE inhibitors, this dipeptide seems to have more than one biological property, which can be the source of its effect on the level of AGEs in vivo. Carnosine has been described as having a hypoglycemic effect, an indirect intracellular antioxidant activity, anti-inflammatory properties and carbonyl-trapping capacities.⁷¹ Naturally present in significant concentrations in the human lens, it was successfully tested as an anti-glycation agent for the lens with the aim of delaying senile cataracts.^{72, 73} Retarding the tissue accumulation of AGEs with carnosine or certain derivatives of this dipeptide should be investigated further.

There are data suggesting that some B vitamins and their synthetic derivatives can reduce the formation of AGEs. Vitamin B1 and benfotiamine, its lipophilic derivative, have emerged as promising inhibitors of glycation in vivo (Figure 2). By increasing transketolase activity, both of them can increase the conversion of fructose-6-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate into ribose-5-phosphate⁷⁴ and therefore prevent the accumulation of triose-phosphate, which is involved in the formation of AGEs. In STZ-induced diabetic rats, the concentrations of some of the AGEs quantified in plasma and tissues decreased in the presence of high-dose thiamine.⁵ However, it is not clear if the lowering effect of thiamine observed on diabetic animals could also be efficient on non-diabetic animals during the course of ageing. Clinical trials using a thiamine therapy for slowing down the accumulation of AGEs in normal subjects without apparent thiamine deficiency are now required to test the therapy fully.

Another vitamin derivative tested for its anti-glycation activity is pyridoxamine (PM) (Figure 2). This B6 vitamin⁷⁵ is found in human plasma at low concentrations (<0.03 µM) and is found in food in the form of PM-5'-phosphate. Booth *et al.* found that PM could prevent the transformation of Amadori products into AGEs.^{76, 77} Different protective effects have been attributed to PM when STZ-diabetic rats were pharmacologically supplied, and at least three mechanisms of PM's action may explain its anti-AGE property. First of all, PM like AG can trap dicarbonyl compounds (such as methylglyoxal). It can also neutralize reactive oxygen species and inhibit the oxidative degradation of the Amadori products. Although it appears that PM can limit the formation and the accumulation of AGEs in diabetic animal models, clinical evidence of its anti-AGE effect on healthy volunteers and sick patients is still lacking.⁶⁹

A recent breakthrough is a clinical trial showing that pharmaceutical doses of two natural compounds could decrease glycation intermediates in vivo.⁷⁸ The innovative co-formulation was made of *trans*-resveratrol found in red grapes and hesperetin derived from hesperidin, which is itself found in citrus fruits (Figure 2). While inefficient when tested individually, those two compounds administered together at high doses were found to improve metabolic health in an overweight population. They were found to decrease methylglyoxal efficiently in plasma, but surprisingly not MG-H1. This apparent lack of effect of the co-formulation on circulating AGEs may however be due to a rapid elimination of MG-H1 in the urine. A rough estimation of the urinary elimination of the endogenously-formed MG-H1 seems to indicate that the co-formulation was not only effective in reducing glycation intermediates, but also in limiting the endogenous formation of AGEs.

The efficacy of the co-formulation of *trans*-resveratrol and hesperetin was apparently due to an elimination of methylglyoxal, which resulted, indirectly, from an enhancement of the glyoxalase system (i.e., glyoxalase-1 inducer activity). Other polyphenols have been found to have a direct effect of scavenging methylglyoxal and other dicarbonyl compounds. The latter chemical property of polyphenols has been not only found at high temperature during food processing,⁷⁹ but also in physiological conditions at 37 °C.⁸⁰ This preliminary observation suggests therefore that a regular intake of polyphenols from plant foods may not only sequester reactive oxygen species and the associated oxidative stress, but also trap reaction carbonyl species (i.e., dicarbonyls) and the associated glycation of proteins.

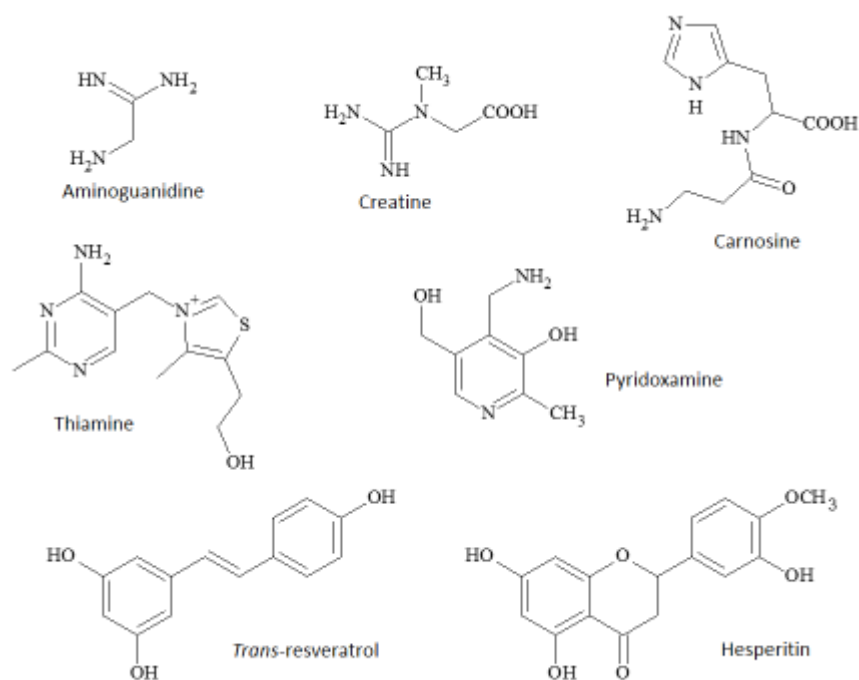


Figure 2. Chemical structures of aminoguanidine and natural compounds that have anti-AGE properties.

9. Conclusions

It is clear that preventing the formation of endogenous AGEs and the accumulation of exogenous AGEs could limit their pathophysiological effects in the human body. Besides curative pharmaceutical interventions, which are under investigation, dietary adjustments or supplementation have emerged as promising preventive therapies to slow down the accumulation of AGEs in the human body.

Decreasing the glucose uptake and controlling the blood glucose level are options that can be applied with a “slow carb” diet. Since the carbonyl stress involved in the formation of endogenous AGEs is closely linked to oxidative stress, any diet that will improve the oxidative status of humans will potentially have the additional benefit of reducing the formation of endogenous AGEs. Trapping endogenous dicarbonyl compounds, such as methylglyoxal, appears also to be a high priority in the fight against glycation. In this regard, certain natural compounds extracted from foods have been found to be good candidates, either because of their chemical affinity with the dicarbonyl compounds or their indirect action in stimulating the dicarbonyl

detoxification system. While promising, the natural compounds derived from foods have been found to be effective only when extracted, purified and administered at pharmacological dosages.

10. Bibliography

1. Tessier, F.J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol. Biol. (Paris)* **2010**, *58*, 214–219.
2. Singh, R.; Barden, A.; Mori, T.; Beilin, L. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia* **2001**, *44*, 129–146.
3. Henning, C.; Glomb, M.A. Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions. *Glycoconj. J.* **2016**, *33*, 499–512.
4. Alamir, I.; Niquet-Leridon, C.; Jacolot, P.; Rodriguez, C.; Orosco, M.; Anton, P.M.; Tessier, F.J. Digestibility of extruded proteins and metabolic transit of N ϵ -carboxymethyllysine in rats. *Amino Acids* **2013**, *44*, 1441–1449.
5. Karachalias, N.; Babaei-Jadidi, R.; Rabbani, N.; Thornalley, P.J. Increased protein damage in renal glomeruli, retina, nerve, plasma and urine and its prevention by thiamine and benfotiamine therapy in a rat model of diabetes. *Diabetologia* **2010**, *53*, 1506–1516.
6. Koschinsky, T.; He, C.J.; Mitsuhashi, T.; Bucala, R.; Liu, C.; Buenting, C.; Heitmann, K.; Vlassara, H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6474–6479.
7. Tessier, F.J.; Niquet, C. The metabolic, nutritional and toxicological consequences of ingested dietary Maillard reaction products: A literature review. *J. Soc. Biol.* **2007**, *201*, 199–207.
8. Tessier, F.J.; Niquet-Leridon, C.; Jacolot, P.; Jouquand, C.; Genin, M.; Schmidt, A.M.; Grossin, N.; Boulanger, E. Quantitative assessment of organ distribution of dietary protein-bound ¹³C-labeled N ϵ -carboxymethyllysine after a chronic oral exposure in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 2446–2456.
9. Roncero-Ramos, I.; Delgado-Andrade, C.; Tessier, F.J.; Niquet-Leridon, C.; Strauch, C.; Monnier, V.M.; Navarro, M.P. Metabolic transit of N(ε)-carboxymethyllysine after consumption of AGEs from bread crust. *Food Funct.* **2013**, *4*, 1032–1039.
10. Grossin, N.; Auger, F.; Niquet-Leridon, C.; Durieux, N.; Montaigne, D.; Schmidt, A.M.; Susen, S.; Jacolot, P.; Beuscart, J.B.; Tessier, F.J.; et al. Dietary CML-enriched protein induces functional arterial aging in a RAGE-dependent manner in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 927–938.

11. Degen, J.; Hellwig, M.; Henle, T. 1,2-dicarbonyl compounds in commonly consumed foods. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7071–7079.
12. Degen, J.; Vogel, M.; Richter, D.; Hellwig, M.; Henle, T. Metabolic transit of dietary methylglyoxal. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 10253–10260.
13. Monnier, V.M. Toward a Maillard reaction theory of aging. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, *304*, 1–22.
14. Roth, G.S.; Ingram, D.K.; Lane, M.A. Caloric restriction in primates and relevance to humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *928*, 305–315.
15. Pallavi, R.; Giorgio, M.; Pelicci, P.G. Insights into the beneficial effect of caloric/dietary restriction for a healthy and prolonged life. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 318.
16. Masoro, E.J.; Katz, M.S.; McMahan, C.A. Evidence for the glycation hypothesis of aging from the food-restricted rodent model. *J. Gerontol.* **1989**, *44*, B20–B22.
17. Masoro, E.J.; McCarter, R.J.; Katz, M.S.; McMahan, C.A. Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. *J. Gerontol.* **1992**, *47*, B202–B208.
18. Cefalu, W.T.; Bell-Farrow, A.D.; Wang, Z.Q.; Sonntag, W.E.; Fu, M.X.; Baynes, J.W.; Thorpe, S.R. Caloric restriction decreases age-dependent accumulation of the glycoxidation products, N ϵ -(carboxymethyl)lysine and pentosidine, in rat skin collagen. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **1995**, *50*, B337–B341.
19. Sell, D.R.; Monnier, V.M. Age-related association of tail tendon break time with tissue pentosidine in DBA/2 vs C57BL/6 mice: The effect of dietary restriction. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **1997**, *52*, B277–B284.
20. Sell, D.R. Ageing promotes the increase of early glycation Amadori product as assessed by epsilon-N-(2-furoylmethyl)-L-lysine (furosine) levels in rodent skin collagen. The relationship to dietary restriction and glycoxidation. *Mech. Ageing Dev.* **1997**, *95*, 81–99.
21. Sell, D.R.; Lane, M.A.; Obrenovich, M.E.; Mattison, J.A.; Handy, A.; Ingram, D.K.; Cutler, R.G.; Roth, G.S.; Monnier, V.M. The effect of caloric restriction on glycation and glycoxidation in skin collagen of nonhuman primates. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2003**, *58*, 508–516.
22. Cai, W.; He, J.C.; Zhu, L.; Chen, X.; Wallenstein, S.; Striker, G.E.; Vlassara, H. Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet. Association with increased AGER1 expression. *Am. J. Pathol.* **2007**, *294*, 145–152.

23. Cai, W.; He, J.C.; Zhu, L.; Chen, X.; Zheng, F.; Striker, G.E.; Vlassara, H. Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. *Am. J. Pathol.* **2008**, *173*, 327–336.
24. Buser, W.; Erbersdobler, H.F. Carboxymethyllysine, a new compound of heat damage in milk products. *Milchwiss* **1986**, *41*, 780–785.
25. 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.* **1986**, *261*, 4889–4894.
26. Henle, T. Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids* **2005**, *29*, 313–322.
27. He, C.; Sabol, J.; Mitsuhashi, T.; Vlassara, H. Dietary glycotoxines: Inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. *Diabetes* **1999**, *48*, 1308–1315.
28. Tessier, F.J.; Birlouez-Aragon, I. Health effects of dietary Maillard reaction products: The results of ICARE and other studies. *Amino Acids* **2012**, *42*, 1119–1131.
29. Birlouez-Aragon, I.; Saavedra, G.; Tessier, F.J.; 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*, 1–7.
30. Semba, R.D.; Ang, A.; Talegawkar, S.; Crasto, C.; Dalal, M.; Jardack, P.; Traber, M.G.; 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.* **2012**, *66*, 3–9.
31. Vlassara, H.; Cai, W.; Tripp, E.; Pyzik, R.; Yee, K.; Goldberg, L.; Tansman, L.; Chen, X.; Mani, V.; Fayad, Z.A.; et al. Oral AGE restriction ameliorates insulin resistance in obese individuals with the metabolic syndrome: A randomised controlled trial. *Diabetologia* **2016**, *59*, 2181–2192.
32. Cai, W.; Ramdas, M.; Zhu, L.; Chen, X.; Striker, G.E.; Vlassara, H. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 15888–15893.
33. Handelsman, Y.; Mechanick, J.I.; Blonde, L.; Grunberger, G.; Bloomgarden, Z.T.; Bray, G.A.; Dagogo-Jack, S.; Davidson, J.A.; Einhorn, D.; Ganda, O.; et al. AACE Task Force for Developing Diabetes Comprehensive Care Plan. American Association

of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan. *Endocr. Pract.* **2011**, *17*, 1–53.

34. Uribarri, J.; Woodruff, S.; Goodman, S.; Cai, W.; Chen, X.; Pyzik, R.; Yong, A.; Striker, G.E.; Vlassara, H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J. Am. Diet. Assoc.* **2010**, *110*, 911–916.

35. Scheijen, J.L.; Clevers, E.; Engelen, L.; Dagnelie, P.C.; Brouns, F.; Stehouwer, C.D.; Schalkwijk, C.G. 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.* **2016**, *190*, 1145–1150.

36. Poulsen, M.W.; Hedegaard, R.V.; Andersen, J.M.; de Courten, B.; Bugel, 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.

37. Loaec, G.; Niquet-Leridon, C.; Henry, N.; Jacolot, P.; Jouquand, C.; Janssens, M.; Hance, P.; Cadalen, T.; Hilbert, J.L.; Desprez, B.; et al. Impact of Variety and Agronomic Factors on Crude Protein and Total Lysine in Chicory; N(ϵ)-Carboxymethyl-lysine-Forming Potential during Drying and Roasting. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10295–10302.

38. Helou, C.; Gadonna-Widehem, P.; Robert, N.; Branlard, G.; Thebault, J.; Librere, S.; Jacquot, S.; Mardon, J.; Piquet-Pissaloux, A.; Chapron, S.; et al. The impact of raw materials and baking conditions on Maillard reaction products, thiamine, folate, phytic acid and minerals in white bread. *Food Funct.* **2016**, *7*, 2498–2507.

39. Jenkins, D.J.; Wolever, T.M.; Taylor, R.H.; Barker, H.; Fielden, H.; Baldwin, J.M.; Bowling, A.C.; Newman, H.C.; Jenkins, A.L.; Goff, D.V. Glycemic index of foods: A physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.* **1981**, *34*, 362–366.

40. Whitcomb, E.A.; Chiu, C.J.; Taylor, A. Dietary glycemia as a determinant of health and longevity. *Mol. Asp. Med.* **2015**, *46*, 14–20.

41. Kostolanska, J.; Jakus, V.; Barak, L. HbA1c and serum levels of advanced glycation and oxidation protein products in poorly and well controlled children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **2009**, *22*, 433–442.

42. Uchiki, T.; Weikel, K.A.; Jiao, W.; Shang, F.; Caceres, A.; Pawlak, D.; Handa, J.T.; Brownlee, M.; Nagaraj, R.; Taylor, A. Glycation-altered proteolysis as a

pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in nondiabetics). *Aging Cell* **2012**, *11*, 1–13.

43. Ashoor, S.H.; Zent, J.B. Maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.* **1984**, *49*, 1206–1207.
44. Laroque, D.; Inisan, C.; Berger, C.; Vouland, E.; Dufosse, L.; Guerard, F. Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chem.* **2008**, *111*, 1032–1042.
45. Kwak, E.J.; Lim, S.I. The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control. *Amino Acids* **2004**, *27*, 85–90.
46. Bunn, H.F.; Higgins, P.J. Reaction of monosaccharides with proteins: Possible evolutionary significance. *Science* **1981**, *213*, 222–224.
47. Suarez, G.; Rajaram, R.; Oronsky, A.L.; Gawinowicz, M.A. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3674–3679.
48. Anderson, G.H. Much ado about high-fructose corn syrup in beverages: The meat of the matter. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *86*, 1577–1578.
49. Sun, S.Z.; Anderson, G.H.; Flickinger, B.D.; Williamson-Hughes, P.S.; Empie, M.W. Fructose and non-fructose sugar intakes in the US population and their associations with indicators of metabolic syndrome. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 2875–2882.
50. Levi, B.; Werman, M.J. Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1442–1449.
51. Lingelbach, L.B.; Mitchell, A.E.; Rucker, R.B.; McDonald, R.B. Accumulation of advanced glycation endproducts in aging male Fischer 344 rats during long-term feeding of various dietary carbohydrates. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1247–1255.
52. Mastrocola, R.; Collino, M.; Rogazzo, M.; Medana, C.; Nigro, D.; Boccuzzi, G.; Aragno, M. Advanced glycation end products promote hepatosteatosis by interfering with SCAP-SREBP pathway in fructose-drinking mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2013**, *305*, G398–G407.
53. Mastrocola, R.; Nigro, D.; Chiazza, F.; Medana, C.; Dal Bello, F.; Boccuzzi, G.; Collino, M.; Aragno, M. Fructose-derived advanced glycation end-products drive lipogenesis and skeletal muscle reprogramming via SREBP-1c dysregulation in mice. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *91*, 224–235.

54. Mastrocola, R.; Nigro, D.; Cento, A.S.; Chiazza, F.; Collino, M.; Aragno, M. High-fructose intake as risk factor for neurodegeneration: Key role for carboxy methyllysine accumulation in mice hippocampal neurons. *Neurobiol. Dis.* **2016**, *89*, 65–75.
55. Bantle, J.P. Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 1263S–1268S.
56. Livesey, G.; Taylor, R. Fructose consumption and consequences for glycation, plasma triacylglycerol, and body weight: Meta-analyses and meta-regression models of intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 1419–1437.
57. Mackie, R.I. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: Diversity and evolution. *Integ. Comp. Biol.* **2002**, *42*, 319–326.
58. Mark, A.B.; Poulsen, M.W.; Andersen, S.; Andersen, J.M.; Bak, M.J.; Ritz, C.; Holst, J.J.; Nielsen, J.; de Courten, B.; Dragsted, L.O.; et al. Consumption of a diet low in advanced glycation end products for 4 weeks improves insulin sensitivity in overweight women. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 88–95.
59. Mc Farland, L.V. Normal flora: Diversity and functions. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2000**, *12*, 193–218.
60. Mikelsaar, M.; Zilmer, M. Lactobacillus fermentum ME-3—An antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2009**, *21*, 1–27.
61. Carding, S.; Verbeke, K.; Vipond, D.T.; Corfe, B.M.; Owen, L.J. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2015**, *26*, 26191.
62. Yun, S.I.; Park, H.O.; Kang, J.H. Effect of Lactobacillus gasseri BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 1681–1686.
63. Chen, P.; Zhang, Q.; Dang, H.; Liu, X.; Tian, F.; Zhao, J.; Chen, Y.; Zhang, H.; Chen, W. Antidiabetic effect of Lactobacillus casei CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocine. *Nutrition* **2014**, *30*, 1061–1068.
64. Tabuchi, M.; Ozaki, M.; Tamura, A.; Yamada, N.; Ishida, T.; Hosada, M.; Hosono, A. Antidiabetic effect of Lactobacillus GG in streptozotocine-induced diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *67*, 1421–1424.
65. Hsieh, F.C.; Lee, C.L.; Chai, C.Y.; Chen, W.T.; Lu, Y.C.; Wu, C.S. Oral administration of Lactobacillus reuteri GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutr. Metab.* **2013**, *10*, 35.

66. Ejtahed, H.S.; Mohtadi-Nia, J.; Homayouni-Rad, A.; Niafar, M.; Asghari-Jafarabadi, M.; Mofid, V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetes patients. *Nutrition* **2012**, *28*, 539–543.
67. Moroti, C.; Souza Magri, L.F.; de Rezende Costa, M.; Cavallini, D.C.U.; Sivieri, K. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. *Lipids Health Dis.* **2012**, *11*, 29.
68. Brownlee, M.; Vlassara, H.; Kooney, A.; Ulrich, P.; Cerami, A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* **1986**, *232*, 1629–1632.
69. Borg, D.J.; Forbes, J.M. Targeting advanced glycation with pharmaceutical agents: Where are we now? *Glycoconj. J.* **2016**, *33*, 653–670.
70. Lobner, J.; Degen, J.; Henle, T. Creatine is a scavenger for methylglyoxal under physiological conditions via formation of *N*-(4-methyl-5-oxo-1-imidazolin-2-yl)sarcosine (MG-HCr). *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 2249–2256.
71. Stegen, S.; Sigal, R.J.; Kenny, G.P.; Khandwala, F.; Yard, B.; De Heer, E.; Baelde, H.; Peersman, W.; Derave, W. Aerobic and resistance training do not influence plasma carnosinase content or activity in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2015**, *309*, E663–E669.
72. Javadi, S.; Yousefi, R.; Hosseinkhani, S.; Tamaddon, A.M.; Uversky, V.N. Protective effects of carnosine on dehydroascorbate-induced structural alteration and opacity of lens crystallins: Important implications of carnosine pleiotropic functions to combat cataractogenesis. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2016**, *19*, 1–19.
73. Abdelkader, H.; Longman, M.R.; Alany, R.G.; Pierscionek, B. Phytosome-hyaluronic acid systems for ocular delivery of L-carnosine. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 2815–2827.
74. Bitsch, R.; Wolf, M.; Moller, J.; Heuzeroth, L.; Gruneklee, D. Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamin derivative. *Ann. Nutr. Metab.* **1991**, *35*, 292–296.
75. Voziyan, P.A.; Hudson, B.G. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: Targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1671–1681.
76. Booth, A.A.; Khalifah, R.G.; Hudson, B.G. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products:

Comparison with aminoguanidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *220*, 113–119.

77. Booth, A.A.; Khalifah, R.G.; Todd, P.; Hudson, B.G. In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). Novel inhibition of post-Amadori glycation pathways. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5430–5407.

78. Xue, M.; Weickert, M.O.; Qureshi, S.; Kandala, N.B.; Anwar, A.; Waldron, M.; Shafie, A.; Messenger, D.; Fowler, M.; Jenkins, G.; et al. Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and Obese Subjects by Glyoxalase 1 Inducer Formulation. *Diabetes* **2016**, *65*, 2282–2294.

79. Totlani, V.M.; Peterson, D.G. Epicatechin carbonyl-trapping reactions in aqueous Maillard systems: Identification and structural elucidation. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7311–7318.

80. Lo, C.Y.; Li, S.; Tan, D.; Pan, M.H.; Sang, S.; Ho, C.T. Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 1118–1128.



Quel est le meilleur modèle murin pour étudier la glycation dans un contexte diabétique ?

The LepR^{db/db} mice model for studying glycation in the context of diabetes.

Diabetes Metabolism Research and Reviews – December 2018

Axel Guilbaud^{1,2}, Michael Howsam¹, Céline Niquet-Léridon³, Florian Delguste¹, Eric Boulanger¹, Frédéric J Tessier¹

¹ University Lille, Inserm, CHU Lille, U995-LIRIC-Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France

² VF Bioscience SAS, Parc Eurasanté, 310 Rue Jules Vallès, 59120 Loos-lez-Lille, France

³ Institut Polytechnique UniLaSalle, Transformations & Agroressources Unit, 19 rue Pierre Waguet, 60000, Beauvais, France

Abstract

Background: Early (furosine) and advanced (carboxymethyllysine, CML) products of glycation (AGEs) have been reported as increased in plasma, tissues and organs of diabetic people, indicating a direct link between glycation and type 2 diabetes (T2D). While murine models present some of the characteristics observed in diabetic humans, their pertinence as models of glycation, particularly for T2D, remains poorly described. The aim of this study was to characterize and compare glycation in several organs of two commonly-studied murine models of T2D using stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Methods: Defining parameters of diabetes including body weight, fasting glycaemia and glucose intolerance were measured in three different C57BL6 mouse models of T2D (the genetic *LepR^{db/db}* (*db/db*) model and two diet-induced obesity (DIO) models) and their respective controls. Furosine, free and protein-bound CML were quantified in kidneys, lungs, heart and liver by LC-MS/MS.

Results: The obesity, hyperglycaemia and glucose intolerance in *db/db* mice was accompanied by an increase of furosine and protein-bound CML levels in all organs relative to controls. The DIO models took several months to become obese, exhibited less severe hyperglycaemia and glucose intolerance, while glycation products were not significantly different between these groups (with the exception of furosine in liver and CML in lungs).

Conclusions: The *db/db* model better reflected the characteristics of human T2D compared with the DIO models, and exhibited greater formation and accumulation of both furosine and protein-bound CML in all of the organs tested here.

KEYWORDS

Type 2 diabetes, murine models, glycation, furosine, free- and protein-bound carboxymethyllysine

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a chronic disease affecting a growing number of people, estimated at 425 million worldwide in 2017 and forecast to reach 642 million by 2045. ¹ It is characterised in humans by a glycated haemoglobin (HbA1c) level >6.5%, a fasting glycaemia >126mg/dL or a random glycaemia >200mg/dL. ² The attendant chronic hyperglycaemia is associated with long-term organ damage, morbidity and mortality. ³ Brownlee highlighted the polyol, protein C kinase, hexoamine and glycation pathways as the 4 main routes *via* which the perturbed glucose metabolism affects the organism. ⁴

Glycation is a non-enzymatic reaction between reducing sugars (e.g. glucose and fructose) and amine functional groups in proteins, peptides or amino acids (preferentially lysine and arginine). ⁵ The primary stable glycation products formed are the Amadori or Heyns products, deriving respectively from glucose and fructose. These early glycation products can be degraded into advanced glycation end products (AGEs), among which N^ε-carboxymethyllysine (CML) is one of the most studied. ⁶ Many publications have reported increased concentrations of both early glycation products and AGEs in plasma and tissues from T2D patients, ⁷⁻¹⁰ demonstrating a direct link between glycation and diabetic complications. ¹¹

Several therapeutic strategies have been investigated for preventing, or at least reducing, the formation and accumulation of AGEs *in vivo* ^{12,13} but findings remain inconclusive. These investigations have often involved the use of animal models. One difficulty with these models for studying glycation in a diabetic context is that, while several of them present one or more of the characteristics observed in diabetic humans, ¹⁴ their pertinence as models of glycation is poorly described.

Only a few rodent models have been used to specifically study glycation. Of note are: the chemically-induced type 1 diabetes (T1D) models, generated by administering streptozotocine (STZ); ⁷ the genetically-induced models of obesity with spontaneous T2D obtained by monogenic mutation, such as the Lep^{ob/ob} mice (deficient in leptin) and the LepR^{db/db} mice (lacking the functional, full-length Ob-Rb leptin receptor); ^{15,16}

and the diet-induced obesity models (DIO) raised on a high fat (HF) or a high fat-high sucrose diet (HF-HS).^{17–19}

The STZ-induced diabetic rat model is, to our knowledge, the only experimental model of diabetes that has also been well characterized for glycation using stable isotope dilution LC-MS/MS to quantify AGEs in plasma and organs.^{7,20} While this model is useful for studying glycation in T1D it is not representative of the metabolic abnormalities seen in T2D – other animal models, such as the genetically- or diet-induced obesity models, better reflect T2D in humans. In the *LepR^{db/db}* mice, CML and other AGEs have been measured in plasma or serum,²¹ but only a few studies using genetically-induced obesity models have analysed AGEs in organs or tissues such as kidneys, liver or skin.^{22–24} Among the DIO models of T2D, HF and HF-HS diets have successfully rendered the animals intolerant to glucose but have mixed results with respect to inducing hyperglycaemia. Very few studies have used DIO models to observe the accumulation of AGEs in fluids, tissues and organs.^{17,19,25}

In addition, studies on both genetic and DIO T2D models have often used semi-quantitative, more-or-less specific analytical methods (ELISA, fluorescence and immunostaining assays) to analyse AGEs. We are not aware of any published study that has measured the accumulation of both early and advanced glycation products in organs from different T2D mouse models using robust, quantitative analytical methods.

The aim of our study was to compare the glycation status of three T2D mouse models: the *LepR^{db/db}* (*db/db*) monogenic model and two DIO models (HF and HF-HS diets). Classic parameters of obesity and glucose homeostasis including body weight, fasting glycaemia and glucose intolerance were measured. Early (Amadori product) and advanced (CML) glycation products were quantified in different organs by stable isotopic dilution LC-MS/MS. We also developed a method to separately analyse free and protein-bound CML, following recent work in our laboratory showing that this latter form of CML accumulates in organs as a function of dietary exposure.²⁶

2. Materials and methods

2.1 Chemical products

Nonafluoropentanoic acid (NFPA) 97% was from SODIPRO (Échirolles, France), HPLC Ultra-pure water from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), and 37% hydrochloric acid (HCl), trichloroacetic acid (TCA), sodium borohydride and boric acid from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Analytical standards of furosine, (D₄)-furosine, CML and (D₂)-CML came from Polypeptide Group Laboratories (Strasbourg, France); lysine and (¹⁵N₂)-lysine standards were from Sigma Aldrich and CORTECNET (Voisins-le-Bretonneux, France), respectively. Standard solutions were prepared in NFPA 10mM.

2.2 Animal studies

Animal experiments were approved by the local ethics committee and respected the principles of animal experimentation (CEEA75 Nord – Pas de Calais).

For the genetic model, 15 male, *db/db*, BKS(D)-LepR^{*db*}/JOrIRj and their 15, *db/+* wild-type littermates were obtained at 6 weeks old from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Saint Berthevin, France). After 2wks acclimatisation, the study was undertaken for 14wks. All mice had *ad libitum* access to a normal diet (A04 U8220G10R, SAFE, Augy, France) and water.

For the Diet-Induced Obesity (DIO) models, 27 male, wild-type, C57BL/6 littermates (all 6wks old) were obtained from Janvier Labs. Mice were acclimatised for 2 wks and then randomly assigned to three groups: 9 received an *ad libitum* normal diet (ND; 3.14kcal/g; A04 U8220G10R, SAFE, Augy, France); 9 received an *ad libitum* high fat diet (HFD; 5.24kcal/g; D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ - 60% fat, 20% carbohydrates, 20% protein); 9 received an *ad libitum* high fat high sucrose diet (HF-HSD; 4.73kcal/g; D12451; Research Diets, New Brunswick, NJ - 45% fat, 35% carbohydrates, 20% protein). To allow for the development of obesity and chronic hyperglycaemia, this study was longer than for the genetic model (26wks). During this experiment, 4 mice from the ND group and 2 from the HFD group had to be euthanised.

All animals were maintained under a 12h light/dark cycle at 23±3°C. Mice were weighed every 2wks. The daily food intake was measured at different points during the experiments and these measurements averaged to obtain a mean daily food intake value. At the beginning and end of the experiments, fasting glycaemia and glucose tolerance tests were performed.

The animals from the genetic and the DIO models were euthanised at 20 and 34wks old, respectively. Four organs (liver, kidneys, lungs, heart) were removed, weighed, immediately plunged into liquid nitrogen and stored at -80°C for the quantification of early (furosine) and advanced (CML) glycation products. Plasma was also collected and stored at -80°C until analysis of the same biomarkers.

2.3 Glucose tolerance test

At the beginning and end of the experiments, all animals underwent an oral glucose tolerance test (OGTT). Mice fasted for 6h²⁷ before a tail incision was used to sample blood to measure fasting blood glucose. Finally, a bolus of glucose (2 g/kg body weight) was administered by gavage and glycaemia measured *via* tail vein sampling at 15, 30, 60 and 120 minutes.

2.4 Quantification of early and advanced glycation products by HPLC-MS/MS

2.4.1 Sample preparation for furosine analysis

Ten milligrams of each lyophilized and powdered organ or 10mg of each powdered mouse diet were hydrolysed in 1.2mL of 6M HCl at 110°C for 21h. Aliquots of 200µL of each hydrolysate were evaporated using a Speed-Vac concentrator (Thermo SPD131DDA) and then re-solubilized with 200µL of a 10mM NFPA solution containing (D₄)-furosine (1µg/mL) and (¹⁵N₂)-lysine (10µg/mL). Each sample was filtered (0.45µm) before LC-MS/MS analysis of furosine and lysine.

2.4.2 Sample preparation for analysis of free and protein-bound CML

The sample preparation and analysis was conducted after the method of Niquet-Léridon and Tessier.²⁸

To separate free CML from protein-bound CML, 10mg of each lyophilized and powdered organ was solubilised for 30min on ice in 200µL of 10% TCA to precipitate proteins. After centrifugation (21 000g, 10min, 4°C), supernatants containing free CML were separated from the pellets containing protein-bound CML. Two-hundred millilitres of supernatant were evaporated using a Speed-Vac concentrator and then re-solubilized in 200µL of internal standards (D₂)-CML (0.1µg/mL) and (¹⁵N₂)-lysine (10µg/mL). Pellets containing protein-bound CML were transferred to Pyrex tubes with 100µL of HPLC Ultra-Pure H₂O and 500µL of 0.1M NaBH₄ (0.1M sodium borohydrate and borate buffer at 200mM, pH 9.5). This reduction step (2.5h at 20°C) is considered necessary to block the Amadori product and avoid *de novo* formation of CML during the subsequent acid hydrolysis. For each protein-bound CML sample, 600µL of 12M HCl was then added to obtain a final concentration of 6M HCl and hydrolysis was performed at 110°C for 21h. Two hundred microliters of protein-bound CML hydrolysates were evaporated using a Speed-Vac and then re-solubilized in 200µL of a 10mM NFPA solution containing internal standards (D₂)-CML (0.1µg/mL) and (¹⁵N₂)-lysine (10µg/mL).

The same procedure was applied for the preparation of the food samples except that no separation of the free from protein-bound CML was performed.

All samples were filtered (0.45µm) before LC-MS/MS analysis.

2.4.3 Analysis of furosine, CML and lysine by LC-MS/MS

HPLC-MS/MS was performed on a Thermo Vantage instrument coupled by a Heated Electrospray Ionization source (HESI) to a Triple quadrupole mass spectrometer (Thermo, Courtaboeuf, France).

A Hypercarb column (100 x 2.1mm, 5µm; Thermo) coupled to a guard column of the same phase (10 x 2.1mm, 5 µm) was used for chromatographic separation. The flow rate was 0.2mL/min of a binary mobile phase (A – aqueous solution 10mM NFPA, B –

acetonitrile). The percentage of A was as follows: 0-9min, 100-75%; 9-11min, 75-40%; 11-13min, 40%; 13.1-21min, 100%. Column temperature was 10°C.

The HESI probe was operated in positive mode: spray voltage 3500V; vaporization temperature 250°C; sheath (AU) 50; aux (AU) 20; capillary temperature 270°C; collision pressure 1.5 bar.

For furosine, CML and lysine quantification, the tandem MS analyses were realized by measuring specific transitions (in elution order): m/z 147.0 → m/z 130.0 and m/z 149.0 → m/z 130.0 for lysine and its isotope, respectively; m/z 205.0 → m/z 130.0 and m/z 207.0 → m/z 130.0 for CML and its isotope, respectively; m/z 255.0 → m/z 130.0 and m/z 259.0 → m/z 134.0 for furosine and its isotope, respectively.

Quantification of furosine, CML and lysine was achieved using the ratio between the area under the peaks for the analyte and its corresponding isotope (*i.e.* internal standard), and comparison with standard curves.

2.5 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Graphpad Prism 5. Quantitative data were represented as box-and-whisker plots: 10-90 percentiles. Wilcoxon tests were used to compare the 2 groups of mice in the genetic model, while Kruskal-Wallis tests with a Dunn *post hoc* test were used to compare the 3 groups in the DIO models. Differences were considered statistically significant at a value of $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Body weight, organ mass and dietary intake

At the beginning of the study (8wks of age for all mice), body weight was comparable between groups (*db/+*, 25.8±1.3; ND, 25.3±1.4; HFD, 25.3±0.7 and HF-HSD, 25.5±1.2 g) except for the *db/db* mice with a mean body weight of 38.0±3.3 g (Fig. 1A). During the experiment, the mean daily energy intake (and hence the mean daily food intake) were 1.7-fold higher ($p < 0.05$) for *db/db* mice (25.4±2.6 kcal/day) compared with *db/+*

mice (15.1 ± 0.8 kcal/day) (Fig. 1B). This gave rise to a significantly higher body weight for *db/db* mice compared with their *db/+* controls (42.9 ± 5.2 g vs. 30.6 ± 1.5 g) at the end of the experiment. Among the four organs collected in this study, the wet mass of kidneys was not different between these two groups (*db/+*, 241 ± 23 mg; *db/db*, 226 ± 25 mg), while the wet mass of lungs and hearts were significantly lower in *db/db* mice compared with their *db/+* controls (130 ± 15 vs. 163 ± 25 mg, and 110 ± 9 vs. 140 ± 11 mg, respectively, $p < 0.01$). Inversely, the wet mass of livers was significantly higher in *db/db* mice compared with their controls (2086 ± 188 vs. 1227 ± 116 mg, $p < 0.001$).

After 26wks of their respective diets, HFD and HF-HSD mice showed higher body mass compared with ND mice (48.2 ± 2.9 , 47.3 ± 4.0 and 32.0 ± 2.0 g, respectively) (Fig. 1A). Daily energy intake was essentially the same for ND, HFD and HF-HSD mice (14.9 ± 2.3 , 14.9 ± 1.2 and 16.0 ± 2.3 kcal/day, respectively) (Fig. 1B). No difference in wet mass was observed for either kidneys or heart among the DIO groups. The wet masses of lungs and liver were significantly higher in HFD and HF-HSD mice compared with ND mice (lungs: 298 ± 56 , 282 ± 63 and 209 ± 32 mg, respectively; liver: 2063 ± 389 , 2031 ± 391 and 1518 ± 216 mg, respectively).

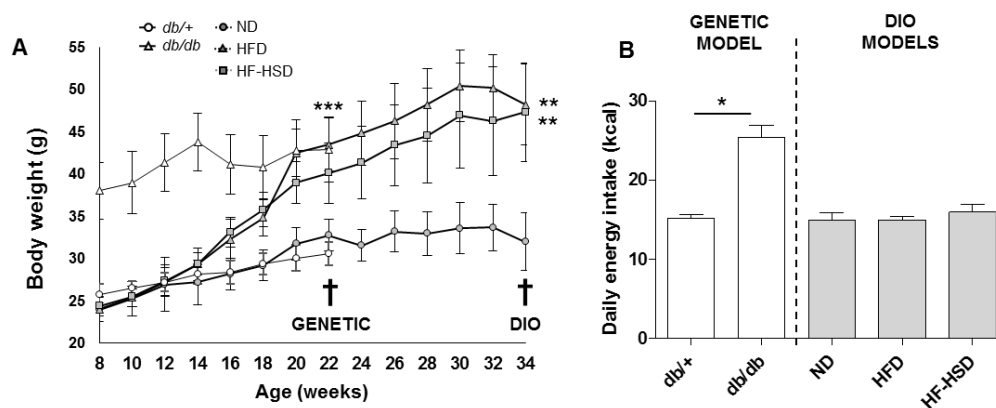


Figure 1 Evolution of body weight in grams (A) and daily energy intake in kcal (mean of three measurements during the experiment) (B). The genetic model (white symbols, solid curves) compares wild type (*db/+*; $n=15$) with diabetic mice (*db/db*; $n=15$). The DIO models (grey symbols, dotted curves) compare wild type mice fed a normal diet (ND; $n=5$), a high-fat diet (HFD; $n=7$) or a high-fat, high-sucrose diet (HF-HSD; $n=9$). Sacrifice (†) took place at 22 weeks old for the Genetic model and 34 weeks old for the DIO models.

Mean \pm SD, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Wilcoxon test was used to compare *db/db* mice with their controls; a Kruskal Wallis tests for multiple comparisons was used to compare HFD and HF-HSD groups with the ND group.

3.2 Fasting glycaemia and glucose tolerance

At the beginning and end of each experiment, all mice underwent an oral glucose tolerance test. Fasting glycaemia was measured before this test was performed: as shown in Fig. 2A and B, *db/db* mice had significantly higher fasting glycaemia than their controls, whatever their age, but the difference between the two groups was greater at 22wks old (623 ± 103 vs. 164 ± 26 mg/dL) than at 8wks old (476 ± 90 vs. 174 ± 28 mg/dL).

Among the DIO groups, the 26wks of HF or HF-HS regimes significantly increased the fasting glycaemia between 8 and 34wks of age (HFD, from 137 ± 28 to 268 ± 59 mg/dL; HF-HSD, from 152 ± 22 to 240 ± 42 mg/dL, $p<0.05$). The ND control mice had a slight, non-significant increase in their fasting glycaemia during the study (from 141 ± 27 to 225 ± 50 mg/dL).

Following fasting glycaemia measurements, glycaemic kinetics (0 to 120mins) were monitored after a gavage with a bolus of glucose (2g/kg body weight). Fig. 2C and D show the evolution of the glycaemic responses at the beginning and end of the two studies. At 8wks old, *db/db* mice already exhibited glucose intolerance as evidenced by the high area under the glycaemic curve (85.2 ± 6.0) (Fig. 2C and E). This trend of glucose intolerance among the *db/db* mice continued to increase until 22wks of age (96.0 ± 7.9). After initially similar glucose tolerance results for the 3 DIO groups at the beginning of the study (from 23.0 to 24.8, Fig. 2C and E), the area under the glycaemic curve increased in HFD mice at the end of the experiment (47.6 ± 12.7) and was significantly different from the ND mice (29.1 ± 6.1), while a smaller, non-significant increase was observed for the HF-HSD mice (37.6 ± 12.9) at sacrifice.

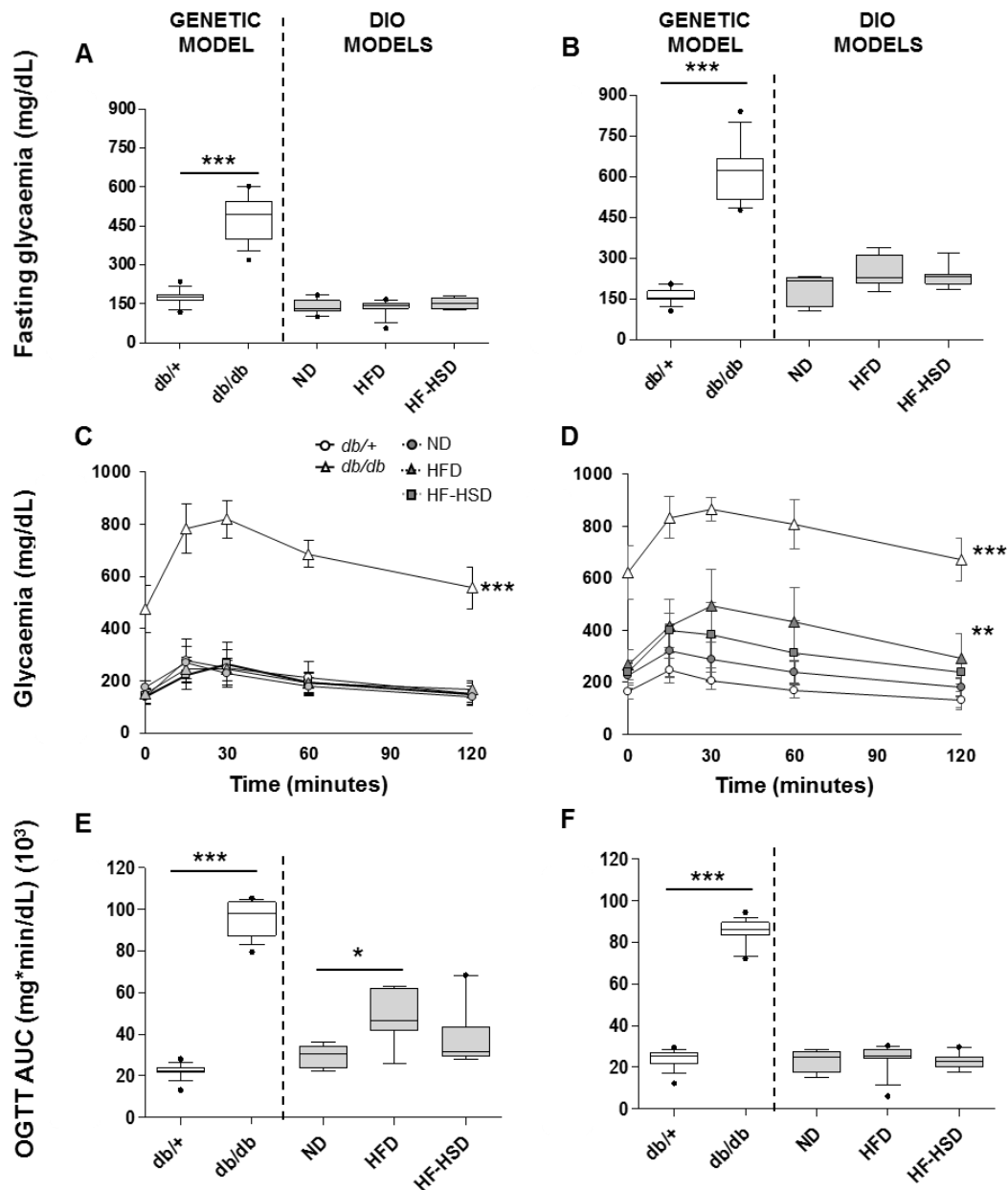


Figure 2 Evolution of glycaemia during the experiments (Start – **A**, **C** and **E**; 8-week-old mice. End – **B**, **D** and **F**; The genetic model mice were 22 weeks old, DIO model mice were 34 weeks old). The OGTTs (**B** and **C**) were performed for 2h in each group and the areas under the curves (mg*min/dL) were compared (**E** and **F**). The Genetic model (white symbols, solid curves) compares wild type (*db/+*; n=15) with diabetic mice (*db/db*; n=15). The DIO models (grey symbols, dotted curves) compares wild type mice fed a normal diet (ND; n=5), a high-fat diet (HFD; n=7) or a high-fat, high-sucrose diet (HF-HSD; n=9). Statistical analyses were performed on measured areas under the curves.

Mean \pm SD were used for OGTT and whisker boxes were used for AUC, 10-90 percentile, * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Wilcoxon test was used to compare *db/db* mice with their controls; a Kruskal Wallis test for multiple comparisons was used to compare HFD and HF-HSD groups with the ND group.

3.3 Early glycation product in organs: furosine derived from fructoselysine

Furosine is the major derivative arising from acid hydrolysis of fructoselysine. Assuming the ratio of formation of furosine during the hydrolysis is constant, some authors have used a conversion factor of 40 to calculate fructoselysine concentrations *in vivo*.²⁹ Given that this ratio may differ slightly between matrices during hydrolysis, the results presented in Fig. 3 are expressed as the furosine concentration normalized to the lysine content of each organ rather than as fructoselysine concentrations.

Furosine concentrations measured in the organs from *db/db* mice differed significantly from those in their *db/+* controls (Fig. 3). Furosine levels in kidneys and lungs from *db/db* mice were 1.9 ± 0.2 and 2.1 ± 0.3 mmol furosine/mol lysine, respectively, against 0.6 ± 0.1 and 0.5 ± 0.2 mmol furosine/mol lysine in *db/+* mice. Furosine in heart and liver were much lower than in kidneys and lungs, but differences between *db/db* mice and their controls remained statistically significant: 0.4 ± 0.1 vs. 1.6 ± 0.2 mmol furosine/mol lysine in the heart, and 0.1 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.3 mmol furosine/mol lysine in the liver.

Among the DIO groups, no variation between groups in furosine levels was observed in the kidneys, lungs or heart (Fig. 3A, B and C). Only the level of furosine in the liver was higher in the HF-HSD mice compared with ND mice (5.5 ± 1.2 vs. 3.4 ± 1.2 mmol furosine/mol lysine, respectively) (Fig. 3D).

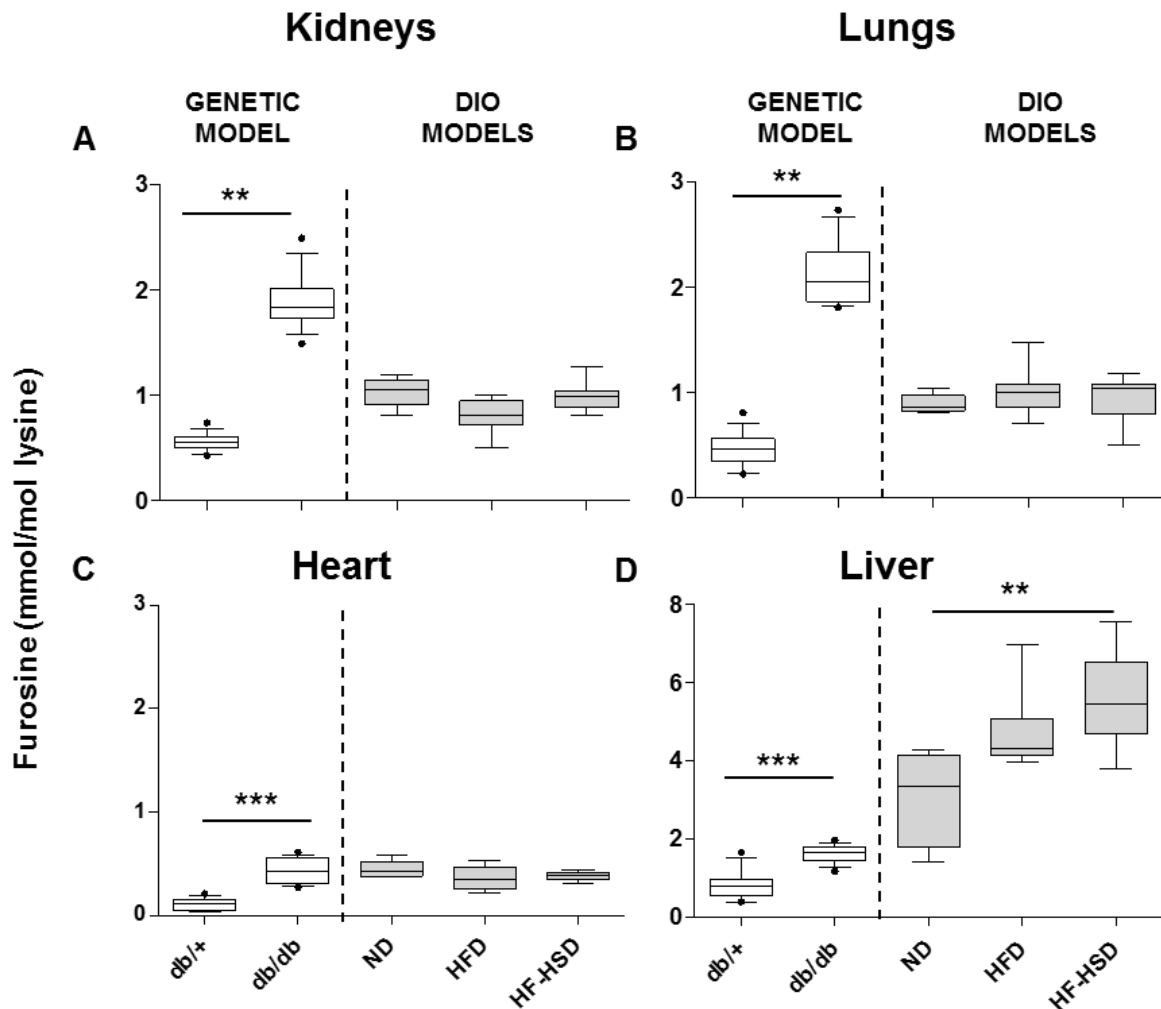


Figure 3 Furosine, an early glycation marker, expressed in mmol/mol lysine in kidneys (A), lungs (B), heart (C) and liver (D). The LC-MS/MS analyses were performed at sacrifice: the genetic model (white boxes, 22 weeks old) compares wild type (*db/+*) with *db/db* mice (both $n=15$). The DIO models (grey boxes, 34 weeks old) compares wild type mice fed a normal diet (ND; $n=5$), a high-fat diet (HFD; $n=7$) or a high-fat, high-sucrose diet (HF-HSD; $n=9$). Whisker boxes, 10-90 percentile, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Wilcoxon test was used to compare *db/db* mice with their controls; a Kruskal Wallis test for multiple comparisons was used to compare HFD and HF-HSD groups with the ND group.

3.4 Free and protein-bound CML in food and organs

The food comprising the ND had a significantly higher level of dietary CML (dCML) compared with the HF and HF-HS diets (17.9 ± 1.6 ; 2.7 ± 0.3 and 2.7 ± 0.8 μg dCML/g food, respectively). The daily exposure to dCML thus calculated from the mean food intake for each group was 86.6 ± 4.8 , 145.4 ± 14.9 , 85.5 ± 13.1 , 8.0 ± 0.6 and 9.2 ± 1.3 $\mu\text{g}/\text{day}$ for the *db/+*, *db/db*, ND, HFD and HF-HSD mice, respectively.

Fig. 4 shows the concentration of free CML in organs expressed as $\mu\text{g}/\text{g}$ dry organ. The *db/db* mice accumulated significantly more free CML than their controls in kidneys (8.9 ± 2.2 vs. 6.2 ± 1.5 $\mu\text{g}/\text{g}$), lungs (7.2 ± 1.5 vs. 5.2 ± 1.3 $\mu\text{g}/\text{g}$) and heart (4.5 ± 0.8 vs. 2.8 ± 0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$), but livers were not significantly different in this regard (2.0 ± 1.0 vs. 1.6 ± 6.7 $\mu\text{g}/\text{g}$).

The HFD and HF-HSD mice accumulated significantly less free CML in kidneys and lungs compared with the ND mice (2.7 ± 1.6 ; 4.3 ± 0.9 ; 8.0 ± 1.9 $\mu\text{g}/\text{g}$ kidney, respectively, and 3.8 ± 1.2 ; 3.7 ± 3.7 ; 7.6 ± 10.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ lung, respectively) (Fig. 4A and B). No inter-group differences were observed between either hearts or livers (Fig. 4C and D)

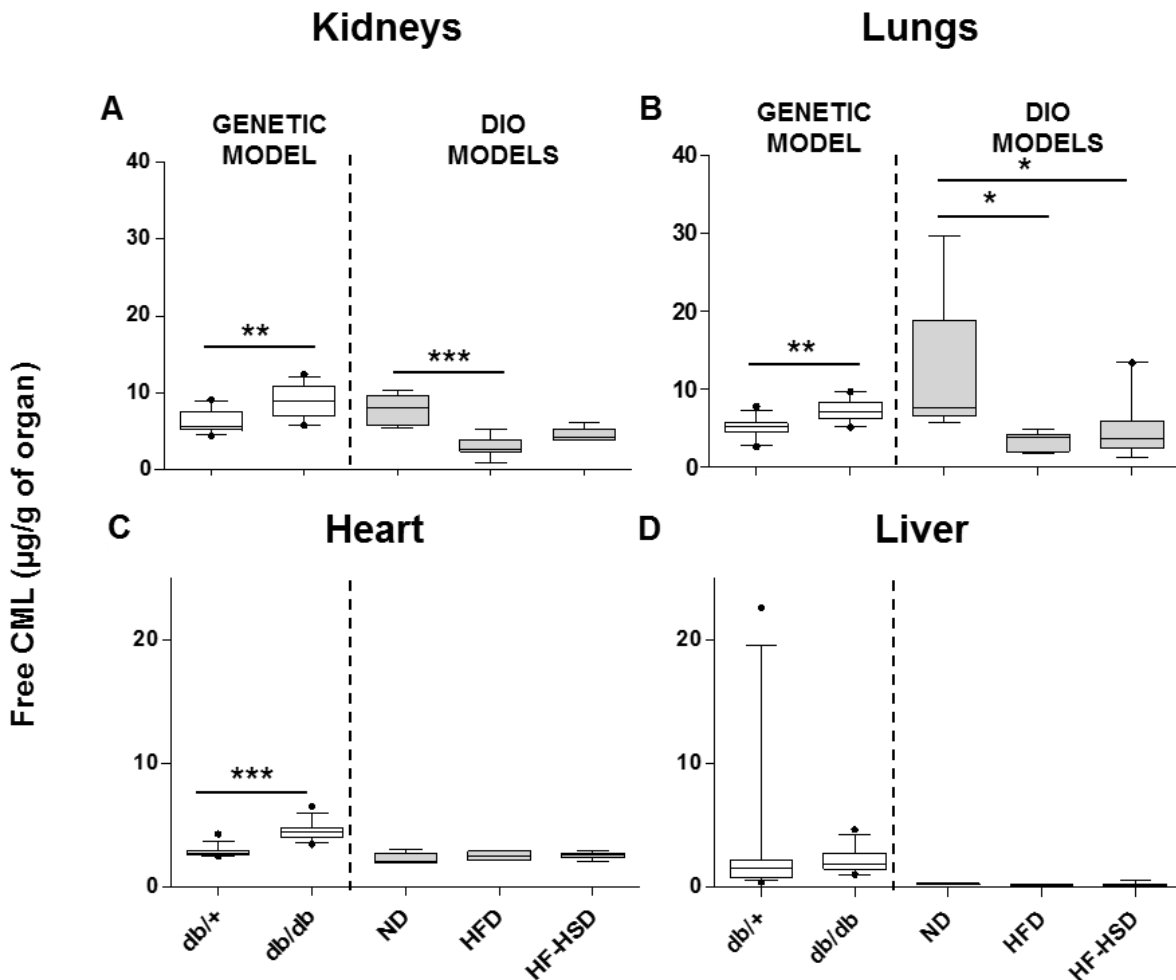


Figure 4 Concentrations of free carboxymethyllysine (CML) expressed in µg/g of dry organ in kidneys (A), lungs (B), heart (C) and liver (D). The genetic model (white boxes, 22 weeks old) compares wild type (*db/+*) with *db/db* mice (both n=15). The DIO models (grey boxes, 34 weeks old) compares wild type mice fed a normal diet (ND; n=5), a high-fat diet (HFD; n=7) or a high-fat, high-sucrose diet (HF-HSD; n=9). Whisker boxes, 10-90 percentile, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Wilcoxon test was used to compare *db/db* mice with their controls; a Kruskal Wallis test for multiple comparisons was used to compare HFD and HF-HSD groups with the ND group.

The levels of protein-bound CML, expressed as mmol/mol lysine, was higher in all organs from the *db/db* mice compared with their controls (Fig. 5), however these differences were only significant in the lungs (139.5 ± 22.5 vs. 96.8 ± 13.3 µmol/mol of lysine) and heart (107.3 ± 12.5 vs. 84.0 ± 12.2 µmol/mol of lysine).

No significant differences in protein-bound CML concentrations were observed when the 3 DIO groups were compared, except in the lung which were significantly lower in

the HFD and HF-HS mice compared with the ND mice (284.4 ± 35.4 ; 319.6 ± 25.2 ; 400.0 ± 39.4 $\mu\text{mol/mol}$ lysine, respectively) (Fig. 5).

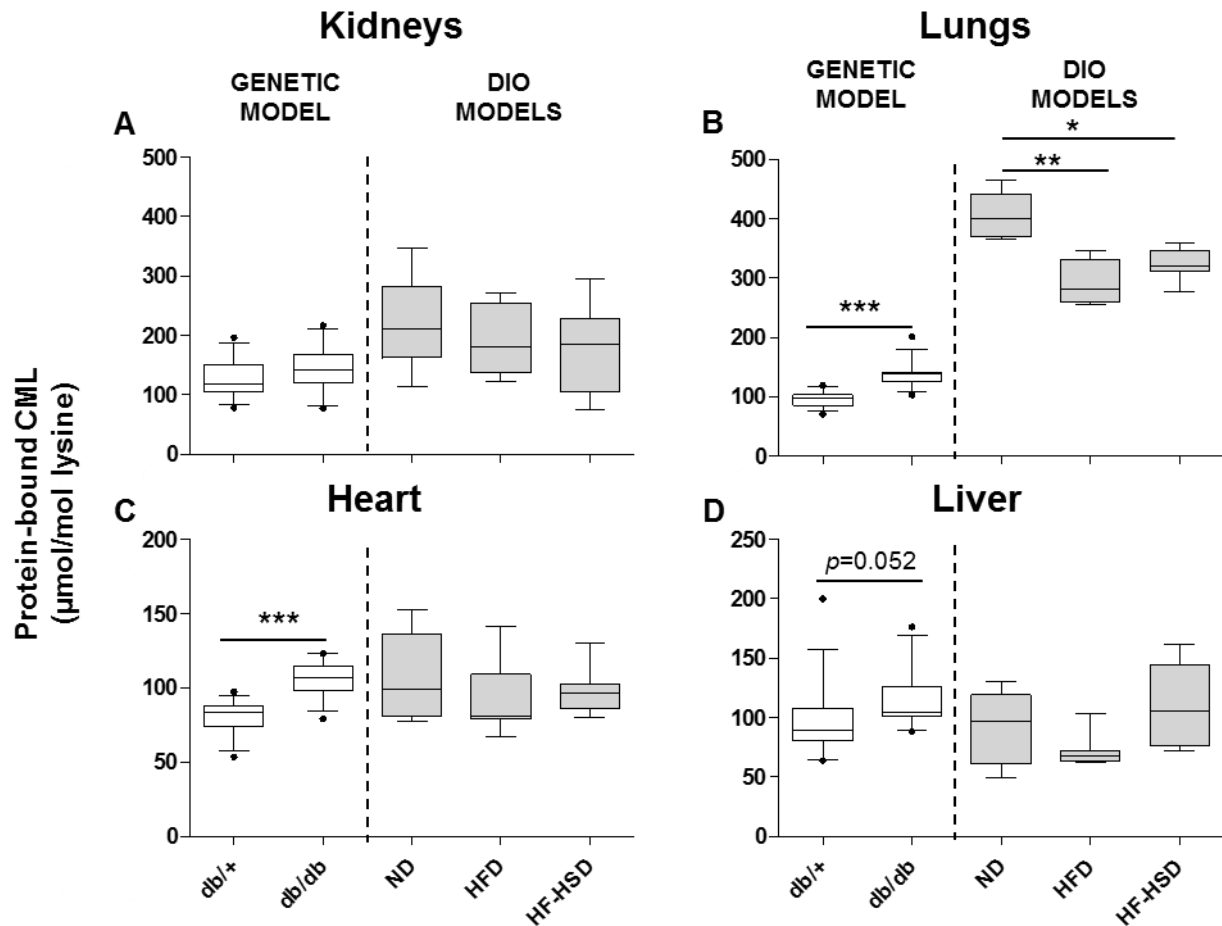


Figure 5 Concentrations of protein-bound carboxymethyllysine (CML) expressed in $\mu\text{mol/mol}$ of lysine in kidneys (A), lungs (B), heart (C) and liver (D). The genetic model (white boxes, 22 weeks old) compares wild type (*db/+*) with *db/db* mice (both $n=15$). The DIO models (grey boxes, 34 weeks old) compares wild type mice fed a normal diet (ND; $n=5$), a high-fat diet (HFD; $n=7$) or a high-fat, high-sucrose diet (HF-HSD; $n=9$).

Whisker boxes, 10-90 percentile, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Wilcoxon test was used to compare *db/db* mice with their controls; a Kruskal Wallis test for multiple comparisons was used to compare HFD and HF-HSD groups with the ND group.

4. Discussion

Different murine model of diabetes and obesity have been used to study glycation and investigate approaches to inhibit or reduce accumulation of endproducts from the advanced glycation pathway. Detailed examinations of glycation in major organs in T2D animal models are lacking, however, as are studies employing robust analytical techniques. In order to better characterise glycation in commonly-used T2D animal models, we compared a genetic model (homozygote T2D *db/db* mice) with two DIO models of T2D (mice exposed to HF or HF-HS diets) using isotope dilution LC-MS/MS.

As T2D is closely related to obesity, a significantly greater weight gains in the *db/db* and DIO mice compared to their controls was a requirement for our study of glycation. As expected, the *db/db* mice were hyperphagic and obese throughout the study (8 to 22 weeks old) (Fig. 1). It took the mice on an HF or HF-HS diet 11 weeks of these high calorie diets to gain significantly more weight than the ND mice, and a further 7 weeks for them to reach a similar level of obesity as the *db/db* mice. The HFD and HF-HSD mice adjusted to their high calorie diets in part by eating less, a compensation strategy also observed by others.^{30,31}

Not only were the *db/db* mice already obese at the beginning of the study, they were also hyperglycaemic and intolerant to glucose (Fig. 2). This altered glucose homeostasis increased at 22 weeks old for the *db/db* mice whereas the control *db/+* mice remained normoglycaemic. The HFD and HF-HSD mice required 28 weeks of their respective diets to induce a significant rise in their fasting glycaemia compared with the start of the diets, but this increase was very low compared with the *db/db* mice and their glucose intolerance was also less pronounced than in the genetic model.

Studies in humans have shown that the fructoselysine concentration (or its indicator, furosine) increased in plasma proteins and tissues with age, but also more markedly with diabetes.^{10,32} Only a few tissue types such as skin and cartilage collagens and lens crystallins have been tested for furosine in humans.^{33,34} In all cases furosine increased 1.4 to 4-fold in diabetic subjects compared with controls. Available data are also limited in animal models. In skin collagen from 86wk-old C57BL/6NNIA mice the mean furosine concentration was found to be 0.548 mmol/mol lysine,³⁵ while in glomerular proteins from STZ-induced diabetic rats and controls the mean

concentration of fructoselysine was 0.95 and 0.24 mmol/mol lysine, respectively (approximately 0.38 and 0.09 mmol furosine/mol lysine).²⁰ In our study 3.4, 4.6, 3.9 and 2-fold differences of furosine concentration were found between *db/db* mice and their controls in kidneys, lungs, heart and liver, respectively. Our range of concentrations is in good agreement with the human studies described above and the magnitude of the increased glycation in *db/db* mice is consistent with that reported in collagen from diabetic patients. We conclude that the genetic T2D model tested here is pertinent for studying potential inhibitors of early glycation in organs. The same cannot be concluded for the DIO models in which no increase of early glycation was detected in three out of the four organs tested here. The liver was the only organ that showed a significant increase of furosine when high calorie, HF or HF-HS diets were consumed. The origin of this increase of furosine in the livers of HFD and HF-HSD mice is under investigation in our laboratory, but we can nevertheless postulate that the increase of liver mass observed in these animals may indicate a nascent nonalcoholic fatty liver disease which could, in turn, promote hepato-glycation.

We recently demonstrated that dCML accumulates in most organs but particularly in kidneys and lungs.²⁶ Hence, the level of free CML *in vivo* is highly influenced by exposure to dCML. When CML is used as a marker of endogenous advanced glycation in preclinical studies, it is therefore essential to measure the level of dCML in the chow and to distinguish free from protein-bound CML. The dCML content in the ND used here was similar to that found by other workers.^{26,36,37} We also found that the two DIO diets had 6 to 7 times less dCML than the ND (*idem* carboxyethyllysine, data not shown), despite a higher lysine content. This is likely due to the use of refined, less glycated proteins in the DIO diets compared with the ND. Given that dCML is biologically active after absorption, it is crucial to distinguish the effect of its exposure from other dietary effects when DIO and other diets are compared, and we strongly recommend that dCML is measured in animal models' diets.

The hyperphagia of the *db/db* mice gave rise to an increased exposure to dCML and an increased concentration of free CML in 3 out of the 4 organs tested. The only organ which showed no accumulation of free CML was the liver, which we have already

reported as retaining relatively little dCML.²⁶ Among the DIO models, the lower dCML exposure for the HFD and HF-HSD mice was reflected in the lower free CML concentration found in kidneys and lungs compared with ND mice. This association between relatively low exposure to dCML *via* an HFD and a low total CML content *in vivo* has been observed by others in the tail tendon of mice.³⁷ Without excluding other potential factors for the variation of free CML in organs, our study underlines the importance of characterizing the dCML exposure and, more particularly, of analytically distinguishing free from protein-bound CML.

Aside from the data obtained by immunohistology, reliable quantitative data on CML concentrations in tissues and organs are limited. In skin collagen,³³ reported CML concentrations ranged from 200 to 2100 $\mu\text{mol/mol}$ lysine, with higher concentrations found among diabetic patients. In STZ-induced diabetic rats the concentration of CML was also higher compared with controls (*e.g.* 460 ± 170 vs. 270 ± 150 $\mu\text{mol/mol}$ lysine in glomerular proteins, respectively).²⁰ In the current study the concentrations of protein-bound CML were of the same order of magnitude as that reported in rats.²⁰ While not always significantly so, the CML concentration was greater (1.2 to 1.5-fold) in all tested organs of *db/db* mice compared with their controls. Among the DIO groups, no difference in protein-bound CML was observed in kidneys, heart or liver. The surprising higher level of protein-bound CML in the lungs of the ND mice compared with the HFD and HF-HSD mice may be due to an incomplete TCA separation of the free from the protein-bound CML. An optimisation of this separation technique of these two forms of CML is underway in our laboratory. As described above for furosine, we concluded that the genetic model is more pertinent than the DIO models for studying advanced glycation in organs.

5. Conclusion

This study is the first, to our knowledge, to have investigated glycation using isotope dilution LC-MS/MS in several organs of different animal models of T2D. The *db/db* mouse model was obese, hyperglycaemic and intolerant to glucose from the start of the experiment; the DIO mouse models took 5 months to attain the same level of obesity as the *db/db* mice, did not exhibit hyperglycaemia after 7 months HF or HF-HS diets and also showed a less severe glucose intolerance. Hyperglycaemia in the *db/db* mice was correlated with higher levels of furosine and protein-bound CML in all of the organs compared with controls, whereas the relatively minor hyperglycaemia in DIO models was not accompanied by an increase of furosine, (except in the liver of HF-HS animals) or CML. Our results concur with those in the literature where quantitative methods were used to investigate glycation in rodent T1D models and in human T2D, and we conclude that the *db/db* mouse model is the most pertinent for studying glycation in a diabetic context.

6. Bibliography

1. Ogurtsova, K. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **128**, 40–50 (2017).
2. Giugliano, D., Ceriello, A. & Esposito, K. Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 217S-222S (2008).
3. Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes* **54**, 1615–1625 (2005).
4. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813–820 (2001).
5. Singh, R., Barden, A., Mori, T. & Beilin, L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**, 129–146 (2001).
6. Tessier, F. J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. </data/revues/03698114/v58i3/S0369811409001928/> (2010).
7. Thornalley, P. J. *et al.* Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* **375**, 581–592 (2003).
8. Kerkeni, M. *et al.* Increased serum concentrations of pentosidine are related to presence and severity of coronary artery disease. *Thromb. Res.* **134**, 633–638 (2014).
9. Structure and Mechanism of Formation of Human Lens Fluorophore LM-1. Available at: <http://www.jbc.org/content/274/30/20796.long>. (Accessed: 5th April 2018)
10. Dyer, D. G. *et al.* Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.* **91**, 2463–2469 (1993).
11. Bastos, D. H. M. & Gugliucci, A. Contemporary and controversial aspects of the Maillard reaction products. *Curr. Opin. Food Sci.* **1**, 13–20
12. Guilbaud, A., Niquet-Leridon, C., Boulanger, E. & Tessier, F. J. How Can Diet Affect the Accumulation of Advanced Glycation End-Products in the Human Body? *Foods* **5**, (2016).
13. Forbes, J. M. *et al.* Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes* **53**, 1813–1823 (2004).

14. King, A. J. The use of animal models in diabetes research. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 877–894 (2012).
15. Low, H. *et al.* Advanced glycation end-products (AGEs) and functionality of reverse cholesterol transport in patients with type 2 diabetes and in mouse models. *Diabetologia* **55**, 2513–2521 (2012).
16. Wang, H. *et al.* PPAR γ agonists regulate bidirectional transport of amyloid- β across the blood–brain barrier and hippocampus plasticity in db/db mice. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 372–385 (2016).
17. Mastrocola, R. *et al.* Accumulation of Advanced Glycation End-Products and Activation of the SCAP/SREBP Lipogenic Pathway Occur in Diet-Induced Obese Mouse Skeletal Muscle. *PLOS ONE* **10**, e0119587 (2015).
18. Sampath, C., Rashid, M. R., Sang, S. & Ahmedna, M. Green tea epigallocatechin 3-gallate alleviates hyperglycemia and reduces advanced glycation end products via nrf2 pathway in mice with high fat diet-induced obesity. *Biomed. Pharmacother.* **87**, 73–81 (2017).
19. Stegen, S. *et al.* Plasma carnosine, but not muscle carnosine, attenuates high-fat diet-induced metabolic stress. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **40**, 868–876 (2015).
20. Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Increased protein damage in renal glomeruli, retina, nerve, plasma and urine and its prevention by thiamine and benfotiamine therapy in a rat model of diabetes. *Diabetologia* **53**, 1506–1516 (2010).
21. Sourris, K. C. *et al.* Modulation of the Cellular Expression of Circulating Advanced Glycation End-Product Receptors in Type 2 Diabetic Nephropathy. *Exp. Diabetes Res.* **2010**, (2010).
22. Park, C. H. *et al.* Polyphenol isolated from Corni Fructus, 7-O-galloyl-d-sedoheptulose, modulates advanced glycation endproduct-related pathway in type 2 diabetic db/db mice. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 1270–1280 (2015).
23. Park, C. H. *et al.* Oligonol, a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee fruit, attenuates gluco-lipotoxicity-mediated renal disorder in type 2 diabetic db/db mice. *Drug Discov. Ther.* **9**, 13–22 (2015).
24. Peppia, M. *et al.* Prevention and Reversal of Diabetic Nephropathy in db/db Mice Treated with Alagebrium (ALT-711). *Am. J. Nephrol.* **26**, 430–436 (2006).

25. Torreggiani, M. *et al.* Advanced Glycation End Product Receptor-1 Transgenic Mice Are Resistant to Inflammation, Oxidative Stress, and Post-Injury Intimal Hyperplasia. *Am. J. Pathol.* **175**, 1722–1732 (2009).
26. Tessier, F. J. *et al.* Quantitative assessment of organ distribution of dietary protein-bound ¹³C-labeled Nε-carboxymethyllysine after a chronic oral exposure in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 2446–2456 (2016).
27. Andrikopoulos, S., Blair, A. R., Deluca, N., Fam, B. C. & Proietto, J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **295**, E1323–E1332 (2008).
28. Niquet-Léridon, C. & Tessier, F. J. Quantification of Nε-carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography–linear ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **126**, 655–663 (2011).
29. Henle, T., Walter, A. W. & Klostermeyer, H. A simple method for the preparation of furosine and pyridosine reference material. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **198**, 66–67 (1994).
30. Zhao, X. *et al.* The Obesity and Fatty Liver Are Reduced by Plant-Derived *Pediococcus pentosaceus* LP28 in High Fat Diet-Induced Obese Mice. *PLoS ONE* **7**, (2012).
31. Ishimoto, T. *et al.* High Fat and High Sucrose (Western) Diet Induce Steatohepatitis that is Dependent on Fructokinase. *Hepatol. Baltim. Md* **58**, 1632–1643 (2013).
32. Ahmed, N., Babaei-Jadidi, R., Howell, S. K., Beisswenger, P. J. & Thornalley, P. J. Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia* **48**, 1590–1603 (2005).
33. Yu, Y. *et al.* Advanced glycation end-products and methionine sulphoxide in skin collagen of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* **49**, 2488–2498 (2006).
34. Tessier, F., Obrenovich, M. & Monnier, V. M. Structure and Mechanism of Formation of Human Lens Fluorophore LM-1 RELATIONSHIP TO VESPERLYSINE A AND THE ADVANCED MAILLARD REACTION IN AGING, DIABETES, AND CATARACTOGENESIS. *J. Biol. Chem.* **274**, 20796–20804 (1999).

35. Sell, D. R., Kleinman, N. R. & Monnier, V. M. Longitudinal determination of skin collagen glycation and glycoxidation rates predicts early death in C57BL/6NNIA mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14**, 145–156 (2000).
36. 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).
37. Eriksen, C. *et al.* Systemic stiffening of mouse tail tendon is related to dietary advanced glycation end products but not high-fat diet or cholesterol. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **117**, 840–847 (2014).



**Effet du *L. fermentum* ME-3 sur la
glycation et les complications du diabète.**

The effect of *Lactobacillus fermentum* ME-3 treatment on glycation and diabetes complications.

Axel Guilbaud^{1,2,3}, Michael Howsam^{1,3}, Céline Niquet-Léridon^{3,4}, Florian Delguste¹, Marc Fremont², Sophie Lestavel⁵, Patrice Maboudou⁶, Anne Garat⁷, Benoît Foligné¹, Éric Boulanger^{1,3}, Frédéric J Tessier^{1,3}

¹ University of Lille, Inserm, CHU Lille, U995-LIRIC-Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France

² VF Bioscience SAS, Parc Eurasanté, 310 Rue Jules Vallès, 59120 Loos-lez-Lille, France

³ Francophone Maillard Reaction Society (FMaRS), Lille, France

⁴ Institut Polytechnique UniLaSalle, Transformations & Agro-ressources Unit, 19 rue Pierre Waguet, 60000, Beauvais, France

⁵ University of Lille, Inserm, CHU Lille, Pasteur Institut of Lille, U1011 - EGID, F-59000, Lille, France

⁶ Laboratory of Biochemistry, Centre de Biologie-Pathologie Pierre-Marie Degand, CHRU Lille, bd du professeur Leclercq, 59037 Lille Cedex

⁷ University of Lille, CHU Lille, Pasteur Institut of Lille, EA 4483-IMPECS-IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France.

Abstract

Background: Type 2 diabetes (T2D) induces organ damage associated with glycation, amongst other metabolic pathways. Therapeutic strategies have been tested to reduce the formation and impact of glycation products, but results are equivocal. Anti-diabetic therapies using probiotics have been proposed but no studies have yet studied their effect upon glycation. We investigated the effects of the bacterial strain *Lactobacillus fermentum* ME-3 on glycation and T2D complications.

Methods: Diabetic LepR^{db/db} and their wild-type (WT) LepR^{db/+} littermates received a daily gavage of either water or the ME-3 strain (10¹⁰ CFU). Glycation markers, furosine and carboxymethyllysine (CML), were quantified in organs and plasma using stable-isotope dilution LC-MS/MS.

Results: After 12 weeks of treatment, significantly reduced weight gain and an improved glucose tolerance were observed in treated diabetic mice. Among the organs examined, only the kidneys showed an attenuation of furosine and free-CML in both WT and diabetic treated mice. Attenuated development of hepatic steatosis was also observed in treated *versus* non-treated mice. The treatment did not disrupt the overall gut microbiota equilibrium in either WT or diabetic mice.

Conclusion: In conclusion, *L. fermentum* ME-3 has potential as a therapeutic for preventing the formation/accumulation of some glycation products in kidneys and attenuating some diabetes-related complications.

KEYWORDS

Probiotic, furosine, free- and protein-bound CML, T2D complications

1. Introduction

According to a growing body of literature the chronic hyperglycemia characteristic of type 2 diabetes induces permanent organ damage through different pathways, one of which is glycation. This chemical reaction involves reducing sugars which react with the amino groups of proteins, peptides or amino acids. ¹ The first stable glycation products formed are the Amadori and the Heyns products. These early glycation products can be degraded into advanced glycation end products (AGEs), among which *N*^ε-carboxymethyllysine (CML) is one of the most studied. ²

Therapeutic approaches to reduce the formation and the accumulation of glycation products, ^{3–6} or to inhibit their interaction with their main receptor (RAGE) which induces pro-inflammatory and pro-oxidant signaling, ^{7,8} have so far yielded only mixed results.

Probiotics are defined as “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host”. ⁹ Preclinical and clinical trials with different probiotic strains (*e.g.* *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bacteroides uniformis*, ...) have reported positive effects of probiotics on weight gain, glucose parameters, ^{10–17} oxidative stress and hepatic triglyceride (TG) levels. ^{10,14,18–20} However the effect of probiotic treatment on glycation has not yet been reported. To address this, we compared probiotic-treated and untreated groups of a commonly-studied genetic model of diabetes, *LepR^{db/db}* mice, with their probiotic-treated and untreated *LepR^{db/+}* littermates. Treated animals received the *Lactobacillus fermentum* ME-3 strain, identified in 1994 at the university of Tartu in Estonia. ²¹ Studies have observed anti-oxidative and anti-inflammatory effects of this strain in mice ^{22,23} and humans. ^{24,25,21}

Our aim was to study the effect of this ME-3 strain on both metabolic disorders and glycation in a diabetic context. Parameters of obesity and T2D including body weight, fasting glycaemia, glucose tolerance and HbA1c were monitored. Markers of early (furosine) and advanced (CML) glycation were quantified in plasma and different organs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Renal and liver complications and gut microbiota were also investigated.

2. Materials and methods

2.1 Chemical products

Nonafluoropentanoic acid (NFPA) 97% was from SODIPRO (Échirolles, France), HPLC Ultra-pure water from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), and 37% hydrochloric acid (HCl), trichloroacetic acid (TCA), sodium borohydride and boric acid from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Analytical standards of furosine, (D₄)-furosine, CML and (D₂)-CML came from Polypeptide Group Laboratories (Strasbourg, France); lysine and (¹⁵N₂)-lysine standards were from Sigma Aldrich and CORTECNET (Voisins-le-Bretonneux, France), respectively. Standard solutions were prepared in aqueous NFPA (10mM).

2.2 Study design

Animal experiments were approved by the local ethics committee and respected the principles of animal experimentation (CEEA75 Nord – Pas de Calais). For the genetic model, 30 diabetic male, *db/db*, BKS(D)-LepR^{db}/JOrIRj and their 30, *db/+* wild-type (WT) littermates were obtained at 6 weeks old from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Saint Berthevin, France). After 2 weeks acclimatization, WT and *db/db* mice were randomly assigned to two groups: 15 received a daily gavage of 400µL H₂O while 15 received a daily dose of *Lactobacillus fermentum* ME-3 (*Lf*, 10¹⁰ colony forming units (CFU) /400µL H₂O) over 12 weeks. All mice had *ad libitum* access to a normal diet (A04 U8220G10R, SAFE, Augy, France) and water. During the experiment, 1 mouse from the *db/+ Lf* group and 1 from the *db/db* group had to be euthanized.

All animals were maintained under a 12h light/dark cycle at 23±3°C. Mice were weighed every week. The daily food intake was measured at different points during the experiment and these measurements averaged to obtain a mean daily food intake value.

All the animals were euthanized at 20 weeks-old. Four organs (kidneys, lungs, heart, liver) were removed, weighed, immediately plunged into liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Plasma, erythrocytes, 24h-urine and -feces were also collected and stored at -80°C.

2.3 Glucose tolerance test

At the beginning and end of the experiments, all animals underwent an oral glucose tolerance test (OGTT). Mice fasted for 6h²⁷ before a tail incision was used to sample blood to measure fasting blood glucose. Finally, a bolus of glucose (2 g/kg body weight) was administered by gavage and glycaemia measured *via* tail vein sampling at 15, 30, 60 and 120 minutes.

2.4 HbA1c

The level of HbA1c in the blood was monitored using a CAPILLARYS 3 TERA electrophoretic instrument.

2.5 Quantification of butyrate of fecal samples

Butyrate concentration were determined in fecal samples by Prodigest BVBA (Zwijnaarde, Belgium).

2.6 Quantification of early and advanced glycation products by HPLC-MS/MS

2.6.1 Sample preparation for furosine analysis

10mg of each lyophilized and powdered organ or 25µL of plasma were hydrolyzed in 1.2mL of 6M HCl at 110°C for 21h. Aliquots of 200µL of each hydrolysate were evaporated using a Speed-Vac concentrator (Thermo SPD131DDA) and re-solubilized in 200µL aqueous 10mM NFPA containing (D₄)-furosine (1µg/mL) and (¹⁵N₂)-lysine (10µg/mL). Each sample was filtered (0.45µm) before LC-MS/MS analysis of furosine and lysine.

2.6.2 Sample preparation for analysis of free and protein-bound CML

Sample preparation and analysis was adapted from Niquet-Léridon and Tessier²⁸ and is described elsewhere.²⁹ To separate free CML from protein-bound CML, 10mg of each lyophilized and powdered organ or 25µL was solubilized for 30min on ice in 200µL or 12.5µL 10% TCA (respectively) to precipitate proteins. After centrifugation (21 000g, 10min, 4°C), supernatants (free CML) were separated from the pellets containing protein-bound CML. 200µL (organ samples) or 25µL (plasma samples) of supernatant were evaporated by Speed-Vac and re-solubilized in 200µL 10mM NFPA

containing (D₂)-CML (0.1µg/mL) and (¹⁵N₂)-lysine (10µg/mL). Pellets containing protein-bound CML were transferred to Pyrex tubes with 100µL of HPLC Ultra-Pure H₂O and 500µL of 0.1M NaBH₄ (0.1M sodium borohydrate and borate buffer at 200mM, pH 9.5). This reduction step (2.5h at 20°C) is considered necessary to block the Amadori product and avoid *de novo* formation of CML during the subsequent acid hydrolysis. For each protein-bound CML sample, 600µL of 12M HCl was added to a final concentration of 6M HCl and hydrolysis performed at 110°C for 21h. 200µL of protein-bound CML hydrolysates were evaporated and re-solubilized in 200µL 10mM NFPA containing (D₂)-CML (0.1µg/mL) and (¹⁵N₂)-lysine (10µg/mL). All samples were filtered (0.45µm) before LC-MS/MS analysis.

2.7 LC-MS/MS analysis of lysine, CML and furosine

Isotope dilution, high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS) was performed on a Thermo Vantage instrument equipped with a Heated Electrospray Ionization source (HESI, Thermo, Courtaboeuf, France). A Hypercarb column (100 x 2.1mm, 5µm; Thermo) with a guard column (10 x 2.1mm, 5 µm) was used for chromatographic separation (column temperature 10°C). Binary mobile phase flow rate was 0.2mL/min (A – aqueous 10mM NFPA, B – acetonitrile; percentage of A: 0-9min, 100-75%; 9-11min, 75-40%; 11-13min, 40%; 13.1-21min, 100%). For lysine, CML and furosine quantification the tandem MS analyses measured the following specific transitions (in elution order): m/z 147.0 → m/z 130.0 and m/z 149.0 → m/z 130.0 for lysine and its isotope, respectively; m/z 205.0 → m/z 130.0 and m/z 207.0 → m/z 130.0 for CML and its isotope, respectively; m/z 255.0 → m/z 130.0 and m/z 259.0 → m/z 134.0 for furosine and its isotope, respectively. Quantification for all compounds utilized the ratio between the area under the peaks of the analyte and its corresponding isotope (*i.e.* internal standard) and comparison with calibration curves.

2.8 Measurement of albuminuria/ creatininuria ratio in urine

Urine samples were analyzed at the Laboratory of Biochemistry, Centre de Biologie-Pathologie (CHRU Lille), where albuminuria was quantified by measuring the turbidity at 340nm and creatininuria was measured by using an enzymatic method. The ratio of these two parameters was subsequently calculated for each urine sample.

2.9 Detection of liver triglycerides and proteins

2.9.1 Histological sections

A portion of liver was fixed with tissue embedding media (Fisher Scientific, Waltham, MA USA) and stored at -80°C. Frozen sections were cut at 8-10µm and fixed with paraformaldehyde 4% for 30 minutes before washing with water then isopropanol 60% for 5 minutes. A working solution of Oil Red O (ORO) was freshly prepared and filtered (250mg solubilized with 50mL of isopropanol 100% at 60°C). Triglycerides were stained for 15 minutes with an aqueous ORO solution (30mL ORO in 20mL water). A second water wash was realized and a drop of hematoxylin (Sigma Aldrich) deposited on the liver sections for 10 seconds. Liver sections were mounted in aqueous media. Coloration was analyzed using Leyca DM5500 B software.

2.9.2 Quantification of triglycerides and proteins in lyophilized liver samples

Triglycerides were quantified in liver using a “Picoprobe Triglycéride Quantification Assay Kit” (Abcam ab178780, Cambridge, United Kingdom). The nitrogen content of liver samples was determined by a combustion method using a LECO FP528 nitrogen analyzer (LECO France, Garges les Gonesse, France) according to the Dumas method. 100mg of the powder was analysed in duplicate using the AOAC method 990.03. A conversion factor of 6.25 was used to calculate the protein content.

2.10 Quantification of the liver injury marker ALAT

Plasma ALAT was measured using commercially available kits (Thermo Scientific) compatible with the KONELAB 20 automat (Thermo Scientific).

2.10 Quantification of choline in the plasma

Choline was quantified in plasma using a “Choline/Acetylcholine Assay kit” (Abcam ab65345).

2.11 RT-qPCR

RNA extraction from 10 mg of colon, kidneys and liver was performed with a commercial kit (Qiagen). ARN was quantified by spectrophotometry at 260 nm (Biotech Spec-nano, Shimadzu Biotech) and quality analyzed by RNA Standard Sens kit (BIO-RAD). For RT-qPCR, amplification of cDNA was performed with the following probe mixes (Thermo Fisher): *Ffar2* (Mm02620654_s1), *Lcn2* (Mm01324470_m1), *Havcr1* (Mm00506686_m1), *IL-6* (Mm00446190_m1), *Tnfa* (Mm00443258_m1), α -SMA (Mm00725412_s1) and *Col1a1* (Mm00801666_g1). The mean cycle threshold (CT) values for both the target and internal control (GAPDH, Mm99999915_g1) were determined for each sample. The fold change in the target gene, normalized to GAPDH and relative to the expression of untreated *db/db* or *db/+* mice, was calculated as $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.12 Microbial profiling using 16S-targeted metagenomics in feces

Microbial diversity and taxonomic composition in fecal samples were determined by Genoscreen (Institut Pasteur de Lille, Lille, France) using the so-called “targeted metagenomic method”, as described elsewhere.²⁶

2.13 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Graphpad Prism 5. Quantitative data are represented as box-and-whisker plots showing medians and 10-90 percentiles. Wilcoxon tests were used to compare *db/db* mice with their controls and to assess the within genotype effects of the probiotic. Differences were considered statistically significant at a value of $p < 0.05$.

3. Results

3.1 ME-3 treatment attenuates weight gain in diabetic mice independent of food intake.

At the beginning of the study (all mice; 8 weeks-old), body weight was comparable between WT groups (*db/+*, 25.8±1.3; *db/+ Lf*, 27.0±1.4 g) and diabetic groups (*db/db*, 38.0±3.3; *db/db Lf*, 37.7±2.8 g) (Fig. 1). After 12 weeks of the experiment, treated diabetic mice had a significantly lower body weight compared with untreated ones (*db/db Lf*, 36.9±3.9; *db/db*, 42.9±5.2 g) but there was no difference between treated and untreated WT mice (*db/+* 30.6±1.5; *db/+ Lf* 29.2±1.3 g) (Fig. 1).

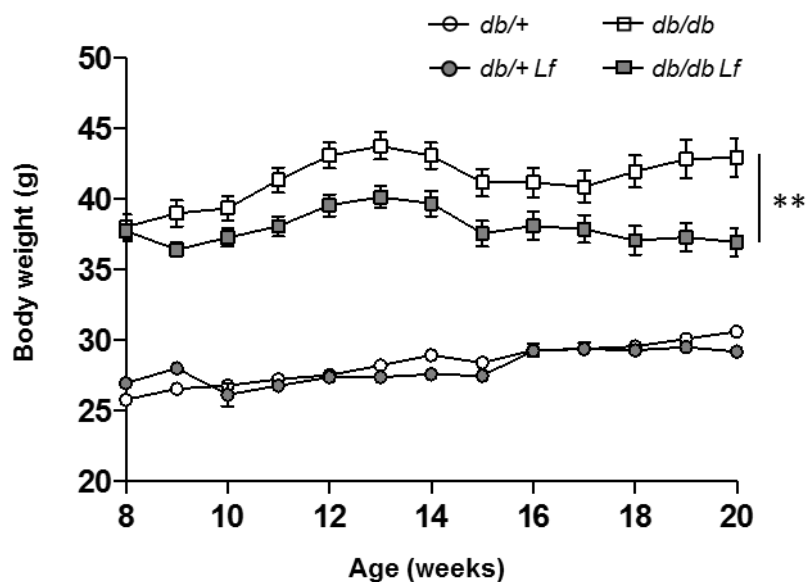


Figure 1 Evolution of body weight in grams. Untreated WT (*db/+*; n=15) and diabetic mice (*db/db*; n=14 – white symbols and boxes) were compared with treated WT *Lf* (*db/+ Lf*; n=14) and diabetic *Lf* mice (*db/db Lf*; n=15 – dark symbols and boxes). Sacrifice (†) took place at 20 weeks old for all animals. Mean ± SD, ** $p < 0.01$. Wilcoxon tests were used to compare untreated with treated groups.

During the experiment, the mean daily energy intake (and hence the mean daily food intake) was 1.9-fold higher for *db/db* mice (25.1±2.6 kcal/day) than *db/+* mice (13.3±1.3

kcal/day; $p < 0.05$). The energy intake did not differ between untreated and treated mice within genotypes (Table 1).

		<i>db/+</i>	<i>db/+ Lf</i>	<i>db/db</i>	<i>db/db Lf</i>
<i>Diet</i>	Energy intake (kcal)	14.7±0.8	9.2±0.4	24.0±0.3	22.4±3.6
	Before treatment				
	After 6wks of treatment	14.7±0.8	12.0±1.0	28.4±6.0	27.7±4.2
	After 12wks of treatment	16.1±1.0	12.8±0.6	23.8±1.0	23.9±0.9
<i>Organs weight</i>	Kidney (mg)	241±23	210±30 *	226±25	220±20
	Lung (mg)	163±25	180±30	130±15 ##	149±31 *
	Heart (mg)	140±11	127±14 *	110±9 ##	106±8
	Liver (mg)	1227±116	1050±80 ***	2086±258 ###	1870±170 *
<i>Fecal parameters</i>	24h-feces (mg)	190±63	181±42	352±95 ###	309±148
	Butyrate (nmol/mg faeces)	15±3	24±9	16±7	17±4
	Ff2a (relative mRNA level)	1.4±1.7	3.1±3.2	1.4±1.6	1.6±1.5
<i>Renal parameters</i>	24h-Urine (µL)	670±346	804±498	1841±844 ###	2273±791
	Albuminuria/ Creatinuria	21.0±9.7	10.5±3.1**	85.0±38.4 ###	106.0±46.8
	Lcn2 (relative mRNA level)	1.2±1.0	1.3±0.7	7.7±8.7 ##	4.4±5.2
	Hvarc (relative mRNA level)	1.2±0.8	1.3±0.4	0.6±0.3	0.4±0.4
<i>Liver parameters</i>	IL-6 (relative mRNA level)	1.4±0.7	1.7±0.9	3.7±5.2	2.9±6.1
	TNF-α (relative mRNA level)	1.0±0.4	1.6±0.9	3.8±2.7 ###	2.2±2.8 *
	α-SMA (relative mRNA level)	1.2±0.4	1.4±0.6	1.2±0.8	1.0±0.4
	Col1a1 (relative mRNA level)	1.0±0.5	1.3±1.0	1.8±1.7	0.7±0.5

Table 1 Evaluation of several parameters: daily energy intake in kcal (before treatment, and after 6 or 12 weeks of treatment); weight of studied organs (kidneys, lungs, heart and liver in mg); weight of 24h-hours feces (mg), fecal butyrate concentration (nmol/mg of feces) and relative quantity of butyrate receptor (*Ffar2*); volume of 24-hours urine (µL); the albuminuria : creatinuria ratio in urine; indicative markers of kidneys injury (*Lcn2* and *Hvarc*); indicative marks of liver inflammation (*IL-6* and *TNF-α*) and fibrosis (*α-SMA* and *Col1a1*) in untreated WT (*db/+*; n=15) and diabetic mice (*db/db*; n=14) compared with treated WT *Lf* (*db/+ Lf*; n=14) and diabetic *Lf* mice (*db/db Lf*; n=15).

Mean ± SD, « * » denotes comparison of untreated with treated mice while « # » denotes a comparison of *db/db* with *db/+* mice, * $p < 0.05$; ** or ## $p < 0.01$, *** or ### $p < 0.001$. Wilcoxon tests were used to compare untreated with treated groups.

3.2 Treated mice generally have organs of lower mass than untreated mice.

After sacrifice, organs were weighed and physiological parameters measured (Table 1). The wet weight of kidneys, heart and liver were all significantly lower in treated *db/+ Lf* than their controls, while only the wet weight of liver was significantly lower in *db/db Lf* mice compared with controls. Conversely, the wet weight of lungs was significantly higher in *db/db Lf* mice compared with *db/db* mice.

3.3 ME-3 treatment promotes different patterns of glucose tolerances responses in WT and diabetic mice.

Fasting glycaemia was measured at the beginning and end of the experiment (Fig. 2A and B) with no difference found between these measurements among either *db/+* or *db/db* mice. A small increase (1.2-fold) in fasting glycaemia was observed from 8 to 20 weeks-of-age among *db/db* mice. Fig. 2C and D respectively show the glycemic responses following OGTTs at the experiment's beginning and end. The areas under the curves (AUC) before treatment were similar between WT groups (*db/+ Lf*, 26.8 ± 3.7 vs. *db/+*, 23.9 ± 4.2 mg.min/dL) and between diabetic groups (*db/db Lf*, 87.8 ± 8.6 vs. *db/db*, 85.2 ± 6.0 mg.min/dL) (Fig. 2E). By the end of the experiment, treated *db/+* mice exhibited lower glycaemia at 15 minutes after gavage (*db/+ Lf*, 206 ± 33 vs. *db/+*, 247 ± 47 mg/dL, $p < 0.05$) (Fig. 2C), something already observed after 6 weeks of treatment (data not shown). 12 weeks of ME-3 treatment resulted in a lower glycemic response in *db/db* mice at 60 and 120 mins post-gavage (at 60min: *db/db Lf*, 747 ± 70 vs. *db/db*, 807 ± 93 mg/dL, $p = 0.06$; at 120min: *db/db Lf*, 611 ± 55 vs. *db/db*, 672 ± 82 mg/dL, $p < 0.05$).

HbA1c was monitored at the same time points as fasting glycaemia and OGTTs (Fig. 2G and H). At 8 weeks-old, there was no difference between the two *db/+* groups (*db/+ Lf*, 1.9 ± 0.1 vs. *db/+*, 1.7 ± 0.3 %), nor between the two *db/db* groups (*db/db Lf*, 5.1 ± 0.8 vs. *db/db*, 4.8 ± 0.7 %). After 12 weeks of treatment there remained no difference between *db/+* mice groups, while *db/db Lf* exhibited a small but significant increase in % HbA1C compared with controls (*db/db Lf*, 6.8 ± 0.8 vs. *db/db*, 6.3 ± 0.6 %, $p = 0.03$).

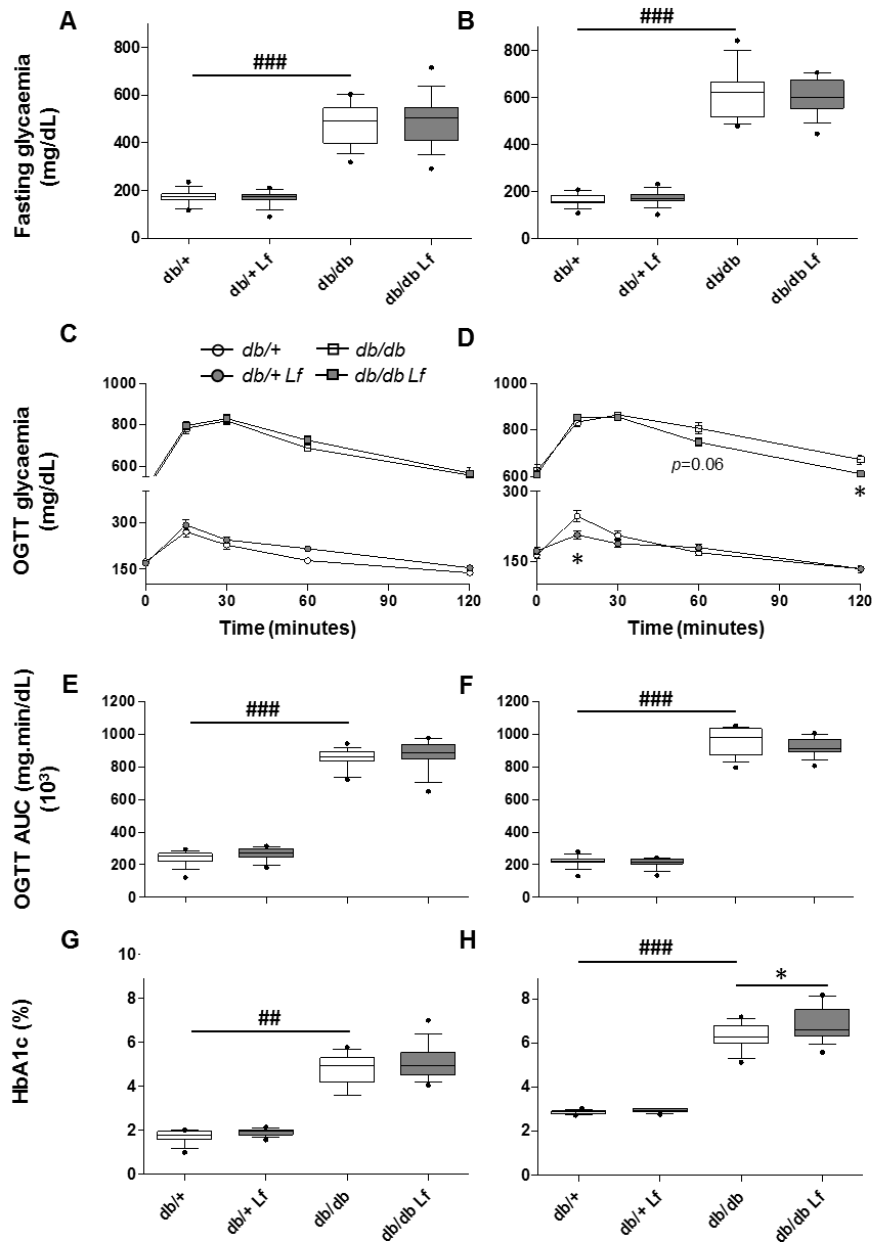


Figure 2 Evolution of glycaemia and HbA1c during the experiments (Start – **A, C, E** and **G**; 8-week-old mice. End – **B, D, F** and **H**; 20 weeks old mice). The fasting glycaemia was measured at the beginning (**A**) and end (**B**) of the experiment. The OGTTs (**C** and **D**) were performed for 2h in each group and the areas under the curves (mg.min/dL) were compared (**E** and **F**). HbA1c (**G** and **H**) were monitored after 6h of fasting. Untreated WT (*db/+*; n=15) and diabetic mice (*db/db*; n=14 – white symbols and boxes) were compared with treated WT *Lf* (*db/+ Lf*; n=14) and diabetic *Lf* mice (*db/db Lf*; n=15 – dark symbols and boxes). Statistical analyses were performed on measured areas under the curves.

Mean \pm SD were used for FBG and OGTT; whisker boxes were used for AUC and HbA1c, 10-90 percentile. « * » denotes comparison of untreated with treated mice while « # » denotes a comparison of *db/db* with *db/+* mice, * $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ### $p < 0.001$. Wilcoxon tests were used to compare treated with untreated groups.

3.4 Fecal butyrate and *Ffar2* are slightly increased in treated WT mice.

Diabetic mice had a higher fecal excretion compared with WT but there was no difference between treated and untreated mice within genotypes (Table 1). There was no difference in the fecal butyrate concentration between *db/+* and *db/db* mice. Although not statistically significant, treated *db/+* mice exhibited 59% higher fecal butyrate concentrations ($p=0.10$) and 2.2-fold higher transcription of butyrate receptor gene (*Ffar2*; $p=0.12$) than untreated *db/+* mice, though these treatment effects were not seen in *db/db* mice.

3.5 Early glycation is reduced in the kidneys of treated mice.

Fig. 3 shows the furosine concentration normalized to the lysine content in organs and plasma. Furosine was lower by a factor of *ca.* 2 – 5 in *db/+* compared with *db/db* mice (depending on the matrix). Its concentration in organs and plasma from treated mice did not differ significantly from the controls' in either genotype (Fig. 3B, C, D and E), except in kidneys (Fig. 3A) where furosine levels were lower in both treated groups (*db/+ Lf*, 0.47 ± 0.08 vs. *db/+*, 0.55 ± 0.09 , $p=0.02$; and *db/db Lf*, 1.65 ± 0.32 vs. *db/db*, 1.88 ± 0.24 mmol furosine/mol lysine, $p=0.04$).

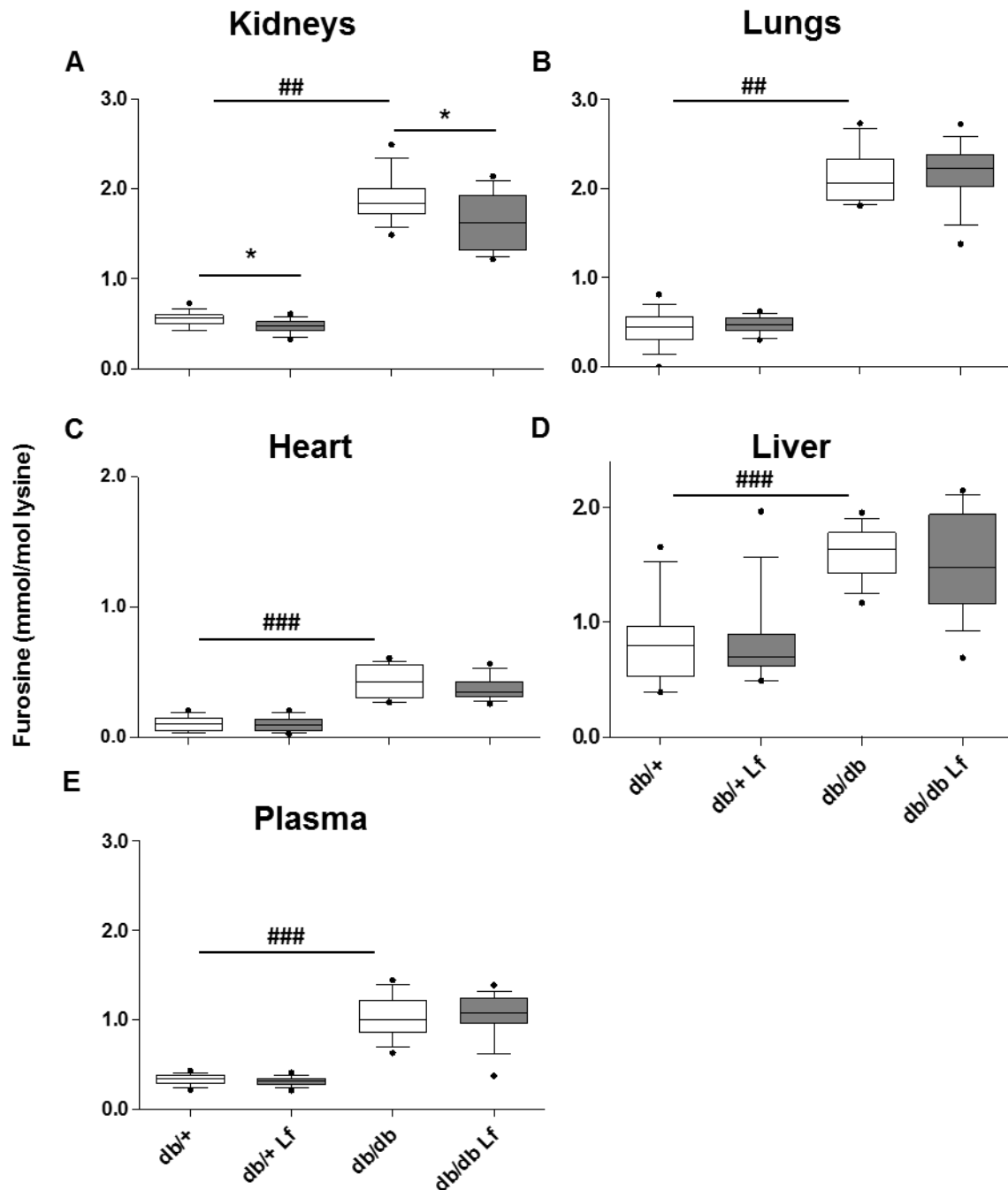


Figure 3 Furosine, an early glycation marker, expressed in mmol/mol lysine in kidneys (A), lungs (B), heart (C), liver (D) and plasma (E). The LC-MS/MS analyses were performed at sacrifice: untreated WT (*db/+*; n=15) and diabetic mice (*db/db*; n=14 – white boxes) were compared with treated WT *Lf* (*db/+ Lf*; n=14) and diabetic *Lf* mice (*db/db Lf*; n=15 – dark boxes).

Whisker boxes, 10-90 percentile, « * » denotes comparison of untreated with treated mice while « # » denotes a comparison of *db/db* with *db/+* mice, * $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. Wilcoxon tests were used to compare treated with untreated groups.

3.6 ME-3 treatment of normal and diabetic mice reduces free but not protein-bound CML in organs.

Throughout the experiment, the food intake of *db/db* mice was almost double that of *db/+* mice (Table 1). Therefore, the daily exposure to CML in the diet (dCML), calculated from the mean food intake for each group and the CML concentration in the chow, was 86.6 ± 4.8 , 65.1 ± 10.9 , 145.4 ± 14.9 , 141.2 ± 15.5 $\mu\text{g/day}$ for the *db/+*, *db/+ Lf*, *db/db* and *db/db Lf* mice, respectively.

The *db/db* mice had significantly more free CML than *db/+* mice in kidneys (43.8 ± 11.0 vs. 30.5 ± 7.4 mmol/g, respectively), lungs (35.8 ± 7.2 vs. 25.2 ± 6.5 mmol/g, respectively) and heart (22.2 ± 4.0 vs. 14.0 ± 2.2 mmol/g, respectively), but the liver was not significantly different in this regard (11.0 ± 5.1 vs. 13.0 ± 21.4 mmol/g, respectively – Fig. 4). The ME-3 strain significantly reduced the levels of free CML in kidneys and lungs of diabetic mice (*db/db* 43.8 ± 11.0 vs. *db/db Lf* 33.1 ± 8.3 mmol/g kidneys, and *db/db* 35.8 ± 7.2 vs. *db/db Lf* 29.1 ± 6.4 mmol/g lungs, respectively) (Fig. 4A and B) and tended to reduce free CML in kidneys of WT mice (*db/+* 30.5 ± 7.4 vs. *db/+ Lf*, 25.0 ± 8.0 mmol/g kidneys – Fig. 4A). The ME-3 strain had no effect on the accumulation of free CML in the heart or liver of either WT or diabetic mice (Fig. 4C and D).

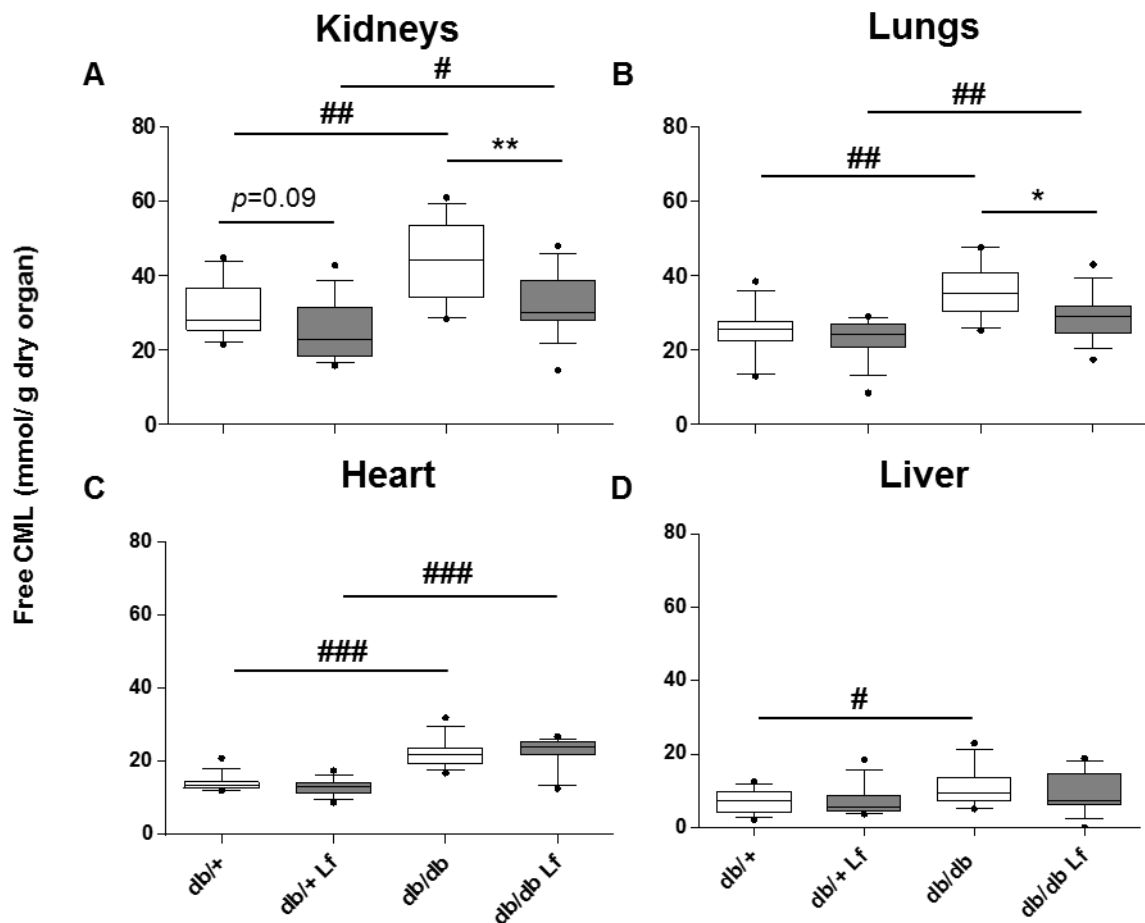


Figure 4 Concentrations of free carboxymethyllysine (CML) expressed in $\mu\text{g/g}$ of dry organ in kidneys (A), lungs (B), heart (C) and liver (D). Untreated WT (*db/+*; $n=15$) and diabetic mice (*db/db*; $n=14$ – white boxes) were compared with treated WT *Lf* (*db/+ Lf*; $n=14$) and diabetic *Lf* mice (*db/db Lf*; $n=15$ – dark boxes). Whisker boxes, 10-90 percentile, « * » denotes comparison of untreated with treated mice while « # » denotes a comparison of *db/db* with *db/+* mice, * or # $p<0.05$, ** or ## $p<0.01$, ### $p<0.001$. Wilcoxon tests were used to compare treated with untreated groups.

The levels of protein-bound CML was higher in all organs from the diabetic mice compared with their WT controls, but only significantly so in the lungs (138.0 ± 22.5 vs. 96.0 ± 13.3 $\mu\text{mol/mol}$ lysine) and heart (105.7 ± 12.5 vs. 80.8 ± 12.2 $\mu\text{mol/mol}$ lysine), with a trend towards significance observed in the liver (114.8 ± 26.1 vs. 97.8 ± 33.3 $\mu\text{mol/mol}$ lysine – Fig. 5). The level of protein-bound CML in the plasma remained unchanged between diabetic and WT mice (Fig. 5E). At 8 weeks-old, the *db/db* mice had significantly more protein-bound CML than *db/+* mice in lungs (114.4 ± 13.9 vs. 87.0 ± 11.1 $\mu\text{mol/mol}$ lysine, respectively), heart (135.3 ± 51.5 vs. 99.6 ± 35.5 $\mu\text{mol/mol}$ lysine, respectively) and liver (130.4 ± 12.6 vs. 110.8 ± 12.3 $\mu\text{mol/mol}$ lysine, respectively), but the kidneys were not significantly different in this regard (146.0 ± 12.9 vs. 124.4 ± 13.5 $\mu\text{mol/mol}$ lysine, respectively). No significant differences in protein-bound CML concentrations between WT or diabetic controls and ME-3 treated animals were observed after 12 weeks of treatment in any of the organs studied here, nor in the plasma (Fig. 5).

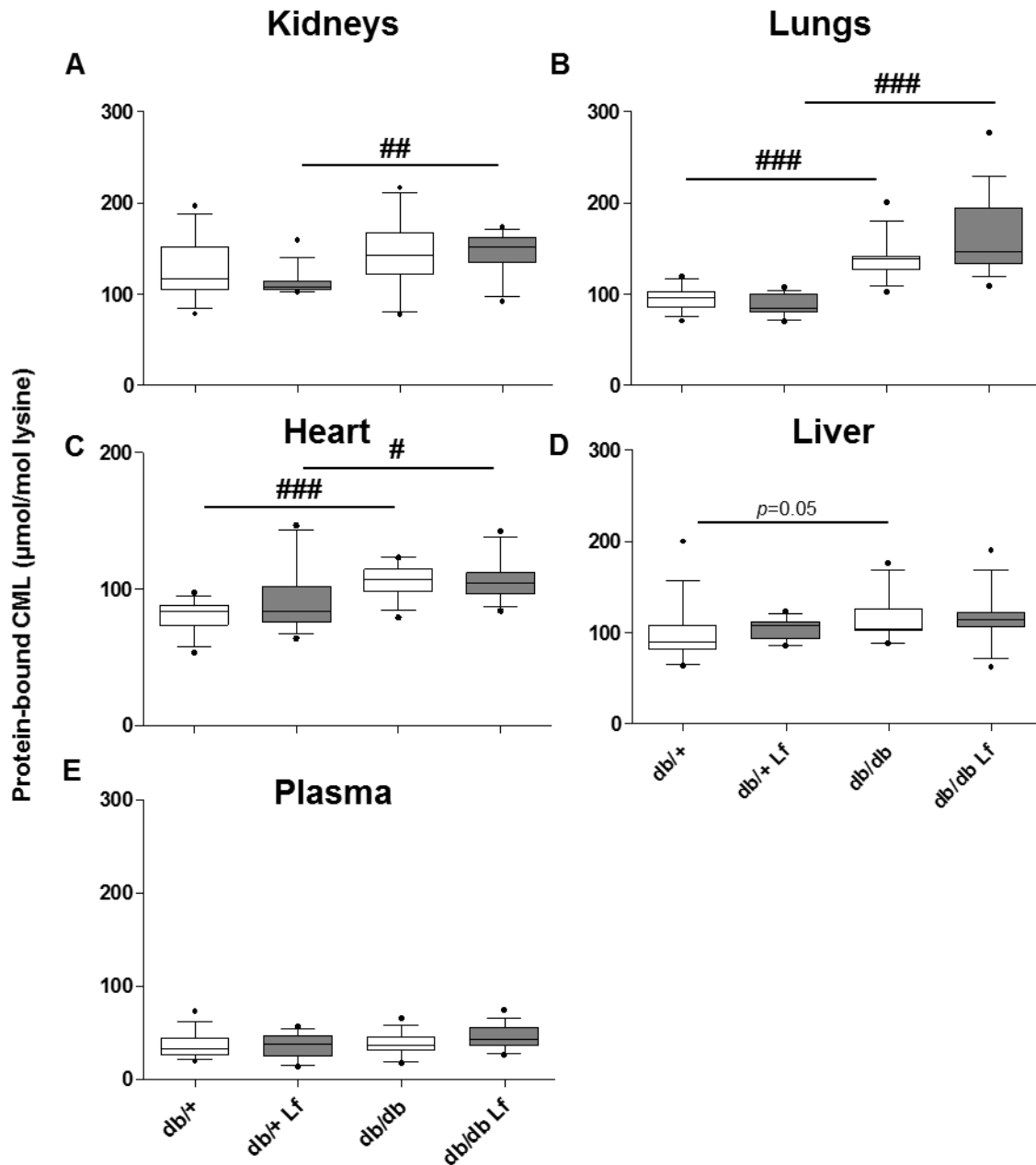


Figure 5 Concentrations of protein-bound carboxymethyllysine (CML) expressed in $\mu\text{mol/mol}$ of lysine in kidneys (A), lungs (B), heart (C), liver (D) and plasma (E). Untreated WT ($db/+$; $n=15$) and diabetic mice (db/db ; $n=14$ – white boxes) were compared with treated WT Lf ($db/+ Lf$; $n=14$) and diabetic Lf mice ($db/db Lf$; $n=15$ – dark boxes).

Whisker boxes, 10-90 percentile, « # » denotes a comparison of db/db with $db/+$ mice, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$. Wilcoxon tests were used to compare treated with untreated groups.

3.7 ME-3 treatment reduces kidney complication.

The average volume of urine excreted per 24 h was higher in diabetic than WT mice (Table 1). The urinary albumin : creatinine ratio, a key indicator of kidney function, was higher in *db/db* compared with *db/+* mice ($p<0.0001$) (Table 1). ME-3 treatment halved this ratio in WT mice but had no effect among the diabetic mice. To investigate whether ME-3 treatment affected renal physiology, two kidney injury markers (*Lcn2* and *Hvarc*) were assayed: *Lcn2* was higher in *db/db* compared with *db/+* mice ($p<0.01$) (Table 1), but there was no difference for *Hvarc*. Although not statistically significant, ME-3 treatment lowered *Lcn2* mRNA from 7.7 ± 8.7 to 4.4 ± 5.2 in *db/db* mice but not in WT mice, while *Hvarc* was unaffected.

3.8 Liver complications are reduced by ME-3 treatment.

To investigate whether treatment affected hepatic steatosis or function in diabetic mice, histological analyses were performed. As shown in Fig. 6A and 6C, a greater accumulation of lipid droplets was evident in the livers of *db/db* compared with *db/+* mice and this accumulation was attenuated by ME-3 treatment (Fig. 6B and 6D). Quantitative measurements of hepatic triglycerides and proteins confirmed these observations. The lipid : protein ratio in livers from *db/db* mice was higher than in *db/+* mice (5.1 ± 2.7 vs. 2.6 ± 0.7 , respectively) and ME-3 treatment significantly reduced this ratio in both genotypes (*db/+* 2.6 ± 0.7 vs. *db/+ Lf* 1.8 ± 0.5 ; *db/db* 5.1 ± 2.7 vs. *db/db Lf* 2.8 ± 0.8) (Fig. 6E). ALAT levels in *db/db* mice were 1.9-fold higher than *db/+* mice ($p=0.25$) and ME-3 tended to reduce concentrations of this marker in both treated groups (*db/db* 199.4 ± 48.0 vs. *db/db Lf* 151.0 ± 53.0 ; and *db/+* 105.7 ± 81.7 vs. *db/+ Lf* 86.0 ± 37.0) (Fig. 6F). ME-3 treatment did not affect choline concentrations in the plasma of either genotype (Fig. 6G). Markers of inflammation (*IL-6* and *TNF- α*) and fibrosis (α -SMA and *Col1a1*) were also studied in liver. There was no difference in *IL-6* with treatment in either genotype, but ME-3 significantly reduced the inflammation marker *TNF- α* in *db/db* mice (*db/db Lf* 2.2 ± 2.8 vs. *db/db* 3.8 ± 2.7 ; $p<0.05$) (Table 1). α -SMA and *Col1a1* levels were not different between *db/db* and *db/+* mice (0.9 ± 0.8 vs. 1.2 ± 1.0 and 1.0 ± 1.7 vs. 1.0 ± 0.5 , relative to the mRNA level of *Col1a1/ GAPDH*, respectively), nor was there any variation with treatment within either genotype (Table 1).

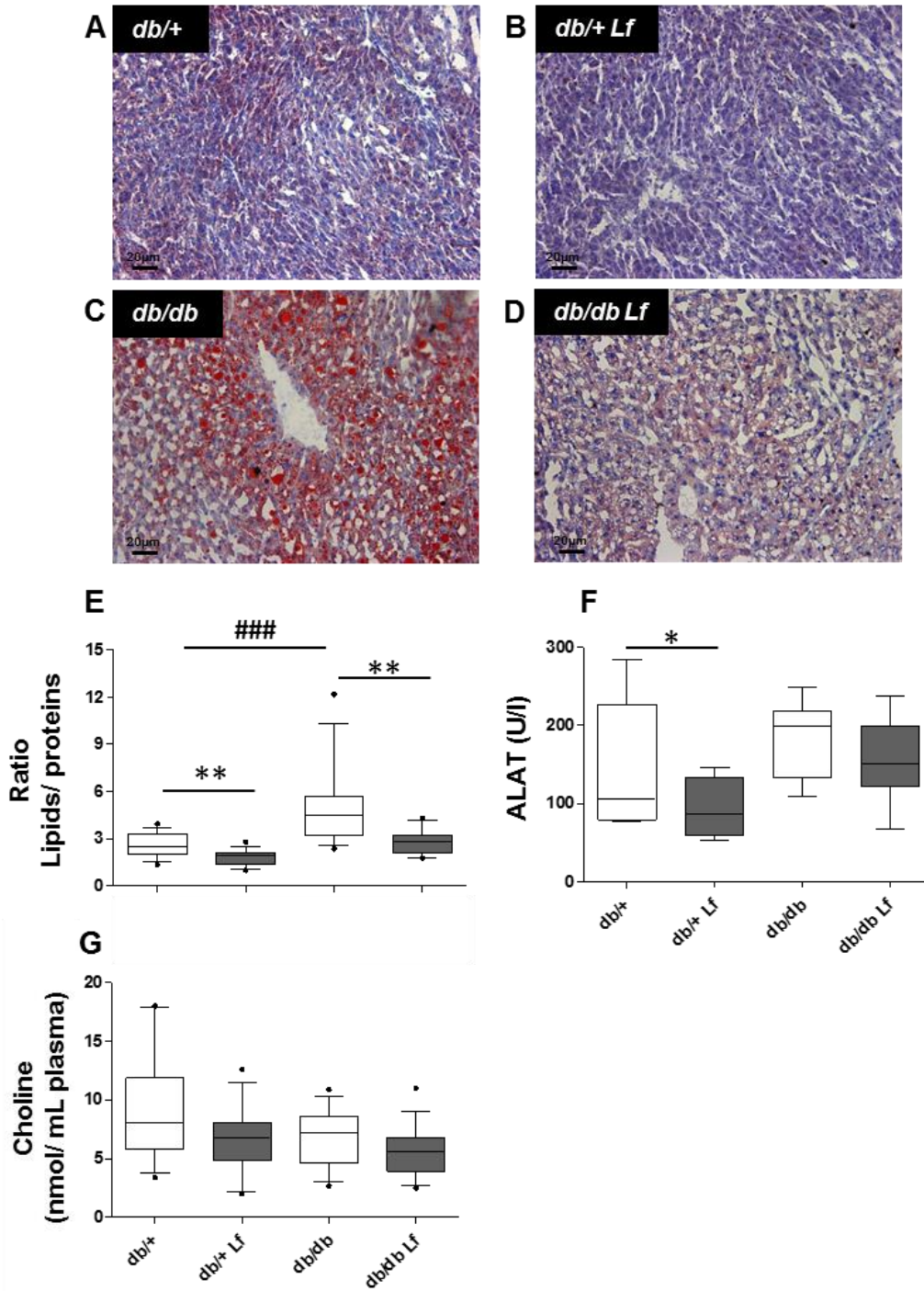


Figure 6 Study of liver complications by evaluation of liver triglycerides by immunostaining (A, B, C and D) in untreated (A, C) and treated (B, D) groups of mice; liver lipids : proteins ratio (E) and the liver injury marker ALAT in plasma (F). Untreated WT (*db/+*; n=15) and diabetic mice (*db/db*; n=14 – white boxes) were compared with treated WT *Lf* (*db/+ Lf*; n=14) and diabetic *Lf* mice (*db/db Lf*; n=15 – dark boxes). Whisker boxes, 10-90 percentile, « * » denotes comparison of untreated with treated mice while « # » denotes a comparison of *db/db* with *db/+* mice, *p<0.05, **p<0.01, ###p<0.001. Wilcoxon tests were used to compare treated with untreated groups.

3.8 ME-3 treatment does not affect the proportion of the dominant bacteria groups of the intestinal microbiota.

Analysis of the fecal microbiota from each group was carried out using Illumina MiSeq sequencing of the V3-V4 region of the 16S ribosomal RNA and comparing operational taxonomic units (OTU) and Shannon diversity indices. The diabetic and WT groups did not differ significantly in terms of microbial alpha diversity (Fig. 7A). Whereas ME-3 treatment in WT mice appeared associated with a reduction in the Proteobacteria phylum (which includes the *Enterobacteriaceae* family), no significant shift in any phylum or family was observed with ME-3 treatment, nor between diabetic and WT mice. Collectively, ME-3 treatment had no effect on either dominant or subdominant bacteria from intestinal microbiota at the phylum or family level (Fig. 7B and C) and the overall structure of the gut microbiota was preserved.

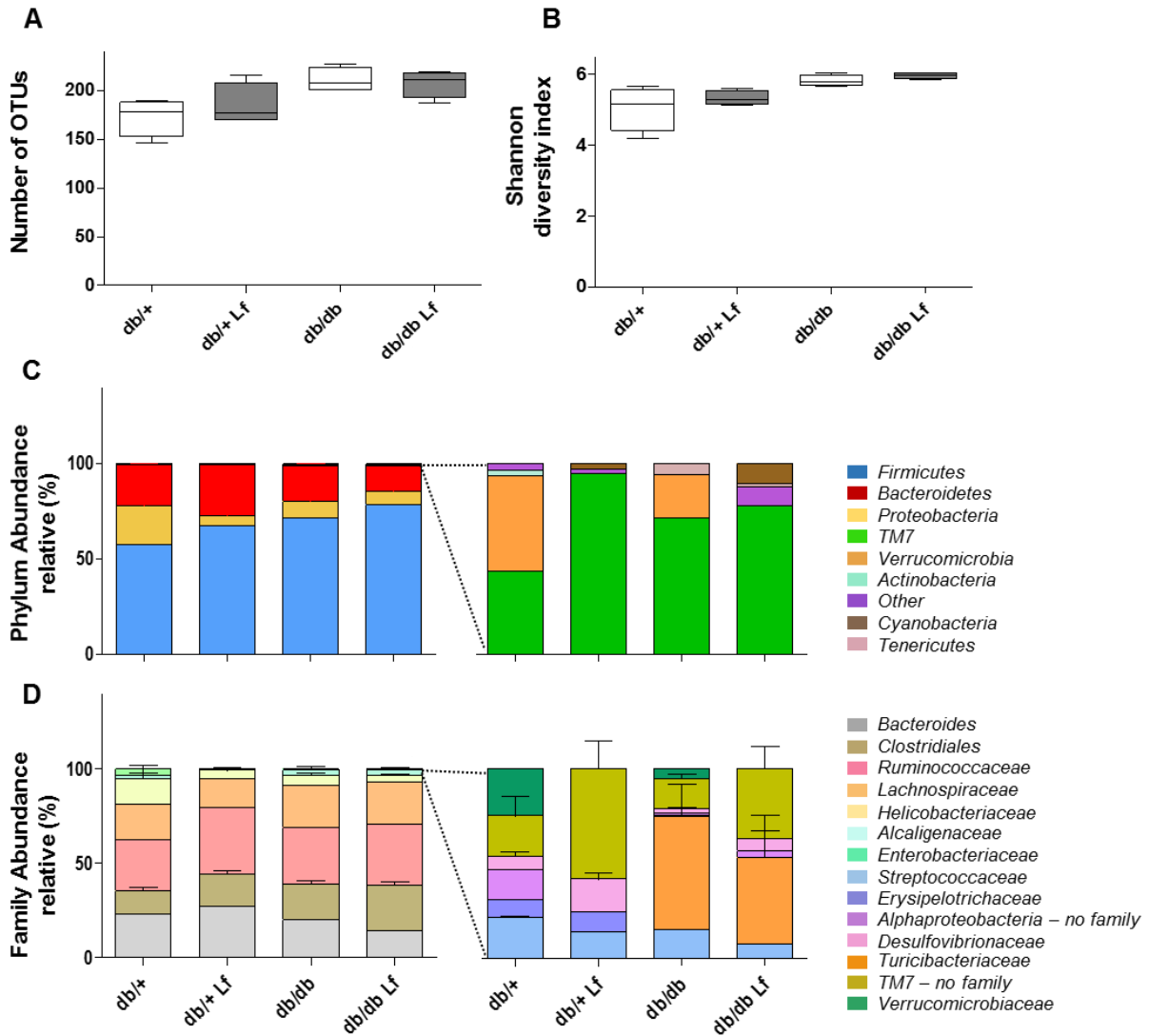


Figure 7 Impact of *L. fermentum* ME-3 on gut microbiota. Number of operational transcript units (OUT) in mice feces (**A**) and Shannon diversity index (**B**). Untreated WT (*db/+*; n=15) and diabetic mice (*db/db*; n=14 – white boxes) were compared with treated WT *Lf* (*db/+ Lf*; n=14) and diabetic *Lf* mice (*db/db Lf*; n=15 – dark boxes). Relative abundance (%) of bacteria at phylum (**C**) and family (**D**) level. Dominant bacteria are presented on the left and subdominants on the right. Wilcoxon tests were used to compare treated with untreated groups.

4. Discussion

In this study, we examined whether a treatment with the *Lactobacillus fermentum* ME-3 bacterial strain affected the formation and accumulation of glycation products and influence the development T2D-induced complications. The obesity characteristic of T2D was here represented by the hyperphagic *LepR^{db/db}* mouse model of diabetes (*db/db*), which were obese throughout the experiment and gained significantly more weight than WT mice (*db/+*). After 12 weeks, the ME-3 treatment had significantly attenuated weight gain in treated diabetic mice compared with untreated controls (mean weight gain during the experiment = -2% in *db/db Lf* mice and +12% in untreated *db/db* mice) (Fig. 1); conversely, but as expected, there was no difference in weight gain between treated and untreated WT mice. Energy intake was slightly less in treated vs. untreated WT mice, but this difference existed before treatment began and thus cannot be attributed to any anorexigenic effect of the tested probiotic. The lack of difference in energy intake between treated and untreated diabetic mice confirms that, under the conditions tested here, the ME-3 bacterial strain had no effect on food intake. Again, therefore, the reduced weight gain in the treated diabetic mice cannot be explained by an anorexigenic effect of the strain but is more likely attributable to a partial reduction of calorie absorption in the gut or to greater energy expenditure.¹¹ These effects of the ME-3 probiotic require further investigation.

Previous studies have reported a link between weight gain and the development of insulin resistance.²⁸ One of the limitations of our study is that neither the insulin resistance nor the insulin level were directly measured. We nevertheless observed an improvement in glucose tolerance from 60 to 120 minutes post-gavage in diabetic mice after 12 weeks of probiotic treatment (Fig. 2D). We may hypothesize that reduced weight gain in ME-3 treated diabetic mice improved insulin sensitivity and thus enhanced glucose tolerance. This enhancement was also observed among the treated WT mice, but was observed earlier, at 15 min after gavage (Fig. 3). This attenuation of postprandial glycaemia may be attributed to improved insulin production rather than any improvement in insulin sensitivity. Accordingly, we may hypothesize that higher levels of butyrate (+59%) and the mRNA of its receptor (*Ffar2*) (+111%) observed in treated WT mice may increase insulin levels *via* the GLP-1 pathway.^{29, 30}

As expected, chronic hyperglycemia and the percentage of glycated hemoglobin (%HbA1c) were higher in *db/db* than *db/+* mice (Fig. 2G and H). While the quantification of HbA1c is an indicator of early glycation in red blood cells, we also measured furosine which provides information on early glycation in fluids, tissues and organs and hence offers a broader view of early glycation status in the whole organism. Furosine was found to be 1.9 to 4.9 times more concentrated in the plasma and all of the organs tested here (kidneys, lungs, heart and liver) of *db/db* compared with *db/+* mice. Preclinical (LepR^{*db/db*},¹² HFD-STZ mice³¹ or STZ-rats^{17,32}) and clinical trials (diabetic patients³³) have quantified HbA1c to study the effect of different strains of probiotics. Some have demonstrated an attenuation of the HbA1c level ranging from 14 to 23%.^{12,17,31} Ours is the first study to report a beneficial effect of a probiotic bacterial strain on early glycation in the kidneys of both WT and diabetic mice (-14.5% and -12.3% in *db/+ Lf* and *db/db Lf* mice, respectively).

We reported in a recent study that dietary CML (dCML) accumulated in organs in the form of free CML, particularly in kidneys and lungs.³⁴ Here we again observed higher free CML levels in kidneys and lungs than in heart and liver of all mice (kidneys>lungs>heart>liver). We described above how *db/db* mice ate almost twice as much as *db/+* mice, likely owing to their deficiency in the leptin receptor, and were thus exposed to more dCML (1.7 to 2.2 fold more than WT for *db/db* and *db/db Lf* mice, respectively). In accordance with this difference of exposure, diabetic mice had higher free CML levels in kidneys, lungs and heart compared with WT mice (Fig. 4). The lack of difference observed in the liver is likely due to the relatively low accumulation of dCML by this organ, regardless of the mice genotype.³⁴ After 12 weeks of ME-3 treatment, lower free CML levels were found in the kidneys of both treated groups compared with untreated ones, as well as in the lungs of treated vs. untreated diabetic mice. The lesser dCML accumulation was observed only in the organs which are known to accumulate the most free CML. Hellwig *et al.* demonstrated that CML was partially metabolized after 24h of incubation with a human fecal suspension.³⁵ The reduction accumulation of free CML in the kidneys and lungs of treated animals may thus be the consequence of CML metabolism by ME-3 in the gut which could reduce its subsequent intestinal absorption and accumulation in peripheral organs.

Because of their well-described chronic hyperglycemia, the diabetic mice had higher levels of protein-bound CML in their organs (but not plasma) compared with WT mice.

The ME-3 treatment had no effect on protein-bound CML levels in organs or plasma within genotypes. These findings may be explained by the limited effect of the probiotic on the glucose metabolism overall and on fasting blood glucose in particular. With the markers used in the current study, it can be concluded that a 12-week ME-3 treatment slows the early, but not the advanced glycation in kidneys.

In rodent models, the use of probiotic strains (e.g. *L. rhamnosus*,¹⁸ *L. casei*,³¹ *L. paracasei*,¹⁰) has been shown to decrease hepatic triglycerides (TG). In this study, we observed a lower liver weight, reduced accumulation of hepatic TG and lower levels of inflammation and liver injury markers in treated vs. untreated mice (Fig. 6). These data seem to indicate that the ME-3 attenuates the development of hepatic steatosis under the conditions tested here. While the effect of the probiotic was more obvious in diabetic mice, a significant improvement of the liver composition was also evident in WT mice. The first hypothesis is that the ME-3 strain may have a beneficial effect upon the intestinal barrier function, resulting in reduced translocation of LPS from the gut to the liver and thence reduced liver steatosis and inflammation.³⁶ A second hypothesis is that the ME-3 treatment attenuated the metabolism of choline, a molecule that plays a key role in lipid metabolism. Changes in microbiota composition have been implicated in altering the metabolism of choline: when it is accentuated, this may lead to a deficiency of choline in plasma and then to an accumulation of TG, increased inflammation and liver damage.³⁶ The lack of a difference in choline concentrations between treated and untreated mice suggests this is not the case, but alternative explanations merit investigation – for example reductions in intestinal permeability, LPS and cytokine concentrations, or an increased production of secondary bile acids.

Various studies have reported associations between gut microbiota composition and chronic kidney disease in rodents and humans.³⁷ The observation of a lower urine albumin : creatinine ratio in treated *db/+* mice leads us to postulate that this strain could protect kidneys from chronic dysfunction. However, it cannot be ruled out that the slight difference in food intake between untreated and treated *db/+* mice could be responsible for this apparently protective effect of ME-3 treatment on renal function. As reported elsewhere,³⁸ the level of *Lcn2*, a key marker of chronic kidney injury, was higher in *db/db* compared with *db/+* mice. The reduction of this marker by a factor of 1.7 in treated vs. non-treated *db/db* mice indicates that the ME-3 strain may also limit kidney injury. We may conclude that a long-term treatment with the ME-3 strain may attenuate

mild and advanced kidney dysfunction in both normal and diabetic mice. Our results are in accordance with other reports of a beneficial effect of *L. paraplantarum* on diabetes-induced kidney damage in diabetic rats.³⁹

Concerning fecal microbiota, an apparent tendency of the ME-3 strain to decrease Proteobacteria could be viewed as coherent with the known anti-inflammatory effects of *Lactobacillus*. Indeed, Proteobacteria are often linked to inflammatory events, especially in metabolic disorders.^{40,41} An apparent lack of any negative impact upon the most abundant taxons would further suggest that the ME-3 strain does not disrupt the gut microbiota under the conditions tested here.

5. Conclusion

This study investigated the effect of a bacterial strain, *Lactobacillus fermentum* ME-3, on both metabolic disorders and glycation in a diabetic context. As described with other bacterial strains, the ME-3 strain had positive effects on weight gain and glucose tolerance, but to our knowledge we are the first to report that a 12-week treatment with a specific *Lactobacillus* strain reduces the accumulation of dCML in the kidneys and lungs, but not endogenous glycation (protein-bound CML). In another novel finding, we observed that the ME-3 strain had beneficial effects on the development of kidney and liver complications in diabetic animals. To conclude, the ME-3 strain is thus a promising treatment against the accumulation of dCML and the development of some metabolic disorders common in type 2 diabetes.

6. Bibliography

1. Singh, R., Barden, A., Mori, T. & Beilin, L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**, 129–146 (2001).
2. Tessier, F. J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. </data/revues/03698114/v58i3/S0369811409001928/> (2010).
3. Forbes, J. M. *et al.* Advanced Glycation End Product Interventions Reduce Diabetes-Accelerated Atherosclerosis. *Diabetes* **53**, 1813–1823 (2004).
4. Stegen, S. *et al.* Plasma carnosine, but not muscle carnosine, attenuates high-fat diet-induced metabolic stress. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **40**, 868–876 (2015).
5. Alderson, N. L. *et al.* The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int.* **63**, 2123–2133 (2003).
6. Xue, M. *et al.* Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and Obese Subjects by Glyoxalase 1 Inducer Formulation. *Diabetes* **65**, 2282–2294 (2016).
7. Boulanger, E., Grossin, N., Wautier, M.-P., Taamma, R. & Wautier, J.-L. Mesothelial RAGE activation by AGEs enhances VEGF release and potentiates capillary tube formation. *Kidney Int.* **71**, 126–133 (2007).
8. Jensen, L. J. N. *et al.* Renal effects of a neutralising RAGE-antibody in long-term streptozotocin-diabetic mice. *J. Endocrinol.* **188**, 493–501 (2006).
9. Hill, C. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 506–514 (2014).
10. Wang, J. *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* **9**, 1–15 (2015).
11. Stenman, L. k. *et al.* Potential probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Benef. Microbes* **5**, 437–445 (2014).
12. Yun, S. i., Park, H. o. & Kang, J. h. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1681–1686 (2009).

13. Hsieh, F.-C. *et al.* Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutr. Metab.* **10**, 35 (2013).
14. Gauffin Cano, P., Santacruz, A., Moya, Á. & Sanz, Y. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 Ameliorates Metabolic and Immunological Dysfunction in Mice with High-Fat-Diet Induced Obesity. *PLoS ONE* **7**, (2012).
15. Park, D.-Y. *et al.* Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity. *PLoS ONE* **8**, (2013).
16. Naito, E. *et al.* Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 650–657
17. Tabuchi, M. *et al.* Antidiabetic Effect of *Lactobacillus* GG in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1421–1424 (2003).
18. Ritze, Y. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG Protects against Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *PLoS ONE* **9**, (2014).
19. Kim, S.-W., Park, K.-Y., Kim, B., Kim, E. & Hyun, C.-K. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 258–263 (2013).
20. Xin, J. *et al.* Preventing non-alcoholic fatty liver disease through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by attenuating inflammation and mitochondrial injury and improving gut environment in obese mice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 6817–6829 (2014).
21. Mikelsaar, M. & Zilmer, M. *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb. Ecol. Health Dis.* **21**, 1–27 (2009).
22. Truusalu, K. *et al.* The influence of antibacterial and antioxidative probiotic lactobacilli on gut mucosa in a mouse model of *Salmonella* infection. *Microb. Ecol. Health Dis.* **16**, 180–187 (2004).
23. Truusalu, K. *et al.* Eradication of *Salmonella* Typhimurium infection in a murine model of typhoid fever with the combination of probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 and ofloxacin. *BMC Microbiol.* **8**, 132 (2008).
24. Songisepp, E. *et al.* Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. *Nutr. J.* **4**, 22 (2005).

25. Kaur, S. *et al.* Successful management of mild atopic dermatitis in adults with probiotics and emollients. *Cent. Eur. J. Med.* **3**, 215–220 (2008).
26. Plé, C. *et al.* Snapshot on a Pilot Metagenomic Study for the Appraisal of Gut Microbial Diversity in Mice, Cat, and Man. *Gastroenterology Research and Practice* (2016). doi:10.1155/2016/6587825
27. Everson, S. A. *et al.* Weight gain and the risk of developing insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* **21**, 1637–1643 (1998).
28. Allin, K. H., Nielsen, T. & Pedersen, O. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol.* **172**, R167–R177 (2015).
29. Guilbaud, A. *et al.* The LepRdb/db mice model for studying glycation in the context of diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **0**, e3103
30. Fantuzzi, G. & Mazzone, T. Adipose Tissue and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2007).
31. Chen, P. *et al.* Antidiabetic effect of *Lactobacillus casei* CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Nutrition* **30**, 1061–1068 (2014).
32. Lu, Y.-C., Yin, L.-T., Chang, W.-T. & Huang, J.-S. Effect of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 treatment on renal fibrosis in diabetic rats. *J. Biosci. Bioeng.* (2010).
33. Ejtahed, H. S. *et al.* Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* **28**, 539–543 (2012).
34. Tessier, F. J. *et al.* Quantitative assessment of organ distribution of dietary protein-bound ¹³C-labeled N ϵ -carboxymethyllysine after a chronic oral exposure in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 2446–2456 (2016).
35. Hellwig, M. *et al.* Stability of Individual Maillard Reaction Products in the Presence of the Human Colonic Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 6723–6730 (2015).
36. Ma, J., Zhou, Q. & Li, H. Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanisms and Therapy. *Nutrients* **9**, (2017).
37. Ramezani, A. & Raj, D. S. The Gut Microbiome, Kidney Disease, and Targeted Interventions. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 657–670 (2014).
38. Wang, Y. *et al.* Lipocalin-2 Is an Inflammatory Marker Closely Associated with Obesity, Insulin Resistance, and Hyperglycemia in Humans. *Clin. Chem.* **53**, 34–41 (2007).

39. Mihailović, M. *et al.* Oral administration of probiotic *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 attenuates diabetes-induced liver and kidney damage in rats. *J. Funct. Foods* **38**, 427–437 (2017).
40. Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C. & Gasbarrini, A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed Research International* (2017). doi:10.1155/2017/9351507
41. Shin, N.-R., Whon, T. W. & Bae, J.-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* **33**, 496–503 (2015).

DISCUSSION

L'hyperglycémie chronique caractéristique du diabète de type 2 (DT2) induit des dommages aux organes sur le long terme. Cela se fait à travers plusieurs voies métaboliques et chimiques dont la glycation des protéines. Depuis une trentaine d'années, des stratégies thérapeutiques « anti-glycation » ont été décrites mais les résultats sont loin d'être satisfaisants.

En parallèle, les scientifiques se sont intéressés au microbiote intestinal comme axe thérapeutique pour prévenir le DT2 et ses complications. Des souches bactériennes, ont ainsi été isolées et mises en avant grâce à leurs propriétés bénéfiques sur certains paramètres glucidiques et le stress oxydant. Cependant, malgré ces effets biologiques prometteurs, aucune étude ne s'est intéressée aux effets des bactéries commensales sur la glycation.

Le premier objectif de nos travaux a été de comparer plusieurs modèles animaux de diabète (génétique et alimentaires) et de caractériser le meilleur d'entre eux pour l'étude de la glycation. Cela s'est fait par l'analyse d'organes à l'aide de l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse.

Notre second objectif a consisté en l'étude des effets d'une souche bactérienne, le *Lactobacillus fermentum* ME-3, sur la glycation et les complications du DT2 dans le modèle le plus pertinent sélectionné lors de la première partie expérimentale de cette thèse.

Caractérisation du meilleur modèle murin pour l'étude de la glycation dans un contexte diabétique

Comme nous l'avons vu à travers la littérature, il existe de nombreux modèles murins de diabète, que ce soit de type 1 (e.g. induit de manière chimique ou virale) ou de type 2 (e.g. induit génétiquement ou par l'alimentation).¹⁴² Ces modèles ont parfois été utilisés afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques « anti-glycation ». ^{6,7,389}

Cependant, les quelques études qui ont caractérisé précisément la glycation, par la méthode de référence qu'est l'HPLC-MS/MS, ¹⁸² l'ont fait uniquement sur un modèle de rats-STZ (diabète de type 1).² Or cette thèse porte sur le diabète de type 2 dont la prévalence est neuf fois plus élevée que celle du diabète de type 1.

Les seules études qui ont suivi la glycation dans un contexte de DT2 ^{164,165,173,176} l'ont fait à l'aide de techniques semi-quantitatives et peu spécifiques (Western Blot, fluorescence, dosages ELISA, immunohistochimie...). ¹⁸¹

Afin de caractériser la glycation de manière quantitative et spécifique dans un contexte de DT2, nous avons quantifié quelques produits de glycation par HPLC-MS/MS dans plusieurs modèles murins dont un modèle génétique de diabète (*LepR^{db/db}*), et deux modèles alimentaires de diabète (modèles DIO avec des régimes HF et HF-HS).

L'obésité étant une des caractéristiques majeures du DT2, elle a été un prérequis à la validation de notre modèle murin. Les souris du modèle génétique, qui ont développé une hyperphagie due à une mutation du gène du récepteur à la leptine (hormone de satiété), sont devenues rapidement obèses et l'expérimentation a pu être arrêtée après 14 semaines d'expérimentation (22 semaines d'âge). Les modèles alimentaires d'obésité ont quant à eux nécessité 26 semaines d'expérimentation (34 semaines d'âge) pour observer une obésité stable et significative. Les souris soumises à un régime HF ou HF-HS riche en calories ont compensé la forte densité énergétique des aliments par une moindre consommation quotidienne. Cette adaptation, connue de la littérature, explique le délai de plusieurs mois, nécessaire pour observer une véritable obésité. ^{376,390}

Une perturbation du métabolisme glucidique est également caractéristique du DT2. En plus d'être obèses, les souris du modèle génétique ont présenté une hyperglycémie chronique associée à une intolérance au glucose dès le début de l'expérimentation, c'est-à-dire à 8 semaines d'âge. Comparativement, après 26 semaines d'expérimentation, seules les souris sous régime HF ont eu une augmentation modeste de leur glycémie à jeun associée à une intolérance au glucose. Comme nous allons le voir dans la suite de cette discussion, la glycémie joue bien évidemment un rôle important dans la formation et l'accumulation des produits de glycation *in vivo*.

La glycation est une réaction chimique complexe qui commence par la formation de produits précoces sur les protéines. En biochimie analytique, les mesures d'HbA1c, de fructosamines ou encore de fructoselysine (ou son dérivé d'hydrolyse acide : la furosine) permettent d'estimer le niveau de glycation précoce *in vivo*.

Chez l'homme, il a été montré que les niveaux de fructoselysine ou de son dérivé la furosine augmentaient dans le plasma,³⁹¹ le collagène de la peau⁵¹ et les cristallins³ au cours du vieillissement mais également au cours du diabète. Cependant les études qui ont rapporté ce type de données sont relativement peu nombreuses, et limitées à quelques protéines extraites de plasma, tissus et organes. Chez les animaux de laboratoire, les données sur la furosine sont également limitées. Il a entre autres été observé une concentration de furosine de 0,55 mmol/mol de lysine dans le collagène de la peau de souris C57BL/6NNIA âgées de 86 semaines,³⁸¹ ou encore une augmentation de la furosine dans les protéines glomérulaires de rats-STZ comparés à des rats non diabétiques (respectivement 0.38 et 0.09 mmol furosine/mol lysine).¹⁴² Dans notre étude, les souris LepR^{db/db} avaient entre 2 et 5 fois plus de furosine que les souris WT dans les quatre organes testés. Les concentrations de furosine que nous avons obtenues chez les souris LepR^{db/db} sont sensiblement proches de celles décrites chez l'homme (1,0 à 2,2 mmol de furosine/mol de lysine chez la souris, soit environ 0,30 à 0,66% de lysines modifiées en fructoselysine si nous considérons un taux de conversion de la fructoselysine en furosine de 30%³⁹³). L'analyse de la furosine dans les organes des souris *db/db* nous permet de conclure que ce modèle génétique est pertinent pour l'étude d'agents inhibiteurs de la glycation précoce.

Les résultats obtenus chez les souris DIO sont quant à eux très différents de ceux observés chez les souris *db/db*. En effet, après 26 semaines de régimes, les niveaux de furosine sont restés identiques entre les souris DIO et les souris contrôles (régime

normal) aussi bien dans les reins que dans les poumons et le cœur. Le foie est le seul organe pour lequel une augmentation significative de la concentration de la furosine a été observée chez les souris DIO comparées aux souris contrôles (28 à 63% d'augmentation, respectivement pour les souris HFD et HF-HSD).

À notre connaissance, la glycation dans le foie est peu décrite. Cet organe a initialement été étudié pour son rôle potentiel dans l'élimination des AGE ³⁹⁴ Cependant plusieurs études cliniques réalisées aussi bien sur des sujets sains qu'atteints de stéatose hépatique n'ont révélé aucune métabolisation par le foie des AGE (libres et protéiques) ³⁹⁵, ou plus spécifiquement de la CML ³⁹⁶.

Par ailleurs, d'autres équipes ont recherché quels pouvaient être les effets d'un régime alimentaire riche en AGE sur la santé hépatique. Une étude menée par H. Vlassara *et al*, a par exemple montré, chez la souris, qu'un régime riche en AGE était associé à des processus inflammatoires dans le foie à travers l'activation de RAGE. ⁹⁰

Enfin la plupart des travaux récents qui se sont intéressés au lien entre glycation et foie ont essentiellement cherché à démontrer une association entre les maladies hépatiques et l'élévation des produits de glycation dans la circulation. À l'aide de méthodes immuno-enzymatiques, plusieurs études ont rapporté des teneurs en produits précoces ³⁹⁵ et avancés ^{395,397-399} de la glycation plus importantes dans le plasma de personnes atteintes de maladies hépatiques chroniques. Une étude récente qui a utilisé la LC-MS/MS pour la quantification de la CML plasmatique n'a montré aucune différence de teneur en CML entre des plasmas issus de patients regroupés en 3 niveaux de stéatose ³⁹⁶ Par contre, cette même étude rapporte une augmentation de la CML hépatique en fonction du niveau de stéatose. Il est important de préciser que dans ce cas les analyses ont été réalisées par immuno-histologie.

Notre étude comparative de modèles murins de diabète apporte de nouveaux éléments sur la glycation du foie. En effet, les foies des souris soumises à un régime hypercalorique ont montré une large augmentation de poids après 26 semaines de régime. L'analyse de ces mêmes foies a révélé une augmentation importante de la furosine mais pas de la CML (valeurs ajustées sur la concentration de protéines). Cette étude révèle pour la première fois une augmentation d'un produit de glycation précoce dans des foies stéatosés. L'accumulation de graisse dans les foies des animaux DIO serait donc à l'origine d'une hépato-glycation qui reste à prouver. Enfin, l'absence

d'augmentation de CML dans les foies de souris DIO ne confirme pas les résultats observés par Gaens *et al.* sur des biopsies de foie humain. Cependant nous suspectons une interférence analytique dans le dosage de la CML par cette équipe. En effet il est aujourd'hui connu que la présence importante de lipides dans un échantillon biologique peu contribuer à une surestimation de la teneur en CML si le dosage est réalisé à l'aide d'anticorps.

Comme présenté dans l'introduction de cette thèse (**chapitre I.2 et I.3**), la glycation est une réaction qui se produit *in vivo* à 37°C tout au long de la vie. Mais de nombreux produits de glycation sont formés dans les aliments, et sont donc ingérés quotidiennement. Les AGE issus de la glycation alimentaire ont été appelés des « glycotoxines » par l'équipe d'H. Vlassara.⁴⁴ Ces dernières sont retrouvées en quantités élevées dans les régimes dits « occidentaux » du fait des températures élevées utilisées lors de la cuisson des aliments.⁴⁸ Notre équipe a pu montrer par HPLC-MS/MS que l'un de ces produits de glycation alimentaire, la CML, s'accumule dans la plupart des organes, en plus ou moins forte concentration.⁸⁷

Lors de notre étude sur les modèles murins de diabète, nous avons comparé un modèle génétique à deux modèles alimentaires (souris sous régime HF ou HF-HS). Dans le cas du modèle génétique, les souris LepR^{db/db} ont consommé environ deux fois plus d'aliment « Normal Diet » (ND) que les souris WT, du fait de leur déficience en récepteur à la leptine. Les souris LepR^{db/db} ont donc été exposées plus fortement à la CML exogène comparées aux souris WT (respectivement 145,4±14,9 et 86,6±4,8 µg de CML/ jour). Pour les deux modèles DIO, nous avons dosé la CML dans les croquettes HF et HF-HS et avons comparé leur teneur à celle des croquettes ND. La concentration de CML mesurée dans les croquettes ND était similaire à celles trouvées habituellement par d'autres équipes scientifiques.^{87,89,400} Nous avons par contre révélé pour la première fois que la concentration de CML, mais aussi de CEL, dans les croquettes HF et HF-HS était six à sept fois inférieure à celle mesurée dans les croquettes classiques pour rongeur de laboratoire (ND). Cette différence de teneur en produits de glycation avancés entre les régimes ND et HF ou HF-HS s'explique par l'utilisation de protéines de meilleure qualité pour la constitution des régimes spéciaux,

ainsi que par l'utilisation de températures de préparation moins élevées que pour la préparation des croquettes ND. Nous pouvons donc généraliser le fait que toute souris soumise à un régime spécial de type HF ou HF-HS, est moins exposée à la CML alimentaire qu'une souris alimentée par un régime classique.

La contribution de la CML alimentaire à la concentration totale de CML retrouvée dans les organes étant significative, il est apparu fondamental de développer une méthode analytique capable de discriminer la CML libre (CML en grande partie d'origine alimentaire) et la CML protéique (CML exclusivement endogène) afin de distinguer la glycation exogène de sa forme endogène.

Cette distinction entre produits de glycation exogènes et endogènes n'a pas été nécessaire pour l'étude de la glycation précoce. En effet, bien que les aliments pour rongeurs contiennent des concentrations variables de fructoselysine (ou furosine), ce produit de glycation est très peu absorbé et est essentiellement dégradé par le microbiote intestinal.³⁰⁰ En conséquence, il est admis que la fructoselysine détectée *in vivo* dans des tissus et organes est uniquement d'origine endogène.

Comme cela a été montré récemment par F. Tessier *et al.*,⁸⁷ nous avons constaté une plus forte accumulation de la CML libre (très probablement d'origine alimentaire) dans les reins et les poumons des différentes souris de nos études, que dans les cœurs et foies. Le deuxième élément notable a été de retrouver des concentrations de CML libre plus élevées dans les reins, les poumons, le cœur et le foie des souris LepR^{db/db} qui étaient surexposées à la CML alimentaire comparées aux souris WT. Suivant la même logique, nous avons retrouvé moins de CML libre dans les reins et les poumons des souris soumises à un régime HF ou HF-HS qui étaient moins exposées à la CML que les souris soumises à un régime ND. Une réduction de la teneur en CML, alors non expliquée par les auteurs, avait été observée dans les tendons de queue de souris soumises à un régime HF.⁴⁰⁰ Cette dernière observation souligne l'importance de maîtriser l'exposition alimentaire aux AGE lorsque différents régimes sont comparés chez l'animal, et lorsque des mesures d'AGE sont ensuite réalisées sur ces mêmes animaux.

Le dosage des produits de glycation a été décrit dans l'introduction de cette thèse (**chapitre I.5.II.**). Beaucoup d'études se sont basées sur des dosages semi-quantitatifs et parfois peu spécifiques (WB, fluorescence, dosages ELISA, immuno-histochimie...). Les seules études qui ont utilisé des méthodes quantitatives et spécifiques pour doser les produits de glycation ont utilisé un modèle de rats-STZ (diabète de type 1).² Dans l'une de ces quelques études, les concentrations de CML mesurées dans les organes des rats diabétiques étaient supérieures à celles observées chez les contrôles. Dans nos études, les souris LepR^{db/db} avaient aussi des concentrations de CML protéique plus importantes que les souris WT dans les poumons et le cœur. Une différence qui s'approchait de la significativité était aussi observée dans les reins et le foie. Cependant, pour les souris DIO aucune différence n'a été observée avec les souris ND dans les reins, le cœur et le foie. De manière surprenante, les concentrations de CML protéique dans les poumons étaient significativement plus faibles chez les souris DIO par rapport aux souris ND. À ce jour nous n'avons pas encore d'hypothèse pouvant expliquer ces résultats.

L'absence de glycation avancée dans la plupart des organes des souris soumises aux deux régimes hypercaloriques s'explique peut-être par le fait que bien que ces animaux aient montré une augmentation importante de la prise de poids, ils n'ont pas pour autant développé d'hyperglycémie chronique. Nous pouvons donc conclure que, dans nos conditions d'expérimentation, les deux modèles DIO que nous avons testé ne conduisent ni au développement d'un diabète ni à une accumulation significative des produits de glycation précoce et avancée.

L'analyse de l'ensemble de ces résultats nous a permis de sélectionner le modèle génétique comme le plus pertinent pour étudier la glycation. Les effets « anti-glycation » de la souche ME-3 ont donc été évalués sur ce modèle.

Étude des effets du Lactobacillus fermentum ME-3 sur la glycation et les complications du diabète

Lors de notre première étude, nous avons sélectionné le modèle génétique de diabète *Lepr^{db/db}* qui s'avère être le modèle le plus pertinent pour l'étude de la glycation et pour la caractérisation de nouvelles stratégies thérapeutiques « anti-glycation ».

Pour rappel, l'utilisation de souches bactériennes a montré des effets bénéfiques sur certains paramètres du glucose dans des études précliniques et cliniques.^{337,353,368,371,372} Cependant, à ce jour, aucune de ces études ne s'est intéressée aux potentiels effets « anti-glycation » des bactéries. Le but de notre deuxième étude était d'observer les effets d'une souche bactérienne, le *Lactobacillus fermentum* ME-3 sur la glycation et les complications du diabète.

La souche ME-3 a été identifiée en 1994 à l'Université de Tartu en Estonie et provient de fèces d'enfants sains.³⁸³ Quelques études préliminaires ont démontré des effets antioxydants (baisse de la peroxydation lipidique et du GSSG) et anti-inflammatoires dans le plasma, l'intestin et le foie de souris infectées à la *Salmonella* Typhimurium.^{383,385} La souche ME-3 a été très peu décrite chez l'homme mais une amélioration du profil oxydatif a été observée dans le plasma de sujets sains après avoir consommé trois fois par jour pendant trois semaines une capsule contenant 10^9 CFU de ME-3.³⁸⁷ Des résultats similaires ont été obtenus dans le sang et la peau de patients atteints de dermatite atopique ou post-AVC.^{383,388}

Pour répondre à notre second objectif, nous avons utilisé le modèle génétique de DT2 et des souris « littermates » comme contrôle. Ces souris ont reçu quotidiennement par gavage, pendant trois mois, de l'eau ou du ME-3 (10^{10} CFU). Comme attendu, nous avons pu constater après douze semaines de traitement, que la souche ME-3 n'affectait pas le poids des souris WT. Cependant, nous avons pu observer une atténuation significative de la prise de poids chez les souris diabétiques traitées par rapport aux souris diabétiques non traitées (-14% de poids corporel).

Notre première hypothèse s'est portée sur un effet anorexigène du probiotique. Cependant aucune différence de consommation n'a été rapportée entre les groupes

de souris diabétiques traitées et non traitées. Une moindre consommation a bien été observée chez les souris WT traitées par rapport au non traitées, mais cette légère différence était présente avant le début du traitement, et n'est manifestement liée qu'à la randomisation des animaux WT.

La seconde hypothèse pouvant expliquer cette perte de poids est une diminution de l'absorption des graisses au niveau intestinal et une augmentation de la teneur en lipides dans les fèces des groupes traités. Une analyse des échantillons de fèces restants est envisagée pour confirmer cette hypothèse.

Selon la littérature, une baisse de l'absorption énergétique provenant de la fermentation des aliments ou une augmentation des dépenses énergétiques pourrait aussi expliquer la perte de poids observée chez des souris traitées par des souches bactériennes.³³⁷

D'après certaines études, la perte de poids due à une diminution du tissu adipeux serait associée à une baisse de l'insulinorésistance et donc à une amélioration du métabolisme du glucose.⁴⁰¹ Dans notre étude, nous avons pu observer une amélioration de la tolérance au glucose dans les deux groupes traités. Pour le groupe WT traité, le pic de glycémie à quinze minutes post-gavage a été significativement atténué (-41%) par rapport au groupe non traité. Cette baisse spécifique à quinze minutes a été non seulement confirmée chez tous les animaux WT traités, mais aussi après seulement 6 semaines de traitement (données intermédiaires non présentées dans la partie expérimentale). Nous avons pu également mettre en évidence une augmentation du butyrate (+60%) et du transcrit de son récepteur *Ffar2* (+111%) dans ce groupe. Selon la littérature, le butyrate, en se liant à son récepteur intestinal synthétiserait du GLP-1 qui en passant par la circulation irait agir au niveau du pancréas pour induire une sécrétion de l'insuline.⁴⁰² Il est important de préciser que les augmentations de butyrate et de *Ffar2* se sont révélées statistiquement non significatives (respectivement $p=0,37$ et $p=0,12$), mais nous pensons que cela est dû à la faible puissance statistique associée au nombre limité d'échantillons ($n=4$ par groupe) pour cette partie de notre étude.

Concernant les souris diabétiques traitées, la tolérance au glucose a été améliorée de 60 à 120 minutes et nous avons pu observer une baisse de l'aire sous la courbe des OGTT de 7%. Ici encore cette amélioration de la tolérance au glucose était déjà visible après 6 semaines de traitement (données non présentées dans la partie expérimentale). Chez les souris diabétiques, les niveaux de butyrate et du transcrit de son récepteur étaient inchangés entre les souris traitées et non traitées. Il est possible, dans ce cas, que la souche ME-3 ait amélioré la sensibilité de l'insuline plutôt que la production d'insuline. Cependant une des limites de nos travaux est l'absence de dosage de l'insuline ainsi que du GLP-1 circulant dans nos expérimentations animales. Nous pouvons tout de même faire le lien entre la perte de poids corporel chez les animaux diabétiques et l'amélioration de leur tolérance au glucose, comme le suggère la littérature. ⁴⁰¹

Comme observé dans l'étude constituant le 1^{er} objectif, les animaux diabétiques présentaient une hyperglycémie chronique ainsi que des concentrations de furosine dans le plasma et les organes d'intérêts (reins, poumons, cœur, foie) deux à quatre fois plus élevées que chez les animaux WT. Des études précliniques (LepR^{db/db}, ³⁶⁸ HFD-STZ mice ³⁵⁶ or STZ-rats ^{370,372}) et cliniques (patients diabétiques) ³⁶⁰ utilisant différentes souches bactériennes ont montré une variation du niveau d'HbA1c. Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence d'HbA1c ni de variation de la furosine dans le plasma des animaux traités. Par contre nous avons pu mettre en évidence une réduction des niveaux de furosine dans les reins des animaux traités, que ce soit chez les diabétiques ou les WT.

Tandis que l'HbA1c ne peut être suivie que dans les érythrocytes, la furosine peut quant à elle être quantifiée dans les protéines du plasma, les tissus et différents organes. L'universalité du dosage de la furosine a été un argument dans le choix de ce marqueur pour le suivi de la glycation précoce dans nos deux expérimentations. Nous verrons par la suite que les baisses de teneurs de furosine retrouvées dans les reins des animaux traités sont corrélées à des améliorations du fonctionnement rénal.

Comme nous l'avons décrit dans la première partie de cette discussion, les souris LepR^{db/db} étaient plus exposées à la CML alimentaire que les souris WT. Nous avons pu constater ici que la souche bactérienne ME-3 réduisait la CML libre dans les reins et les poumons des souris diabétiques et WT. Cette réduction est visible dans les organes qui sont connus pour accumuler le plus la CML alimentaire. Elle n'est pas retrouvée dans le cœur et le foie qui sont des organes moins sensibles à l'accumulation de la CML alimentaire.

Il est possible que la souche ME-3 ait amélioré la métabolisation de la CML alimentaire au niveau intestinal et ait, ainsi, empêché son absorption puis accumulation dans certains organes périphériques. Une étude de M. Hellwig *et al.* a montré *in vitro*, que la CML se dégradait en présence d'échantillons de fèces humaines après 24h.³⁰⁰ Pour pouvoir confirmer notre hypothèse, nous envisageons d'incuber la souche bactérienne en présence de CML pendant plusieurs heures à 37°C et de quantifier la CML à différents temps de culture bactérienne.

À l'inverse, nous n'avons noté aucun effet de la souche bactérienne sur la CML protéique. Ce résultat n'est pas surprenant, puisque nous avons montré que le probiotique n'a pas d'effet direct sur la glycémie à jeun.

Nous avons finalement investigué l'effet de la souche ME-3 sur quelques complications du diabète et notamment celles touchant le foie et les reins.

Dans certaines études murines, l'utilisation de souches bactériennes spécifiques (*L. rhamnosus*,³⁵¹ *L. casei*,³⁵⁶ *L. paracasei*,³⁵³ ...) ont mis en évidence une baisse des TG hépatiques. Au cours de notre étude, nous avons observé une atténuation du développement de la stéatose hépatique à travers une réduction du poids des foies, une réduction des TG hépatiques, une baisse de l'inflammation et une baisse de l'un des marqueurs de souffrance hépatique (ALAT). Il est possible que la souche bactérienne améliore la perméabilité intestinale et réduise le passage des LPS intestinaux vers le foie, et réduise *in fine* l'inflammation et la stéatose.³¹⁶ Dans le cas d'une perturbation de la flore intestinale, le métabolisme de la choline est altéré, et provoque une dérégulation du métabolisme lipidique. En particulier, une accentuation

du métabolisme de la choline conduit à une déficience en choline plasmatique ainsi qu'à la formation de métabolites toxiques (di- et tri-méthylamines). Cela conduit progressivement à l'accumulation de TG hépatiques, à une inflammation et à des dommages hépatiques.³¹⁶ Notre seconde hypothèse serait donc que la souche bactérienne pourrait atténuer la métabolisation de la choline et ainsi réduire le développement de la stéatose hépatique. Un dosage plasmatique de la choline est prévu pour vérifier cette hypothèse.

Quelques études ont rapporté une altération du microbiote intestinale et le développement de maladies rénales chez l'homme, mais les mécanismes d'action sont encore peu décrits.²⁷¹ Dans notre dernière étude, nous avons constaté que le groupe des souris WT traitées a ingéré légèrement moins de calories que le groupe de souris WT non traitées. Bien que cette différence de prise alimentaire ne soit pas liée au traitement, puisqu'existante avant le traitement, elle a potentiellement eu un effet sur certains paramètres suivis dans notre étude. Nous avons par exemple observé une baisse du poids des reins des souris WT traitées, une baisse de la concentration de furosine et une réduction significative du ratio albuminurie : créatininurie (marqueur de risque de maladie rénale chronique). Il est difficile de conclure quant à l'origine de l'amélioration de ce ratio chez les souris WT traitées par rapport aux souris WT non traitée. Il serait important de confirmer non seulement l'effet potentiel du traitement avec deux groupes de souris ne présentant pas de différence d'apport calorique, mais aussi le lien qui pourrait exister entre les concentrations de furosine dans les reins et le rapport de concentration albumine : créatinine.

Un marqueur de lésions tubulaires rénale chronique (*Lcn2*) a aussi été mesuré.⁴⁰³ Comme attendu, il s'est avéré normal chez les souris non diabétiques. En revanche son niveau significativement plus élevé chez les souris *LepR^{db/db}* permet d'évoquer une atteinte tubulaire rénale chez ces souris diabétiques. Nous avons observé que le traitement au ME-3 a réduit de 43% le niveau de ce marqueur de lésions tubulaires chroniques chez les souris diabétiques traitées. Cette amélioration reste à confirmer avec une différence statistiquement significative. En revanche, nous n'avons pas noté d'amélioration de la souffrance rénale glomérulaire (ratio albuminurie : créatininurie) chez ces souris diabétiques traitées. Un traitement plus long aurait peut-être atténué cette souffrance rénale chez les souris diabétiques. En conclusion, il est possible que

la baisse de la consommation alimentaire améliore la fonction glomérulaire dans les reins des souris WT. Dans un second temps, la souche bactérienne semble réduire les lésions tubulaires rénales chez les souris diabétiques. Nos résultats concordent avec une étude qui a rapporté des effets bénéfiques de la souche bactérienne *L. paraplantarum* sur les dommages rénaux induits par le diabète chez le rat-STZ.⁴⁰⁴ Après avoir étudié le microbiote au sein des quatre groupes, nous avons pu constater une tendance à la baisse des bactéries du phylum des protéobactéries et des bactéries de la famille des entérobactéries correspondantes chez les souris WT traitées. D'après la littérature ces bactéries auraient des effets pro-inflammatoires. Finalement, il semblerait que mise à part cette tendance à la baisse pour les entérobactéries, la souche ME-3 n'altère pas la flore bactérienne au niveau des phylum et des familles que ce soit pour les catégories dominantes ou sous dominantes chez les souris diabétiques ou WT.



CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Des études précliniques et cliniques ont montré que des souches bactériennes pouvaient avoir des effets bénéfiques sur les paramètres glucidiques mais aucune n'a pour le moment investigué les effets de ces souches sur la glycation. Le double objectif de ces travaux était de caractériser le modèle murin de glycation le plus pertinent parmi plusieurs modèles de diabète (génétique et alimentaires) afin d'étudier par la suite les effets d'une souche bactérienne, le *Lactobacillus fermentum* ME-3, sur la glycation et les complications du diabète.

Nous avons dans un premier temps démontré par une méthode quantitative et spécifique, l'HPLC-MS/MS, que le modèle génétique de diabète (LepR^{db/db}) était le plus pertinent par rapport aux deux modèles alimentaires (souris soumises à un régime HFD ou HF-HS). Les souris LepR^{db/db} du modèle génétique avaient des niveaux de furosine et de CML significativement plus élevés dans le plasma et les organes cibles par rapport aux souris WT. À l'inverse les souris des modèles alimentaires avaient des niveaux en furosine et en CML similaires à ceux des souris soumises à un régime ND. La caractérisation d'un modèle de glycation et de diabète nous a été utile pour étudier les effets de la souche bactérienne ME-3 sur la glycation, mais cette étude pourra également servir pour de futurs développements thérapeutiques visant à atténuer la formation et l'accumulation des produits de glycation.

Après avoir caractérisé le modèle de glycation et de diabète le plus pertinent, nous avons administré à des souris diabétiques et non diabétiques, une souche bactérienne pour y étudier ses effets sur la glycation et les complications du diabète.

Nous avons pu mettre en évidence des effets de la souches ME-3 sur – 1) l'atténuation de la prise de poids chez les souris diabétiques – 2) une baisse de la concentration de furosine dans les reins des souris WT et diabétiques – 3) une baisse de l'accumulation de la CML libre dans les reins et les poumons des souris WT et diabétiques – 4) un effet protecteur contre les complications rénales chez les souris diabétiques – 5) une réduction du risque de maladie rénale chronique chez les souris WT et diabétiques – 6) une atténuation du développement de la stéatose hépatique chez les souris WT et diabétiques.

Afin de compléter ces travaux, différentes perspectives peuvent être envisagées.

Un dosage de l'insuline ainsi que du GLP-1 aurait été nécessaire afin de faire le lien entre le microbiote et l'amélioration de la tolérance au glucose observée chez les souris traitées. Nous avons pu observer chez les souris WT une augmentation des niveaux de butyrate et du transcrit de son récepteur (*Ffar2*). Nous faisons l'hypothèse qu'en augmentant les niveaux de butyrate et de son récepteur, la souche bactérienne permettrait une synthèse accrue du GLP-1 induisant une augmentation de la sécrétion en insuline par le pancréas et donc une meilleure prise en charge du glucose.

Afin de vérifier une autre de nos hypothèses, il serait intéressant de pouvoir réaliser une étude *in vitro* en mettant la souche ME-3 en présence de CML pendant une durée déterminée et de quantifier la CML par HPLC-MS/MS à différents temps. Nous pourrions ainsi confirmer que la souche bactérienne ME-3 dégrade la CML au niveau de l'intestin, et limite son absorption intestinale, son passage dans la circulation systémique et son accumulation dans les organes

La CML est l'un des AGE les plus abondants *in vivo*, mais aussi l'un des plus étudiés. Cependant il aurait été intéressant de quantifier d'autres AGE tels que le MG-H1 ou la pentosidine, et de valider nos conclusions avec ces autres marqueurs de la glycation avancée. Grâce à la méthode analytique que nous avons utilisée pour quantifier la CML, nous avons aussi pu quantifier la *N*-carboxyéthyl-lysine (CEL). Les résultats sont présentés en Annexes 1 à 6. Ils nécessitent encore une analyse détaillée avant interprétation.

Pour étudier le lien entre l'utilisation de la souche ME-3 et l'atténuation du développement de la stéatose hépatique, il serait judicieux de pouvoir doser la choline dans le plasma des souris. Une augmentation des niveaux de choline plasmatique chez les souris traitées serait alors un élément important pouvant expliquer une plus faible accumulation des lipides hépatiques chez ces souris.

De manière surprenante, lors de la première étude murine, nous avons constaté une forte augmentation de la fructoselysine dans les foies des souris diabétiques *db/db* par rapport aux souris WT. Cependant, le niveau de fructoselysine était encore plus élevé dans les foies des souris soumises à un régime HFD ou HF-HS. Comme nous l'avons expliqué précédemment, il y a très peu de données publiées sur la glycation dans le foie. Il serait intéressant d'étudier d'avantage la glycation précoce et avancée dans cet

organe, qui représente un élément majeur dans le métabolisme du glucose. Enfin, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD en anglais) qui est l'une des affections hépatiques chroniques des plus fréquentes est une complication importante au diabète.

Dans un second temps, nous avons pu observer une réduction de la CML protéique dans les poumons des souris soumises à un régime HFD ou HF-HS. Ici encore la littérature est peu abondante. C'est cependant dans cet organe que le RAGE est présent en plus forte quantité.⁴⁰⁵ Nos données sur la CEL dans cet organe (annexes 1 à 6) montrent la même tendance que pour la CML, mais elles montrent aussi pour la première fois des teneurs très élevées en ce deuxième AGE (10 fois plus concentré que la CML). Une étude approfondie serait nécessaire afin de comprendre les mécanismes impliquant les produits de glycation avancée dans ce second organe.

Enfin, au cours de l'étude, nous avons prélevé l'ensemble des organes de chacune des souris. Il serait pertinent de pouvoir étudier les effets de la souche ME-3 sur la glycation et les complications du diabète sur d'autres organes ou tissus comme la peau, les cristallins ou le cerveau. Concernant la peau, les données seraient facilement comparables aux données de la littérature puisqu'en effet une grande majorité des études sur la glycation a quantifié les produits précoces et avancés dans ce tissu.



TRAVAUX PERSONNELS

Articles originaux

Y. Yu, L. Wang, F. Delguste, **A. Guilbaud**, C. Rousselin, AM Schmidt, F.J. Tessier, E. Boulanger and R. Neviere, « Advanced glycation end products receptor RAGE controls myocardial dysfunction and oxidative stress in high-fat fed mice by sustaining mitochondrial dynamics and autophagy-lysosome pathway », *Free Radic. Biol. Med.*, Aug. 2017.

K. Laleg, J. Salles, A. Berry, C. Giraudet, V. Patrac, C. Guillet, P. Denis, F.J. Tessier, **A. Guilbaud**, M. Howsam, Y. Boirie, V. Micard and S. Walrand, « Nutritional evaluation of mixed wheat–faba bean pasta in growing rats: Impact of protein source and drying temperature on protein digestibility and retention », *British Journal of Nutrition*, Dec. 2018.

A. Guilbaud, M. Howsam, C. Niquet-Léridon, F. Delguste, E. Boulanger and F.J. Tessier, « The LepR^{db/db} mice model for studying glycation in the context of diabetes », *Diabetes Metabolism Research and Review*, Dec. 2018.

A. Guilbaud, M. Howsam, C. Niquet-Léridon, F. Delguste, S. Lestavel, P. Maboudou, A. Garat, B. Foligné, E. Boulanger and F.J. Tessier, « The effect of *Lactobacillus fermentum* ME-3 on glycation and diabetes complication », *Diabetes*, *en rédaction*.

Articles de revue

A. Guilbaud, C. Niquet-Leridon, E. Boulanger, et F. J. Tessier, « How Can Diet Affect the Accumulation of Advanced Glycation End-Products in the Human Body? », *Foods*, vol. 5, n° 4, Dec. 2016.

F. George, C. Daniel, M. Thomas, E. Singer, **A. Guilbaud**, F. Tessier, A-M. Revol-Junelles, F. Borges, B. Foligne, « Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective », *Frontier in Microbiology*, Oct. 2018.

Article de vulgarisation

A. Guilbaud and M. Fremont, « New-generation probiotics », *Ingredients insight*, vol. 1, 2017.

Communications orales

A. Guilbaud, M. Howsam, E. Boulanger, et F. J. Tessier « Sample preparation for measuring early and advanced glycation products », Young AGErs Symposium, Wageningen; PAYS-BAS, Jul. 2018.

A. Guilbaud, M. Howsam, F. Delguste, C. Niquet-Leridon, S. Lestavel, P. Maboudou, B. Foligne, E. Boulanger, et F. J. Tessier « Effects of a probiotic on glycation in a type 2 diabetes mouse model », ISMR 13th International symposium of the Maillard Reaction, Montréal; CANADA, Sept. 2018.

Communication avec acte

M. Hanssens, I. Everaert, **A. Guilbaud**, F. Tessier, J. Delanghe, H. Baelde, S.J. Hauske, B.A. Yard & W. Derave « The protective effect of exercise on diabetic nephropathy: the role of histidine containing dipeptides », 4th International Congress on Carnosine and Anserine (ICCA), Louisville; KENTUCKY. Program and abstract book. p.35, 2017.



BIBLIOGRAPHIE

1. Maillard, L. C., Maillard, L. C. & Maillard, L. Action Des Acides Aminés Sur Les Sucres; Formation Des Mélanoidines Par Voie Méthodique. (1912).
2. Thornalley, P. J. *et al.* Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* **375**, 581–592 (2003).
3. Tessier, F., Obrenovich, M. & Monnier, V. M. Structure and Mechanism of Formation of Human Lens Fluorophore LM-1 RELATIONSHIP TO VESPERLYSINE A AND THE ADVANCED MAILLARD REACTION IN AGING, DIABETES, AND CATARACTOGENESIS. *J. Biol. Chem.* **274**, 20796–20804 (1999).
4. Ogurtsova, K. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **128**, 40–50 (2017).
5. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813–820 (2001).
6. Monnier, V. M. The fructosamine 3-kinase knockout mouse: a tool for testing the glycation hypothesis of intracellular protein damage in diabetes and aging. *Biochem. J.* **399**, (2006).
7. Xue, M. *et al.* Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and Obese Subjects by Glyoxalase 1 Inducer Formulation. *Diabetes* **65**, 2282–2294 (2016).
8. Borg, D. J. & Forbes, J. M. Targeting advanced glycation with pharmaceutical agents: where are we now? *Glycoconj. J.* **33**, 653–670 (2016).
9. Petersen, C. & Round, J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell. Microbiol.* **16**, 1024–1033 (2014).
10. Ley, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11070–11075 (2005).
11. Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M. & Owen, L. J. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* **26**, (2015).
12. George Kerry, R. *et al.* Benefaction of probiotics for human health: A review. *J. Food Drug Anal.* (2018). doi:10.1016/j.jfda.2018.01.002

13. Ling, A. R. Malting. *J. Inst. Brew.* **14**, 494–521
14. Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F. & van Boekel, M. A. J. S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Technol.* **11**, 364–373 (2000).
15. Tessier, F. J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol. Biol.* **58**, 214–219 (2010).
16. Breyer, V., Becker, C.-M. & Pischetsrieder, M. Intracellular Glycation of Nuclear DNA, Mitochondrial DNA, and Cytosolic Proteins During Senescence-like Growth Arrest. *DNA Cell Biol.* **30**, 681–689 (2011).
17. Jaramillo, R. *et al.* DNA advanced glycation end products (DNA-AGEs) are elevated in urine and tissue in an animal model of type 2 diabetes. *Chem. Res. Toxicol.* **30**, 689–698 (2017).
18. Hodge, J. E. The Amadori Rearrangement. in *Advances in Carbohydrate Chemistry* (ed. Wolfson, M. L.) **10**, 169–205 (Academic Press, 1955).
19. Tessier, F. J., Monnier, V. M., Sayre, L. M. & Kornfield, J. A. Triosidines: novel Maillard reaction products and cross-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues. *Biochem. J.* **369**, 705–719 (2003).
20. Cerami, A. Aging of proteins and nucleic acids: what is the role of glucose? *Trends Biochem. Sci.* **11**, 311–314 (1986).
21. Bastos, D. M., Monaro, É. & Séfora, É. S. and M. Maillard Reaction Products in Processed Food: Pros and Cons. *Food Ind. Process. - Methods Equip.* (2012). doi:10.5772/31925
22. Hodge, J. E. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1**, 928–943 (1953).
23. Kunkel, H. G. & Wallenius, G. New Hemoglobin in Normal Adult Blood. *Science* **122**, 288–288 (1955).
24. Leow, M. K. S. Glycated Hemoglobin (HbA1c): Clinical Applications of a Mathematical Concept. *Acta Inform. Medica* **24**, 233–238 (2016).

25. Gillery, P. A history of HbA1c through Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.* **51**, 65–74 (2013).
26. Allen, D. W., Schroeder, W. A. & Balog, J. Observations on the Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hemoglobin: A Study of the Effects of Crystallization and Chromatography on the Heterogeneity and Isoleucine Content. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1628–1634 (1958).
27. Rahbar, S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta* **22**, 296–298 (1968).
28. Koenig, R. J. *et al.* Correlation of Glucose Regulation and Hemoglobin A1c in Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* **295**, 417–420 (1976).
29. Ohmori, S., Mori, M., Shiraha, K. & Kawase, M. Biosynthesis and degradation of methylglyoxal in animals. *Prog. Clin. Biol. Res.* **290**, 397–412 (1989).
30. NAKAYAMA, T., HAYASE, F. & KATO, H. Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan Received December 24, 1979. 2
31. Cerami, A., Ulrich, P. C. & Brownlee, M. Method and agents for inhibiting protein aging. (1988).
32. Monnier, V. M. & Cerami, A. Non-enzymatic glycosylation and browning of proteins in diabetes. *Clin. Endocrinol. Metab.* **11**, 431–452 (1982).
33. 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).
34. Dunn, J. A., Patrick, J. S., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry* **28**, 9464–9468 (1989).
35. Dunn, J. A., McCance, D. R., Thorpe, S. R., Lyons, T. J. & Baynes, J. W. Age-dependent accumulation of N.epsilon.-(carboxymethyl)lysine and N.epsilon.-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* **30**, 1205–1210 (1991).
36. Wadman, S. K. *et al.* Nε-(carboxymethyl)lysine, a constituent of human urine. *Clin. Chim. Acta* **59**, 313–320 (1975).

37. Sell, D. R. & Monnier, V. M. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J. Biol. Chem.* **264**, 21597–21602 (1989).
38. Fokkens, B. T. & Smit, A. J. Skin fluorescence as a clinical tool for non-invasive assessment of advanced glycation and long-term complications of diabetes. *Glycoconj. J.* **33**, 527–535 (2016).
39. Lavielle, A. *et al.* Skin autofluorescence in acute kidney injury. *Crit. Care* **21**, (2017).
40. Vélayoudom-Céphise, F.-L. *et al.* Skin autofluorescence predicts cardio-renal outcome in type 1 diabetes: a longitudinal study. *Cardiovasc. Diabetol.* **15**, (2016).
41. Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J. & Thérond, P. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann Biol Clin* **66**, 16 (2008).
42. Baynes, J. W. & Thorpe, S. R. Glycoxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1708–1716 (2000).
43. Cerami, C. *et al.* Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13915–13920 (1997).
44. Koschinsky, T. *et al.* Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 6474–6479 (1997).
45. Henle, T. AGEs in foods: Do they play a role in uremia? *Kidney Int.* **63**, S145–S147 (2003).
46. Gkogkolou, P. & Böhm, M. Advanced glycation end products. *Dermatoendocrinol.* **4**, 259–270 (2012).
47. Sell, D. R. *et al.* Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 485–490 (1996).
48. Semba, R. D., Nicklett, E. J. & Ferrucci, L. Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **65A**, 963–975 (2010).
49. Singh, V. P., Bali, A., Singh, N. & Jaggi, A. S. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* **18**, 1–14 (2014).

50. Verzijl, N. *et al.* Effect of Collagen Turnover on the Accumulation of Advanced Glycation End Products. *J. Biol. Chem.* **275**, 39027–39031 (2000).
51. Dyer, D. G. *et al.* Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.* **91**, 2463–2469 (1993).
52. Monnier, V. M., Kohn, R. R. & Cerami, A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 583–587 (1984).
53. Pigeon, H. Reaction of glycation and human skin: The effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. *Pathol. Biol.* **58**, 226–231 (2010).
54. Miura, J. *et al.* Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. *Arch. Oral Biol.* **59**, 119–124 (2014).
55. Verzijl, N. *et al.* Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem. J.* **350**, 381–387 (2000).
56. Gautieri, A. *et al.* Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue. *Matrix Biol.* **59**, 95–108 (2017).
57. Fan, X. *et al.* Vitamin C mediates chemical aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 16912–16917 (2006).
58. Frimat, M. *et al.* Kidney, heart and brain: three organs targeted by ageing and glycation. *Clin. Sci.* **131**, 1069–1092 (2017).
59. Evans, T. W. Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 6–11 (2002).
60. Rondeau, P. & Bourdon, E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie* **93**, 645–658 (2011).
61. Barnaby, O. S., Cerny, R. L., Clarke, W. & Hage, D. S. COMPARISON OF MODIFICATION SITES FORMED ON HUMAN SERUM ALBUMIN AT VARIOUS STAGES OF GLYCATION. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **412**, 277–285 (2011).

62. Rubenstein, D. A. & Yin, W. Glycated albumin modulates platelet susceptibility to flow induced activation and aggregation. *Platelets* **20**, 206–215 (2009).
63. Unoki, H. *et al.* Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **76**, 236–244 (2007).
64. Ahmad, S., Moinuddin, Khan, R. H. & Ali, A. Physicochemical studies on glycation-induced structural changes in human IgG. *IUBMB Life* **64**, 151–156
65. Sen, S., Kar, M., Roy, A. & Chakraborti, A. S. Effect of nonenzymatic glycation on functional and structural properties of hemoglobin. *Biophys. Chem.* **113**, 289–298 (2005).
66. Younis, N. *et al.* Glycation as an atherogenic modification of LDL: *Curr. Opin. Lipidol.* **19**, 378–384 (2008).
67. Bastos, D. H. M. & Gugliucci, A. Contemporary and controversial aspects of the Maillard reaction products. *Curr. Opin. Food Sci.* **1**, 13–20 (2015).
68. Basta, G., Schmidt, A. M. & De Caterina, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* **63**, 582–592 (2004).
69. Neepser, M. *et al.* Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 14998–15004 (1992).
70. Lee, E. J. & Park, J. H. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics Inform.* **11**, 224 (2013).
71. Hudson, B. I. *et al.* Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J.* **22**, 1572–1580 (2007).
72. Maillard-Lefebvre, H. *et al.* Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology* **48**, 1190–1196 (2009).

73. Ott, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* **2**, 411–429 (2014).
74. Valente, T., Gella, A., Fernández-Busquets, X., Unzeta, M. & Durany, N. Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiol. Dis.* **37**, 67–76 (2010).
75. Simm, A. *et al.* Age associated changes of AGE-receptor expression: RAGE upregulation is associated with human heart dysfunction. *Exp. Gerontol.* **39**, 407–413 (2004).
76. Hammes, H.-P. *et al.* N ϵ (Carboxymethyl)Lysin and the AGE Receptor RAGE Colocalize in Age-Related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1855–1859 (1999).
77. Kislinger, T. *et al.* N ϵ -(Carboxymethyl)Lysine Adducts of Proteins Are Ligands for Receptor for Advanced Glycation End Products That Activate Cell Signaling Pathways and Modulate Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 31740–31749 (1999).
78. Bierhaus, A. *et al.* Diabetes-Associated Sustained Activation of the Transcription Factor Nuclear Factor- κ B. *Diabetes* **50**, 2792–2808 (2001).
79. Vazzana, N., Santilli, F., Cuccurullo, C. & Davì, G. Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Intern. Emerg. Med.* **4**, 389–401 (2009).
80. Niquet-Léridon, C. & Tessier, F. J. Quantification of N ϵ -carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography–linear ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **126**, 655–663 (2011).
81. Loaëc, G., Jacolot, P., Helou, C., Niquet-Léridon, C. & Tessier, F. J. Acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural and N ϵ -carboxymethyl-lysine in coffee substitutes and instant coffees. *Food Addit. Contam. Part A* **31**, 593–604 (2014).
82. Hull, G. *et al.* N ϵ -(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. *Food Chem.* **131**, 170–174 (2012).

83. 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. (2015).
84. Tan, D., Wang, Y., Lo, C.-Y., Sang, S. & Ho, C.-T. Methylglyoxal: Its Presence in Beverages and Potential Scavengers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1126**, 72–75 (2008).
85. Degen, J., Hellwig, M. & Henle, T. 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 7071–7079 (2012).
86. Degen, J., Vogel, M., Richter, D., Hellwig, M. & Henle, T. Metabolic Transit of Dietary Methylglyoxal. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 10253–10260 (2013).
87. Tessier, F. J. *et al.* Quantitative assessment of organ distribution of dietary protein-bound ¹³C-labeled N ϵ -carboxymethyllysine after a chronic oral exposure in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 2446–2456 (2016).
88. Birlouez-Aragon, I. *et al.* A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 1220–1226 (2010).
89. 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).
90. Patel, R. *et al.* Effect of Dietary Advanced Glycation End Products on Mouse Liver. *PLoS ONE* **7**, (2012).
91. Ahmed, A. M. History of diabetes mellitus. *Saudi Med. J.* **23**, 373–378 (2002).
92. Drouin, P. *et al.* DIAGNOSTIC ET CLASSIFICATION DU DIABÈTE SUCRÉ LES NOUVEAUX CRITÈRES. [/data/revues/12623636/00250001/72/](#) (2008).
93. Association, A. D. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **37**, S81–S90 (2014).
94. Association, A. D. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* **28**, s4–s36 (2005).
95. Kharroubi, A. T. & Darwish, H. M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J. Diabetes* **6**, 850–867 (2015).

96. Olokoba, A. B., Obateru, O. A. & Olokoba, L. B. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med. J.* **27**, 269–273 (2012).
97. IDF diabetes atlas - 2017 Atlas. Available at: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>. (Accessed: 5th April 2018)
98. Yamagata, K. *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**, 455–458 (1996).
99. Vionnet, N. *et al.* Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* **356**, 721–722 (1992).
100. Yamagata, K. *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* **384**, 458–460 (1996).
101. Shields, B. M. *et al.* Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia* **53**, 2504–2508 (2010).
102. Karalliedde, J. & Gnudi, L. Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31**, 206–213 (2016).
103. Kampmann, U. *et al.* Gestational diabetes: A clinical update. *World J. Diabetes* **6**, 1065–1072 (2015).
104. Mellitus*, T. E. C. on the D. and C. of D. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **20**, 1183–1197 (1997).
105. Redondo, M. J., Fain, P. R. & Eisenbarth, G. S. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog. Horm. Res.* **56**, 69–89 (2001).
106. Daneman, D. Type 1 diabetes. *The Lancet* **367**, 847–858 (2006).
107. Fagot-Campagna, A. *et al.* Type 2 diabetes among North adolescents: An epidemiologic health perspective. *J. Pediatr.* **136**, 664–672 (2000).
108. Halban, P. A. *et al.* β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 1983–1992 (2014).

109. Druet, C. *et al.* Characterization of Insulin Secretion and Resistance in Type 2 Diabetes of Adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 401–404 (2006).
110. Qin, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55–60 (2012).
111. Saad, M. J. A., Santos, A. & Prada, P. O. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology* **31**, 283–293 (2016).
112. Cani, P. D. *et al.* Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* **56**, 1761–1772 (2007).
113. A Randomized Trial of Sorbinil, an Aldose Reductase Inhibitor, in Diabetic Retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* **108**, 1234–1244 (1990).
114. Wilkins, L. W. &. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. *Neurology* **56**, 1124–1124 (2001).
115. Gao, Y., Wells, L., Comer, F. I., Parker, G. J. & Hart, G. W. Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NEUTRAL, CYTOSOLIC β -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE FROM HUMAN BRAIN. *J. Biol. Chem.* **276**, 9838–9845 (2001).
116. Buse, M. G. Hexosamines, insulin resistance and the complications of diabetes: current status. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **290**, E1–E8 (2006).
117. Kuboki, K. *et al.* Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* **101**, 676–681 (2000).
118. Williams, B., Gallacher, B., Patel, H. & Orme, C. Glucose-Induced Protein Kinase C Activation Regulates Vascular Permeability Factor mRNA Expression and Peptide Production by Human Vascular Smooth Muscle Cells In Vitro. *Diabetes* **46**, 1497–1503 (1997).
119. Yerneni, K. K., Bai, W., Khan, B. V., Medford, R. M. & Natarajan, R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* **48**, 855–864 (1999).

120. Thornalley, P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* **269**, 1–11 (1990).
121. Wells-Knecht, K. J., Zyzak, D. V., Litchfield, J. E., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* **34**, 3702–3709 (1995).
122. Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1045–1050 (2008).
123. Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* **44**, 1139–1145 (1998).
124. Haddad, M. *et al.* Plasma Levels of Pentosidine, Carboxymethyl-Lysine, Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products, and Metabolic Syndrome: The Metformin Effect. *Dis. Markers* **2016**, (2016).
125. Wada, R. *et al.* Effects of OPB-9195, anti-glycation agent, on experimental diabetic neuropathy. *Eur. J. Clin. Invest.* **31**, 513–520 (2001).
126. Soulis, T. *et al.* Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* **40**, 619–628 (1997).
127. Baynes, J. W. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. *Diabetes* **40**, 405–412 (1991).
128. Forbes, J. M. *et al.* Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes* **53**, 1813–1823 (2004).
129. Yamamoto, Y. *et al.* Receptor for Advanced Glycation End Products Is a Promising Target of Diabetic Nephropathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 562–566 (2005).
130. Zong, H. *et al.* Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Müller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). *Diabetologia* **53**, 2656–2666 (2010).

131. Nakamura, N. *et al.* Increased concentration of pentosidine, an advanced glycation end product, and interleukin-6 in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **61**, 93–101 (2003).
132. Wilkinson-Berka, J. L., Agrotis, A. & Deliyanti, D. The retinal renin–angiotensin system: Roles of angiotensin II and aldosterone. *Peptides* **36**, 142–150 (2012).
133. Bai, P., Phua, K., Hardt, T., Cernadas, M. & Brodsky, B. Glycation alters collagen fibril organization. *Connect. Tissue Res.* **28**, 1–12 (1992).
134. Jensen, L. J. N. *et al.* Renal effects of a neutralising RAGE-antibody in long-term streptozotocin-diabetic mice. *J. Endocrinol.* **188**, 493–501 (2006).
135. Stracke, H. *et al.* Efficacy of benfotiamine versus thiamine on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **109**, 330–336 (2001).
136. Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Ahmed, N. & Thornalley, P. J. Accumulation of fructosyl-lysine and advanced glycation end products in the kidney, retina and peripheral nerve of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1423–1425 (2003).
137. Sugimoto, K., Nishizawa, Y., Horiuchi, S. & Yagihashi, S. Localization in human diabetic peripheral nerve of N(epsilon)-carboxymethyllysine-protein adducts, an advanced glycation endproduct. *Diabetologia* **40**, 1380–1387 (1997).
138. Wada, R. & Yagihashi, S. Role of Advanced Glycation End Products and Their Receptors in Development of Diabetic Neuropathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 598–604 (2005).
139. Bell, D. S. H. Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Care* **26**, 2949–2951 (2003).
140. Leiter, E. H., Prochazka, M. & Coleman, D. L. The non-obese diabetic (NOD) mouse. *Am. J. Pathol.* **128**, 380–383 (1987).
141. Yang, Y. & Santamaria, P. Dissecting autoimmune diabetes through genetic manipulation of non-obese diabetic mice. *Diabetologia* **46**, 1447–1464 (2003).
142. King, A. J. The use of animal models in diabetes research. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 877–894 (2012).

143. Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Increased protein damage in renal glomeruli, retina, nerve, plasma and urine and its prevention by thiamine and benfotiamine therapy in a rat model of diabetes. *Diabetologia* **53**, 1506–1516 (2010).
144. Gilbert, E. R., Fu, Z. & Liu, D. Development of a Nongenetic Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Exp. Diabetes Res.* **2011**, (2011).
145. Jariyapongskul, A., Areebambud, C., Suksamrarn, S. & Meksepralard, C. Alpha-Mangostin Attenuation of Hyperglycemia-Induced Ocular Hypoperfusion and Blood Retinal Barrier Leakage in the Early Stage of Type 2 Diabetes Rats. *BioMed Research International* (2015). doi:10.1155/2015/785826
146. Shao, M. *et al.* Additive protection by LDR and FGF21 treatment against diabetic nephropathy in type 2 diabetes model. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **309**, E45–E54 (2015).
147. Lin, Y.-J. *et al.* The protection of Rhein lysinate to liver in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 885–892 (2015).
148. Deeds, M. *et al.* Single Dose Streptozotocin Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models. *Lab. Anim.* **45**, 131–140 (2011).
149. Chen, H. *et al.* Apelin alleviates diabetes-associated endoplasmic reticulum stress in the pancreas of Akita mice. *Peptides* **32**, 1634–1639 (2011).
150. Werf, N. van der, Kroese, F. G. M., Rozing, J. & Hillebrands, J.-L. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **23**, 169–183 (2007).
151. Dufrane, D., Nenquin, M. & Henquin, J. C. Nutrient control of insulin secretion in perfused adult pig islets. */data/revues/12623636/00330006/430/* (2008).
152. Fisher, S. J. *et al.* Low-dose IGF-I has no selective advantage over insulin in regulating glucose metabolism in hyperglycemic depancreatized dogs. *J. Endocrinol.* **168**, 49–58 (2001).
153. He, S. *et al.* Treatment and risk factor analysis of hypoglycemia in diabetic rhesus monkeys. *Exp. Biol. Med.* **236**, 212–218 (2011).

154. Katsuda, Y., Ohta, T., Shinohara, M., Bin, T. & Yamada, T. Diabetic mouse models. *Open J. Anim. Sci.* **03**, 334–342 (2013).
155. Drel, V. R. *et al.* The Leptin-Deficient (ob/ob) Mouse: A New Animal Model of Peripheral Neuropathy of Type 2 Diabetes and Obesity. *Diabetes* **55**, 3335–3343 (2006).
156. Wang, B., P., C. C. & Pippin, J. J. Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* **10**, 131–145 (2014).
157. Huh, J. Y., Jung, I., Piao, L., Ha, H. & Chung, M.-H. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and adipocyte dysfunction in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017). doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.132
158. Karasawa, H., Nagata-Goto, S., Takaishi, K. & Kumagae, Y. A novel model of type 2 diabetes mellitus based on obesity induced by high-fat diet in BDF1 mice. *Metabolism* **58**, 296–303 (2009).
159. Csóka, B. *et al.* A2A adenosine receptors control pancreatic dysfunction in high-fat-diet induced obesity. *FASEB J.* fj.201700398R (2017). doi:10.1096/fj.201700398R
160. Sumiyoshi, M., Sakanaka, M. & Kimura, Y. Chronic Intake of High-Fat and High-Sucrose Diets Differentially Affects Glucose Intolerance in Mice. *J. Nutr.* **136**, 582–587 (2006).
161. Yang, Y., Smith, D. L., Keating, K. D., Allison, D. B. & Nagy, T. R. Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice: Variations in Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice. *Obesity* **22**, 2147–2155 (2014).
162. Heydemann, A. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research* (2016). doi:10.1155/2016/2902351
163. Östenson, C.-G. & Efendic, S. Islet gene expression and function in type 2 diabetes; studies in the Goto-Kakizaki rat and humans. *Diabetes Obes. Metab.* **9**, 180–186
164. Tang, S.-G. *et al.* Isosteviol ameliorates diabetic cardiomyopathy in rats by inhibiting ERK and NF- κ B signaling pathways. *J. Endocrinol.* **238**, 47–60 (2018).

165. Gugliucci, A. & Menini, T. Circulating advanced glycation peptides in streptozotocin-induced diabetic rats: Evidence for preferential modification of IgG light chains. *Life Sci.* **62**, 2141–2150 (1998).
166. Ou, J., Huang, J., Zhao, D., Du, B. & Wang, M. Protective effect of rosmarinic acid and carnosic acid against streptozotocin-induced oxidation, glycation, inflammation and microbiota imbalance in diabetic rats. *Food Funct.* **9**, 851–860 (2018).
167. Barman, S., Pradeep, S. R. & Srinivasan, K. Zinc supplementation alleviates the progression of diabetic nephropathy by inhibiting the overexpression of oxidative-stress-mediated molecular markers in streptozotocin-induced experimental rats. *J. Nutr. Biochem.* **54**, 113–129 (2018).
168. Jagtap, A. G. & Patil, P. B. Antihyperglycemic activity and inhibition of advanced glycation end product formation by *Cuminum cyminum* in streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2030–2036 (2010).
169. Barman, S. & Srinivasan, K. Zinc Supplementation Ameliorates Diabetic Cataract Through Modulation of Crystallin Proteins and Polyol Pathway in Experimental Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 1–12 (2018). doi:10.1007/s12011-018-1373-3
170. Mohammadzadeh, F., Tsoporis, J. N., Izhar, S., Desjardins, J.-F. & Parker, T. G. Deficiency of S100B confers resistance to experimental diabetes in mice. *Exp. Cell Res.* **365**, 129–137 (2018).
171. Mastrocola, R. *et al.* Accumulation of Advanced Glycation End-Products and Activation of the SCAP/SREBP Lipogenic Pathway Occur in Diet-Induced Obese Mouse Skeletal Muscle. *PLOS ONE* **10**, e0119587 (2015).
172. Zhao, Q., Jia, T. Z., Cao, Q. C., Tian, F. & Ying, W. T. A Crude 1-DNJ Extract from Home Made *Bombyx Batryticatus* Inhibits Diabetic Cardiomyopathy-Associated Fibrosis in db/db Mice and Reduces Protein N-Glycosylation Levels. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1699 (2018).
173. Iacobini, C. *et al.* FL-926-16, a novel bioavailable carnosinase-resistant carnosine derivative, prevents onset and stops progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 53–66 (2018).

174. Wang, H. *et al.* Targeted inhibition of RAGE reduces amyloid- β influx across the blood-brain barrier and improves cognitive deficits in db/db mice. *Neuropharmacology* **131**, 143–153 (2018).
175. Park, C. H. *et al.* Polyphenol isolated from Corni Fructus, 7-O-galloyl-d-sedoheptulose, modulates advanced glycation endproduct-related pathway in type 2 diabetic db/db mice. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 1270–1280 (2015).
176. Park, C. H. *et al.* Oligonol, a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee fruit, attenuates gluco-lipotoxicity-mediated renal disorder in type 2 diabetic db/db mice. *Drug Discov. Ther.* **9**, 13–22 (2015).
177. Maessen, D. E. *et al.* Delayed Intervention With Pyridoxamine Improves Metabolic Function and Prevents Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in High-Fat Diet–Induced Obese Mice. *Diabetes* **65**, 956–966 (2016).
178. Wang, H.-J. & Chiang, B.-H. Anti-diabetic effect of a traditional Chinese medicine formula. *Food Funct.* **3**, 1161–1169 (2012).
179. Sampath, C., Sang, S. & Ahmedna, M. In vitro and in vivo inhibition of aldose reductase and advanced glycation end products by phloretin, epigallocatechin 3-gallate and [6]-gingerol. *Biomed. Pharmacother.* **84**, 502–513 (2016).
180. Abdelmegeed, M. A. *et al.* Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced nonalcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **57**, 860–866 (2012).
181. Tate, J. & Ward, G. Interferences in Immunoassay. *Clin. Biochem. Rev.* **25**, 105–120 (2004).
182. Thornalley, P. J. & Rabbani, N. Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry — A user's perspective. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1840**, 818–829 (2014).
183. Phillips, S. A., Mirrlees, D. & Thornalley, P. J. Modification of the glyoxalase system in streptozotocin-induced diabetic rats: Effect of the aldose reductase inhibitor statil. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 805–811 (1993).

184. Babaei-Jadidi, R., Karachalias, N., Kupich, C., Ahmed, N. & Thornalley, P. J. High-dose thiamine therapy counters dyslipidaemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* **47**, 2235–2246 (2004).
185. Mustata, G. T. *et al.* Paradoxical Effects of Green Tea (*Camellia Sinensis*) and Antioxidant Vitamins in Diabetic Rats: Improved Retinopathy and Renal Mitochondrial Defects but Deterioration of Collagen Matrix Glycooxidation and Cross-Linking. *Diabetes* **54**, 517–526 (2005).
186. Lai, D.-W. *et al.* TPL2 (Therapeutic Targeting Tumor Progression Locus-2)/ATF4 (Activating Transcription Factor-4)/SDF1 α (Chemokine Stromal Cell-Derived Factor- α) Axis Suppresses Diabetic Retinopathy Novelty and Significance. *Circ. Res.* **121**, e37–e52 (2017).
187. Skovgaard, D. *et al.* An advanced glycation endproduct (AGE)-rich diet promotes accumulation of AGEs in Achilles tendon. *Physiol. Rep.* **5**, (2017).
188. Szwergold, B. S., Kappler, F. & Brown, T. R. Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science* **247**, 451–454 (1990).
189. Delpierre, G. *et al.* Identification, cloning, and heterologous expression of a mammalian fructosamine-3-kinase. *Diabetes* **49**, 1627–1634 (2000).
190. da-Cunha, M. V. *et al.* Increased protein glycation in fructosamine 3-kinase-deficient mice. *Biochem. J.* **399**, 257–264 (2006).
191. 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).
192. Hellwig, A., Scherber, A., Koehler, C., Hanefeld, M. & Henle, T. A new HPLC-based assay for the measurement of fructosamine-3-kinase (FN3K) and FN3K-related protein activity in human erythrocytes. *Clin. Chem. Lab. Med.* **52**, 93–101 (2013).
193. Kishabongo, A. S. *et al.* The presence of fructosamine in human aortic valves is associated with valve stiffness. *J. Clin. Pathol.* **69**, 772–776 (2016).

194. Monnier, V. M. & Wu, X. Enzymatic deglycation with amadoriase enzymes from *Aspergillus* sp. as a potential strategy against the complications of diabetes and aging. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1349–1353 (2003).
195. Silva, M. S., Gomes, R. A., Ferreira, A. E. N., Freire, A. P. & Cordeiro, C. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. *Biochem. J.* **453**, 1–15 (2013).
196. Dakin, H. D. & Dudley, H. W. An Enzyme Concerned with the Formation of Hydroxy Acids from Ketonic Aldehydes. *J. Biol. Chem.* **14**, 155–157 (1913).
197. Jowett, M. & Quastel, J. H. The glyoxalase activity of the red blood cell. *Biochem. J.* **27**, 486–498 (1933).
198. Racker, E. The Mechanism of Action of Glyoxalase. *J. Biol. Chem.* **190**, 685–696 (1951).
199. Thornalley, P. J. The glyoxalase system in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **14**, 287–371 (1993).
200. Xue, M., Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Glyoxalase in ageing. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 293–301 (2011).
201. Larsen, K., Aronsson, A. C., Marmstål, E. & Mannervik, B. Immunological comparison of glyoxalase I from yeast and mammals and quantitative determination of the enzyme in human tissues by radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol. B* **82**, 625–638 (1985).
202. Schimandle, C. M. & Vander Jagt, D. L. Isolation and kinetic analysis of the multiple forms of glyoxalase-I from human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 261–268 (1979).
203. McCann, V. J., Davis, R. E., Welborn, T. A., Constable, I. J. & Beale, D. G. Glyoxalase phenotypes in patients with diabetes mellitus. *Aust. N. Z. J. Med.* **11**, 380–382 (1981).
204. Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Glyoxalase 1 Modulation in Obesity and Diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* (2017). doi:10.1089/ars.2017.7424
205. Masania, J. *et al.* Dicarbonyl stress in clinical obesity. *Glycoconj. J.* **33**, 581–589 (2016).
206. Gale, C. P., Futers, T. S. & Summers, L. K. M. Common polymorphisms in the glyoxalase-1 gene and their association with pro-thrombotic factors. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **1**, 34–39 (2004).

207. Hollenbach, M. *et al.* Expression of glyoxalase-I is reduced in cirrhotic livers: A possible mechanism in the development of cirrhosis. *PLOS ONE* **12**, e0171260 (2017).
208. Rabbani, N., Xue, M., Weickert, M. O. & Thornalley, P. J. Multiple roles of glyoxalase 1-mediated suppression of methylglyoxal glycation in cancer biology—Involvement in tumour suppression, tumour growth, multidrug resistance and target for chemotherapy. *Semin. Cancer Biol.* **49**, 83–93 (2018).
209. Shafie, A., Xue, M., Thornalley, P. J. & Rabbani, N. Copy number variation of glyoxalase I. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 500–503 (2014).
210. Rabbani, N., Xue, M. & Thornalley, P. J. Methylglyoxal-induced dicarbonyl stress in aging and disease: first steps towards glyoxalase 1-based treatments. *Clin. Sci.* **130**, 1677–1696 (2016).
211. Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458**, 221–226 (2015).
212. Giacco, F. *et al.* Knockdown of Glyoxalase 1 Mimics Diabetic Nephropathy in Nondiabetic Mice. *Diabetes* **63**, 291–299 (2014).
213. Morcos, M. *et al.* Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **7**, 260–269 (2008).
214. Fleming, T. H. *et al.* Aging-Dependent Reduction in Glyoxalase 1 Delays Wound Healing. *Gerontology* **59**, 427–437 (2013).
215. Thornalley, P. J. *et al.* Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5432–5442 (2010).
216. Santarius, T. *et al.* GLO1—A Novel Amplified Gene in Human Cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* **49**, 711–725 (2010).
217. Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P. & Cerami, A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* **232**, 1629–1632 (1986).

218. Nyengaard, J. R. *et al.* Discordant Effects of Guanidines on Renal Structure and Function and on Regional Vascular Dysfunction and Collagen Changes in Diabetic Rats. *Diabetes* **46**, 94–106 (1997).
219. Soulis, T. *et al.* Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to aminoguanidine-mediated renoprotection in diabetic rats. *Diabetologia* **40**, 1141–1151 (1997).
220. Degenhardt, T. P. *et al.* Aminoguanidine inhibits albuminuria, but not the formation of advanced glycation end-products in skin collagen of diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **43**, 81–89 (1999).
221. Soulis, T., Cooper, M. E., Vranes, D., Bucala, R. & Jerums, G. Effects of aminoguanidine in preventing experimental diabetic nephropathy are related to the duration of treatment. *Kidney Int.* **50**, 627–634 (1996).
222. Boel, E., Selmer, J., Flodgaard, H. J. & Jensen, T. Diabetic late complications: Will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation endproduct formation hold promise? *J. Diabetes Complications* **9**, 104–129 (1995).
223. Bolton, W. K. *et al.* Randomized Trial of an Inhibitor of Formation of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. *Am. J. Nephrol.* **24**, 32–40 (2004).
224. Nagaraj, R. H. *et al.* Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch. Biochem. Biophys.* **402**, 110–119 (2002).
225. Degenhardt, T. P. *et al.* Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int.* **61**, 939–950 (2002).
226. Alderson, N. L. *et al.* The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int.* **63**, 2123–2133 (2003).
227. Williams, M. E. *et al.* Effects of Pyridoxamine in Combined Phase 2 Studies of Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes and Overt Nephropathy. *Am. J. Nephrol.* **27**, 605–614 (2007).

228. La Selva, M. *et al.* Thiamine corrects delayed replication and decreases production of lactate and advanced glycation end-products in bovine retinal and human umbilical vein endothelial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetologia* **39**, 1263–1268 (1996).
229. Rabbani, N. *et al.* High-dose thiamine therapy for patients with type 2 diabetes and microalbuminuria: a randomised, double-blind placebo-controlled pilot study. *Diabetologia* **52**, 208–212 (2009).
230. Schupp, N. *et al.* Benfotiamine reduces genomic damage in peripheral lymphocytes of hemodialysis patients. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **378**, 283 (2008).
231. Fraser, D. A. *et al.* The Effects of Long-Term Oral Benfotiamine Supplementation on Peripheral Nerve Function and Inflammatory Markers in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* **35**, 1095–1097 (2012).
232. Alkhalaf, A. *et al.* Effect of Benfotiamine on Advanced Glycation Endproducts and Markers of Endothelial Dysfunction and Inflammation in Diabetic Nephropathy. *PLoS ONE* **7**, (2012).
233. Kim, T. & Spiegel, D. A. The Unique Reactivity of N-Phenacyl-Derived Thiazolium Salts Toward α -Dicarbonyl Compounds. *Rejuvenation Res.* **16**, 43–50 (2012).
234. Hollenbach, S., Thampi, P., Viswanathan, T. & Abraham, E. C. Cleavage of in vitro and in vivo formed lens protein cross-links by a novel cross-link breaker. *Mol. Cell. Biochem.* **243**, 73–80 (2003).
235. Kass, D. A. *et al.* Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation* **104**, 1464–1470 (2001).
236. Candido, R. *et al.* A Breaker of Advanced Glycation End Products Attenuates Diabetes-Induced Myocardial Structural Changes. *Circ. Res.* **92**, 785–792 (2003).
237. Wang, Y. *et al.* sRAGE Induces Human Monocyte Survival and Differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 1822–1835 (2010).
238. Geroldi, D. *et al.* High Levels of Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products May Be a Marker of Extreme Longevity in Humans. *J. Am. Geriatr. Soc.* **54**, 1149–1150 (2006).

239. 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).
240. Giannini, C. *et al.* The possible role of esRAGE and sRAGE in the natural history of diabetic nephropathy in childhood. *Pediatr. Nephrol.* **27**, 269–275 (2012).
241. Grossin, N. *et al.* Severity of diabetic microvascular complications is associated with a low soluble RAGE level. *Diabetes Metab.* **34**, 392–395 (2008).
242. Basta, G. *et al.* High plasma levels of the soluble receptor for advanced glycation endproducts in patients with symptomatic carotid atherosclerosis. *Eur. J. Clin. Invest.* **39**, 1065–1072 (2009).
243. Jiao, L. *et al.* Advanced Glycation End-Products, Soluble Receptor for Advanced Glycation End-Products and Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **20**, 1430–1438 (2011).
244. Kalousová, M. *et al.* Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Patients With Decreased Renal Function. *Am. J. Kidney Dis.* **47**, 406–411 (2006).
245. Jabaudon, M. *et al.* Soluble form of the receptor for advanced glycation end products is a marker of acute lung injury but not of severe sepsis in critically ill patients*: *Crit. Care Med.* **39**, 480–488 (2011).
246. Pullerits, R., Bokarewa, M., Dahlberg, L. & Tarkowski, A. Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res. Ther.* **7**, R817–R824 (2005).
247. Yilmaz, Y. *et al.* Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Biochem.* **42**, 802–807 (2009).
248. 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).

249. Schmidt, A. M. *et al.* Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J. Clin. Invest.* **96**, 1395–1403 (1995).
250. Sakaguchi, T. *et al.* Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J. Clin. Invest.* **111**, 959–972 (2003).
251. Naka, Y. *et al.* RAGE Axis: Animal Models and Novel Insights Into the Vascular Complications of Diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1342–1349 (2004).
252. Wendt, T. *et al.* Glucose, Glycation, and RAGE: Implications for Amplification of Cellular Dysfunction in Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1383–1395 (2003).
253. Goova, M. T. *et al.* Blockade of Receptor for Advanced Glycation End-Products Restores Effective Wound Healing in Diabetic Mice. *Am. J. Pathol.* **159**, 513–525 (2001).
254. Wang, Q. *et al.* Blocking AGE-RAGE Signaling Improved Functional Disorders of Macrophages in Diabetic Wound. *J. Diabetes Res.* **2017**, (2017).
255. 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).
256. Burstein, A. H. *et al.* Development of Azeliragon, an Oral Small Molecule Antagonist of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts, for the Potential Slowing of Loss of Cognition in Mild Alzheimer's Disease. *J. Prev. Alzheimers Dis.* **5**, 149–154 (2018).
257. Sabbagh, M. N. *et al.* PF-04494700, an Oral Inhibitor of Receptor For Advanced Glycation End Products (RAGE), in Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **25**, 206–212 (2011).
258. Guilbaud, A., Niquet-Leridon, C., Boulanger, E. & Tessier, F. J. How Can Diet Affect the Accumulation of Advanced Glycation End-Products in the Human Body? *Foods* **5**, (2016).
259. Whitcomb, E. A., Chiu, C.-J. & Taylor, A. Dietary glycemia as a determinant of health and longevity. *Mol. Aspects Med.* **46**, 14–20 (2015).

260. Löbner, J., Degen, J. & Henle, T. Creatine Is a Scavenger for Methylglyoxal under Physiological Conditions via Formation of N-(4-Methyl-5-oxo-1-imidazolin-2-yl)sarcosine (MG-HCr). *J. Agric. Food Chem.* **63**, 2249–2256 (2015).
261. Javadi, S., Yousefi, R., Hosseinkhani, S., Tamaddon, A.-M. & Uversky, V. N. Protective effects of carnosine on dehydroascorbate-induced structural alteration and opacity of lens crystallins: important implications of carnosine pleiotropic functions to combat cataractogenesis. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **35**, 1766–1784 (2017).
262. Andrew H. Knoll & Elso S. Barghoorn. Archean Microfossils Showing Cell Division from the Swaziland System of South Africa. *Sci. New Ser.* **198**, 396–398 (1977).
263. Rothschild, L. J. & Mancinelli, R. L. Life in extreme environments. **409**, 10 (2001).
264. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
265. Sommer, F. & Bäckhed, F. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 227–238 (2013).
266. Mackie, R. I. Mutualistic Fermentative Digestion in the Gastrointestinal Tract: Diversity and Evolution. *Integr. Comp. Biol.* **42**, 319–326 (2002).
267. Consortium, T. H. M. P. *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214 (2012).
268. Frank, D. N. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13780–13785 (2007).
269. Mariat, D. *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* **9**, 123 (2009).
270. Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., He, T., Degener, J. E. & Welling, G. W. Extensive Set of 16S rRNA-Based Probes for Detection of Bacteria in Human Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2982–2990 (2002).

271. Ramezani, A. & Raj, D. S. The Gut Microbiome, Kidney Disease, and Targeted Interventions. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 657–670 (2014).
272. Dueñas, M. *et al.* Studies on Modulation of Gut Microbiota by Wine Polyphenols: From Isolated Cultures to Omic Approaches. *Antioxidants* **4**, 1–21 (2015).
273. Singhi, S. C. & Baranwal, A. Probiotic use in the critically ILL. *Indian J. Pediatr.* **75**, 621–627 (2008).
274. Xu, J. & Gordon, J. I. Honor thy symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10452–10459 (2003).
275. Grover, M. & Kashyap, P. C. Germ free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* **26**, 745–748 (2014).
276. McFarland, L. V. Normal flora: diversity and functions. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**, 193–207 (2000).
277. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **90**, 859–904 (2010).
278. Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z. & Li, L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* **3**, 71–82 (2017).
279. Macfarlane, S. & Macfarlane, G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 67–72 (2003).
280. Gao, Z. *et al.* Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. *Diabetes* **58**, 1509–1517 (2009).
281. Davie, J. R. Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. *J. Nutr.* **133**, 2485S–2493S (2003).
282. Lin, H. V. *et al.* Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLoS ONE* **7**, (2012).
283. Wolever, T. M., Brighenti, F., Royall, D., Jenkins, A. L. & Jenkins, D. J. Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects. *Am. J. Gastroenterol.* **84**, 1027–1033 (1989).
284. Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J. & Duncan, S. H. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol. Res.* **69**, 52–60 (2013).

285. Cebra, J. J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 1046s-1051s (1999).
286. Thaïss, C. A., Zmora, N., Levy, M. & Elinav, E. The microbiome and innate immunity. *Nature* **535**, 65–74 (2016).
287. Francino, M. P. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Front. Microbiol.* **6**, (2016).
288. Fouhy, F., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. & Cotter, P. D. A degenerate PCR-based strategy as a means of identifying homologues of aminoglycoside and β -lactam resistance genes in the gut microbiota. *BMC Microbiol.* **14**, 25 (2014).
289. Marra, F., Patrick, D. M., Chong, M. & Bowie, W. R. Antibiotic use among children in British Columbia, Canada. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 830–839 (2006).
290. Blaser, M. J. Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases. *EMBO Rep.* **7**, 956–960 (2006).
291. Strachan, D. P. Family size, infection and atopy: the first decade of the ‘hygiene hypothesis’. *Thorax* **55**, S2–S10 (2000).
292. Turnbaugh, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–1031 (2006).
293. Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F. & Gordon, J. I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 979–984 (2007).
294. Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I. Marked alterations in the distal gut microbiome linked to diet-induced obesity. *Cell Host Microbe* **3**, 213–223 (2008).
295. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022–1023 (2006).
296. Schwartz, A. *et al.* Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity* **18**, 190–195 (2010).

297. Schwartz, A., Lehmann, U., Jacobasch, G. & Blaut, M. Influence of resistant starch on the SCFA production and cell counts of butyrate-producing Eubacterium spp. in the human intestine. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 157–162 (2002).
298. Duncan, S. H. *et al.* Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int. J. Obes.* **32**, 1720–1724 (2008).
299. Nicholson, J. K. *et al.* Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science* **336**, 1262–1267 (2012).
300. Hellwig, M., Matthes, R., Peto, A., Löbner, J. & Henle, T. N- ϵ -fructosyllysine and N- ϵ -carboxymethyllysine, but not lysinoalanine, are available for absorption after simulated gastrointestinal digestion. *Amino Acids* **46**, 289–299 (2014).
301. 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**, 1700118 (2017).
302. Qu, W. *et al.* Microbiome-metabolomics Analysis of the Impacts of Long-term Dietary Advanced Glycation End Products Consumption on the C57BL/6 Mouse Fecal Microbiota and Metabolite Perturbation. *J. Agric. Food Chem.* (2018). doi:10.1021/acs.jafc.8b01466
303. Helou, C. *et al.* Insights into bread melanoidins: fate in the upper digestive tract and impact on the gut microbiota using in vitro systems. *Food Funct.* **6**, 3737–3745 (2015).
304. Borrelli, R. C. & Fogliano, V. Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 673–678 (2005).
305. Blaut, M. Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *Proc. Nutr. Soc.* **74**, 227–234 (2015).
306. Vrieze, A. *et al.* Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* **143**, 913-916.e7 (2012).
307. Sun, L. *et al.* A Marker of Endotoxemia Is Associated With Obesity and Related Metabolic Disorders in Apparently Healthy Chinese. *Diabetes Care* **33**, 1925–1932 (2010).
308. Utschneider, K. M., Kratz, M., Damman, C. J. & Hullarg, M. Mechanisms Linking the Gut Microbiome and Glucose Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 1445–1454 (2016).

309. Cani, P. D. *et al.* Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **50**, 2374–2383 (2007).
310. Resta-Lenert, S. & Barrett, K. E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* **52**, 988–997 (2003).
311. Jayashree, B. *et al.* Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* **388**, 203–210 (2014).
312. Zhang, D. *et al.* Circulating zonulin levels in newly diagnosed Chinese type 2 diabetes patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **106**, 312–318 (2014).
313. Horton, F., Wright, J., Smith, L., Hinton, P. J. & Robertson, M. D. Increased intestinal permeability to oral chromium (51Cr) -EDTA in human Type 2 diabetes. *Diabet. Med.* **31**, 559–563 (2014).
314. Schiffrin, E. J. *et al.* Probiotic yogurt in the elderly with intestinal bacterial overgrowth: endotoxaemia and innate immune functions. *Br. J. Nutr.* **101**, 961–966 (2008).
315. Resta-Lenert, S. & Barrett, K. E. Probiotics and Commensals Reverse TNF- α - and IFN- γ -Induced Dysfunction in Human Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology* **130**, 731–746 (2006).
316. Ma, J., Zhou, Q. & Li, H. Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanisms and Therapy. *Nutrients* **9**, (2017).
317. Younossi, Z. M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73–84 (2016).
318. Day, C. P. & James, O. F. Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’? *Gastroenterology* **114**, 842–845 (1998).
319. Bäckhed, F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15718–15723 (2004).
320. Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* **115**, 1111–1119 (2005).

321. Erridge, C., Attina, T., Spickett, C. M. & Webb, D. J. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 1286–1292 (2007).
322. Harte, A. L. *et al.* High Fat Intake Leads to Acute Postprandial Exposure to Circulating Endotoxin in Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care* **35**, 375–382 (2012).
323. Corbin, K. D. & Zeisel, S. H. Choline Metabolism Provides Novel Insights into Non-alcoholic Fatty Liver Disease and its Progression. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **28**, 159–165 (2012).
324. Simenhoff, M. L. *et al.* Biomodulation of the toxic and nutritional effects of small bowel bacterial overgrowth in end-stage kidney disease using freeze-dried *Lactobacillus acidophilus*. *Miner. Electrolyte Metab.* **22**, 92–96 (1996).
325. Magnusson, M., Magnusson, K. E., Sundqvist, T. & Denneberg, T. Increased intestinal permeability to differently sized polyethylene glycols in uremic rats: effects of low- and high-protein diets. *Nephron* **56**, 306–311 (1990).
326. Magnusson, M., Magnusson, K. E., Sundqvist, T. & Denneberg, T. Impaired intestinal barrier function measured by differently sized polyethylene glycols in patients with chronic renal failure. *Gut* **32**, 754–759 (1991).
327. Poesen, R. *et al.* Associations of Soluble CD14 and Endotoxin with Mortality, Cardiovascular Disease, and Progression of Kidney Disease among Patients with CKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **10**, 1525–1533 (2015).
328. Raj, D., Shah, V., Rambod, M., Kovesdy, C. P. & Kalantar-Zadeh, K. Association of Soluble Endotoxin Receptor CD14 and Mortality among Patients Undergoing Hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **54**, 1062–1071 (2009).
329. Lin, C.-J. *et al.* p-cresylsulfate and indoxyl sulfate level at different stages of chronic kidney disease. *J. Clin. Lab. Anal.* **25**, 191–197 (2011).

330. Wu, I.-W. *et al.* p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **26**, 938–947 (2011).
331. Satoh, M. *et al.* Uremic toxins overload accelerates renal damage in a rat model of chronic renal failure. *Nephron Exp. Nephrol.* **95**, e111-118 (2003).
332. McIntyre, C. W. *et al.* Circulating Endotoxemia: A Novel Factor in Systemic Inflammation and Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **6**, 133–141 (2011).
333. Feroze, U. *et al.* Examining Associations of Circulating Endotoxin with Nutritional Status, Inflammation and Mortality in Hemodialysis Patients. *J. Ren. Nutr.* **22**, 317–326 (2012).
334. Afric, R. F. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365–378 (1989).
335. Morelli, L. & Capurso, L. FAO/WHO Guidelines on Probiotics: 10 Years Later. *J. Clin. Gastroenterol.* **46**, S1 (2012).
336. Kechagia, M. *et al.* Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutr.* **2013**, (2013).
337. Stenman, L. k. *et al.* Potential probiotic *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Benef. Microbes* **5**, 437–445 (2014).
338. Konstantinov, S. R. *et al.* S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19474–19479 (2008).
339. Fooladi, A. A. I., Hosseini, H. M., Nourani, M. R., Khani, S. & Alavian, S. M. Probiotic as a Novel Treatment Strategy Against Liver Disease. *Hepat. Mon.* **13**, (2012).
340. Armani, R. G. *et al.* Gut Microbiome in Chronic Kidney Disease. *Curr. Hypertens. Rep.* **19**, 29 (2017).
341. Prakash, S. & Chang, T. M. Microencapsulated genetically engineered live *E. coli* DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats. *Nat. Med.* **2**, 883–887 (1996).

342. Ranganathan, N. *et al.* Probiotic Amelioration of Azotemia in 5/6th Nephrectomized Sprague-Dawley Rats. *Sci. World J.* **5**, 652–660 (2005).
343. Takayama, F., Taki, K. & Niwa, T. Bifidobacterium in gastro-resistant seamless capsule reduces serum levels of indoxyl sulfate in patients on hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* **41**, S142–S145 (2003).
344. Taki, K., Takayama, F. & Niwa, T. Beneficial effects of Bifidobacteria in a gastroresistant seamless capsule on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *J. Ren. Nutr. Off. J. Counc. Ren. Nutr. Natl. Kidney Found.* **15**, 77–80 (2005).
345. Natarajan, R. *et al.* Randomized Controlled Trial of Strain-Specific Probiotic Formulation (Renadyl) in Dialysis Patients. *BioMed Res. Int.* **2014**, (2014).
346. Wang, I.-K. *et al.* The effect of probiotics on serum levels of cytokine and endotoxin in peritoneal dialysis patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Benef. Microbes* **6**, 423–430 (2015).
347. Ranganathan, N. *et al.* Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial in Canada. *Curr. Med. Res. Opin.* **25**, 1919–1930 (2009).
348. Ranganathan, N. *et al.* Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease. *Adv. Ther.* **27**, 634–647 (2010).
349. Miranda Alatríste, P. V., Urbina Arronte, R., Gómez Espinosa, C. O. & Espinosa Cuevas, M. de los Á. Effect of probiotics on human blood urea levels in patients with chronic renal failure. *Nutr. Hosp.* **29**, 582–590 (2014).
350. Park, K.-Y., Kim, B. & Hyun, C.-K. Lactobacillus rhamnosus GG improves glucose tolerance through alleviating ER stress and suppressing macrophage activation in db/db mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **56**, 240–246 (2015).
351. Ritze, Y. *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG Protects against Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *PLoS ONE* **9**, (2014).

352. Kim, S.-W., Park, K.-Y., Kim, B., Kim, E. & Hyun, C.-K. Lactobacillus rhamnosus GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 258–263 (2013).
353. Wang, J. *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* **9**, 1–15 (2015).
354. Naito, E. *et al.* Beneficial effect of oral administration of Lactobacillus casei strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 650–657
355. Asgharzadeh, F., Tanomand, A., Ashoori, M. R., Asgharzadeh, A. & Zarghami, N. Investigating the effects of Lactobacillus casei on some biochemical parameters in diabetic mice. *J. Endocrinol. Metab. Diabetes South Afr.* **22**, 47–50 (2017).
356. Chen, P. *et al.* Antidiabetic effect of Lactobacillus casei CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Nutrition* **30**, 1061–1068 (2014).
357. Wang, G., Li, X., Zhao, J., Zhang, H. & Chen, W. Lactobacillus casei CCFM419 attenuates type 2 diabetes via a gut microbiota dependent mechanism. *Food Funct.* **8**, 3155–3164 (2017).
358. Plaza-Diaz, J. *et al.* Effects of Lactobacillus paracasei CNCM I-4034, Bifidobacterium breve CNCM I-4035 and Lactobacillus rhamnosus CNCM I-4036 on Hepatic Steatosis in Zucker Rats. *PLoS ONE* **9**, (2014).
359. Park, D.-Y. *et al.* Supplementation of Lactobacillus curvatus HY7601 and Lactobacillus plantarum KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity. *PLoS ONE* **8**, (2013).
360. Ejtahed, H. S. *et al.* Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* **28**, 539–543 (2012).
361. Simon, M.-C. *et al.* Intake of Lactobacillus reuteri Improves Incretin and Insulin Secretion in Glucose-Tolerant Humans: A Proof of Concept. *Diabetes Care* **38**, 1827–1834 (2015).

362. Bahmani, F. *et al.* The Consumption of Synbiotic Bread Containing *Lactobacillus sporogenes* and Inulin Affects Nitric Oxide and Malondialdehyde in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J. Am. Coll. Nutr.* **35**, 506–513 (2016).
363. Hove, K. D. *et al.* Effects of 12 weeks of treatment with fermented milk on blood pressure, glucose metabolism and markers of cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes: a randomised double-blind placebo-controlled study. *Eur. J. Endocrinol.* **172**, 11–20 (2015).
364. Firouzi, S., Majid, H. A., Ismail, A., Kamaruddin, N. A. & Barakatun-Nisak, M.-Y. Effect of multi-strain probiotics (multi-strain microbial cell preparation) on glycemic control and other diabetes-related outcomes in people with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Eur. J. Nutr.* **56**, 1535–1550 (2017).
365. Raoult, D. Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 631–634 (2008).
366. Chaucheyras-Durand, F. & Durand, H. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef. Microbes* **1**, 3–9 (2009).
367. Lesmeister, K. E., Heinrichs, A. J. & Gabler, M. T. Effects of Supplemental Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Culture on Rumen Development, Growth Characteristics, and Blood Parameters in Neonatal Dairy Calves. *J. Dairy Sci.* **87**, 1832–1839 (2004).
368. Yun, S. i., Park, H. o. & Kang, J. h. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1681–1686 (2009).
369. Xin, J. *et al.* Preventing non-alcoholic fatty liver disease through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by attenuating inflammation and mitochondrial injury and improving gut environment in obese mice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 6817–6829 (2014).
370. Lu, Y.-C., Yin, L.-T., Chang, W.-T. & Huang, J.-S. Effect of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 treatment on renal fibrosis in diabetic rats. *J. Biosci. Bioeng.* (2010).

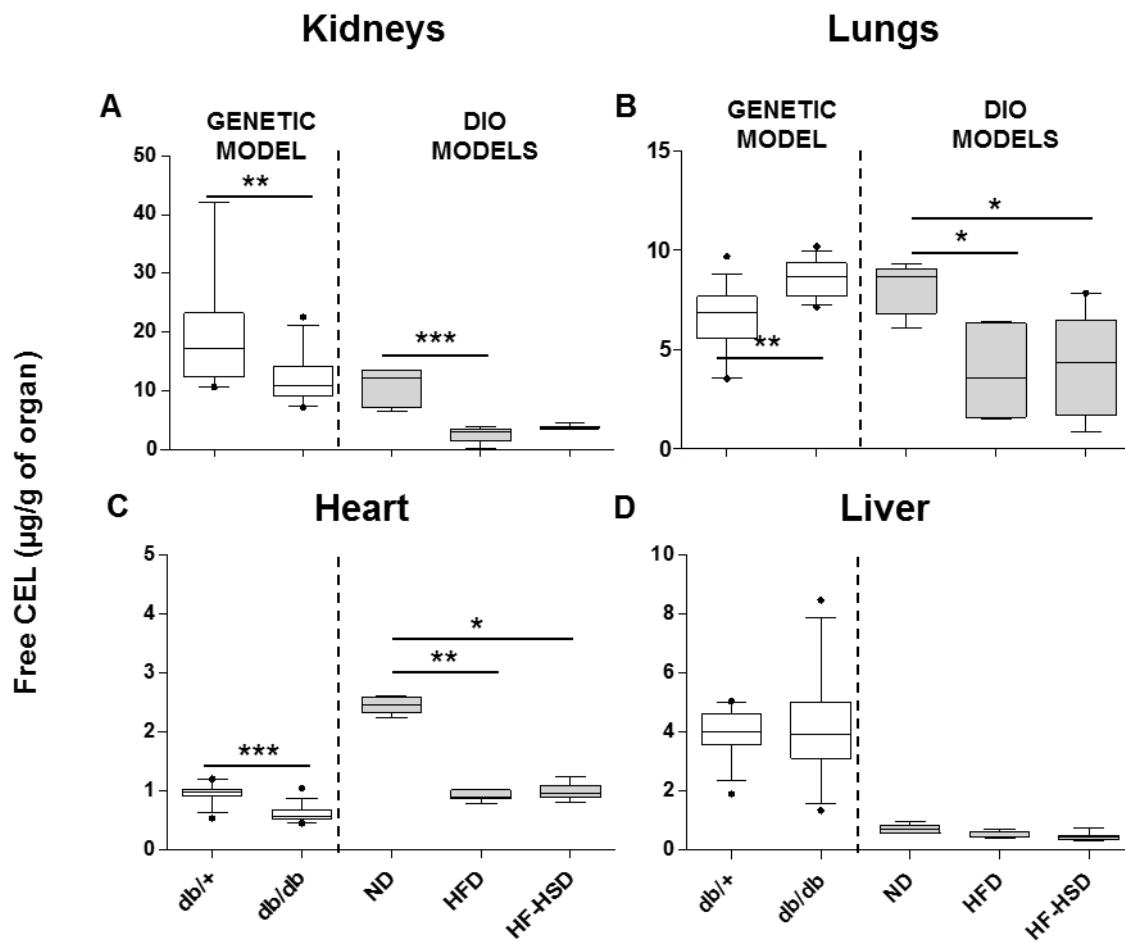
371. Hsieh, F.-C. *et al.* Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutr. Metab.* **10**, 35 (2013).
372. Tabuchi, M. *et al.* Antidiabetic Effect of *Lactobacillus* GG in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1421–1424 (2003).
373. Everard, A., Matamoros, S., Geurts, L., Delzenne, N. M. & Cani, P. D. *Saccharomyces boulardii* Administration Changes Gut Microbiota and Reduces Hepatic Steatosis, Low-Grade Inflammation, and Fat Mass in Obese and Type 2 Diabetic db/db Mice. *mBio* **5**, (2014).
374. Lei, K. *et al.* Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* B10 on biochemical and molecular parameters in the serum and liver of high-fat diet-induced obese mice. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **16**, 487–495 (2015).
375. Gauffin Cano, P., Santacruz, A., Moya, Á. & Sanz, Y. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 Ameliorates Metabolic and Immunological Dysfunction in Mice with High-Fat-Diet Induced Obesity. *PLoS ONE* **7**, (2012).
376. Zhao, X. *et al.* The Obesity and Fatty Liver Are Reduced by Plant-Derived *Pediococcus pentosaceus* LP28 in High Fat Diet-Induced Obese Mice. *PLoS ONE* **7**, (2012).
377. Yoda, K. *et al.* A combination of probiotics and whey proteins enhances anti-obesity effects of calcium and dairy products during nutritional energy restriction in aP2-agouti transgenic mice. *Br. J. Nutr.* **113**, 1689–1696 (2015).
378. Yoo, S.-R. *et al.* Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in Combination Alter Hepatic Lipid Metabolism and Suppress Diet-Induced Obesity. *Obesity* **21**, 2571–2578
379. Tajadadi-Ebrahimi, M. *et al.* Effects of Daily Consumption of Synbiotic Bread on Insulin Metabolism and Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein among Diabetic Patients: A Double-Blind, Randomized, Controlled Clinical Trial. *Ann. Nutr. Metab.* **65**, 34–41 (2014).
380. Mazloom, Z., Yousefinejad, A. & Dabbaghmanesh, M. H. Effect of Probiotics on Lipid Profile, Glycemic Control, Insulin Action, Oxidative Stress, and Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes: A Clinical Trial. *Iran. J. Med. Sci.* **38**, 38–43 (2013).

381. Asemi, Z., Zare, Z., Shakeri, H., Sabihi, S. & Esmailzadeh, A. Effect of Multispecies Probiotic Supplements on Metabolic Profiles, hs-CRP, and Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes. *Ann. Nutr. Metab.* **63**, 1–9 (2013).
382. Mohamadshahi, M. *et al.* Effects of probiotic yogurt consumption on lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized controlled clinical trial. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* **19**, 531–536 (2014).
383. Mikelsaar, M. & Zilmer, M. Lactobacillus fermentum ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb. Ecol. Health Dis.* **21**, 1–27 (2009).
384. Songisepp, E. *et al.* A New Probiotic Cheese with Antioxidative and Antimicrobial Activity. *J. Dairy Sci.* **87**, 2017–2023 (2004).
385. Truusalu, K. *et al.* The influence of antibacterial and antioxidative probiotic lactobacilli on gut mucosa in a mouse model of *Salmonella* infection. *Microb. Ecol. Health Dis.* **16**, 180–187 (2004).
386. Truusalu, K. *et al.* Eradication of Salmonella Typhimurium infection in a murine model of typhoid fever with the combination of probiotic Lactobacillus fermentum ME-3 and ofloxacin. *BMC Microbiol.* **8**, 132 (2008).
387. Songisepp, E. *et al.* Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. *Nutr. J.* **4**, 22 (2005).
388. Kaur, S. *et al.* Successful management of mild atopic dermatitis in adults with probiotics and emollients. *Open Med.* **3**, (2008).
389. Stegen, S. *et al.* Plasma carnosine, but not muscle carnosine, attenuates high-fat diet-induced metabolic stress. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **40**, 868–876 (2015).
390. Ishimoto, T. *et al.* High Fat and High Sucrose (Western) Diet Induce Steatohepatitis that is Dependent on Fructokinase. *Hepatol. Baltim. Md* **58**, 1632–1643 (2013).
391. Ahmed, N., Babaei-Jadidi, R., Howell, S. K., Beisswenger, P. J. & Thornalley, P. J. Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia* **48**, 1590–1603 (2005).

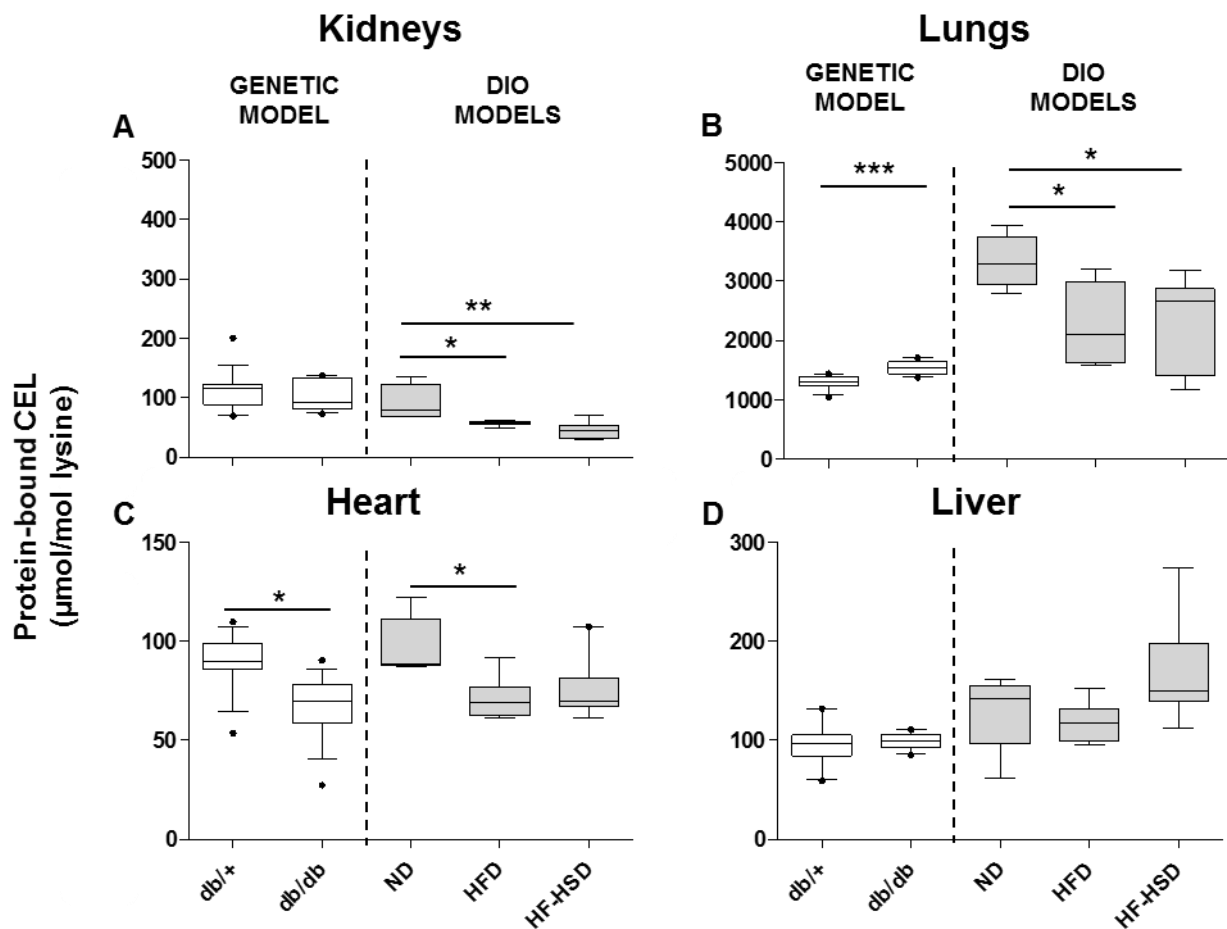
392. Sell, D. R., Kleinman, N. R. & Monnier, V. M. Longitudinal determination of skin collagen glycation and glycooxidation rates predicts early death in C57BL/6NNIA mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14**, 145–156 (2000).
393. Erbersdobler, H. F. & Somoza, V. Forty years of furosine – Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 423–430 (2007).
394. Smedsrød, B., Melkko, J., Araki, N., Sano, H. & Horiuchi, S. Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem. J.* **322**, 567–573 (1997).
395. Ahmed, N. *et al.* Processing of protein glycation, oxidation and nitrosation adducts in the liver and the effect of cirrhosis. *J. Hepatol.* **41**, 913–919 (2004).
396. Gaens, K. H. J. *et al.* Endogenous formation of N ϵ -(carboxymethyl)lysine is increased in fatty livers and induces inflammatory markers in an in vitro model of hepatic steatosis. *J. Hepatol.* **56**, 647–655 (2012).
397. Šebeková, K., Kupčová, V., Schinzel, R. & Heidland, A. Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis – amelioration by liver transplantation. *J. Hepatol.* **36**, 66–71 (2002).
398. Yagmur, E. *et al.* Elevation of N ϵ -(carboxymethyl)lysine-modified advanced glycation end products in chronic liver disease is an indicator of liver cirrhosis. *Clin. Biochem.* **39**, 39–45 (2006).
399. Zuwała-Jagiełło, J., Pazgan-Simon, M., Simon, K. & Warwas, M. Elevated advanced oxidation protein products levels in patients with liver cirrhosis. *Acta Biochim. Pol.* **56**, 679–685 (2009).
400. Eriksen, C. *et al.* Systemic stiffening of mouse tail tendon is related to dietary advanced glycation end products but not high-fat diet or cholesterol. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **117**, 840–847 (2014).
401. Everson, S. A. *et al.* Weight gain and the risk of developing insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* **21**, 1637–1643 (1998).

402. Allin, K. H., Nielsen, T. & Pedersen, O. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol.* **172**, R167–R177 (2015).
403. Viau, A. *et al.* Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **120**, 4065–4076 (2010).
404. Mihailović, M. *et al.* Oral administration of probiotic *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 attenuates diabetes-induced liver and kidney damage in rats. *J. Funct. Foods* **38**, 427–437 (2017).
405. Buckley, S. T. & Ehrhardt, C. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and the Lung. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, (2010).

ANNEXES

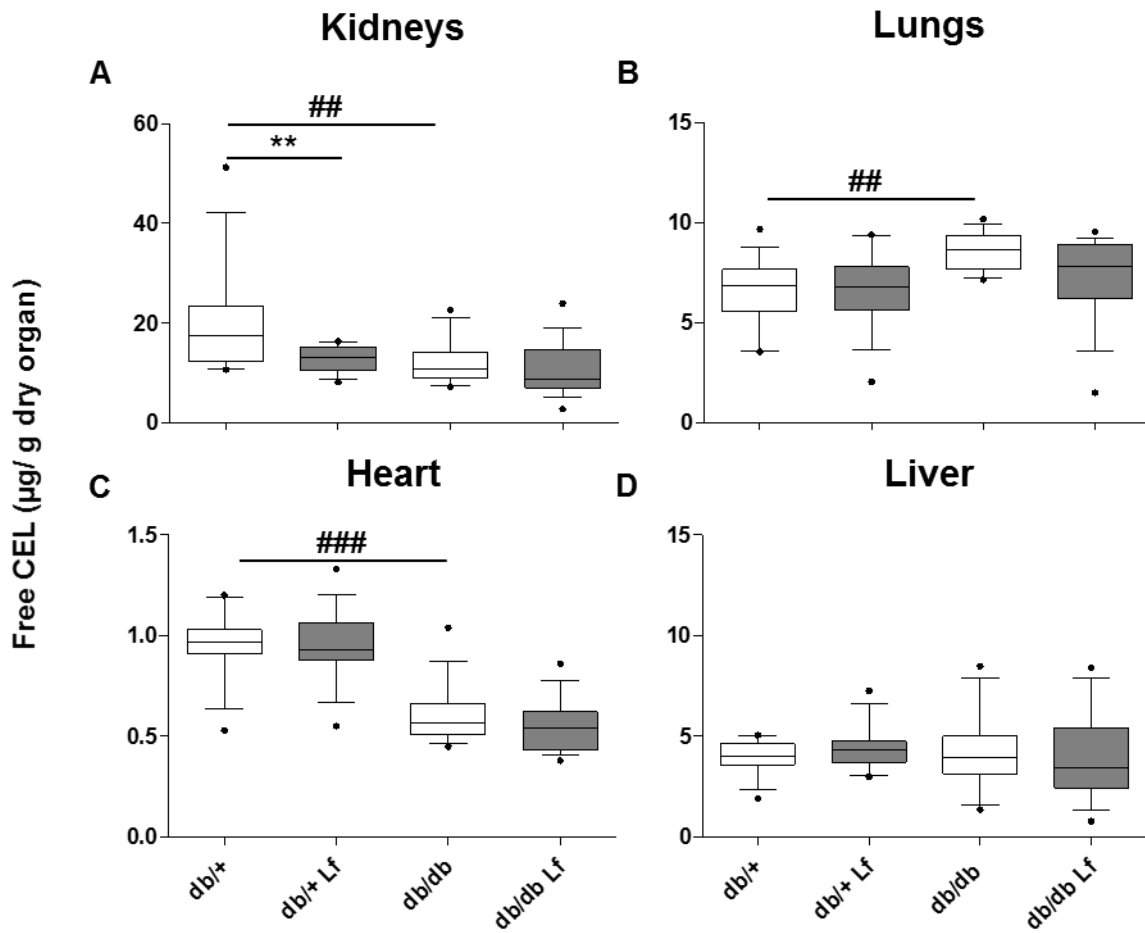


Annexe 1 Concentrations of free carboxyethyllysine (CEL) expressed in µg/g of dry organ in kidneys (A), lungs (B), heart (C) and liver (D). The genetic model (white boxes, 22 weeks old) compares wild type (*db/+*) with *db/db* mice (both n=15). The DIO models (grey boxes, 34 weeks old) compares wild type mice fed a normal diet (ND; n=5), a high-fat diet (HFD; n=7) or a high-fat, high-sucrose diet (HF-HSD; n=9). Whisker boxes, 10-90 percentile, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Wilcoxon test was used to compare *db/db* mice with their controls; a Kruskal Wallis test for multiple comparisons was used to compare HFD and HF-HSD groups with the ND group.



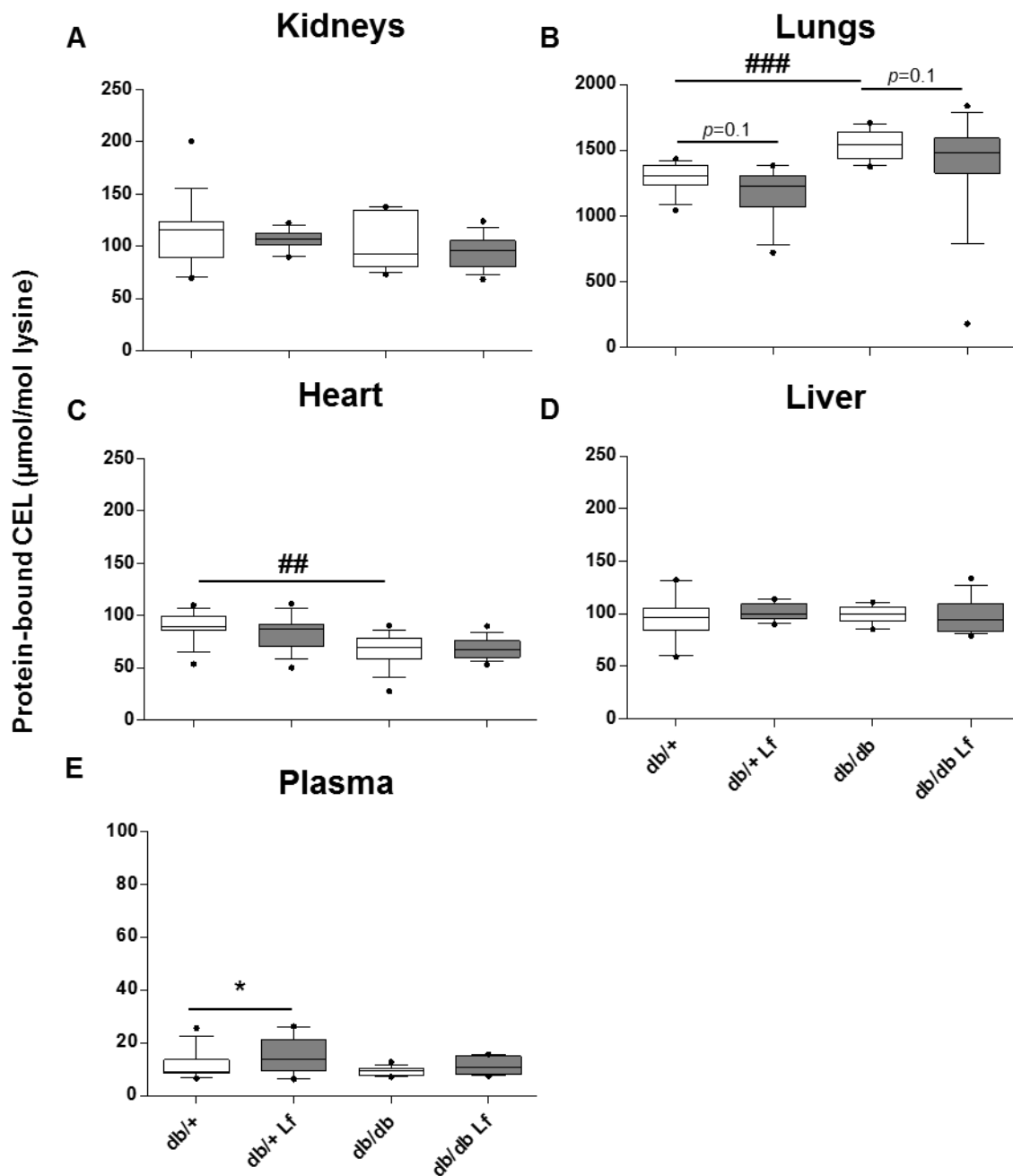
Annexe 2 Concentrations of protein-bound carboxyethyllysine (CEL) expressed in μmol/mol of lysine in kidneys (A), lungs (B), heart (C) and liver (D). The genetic model (white boxes, 22 weeks old) compares wild type (*db/+*) with *db/db* mice (both $n=15$). The DIO models (grey boxes, 34 weeks old) compares wild type mice fed a normal diet (ND; $n=5$), a high-fat diet (HFD; $n=7$) or a high-fat, high-sucrose diet (HF-HSD; $n=9$).

Whisker boxes, 10-90 percentile, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Wilcoxon test was used to compare *db/db* mice with their controls; a Kruskal Wallis test for multiple comparisons was used to compare HFD and HF-HSD groups with the ND group.



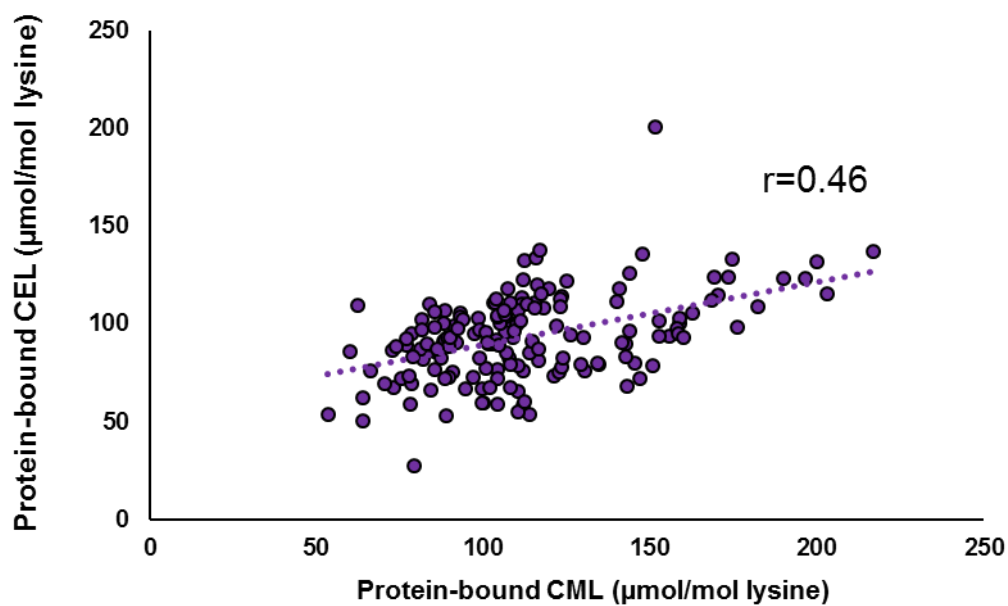
Annexe 3 Concentrations of free carboxyethyllysine (CEL) expressed in $\mu\text{g/g}$ of dry organ in kidneys (A), lungs (B), heart (C) and liver (D). Untreated WT (*db/+*; n=15) and diabetic mice (*db/db*; n=14 – white boxes) were compared with treated WT *Lf* (*db/+ Lf*; n=14) and diabetic *Lf* mice (*db/db Lf*; n=15 – dark boxes).

Whisker boxes, 10-90 percentile, « * » denotes comparison of untreated with treated mice while « # » denotes a comparison of *db/db* with *db/+* mice, ** or ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. Wilcoxon tests were used to compare treated with untreated groups.

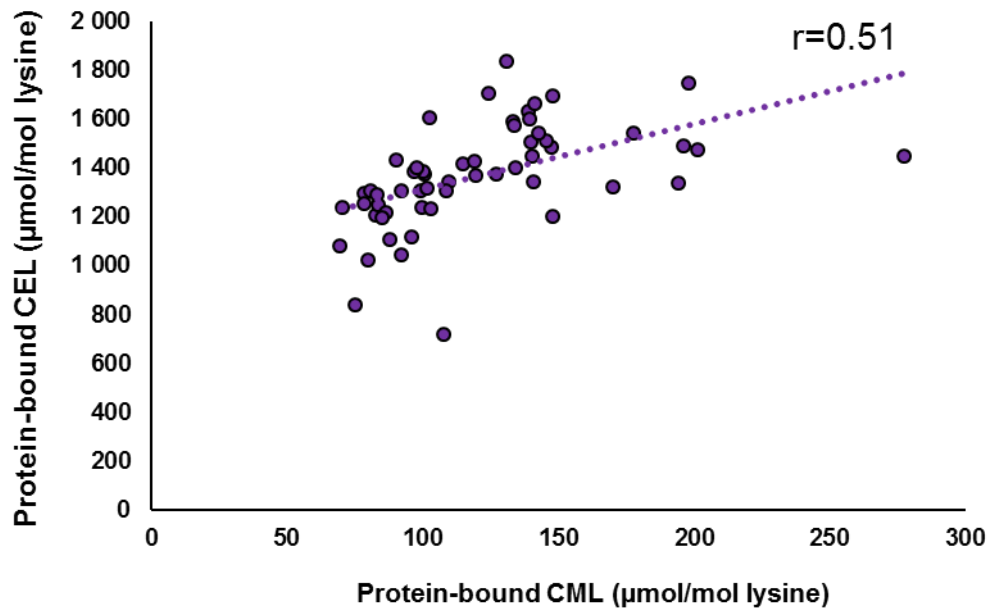


Annexe 4 Concentrations of protein-bound carboxyethyllysine (CEL) expressed in $\mu\text{mol/mol}$ of lysine in kidneys (A), lungs (B), heart (C), liver (D) and plasma (E). Untreated WT (*db/+*; n=15) and diabetic mice (*db/db*; n=14 – white boxes) were compared with treated WT *Lf* (*db/+ Lf*; n=14) and diabetic *Lf* mice (*db/db Lf*; n=15 – dark boxes).

Whisker boxes, 10-90 percentile, « * » denotes comparison of untreated with treated mice while « # » denotes a comparison of *db/db* with *db/+* mice, * $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ### $p < 0.001$. Wilcoxon tests were used to compare treated with untreated groups.



Annexe 5 Corrélation entre les concentrations de la carboxyéthyllysine (CEL) et de la carboxyméthyllysine (CML) exprimées en µmol/mol de lysine. Les points correspondent à l'ensemble des souris WT (*db/+* ; n=15) et diabétiques (*db/db* ; n=14) traitées ou non par le *Lactobacillus fermentum* ME-3, dans trois des quatre organes d'intérêt (reins, coeur, foie).



Annexe 6 Corrélation entre les concentrations de la carboxyéthyllysine (CEL) et de la carboxyméthyllysine (CML) exprimées en $\mu\text{mol/mol}$ de lysine. Les points correspondent à l'ensemble des souris WT (*db/+* ; $n=15$) et diabétiques (*db/db* ; $n=14$) traitées ou non par le *Lactobacillus fermentum* ME-3, dans les poumons.