



ACADÉMIE NATIONALE DE PHARMACIE

SANTÉ PUBLIQUE - MÉDICAMENT - PRODUITS DE SANTÉ - BIOLOGIE - SANTÉ ET ENVIRONNEMENT

Fondée le 3 août 1803 sous le nom de Société de Pharmacie de Paris
Reconnue d'utilité publique le 5 octobre 1877

Compte-rendu de la séance thématique

« Glycation des protéines - La réaction de Maillard »

Mercredi 22 janvier 2014

Accueil par Jean-Pierre FOUCHER, *Président de l'Académie nationale de Pharmacie*

Le Président Jean-Pierre FOUCHER ouvre la séance et remercie Jean-Luc WAUTIER, artisan de cette séance, en soulignant que les nouveautés présentées au cours de cette séance vont clarifier les données sur les produits de glycation.

Introduction générale par Jean-Luc WAUTIER

Jean-Luc WAUTIER remercie l'Académie et les orateurs, tous des spécialistes des produits de glycation. L'idée d'une séance thématique sur la réaction de Maillard lui est venue, avec François TRIVIN, à l'occasion du centième anniversaire de la communication de L.C. Maillard à l'Académie des Sciences, le 23 décembre 1912.

« *Les produits de glycation avancée en pathologie humaine* »

Pr Jean-Luc WAUTIER, *Faculté de Médecine, Université Denis Diderot Paris, membre correspondant de l'Académie nationale de Pharmacie*

La terminologie de ces produits a beaucoup changé depuis qu'A. GAUTIER insistait sur l'intérêt de ces glycotoxines. Les produits de glycation avancée (AGE) résultent de la fixation d'un sucre sur la fonction NH₂ libre d'un acide aminé d'une protéine ou lipoprotéine, le plus souvent une lysine ou une arginine. Cette réaction se déroule sans participation enzymatique, elle est très dépendante du temps d'exposition au sucre et de la concentration du sucre. A la suite de cette première étape, un réarrangement moléculaire a lieu, réarrangement dit d'Amadori qui est lui-même suivi d'une réaction complexe, aboutissant à la formation de Produits de MAILLARD, en mémoire du découvreur de ces composés et de leur mode de formation.

Cette réaction peut survenir dans les aliments mais aussi *in vivo* dans l'organisme. Elle est responsable de la couleur brune de certains pains, du pain d'épice, des sirops colorants, des boissons alcoolisées ou des sodas. Les concentrations en AGE, plasmatiques, cellulaires, des structures de collagène et du rein sont augmentées dans le diabète, l'insuffisance rénale et le vieillissement. Environ 10 % des AGE retrouvés *in vivo* ont une origine alimentaire.

Les conséquences de la glycation des protéines sont multiples. Les protéines glyquées perdent certaines de leurs propriétés. C'est ainsi que la glycation peut provoquer l'opacification du cristallin en induisant des réactions réticulant les protéines. La glycation des collagènes des parois vasculaires fait perdre une partie de leurs propriétés mécaniques et les rend résistantes aux enzymes nécessaires au remodelage des parois.

Les protéines plasmatiques ou des cellules circulantes peuvent être aussi glyquées. Cette modification a des conséquences importantes sur le métabolisme et les fonctions cellulaires. Les protéines et les lipoprotéines glyquées et oxydées se fixent à des récepteurs qui activent les cellules.

Des récepteurs spécialisés (RAGE, Galectin 3...) fixent les AGE. La liaison au récepteur provoque la formation de radicaux libres ou formes réactives de l'oxygène, qui peuvent avoir un effet délétère car ce sont de puissants oxydants, mais qui peuvent aussi jouer le rôle de messenger intracellulaire, modifiant les fonctions des cellules. Cela est particulièrement vrai au niveau des cellules endothéliales : la fixation des AGE sur le récepteur RAGE provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire dont on connaît l'importance dans l'angiopathie diabétique au niveau de la rétine et des glomérules rénaux. La liaison AGE-récepteur au niveau de l'endothélium, mais aussi des monocytes-macrophages, conduit à des états cellulaires dits « activés » qui correspondent à des productions de

cytokines, de facteurs de croissance, à l'expression de molécules d'adhérence, à l'enclenchement d'une activité procoagulante. Tous ces éléments peuvent être le point de départ d'une réaction inflammatoire, mais aussi d'une détérioration vasculaire.

La rétinopathie diabétique est aujourd'hui considérée comme liée à une sécrétion exagérée de facteur de croissance vasculaire (VEGF: *vascular endothelium growth factor*). Les AGE se liant au récepteur RAGE provoquent la synthèse et la sécrétion de VEGF.

L'augmentation de la perméabilité, la facilitation de la migration leucocytaire, la production de formes réactives de l'oxygène, de cytokines et de VEGF suggèrent que les AGE pourraient être un élément d'une cascade de réactions responsable de l'angiopathie diabétique et peut-être d'autres maladies vasculaires observées au cours du vieillissement ou de l'insuffisance rénale chronique.

Une étude réalisée chez des patients diabétiques souffrant ou non de rétinopathie et de néphropathie a montré que le taux de RAGE soluble (sRAGE) est significativement plus bas chez des patients diabétiques souffrant de complications microvasculaires. Une analyse de la littérature entre 2005 et 2012 permet de conclure qu'un taux diminué de sRAGE est associé à un risque vasculaire dans le diabète de type I et de type II. Cependant, les dosages doivent être améliorés en sensibilité et en spécificité.

Il existe des mécanismes endogènes anti-glycation. De plus, sur des modèles animaux, certains médicaments, comme la metformine, la benfotiamine ou l'OPB-9195 fabriqué au Japon, neutraliseraient les intermédiaires de la glycation. Enfin, il est possible de bloquer RAGE par des anticorps anti-RAGE, du RAGE recombinant ou des peptides dérivés du RAGE.

Pour conclure, il nous est impossible de vivre sans glucose ni oxygène, la formation d'AGE est donc inévitable, mais des mesures diététiques et thérapeutiques peuvent en limiter la synthèse et leurs conséquences sur les fonctions vasculaires. La glycation est-elle un processus inéluctable de vieillissement, accéléré dans le diabète et l'insuffisance rénale, début inévitable d'un changement plus profond de la matière ?

« **Identification et dosage des produits avancés de glycation, aussi appelés AGEs** »

Pr Frédéric TESSIER, Unité EGEAL Département SNES Institut Polytechnique LaSalle Beauvais

Frédéric TESSIER précise ses liens d'intérêt avec les industriels de l'agro-alimentaire, qui sont conscients des problèmes posés par les produits de MAILLARD.

La découverte d'un récepteur aux produits de glycation avancés (RAGE) dans différents tissus et celle de composés potentiellement toxiques (*e.g.* acrylamide) dans les aliments ont conduit à un regain d'intérêt pour l'examen de la glycation *in vivo* et, plus généralement, pour l'étude de la réaction de MAILLARD dans les aliments transformés.

Louis-Camille MAILLARD a décrit, il y a un peu plus de cent ans, un type particulier de réaction entre les sucres réducteurs et les protéines. Dès 1912, il faisait l'hypothèse que cette réaction chimique devait être impliquée dans la modification des nutriments pendant la cuisson des aliments et dans la modification des protéines, *in vivo*, catalysée par l'hyperglycémie des sujets diabétiques. Le développement et la maîtrise d'outils de chimie analytique aux cours des années qui ont suivi ont conditionné la mise au jour des mécanismes de formation des produits de MAILLARD, mais aussi celle des produits de glycation, aussi bien dans les aliments qu'*in vivo*. La nomenclature actuelle distingue les produits de la réaction de Maillard (MRP) trouvés dans l'organisme et dans les aliments, et les AGE (*advanced glycation endproduct*) formés *in vivo*. C'est par séparation électrophorétique qu'a été découverte en 1955 la première protéine glyquée chez l'homme : l'hémoglobine glyquée, aujourd'hui appelée HbA1c. Entre temps, de nombreux travaux de chimie analytique ont permis la découverte de composés de MAILLARD - dits néoformés - au cours de la transformation thermique des aliments. C'est principalement l'essor des méthodes de séparation chromatographiques, liquides et gazeuses, qui a autorisé la détection de nouvelles molécules issues de la réaction de MAILLARD. La N^ε-carboxyméthyllysine (CML) fut le premier produit de glycation détecté presque simultanément dans les aliments et dans les échantillons biologiques humains. Ce dérivé de la lysine reste aujourd'hui un marqueur incontournable des produits de glycation (aussi appelés AGE). Bien que l'on n'ait pas su, à ce moment-là, si cet AGE était majoritaire *in vivo*, sa stabilité lors de la préparation des échantillons (extraction après hydrolyse acide des protéines), sa détection facilitée par LC-MS/MS, et sa reconnaissance par le récepteur aux AGE (RAGE) en ont fait un marqueur de choix pour tous les scientifiques de ce domaine. Enfin, différentes techniques d'immunohistochimie, plus ou moins spécifiques, ont été mises en place afin de détecter les protéines porteuses de CML dans différents tissus.

Les propriétés naturelles de fluorescence de certains AGE ont aussi été mises à profit pour découvrir de nouvelles molécules et les suivre au cours du développement de maladies métaboliques et dégénératives. C'est ainsi qu'un nombre important d'AGE connus à ce jour (pentosidine, argpyrimidine, vesperlysine...) possède des propriétés spectrales de fluorescence à des longueurs d'ondes caractéristiques des hétérocycles formés par condensation entre un sucre et un acide aminé. Par ailleurs, la fluorescence naturelle de certains AGE est aujourd'hui utilisée pour

quantifier de manière approximative la teneur en produits de MAILLARD dans certains aliments, et en biologie pour estimer la densité d'AGE sur la peau de sujets sains ou diabétiques.

L'acrylamide, "la molécule qui dérange", est formé lors du procédé de transformation alimentaire. Il est génotoxique, cancérogène et neurotoxique à fortes doses. La Commission Européenne a émis des recommandations concernant l'étude des teneurs en acrylamide des denrées alimentaires et, aux Etats-Unis, diverses chaînes de restauration rapide affichent des avertissements sur la consommation des aliments contenant de l'acrylamide.

En conclusion, il est nécessaire 1) de discuter la nomenclature et la classification des AGE et autres produits de MAILLARD, 2) de poursuivre la découverte des composés néoformés aussi bien dans les aliments que dans les milieux biologiques, 3) de mettre en place une évaluation des performances des méthodes analytiques actuellement utilisées pour quantifier les produits de MAILLARD et de développer de nouveaux outils analytiques, 4) de mieux évaluer l'exposition alimentaire aux AGE et autres produits de MAILLARD et 5) d'évaluer le risque associé à une exposition chronique à faible dose des AGE et autres produits de MAILLARD.

« Dosage de l'HbA_{1c} et des produits d'Amadori en biologie humaine »

Pr Philippe GILLERY, *Laboratoire de Biologie et de Recherche Pédiatriques - CHU de Reims*

Laboratoire de Biochimie médicale et Biologie moléculaire FRE CNRS/URCA n°3481 – Faculté de Médecine de Reims

Phillipe GILLERY précise ses liens d'intérêt avec les industriels pour les dosages.

Le dosage des produits de glycation en Biologie humaine est à l'heure actuelle relativement limité, principalement en raison de la diversité structurale de ces produits et du manque de preuve indiscutable d'intérêt diagnostique et/ou pronostique de la plupart d'entre eux en pratique courante.

Une exception de taille concerne l'HbA_{1c}, forme d'hémoglobine glyquée générée par la fixation de glucose à l'extrémité N-terminale des chaînes β de la globine, suivie d'un réarrangement d'AMADORI. Ce composé, dont le dosage est réalisé en routine dans les laboratoires de Biologie Médicale par des techniques variées (chromatographie liquide haute performance (CLHP) d'échange ionique ou d'affinité, électrophorèse capillaire, immunodosage, technique enzymatique) est considéré comme le marqueur de choix du suivi des patients diabétiques. Sa formation irréversible et cumulative renseigne rétrospectivement sur l'équilibre glycémique des 4 à 8 semaines qui précèdent le dosage. Ce dosage bénéficie d'une standardisation internationale, fondée sur une méthode de référence utilisant la CLHP couplée à l'électrophorèse capillaire ou à la spectrométrie de masse, et maintenue par un réseau international de laboratoires de référence.

En cas d'impossibilité d'utiliser l'HbA_{1c} (par exemple lors de troubles hématologiques ou d'hémoglobinopathies), le dosage d'autres produits d'Amadori peut être réalisé, comme par exemple celui des fructosamines plasmatiques (ensemble des protéines glyquées circulantes) ou de l'albumine glyquée. Ces dosages restent cependant moins pratiqués, leur valeur sémiologique étant moins bien établie et souffrant pour le premier d'un manque de spécificité, pour le second d'une mise au point encore récente. Les dosages d'AGE restent plus confidentiels. Cependant, les techniques de CLHP couplées à la spectrométrie de masse en tandem offrent de nouvelles perspectives en matière de sensibilité et de spécificité. Elles pourraient permettre d'identifier certains AGE comme marqueurs spécifiques dans des conditions pathologiques particulières. Cependant, ces techniques ne sont pas standardisées et l'expression des résultats est très variable selon les études. La standardisation des méthodes de dosage des AGE pourrait constituer un progrès important en matière d'exploration des produits de glycation et probablement de prise en charge des patients atteints de diabète ou de maladies rénales.

En conclusion, l'HbA_{1c} est le paramètre de référence du suivi de l'équilibre glycémique des patients diabétiques. Les dosages sont bien caractérisés, évalués et contrôlés grâce à des programmes d'assurance qualité. La standardisation internationale des dosages d' HbA_{1c} est en cours. Les autres produits d'AMADORI peuvent représenter une solution alternative et de nouvelles stratégies sont en cours d'évaluation.

« Vieillesse vasculaire induit par les produits de glycation alimentaires »

Pr Eric BOULANGER, *Biologie du Vieillesse, Faculté de Médecine, Université du Droit et de la Santé, Lille 2*

Eric BOULANGER remercie Jean-Luc WAUTIER, son maître en recherche, et Marie-Paule WAUTIER.

Le vieillissement artériel est caractérisé par différents mécanismes conduisant à la rigidité artérielle responsable de l'hypertension artérielle (HTA), facteur de risque majeur de morbi-mortalité vasculaire.

Les produits de glycation avancée (AGE pour *Advanced Glycation End-products*) sont des toxines endogènes néoformées aux cours du diabète, de l'insuffisance rénale et du vieillissement. La glycation est une théorie du vieillissement. Les AGE sont formés suite à la liaison non-enzymatique et irréversible d'un sucre à une protéine. Les AGE ont des effets délétères vasculaires (athérosclérose), rénaux, rétinien mais également cérébraux (Alzheimer) et

cutanés. Les AGE exercent leur toxicité selon trois mécanismes : la glycation *in-situ*, les dépôts d'AGE et l'interaction avec le récepteur aux AGE (RAGE). Le RAGE est un récepteur exprimé notamment par les cellules endothéliales. Son activation induit une dysfonction endothéliale. L'AGE ayant la plus haute affinité pour le RAGE est la carboxyméthyllysine (CML).

Depuis la « crise de l'acrylamide » en 2002 où une équipe Suédoise a mis en évidence la présence de ce produit de glycation dans notre alimentation, un intérêt certain est porté à la glycation alimentaire. On parlera alors plus généralement de produits de MAILLARD, dont les AGE font partie bien sûr. Il est important de souligner que les AGE sont retrouvés en excès dans les aliments riches en sucres et protéines, ce d'autant plus qu'ils subissent une étape de cuisson. C'est le cas notamment de la CML.

A ce jour, il n'y a aucune classification établie concernant les produits de MAILLARD. Leur présence n'est pas déterminée dans tous les aliments ou boissons. De nombreux facteurs de variabilités de teneur en produits de MAILLARD sont connus: concentrations des protéines et sucres, conditions de stockage, procédés de préparation (plats préparés), durée et temps cuissons ou de fritures voire de torrification, variétés agroalimentaires (espèces, terrain, exposition solaire...). Aucune technique de dosage ne fait consensus par ailleurs.

On connaît un certain nombre d'effets cellulaires *in vitro* de la CML et de l'acrylamide. On connaît les effets des aliments trop cuits dans des modèles animaux. En revanche, on ne connaît pas les effets de la CML ni de l'acrylamide sur le vieillissement vasculaire de la souris. Les effets santé des produits de glycation alimentaires ne sont pas connus chez l'homme.

Notre équipe centre ses recherches sur les effets santé des produits de glycation alimentaires, notamment sur l'induction d'un vieillissement vasculaire accéléré. Il est démontré que l'acrylamide et son métabolite (le glycidamide) altèrent la viabilité et accélèrent le raccourcissement des télomères des cellules endothéliales *in vitro*. L'acrylamide, ajouté dans l'eau de boisson des souris, accélère leur rigidité artérielle. Nous montrons également que la CML alimentaire induit une dysfonction endothéliale et une rigidité artérielle prématurée (accélération de l'onde de pouls par IRM) chez la souris. Les souris dont le gène du RAGE a été invalidé sont moins sensibles à ce vieillissement vasculaire accéléré par ce produit de glycation alimentaire qu'est la CML.

Il existe des mesures de prévention et de traitement des conséquences de la glycation (dépôts d'AGE, interaction AGE/RAGE, glycation *in situ*) avec les statines, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et la metformine. D'autres traitements pour le contrôle de la glycation sont à l'étude.

« Glycation des protéines - Application en biologie humaine par un inductriel du diagnostic *in vitro* » **Christine FLANDRE et Frédéric ROBERT, Société Sebia R&D**

Christine FLANDRE présente SEBIA, Société française de diagnostic *in vitro* fondée en 1967, leader mondial de la séparation des protéines par électrophorèse. Les méthodes de dosage de l'HbA_{1c} ont évolué vers la simplicité et la robustesse avec le développement de l'électrophorèse capillaire. Cependant le nombre de tests réalisés dans le monde est en croissance et les patients de plus en plus complexes, les méthodes de routine sont inadéquates, sensibles aux interférences, ce qui conduit à des mesures incorrectes, les valeurs trouvées ne sont pas toujours interprétées correctement. Le projet "Albumine glyquée" a pour enjeux de définir le marqueur biologique cliniquement significatif au sein d'un Groupe d'Experts Internationaux, de développer la technique, les réactifs et le logiciel, de répondre aux exigences réglementaires d'un nombre croissant de pays et de participer à un programme de standardisation international. Sa durée moyenne est estimée à 2 à 3 ans.

Jean-Luc WAUTIER remercie la Société Sebia pour l'ouverture de collaborations avec les biologistes.

Table ronde - Discussion générale

Pr Eric BOULANGER - Pr Philippe GILLERY - Pr Frédéric TESSIER - Pr Jean-Luc WAUTIER

Christine FLANDRE (Société Sebia R&D) - Frédéric ROBERT (Société Sebia R&D) - Pr Pascale MASSIN

La discussion concerne d'une part, la standardisation des méthodes de dosage de l'HbA_{1c} et d'autre part, l'acrylamide dans l'alimentation.

QUESTIONS/RÉPONSES :

Bernard TEISSEIRE (Q) : Les différentes hémoglobines, normales et anormales, sont-elles glycosylées de la même façon ?

Philippe GILLERY (R) : *On ne sait pas, mais il faudrait répondre à cette question. La cinétique de glycation des variants pourrait être différente, mais il existe très peu de publications.*

Jean-Luc WAUTIER (R) : *Les variants posent un problème majeur par exemple en Inde ou en Afrique, où le diabète apparaît par suite du changement des habitudes alimentaires. Les patients qui ont une hémoglobine modifiée sont mal pris en charge.*

François TRIVIN (Q) : Est-ce que la variabilité des taux d'HbA_{1c} selon l'ethnicité du patient a été validée ? Comment peut-on l'expliquer ? Est-ce lié à des variations structurales de l'Hb ?

Philippe GILLERY (R) : *Il n'y a pas de publication sur les valeurs de référence mais les valeurs seuils retenues pour définir le diabète ont été discutées, notamment en Chine et au Brésil, avec des variations de quelques points pour cent. L'accès du glucose peut être modifié chez les variants, d'où une modification de la valeur du dosage de l'HbA_{1c}.*

Jean-Gérard GOBERT (Q) : Quel problème pose le dosage de l'HbA_{1c} en biologie délocalisée ?

Philippe GILLERY (R) : *Il s'agit de problèmes méthodologiques car les paramètres proposés par les appareils sont variables. En France, il n'y a pas de problème car la biologie délocalisée est réglementée et contrôlée, contrairement aux Etats-Unis où seuls les dosages de laboratoire sont contrôlés.*

Claude BOHUON (Q) : Quelles sont les autres protéines sanguines glyquées ?

Jean-Luc WAUTIER (R) : *Le fibrinogène, la transferrine, les lipoprotéines peuvent être glyquées, mais quelle est la demi-vie du produit glyqué ? Il y a des problèmes de dosage car, si la spectrométrie de masse et l'HPLC sont les meilleures techniques, tous les laboratoires n'en sont pas équipés.*

Frédéric TESSIER (R) : *Les outils développés sont coûteux et non adaptés à la biologie de routine. Il existe effectivement d'autres protéines circulantes glyquées que l'on pourrait doser, mais celles qui s'accumulent le plus, comme le collagène ou la cristalline, ne sont pas circulantes.*

Eric BOULANGER (R) : *La α 2-microglobuline, par exemple, est très glyquée dans l'amylose, ce qui est un bon marqueur. Mais il faut être prudent dans le message donné avec la valeur trouvée.*

Claude MONNERET (Q) : Puisque l'acrylamide provient de l'asparagine, on a préconisé un traitement préalable des aliments par l'asparaginase. Qu'en est-il réellement ?

Jean-Luc WAUTIER (R) : *Effectivement, en raison de la toxicité de l'acrylamide dont nous avons parlé, on peut essayer d'éliminer l'asparagine des aliments. Mais quel est alors leur goût ?*

François TRIVIN (Q) : Quel est l'effet de la cuisson ou de réchauffement des aliments dans les fours à micro-ondes ? Est-ce que les micro-ondes modifient le taux de formation des produits de glycation ?

Frédéric TESSIER (R) : *Justement, il y a quelques mois nous avons terminé un projet de 4 ans à ce sujet. Différentes méthodes de chauffage des aliments ont été reproduites aux micro-ondes. La teneur en produits de MAILLARD est identique entre le chauffage par micro-ondes et le chauffage par four, plaque électrique ou autre. Ce qui compte, c'est la chaleur apportée à l'aliment, quelle soit sa source.*

Jean-Gérard GOBERT (Q) : Conseillez-vous le pain blanc, pas de frites, pas de café ?

Eric BOULANGER (R) : *Personnellement, je bois du café car il protège de la maladie d'Alzheimer et mange du pain blanc mais pas de frites.*

Jean-Claude STOCLET (Q) : Que sait-on des effets de l'acrylamide et des autres AGE alimentaires sur le microbiote intestinal dont les modifications sont impliquées dans plusieurs pathologies dont l'obésité et le diabète ?

Eric BOULANGER (R) : *Il n'y a que des résultats préliminaires avec l'acrylamide.*

Frédéric TESSIER (R) : *La relation entre produits de MAILLARD et microbiote est étudiée depuis 20 ans.*

Jean-Luc WAUTIER remercie les orateurs puis présente les projets de recommandations en deux diapositives qui ont été préparées sur la base des informations disponibles comme il est dorénavant prévu pour les séances thématiques.

Les recommandations concernent la santé publique (les autorités de tutelle françaises et de l'Union européenne), la diététique (les industries agro-alimentaires, les équipementiers de cuisson et les particuliers) et la thérapeutique (les médecins, les pharmaciens et les industriels du médicament).

Aucun commentaire n'est enregistré.

Clôture par Jean-Pierre FOUCHER, Président de l'Académie nationale de Pharmacie

Jean-Pierre FOUCHER rappelle qu'à la suite de cette séance thématique, les recommandations seront finalisées puis soumises aux membres de l'Académie pour discussion. Par ailleurs, il remercie à nouveau Jean-Luc WAUTIER pour son travail et les orateurs.

La séance est levée à 16 h 50.

* *
*

Jean-Pierre FOUCHER
Président

Agnès ARTIGES
Secrétaire Général