

Démonstration de l'effet cytotoxique des produits avancés de la glycation (AGE-s)

par V. Ravelojaona, G. Péterszegi, J. Molinari, J. L. Gesztesi* & L. Robert

Laboratoire de recherches ophtalmologiques, Hôtel-Dieu, Université Paris V, 1, place Parvis Notre Dame, 75181 Paris cedex 04, France;

*NATURA, LTDA, Sao Paolo, Brésil. Contacts : lrobert5@wanadoo.fr

reçu le 21 février 2007

RÉSUMÉ

Les produits de la réaction de Maillard, ou AGE-s (Advanced Glycation End-products) possèdent un certain nombre d'effets potentiellement nuisibles au niveau des cellules et des tissus de l'organisme. À ce titre, leur augmentation avec l'âge – plus rapide encore chez les hyperglycémiques – est considérée comme un facteur important dans les pathologies liées à l'âge, et tout spécialement dans l'athéro-artériosclérose et le diabète de type II. Les expériences qui seront décrites dans cette note donnent quelques détails sur la méthode utilisée pour la mise en évidence d'une cytotoxicité directe de plusieurs produits AGE-s sur des fibroblastes de peau humaine. Cette cytotoxicité a été retrouvée après la remise en culture

des cellules dans un nouveau milieu, sans AGE-s. Cet effet de «rémanence» suggère une transmission de l'effet toxique des AGE-s entre générations cellulaires, probablement par des mécanismes épigénétiques. Ce phénomène se ferait *via* des récepteurs des AGE-s (RAGE-s) et serait inhibé par des capteurs radicalaires tels que la L-Carnosine, la Catalase et les oligo- et polysaccharides riches en α -L-Rhamnose. Une telle cytotoxicité peut s'exercer non seulement au niveau de la peau mais dans d'autres tissus aussi. Il apparaît ainsi qu'à part le pontage du collagène et d'autres macromolécules, les produits de la réaction de Maillard peuvent exercer leurs effets cytotoxiques nocifs directement sur les cellules.

SUMMARY Demonstration of the cytotoxic effect of Advanced glycation Endproducts (AGE-s)

Advanced Glycation End-products (AGE-s) were shown to exhibit a number of potentially harmful properties in contact with cells and tissues. As their concentrations increases with age, faster even in hyperglycemic individuals, they are considered important for aging- and age-associated pathologies, especially for athero-arteriosclerosis and type II diabetes. We describe here the methods used for the demonstration of a direct cytotoxicity of several AGE-products when added to human skin fibroblast cultures. This cytotoxicity was still demonstrable when cells, previously cultured with AGE-s, were transferred to new medium without AGE-s. This

effect, the remanence of cytotoxicity in absence of AGE-s, suggests a certain degree of inheritance, possibly by epigenetic mechanisms, of the cytotoxic effect of AGE-s, mediated by the AGE-receptors (RAGE-s) and inhibited by free radical-scavengers, such as L-Carnosine, Catalase and Rhamnose-rich oligo- and polysaccharides. Such cytotoxicity can occur not only on the skin but also in other tissues. It appears thus that besides the crosslinking of collagen and other macromolecules, the products of the Maillard reaction can exert their harmful cytotoxic effects directly on the cells.

INTRODUCTION

Depuis leur première description par Maillard en 1912, de très nombreuses études ont été effectuées avec une variété de produits avancés de la glycation, ou AGE-s (Advanced Glycation End-products) (voir Baynes *et al.*, 2005 pour une récente mise au point). Un faisceau cohé-

rent d'arguments étaye l'hypothèse qui leur attribue des effets nuisibles pour l'organisme. Parmi de tels effets, on peut mentionner l'action mutagène, le relargage de radicaux libres (plus exactement de produits réactifs de l'oxygène ou ROS, Reactive Oxygen Species), l'effet sur la biosynthèse des constituants de la matrice extracellulaire (MEC). La plupart de ces effets sont médiés

par des récepteurs reconnaissant les AGE-s et pouvant transmettre vers l'intérieur de la cellule des « messages » modifiant les fonctions cellulaires (Thornalley, 1998). La question que nous nous sommes posée concerne la possibilité d'une action toxique directe des produits AGE-s mis en contact avec des cellules comme les fibroblastes de la peau humaine. Certains des résultats de ces expériences ont été récemment publiés (Peterszegi *et al.*, 2006), d'autres sont encore en préparation. Voici une revue qui présente les résultats les plus saillants de ces expériences.

MÉTHODES

Les fibroblastes utilisés ont été fournis par Cambrex (Walkersville), provenant de la biopsie cutanée d'une femme de 37 ans. Les conditions de culture sont classiques : les cellules sont cultivées dans un milieu de culture DMEM-Glutamax de Eagle, modifié par Dulbecco (Gibco, Carlsbad, USA) et supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (Gibco, Carlsbad, USA), des antibiotiques et antifongiques (Pénicilline 100 U/mL (Gibco), Streptomycine 100 µg/mL (Gibco) et Fongisone (Gibco)). L'incubation se déroule dans une étuve à 5 % de CO₂ et thermostatée à 37° C.

Les AGE-s ont été préparés par incubation prolongée (4 à 8 semaines) à 37° C de protéines (Bovine Serum Albumin, BSA, et Lysozyme) ou de peptides (RGD), avec des glucides (Glucose ou Fructose), en présence ou non de FeCl₂ à 0,01 M pour accélérer la glycoxydation, dans des conditions stériles. Ensuite, un aliquot de ces différents mélanges est filtré sur colonne Sephadex G-25 (Pharmacia) (selon la méthode de chromatographie d'exclusion), afin d'éliminer les petites molécules intactes. Lorsque l'incubation du glucide se fait avec un acide aminé (lysine ou arginine), la préparation est différente : le mélange est chauffé à 100° C pendant 1 heure. D'autres détails peuvent être trouvés dans la note originale (Peterszegi *et al.*, 2006).

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques TPP de 24 puits (CML, Nemours) avec 1 mL de suspension cellulaire contenant 4.10⁴ cellules aux passages indiqués dans les légendes des figures, dans chaque puits. Après 4 jours d'incubation, on remplace le milieu d'incubation par 1 mL de milieu frais contenant 10 à 100 µL de solution de produit glyqué, aux concentrations indiquées dans les légendes des figures. Ces produits de glycation restent en contact avec les cellules pendant 72 heures. Cette incubation est suivie d'un comptage des cellules mortes, flottant dans le surnageant (comptage Coulter). Les cellules adhérentes ont été resuspendues par trypsinisation : la moitié a été comptée au Compteur Coulter et l'autre moitié a été réensemencée dans de nouvelles plaques de 24 puits, pour une nouvelle incubation de 72 heures, cette fois-ci, en l'absence des AGE-s. Après ces 3 jours de culture (soit 10 jours après le début de l'expérience), le milieu est décanté : les cellules mortes qui flottent dans le surnageant ont été comptées et les cellules adhérentes ont été trypsinisées pour être aussi comptées. L'effet, dit de « rémanence », des AGE-s, ainsi

mesuré aussi bien sur la mort cellulaire que sur la prolifération, a pu être observé dans ces cultures ne contenant plus les AGE-s ajoutés à la première phase de l'expérience. Le contact entre cellules et AGE-s se situe donc entre le 4^{ème} et le 7^{ème} jour de culture.

RÉSULTATS

La figure 1 montre l'augmentation du nombre de cellules mortes dans les cultures en présence des AGE-s, exprimée en pourcentage par rapport aux cultures témoins en l'absence d'AGE-s.

Dans la culture témoin, sur 4.10⁴ cellules ensemencées, environ 1 550 cellules ont été retrouvées, flottant dans le surnageant, prenant le colorant vital (rouge neutre), preuve de mort cellulaire. Ce chiffre correspond à environ 4 % des cellules ensemencées. En présence des AGE-s testés, cette proportion augmente fortement. Le plus toxique a été la Lysine-Glucose qui a produit, à la concentration de 550 µM, une augmentation de la mort cellulaire de plus de 600 %.

Les autres AGE-s se sont révélés moins toxiques, produisant néanmoins, aux concentrations indiquées dans la légende, une augmentation de 300 % à 500 % de la mort cellulaire.

La figure 2 montre l'effet de rémanence, c'est-à-dire l'effet toxique mesuré au cours de la deuxième phase de la culture, donc en absence de produits AGE-s. Ici encore, ce sont les cellules incubées au préalable (au cours de la première phase de la culture) avec le Lysozyme-Glucose, qui ont présenté la plus forte mortalité, dépassant le témoin de plus de 600 %. Il s'agit donc d'une cytotoxicité « héritée » des cellules cultivées en présence de cet AGE, et qui, à travers les passages successifs, ont transmis aux générations cellulaires suivantes une fragilité augmentée, même en absence d'AGE-s dans le milieu. L'effet de la Lysine-Glucose est suivi de près par celui de la BSA-Fructose-FeCl₂, tandis que d'autres produits AGE-s, comme le RGD-Glucose, ont montré nettement moins de « rémanence ». Cet effet de rémanence concerne non seulement la mort cellulaire mais aussi la vitesse de prolifération des cellules.

Comme le montre la figure 3, plusieurs AGE-s ajoutés à la première phase de la culture ont fortement stimulé la prolifération, en l'absence de ces mêmes AGE-s au cours de la deuxième phase de culture où ces effets ont été enregistrés. L'effet stimulant le plus fort de la prolifération a été observé pour la BSA-Glucose-FeCl₂, suivi par le Lysozyme-Glucose et par le RGD-Glucose ; tandis que l'effet des acides aminés glyqués a été négligeable. Il paraît ainsi que ce ne sont pas les mêmes AGE-s qui augmentent le plus fortement la mort cellulaire et qui accélèrent la prolifération cellulaire.

Inhibition de la cytotoxicité.

Comme mentionné dans la note introductive de cette séance (voir Robert & Robert, dans ce fascicule), la plupart des effets des AGE-s sont médiés par des récepteurs

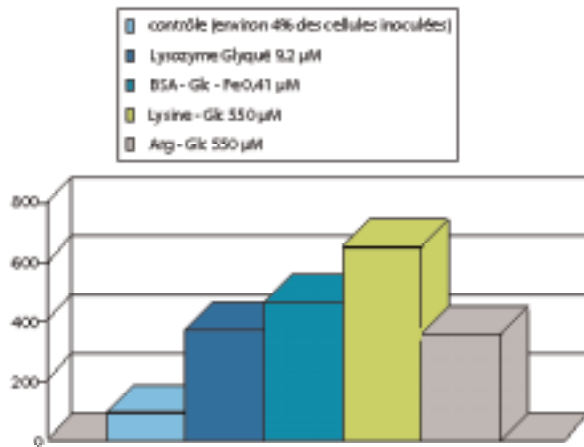


FIG. 1. – Mort cellulaire augmentée en présence des AGE-s ajoutés au milieu de culture. Pour les détails, voir le Matériel et Méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation du nombre de cellules mortes, flottantes dans le surnageant du milieu de culture, le contrôle sans AGE étant à 100 %.

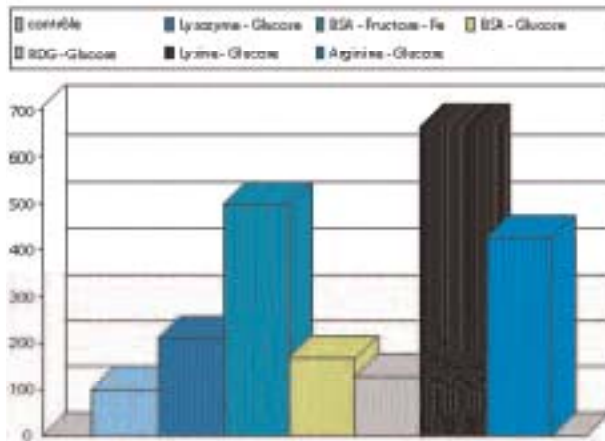


FIG. 2. – Effet de rémanence : mort cellulaire au cours de la deuxième phase de culture, sans AGE-s dans le milieu. Les cellules précédemment cultivées en présence des AGE-s (voir Fig. 1) sont remises en culture dans un milieu neuf, sans AGE-s, et le nombre de cellules mortes est déterminé comme précédemment, après 4 jours de culture, et exprimé en pourcentage d'augmentation par rapport au contrôle à 100 %

tels que les RAGE-s, et comportent des étapes d'activation de réactions antiradicalaires. Nous avons donc testé des capteurs radicalaires, comme la N-acétyl-Cystéine, la L-Carnosine, la Catalase ou encore des polysaccharides riches en α -L-Rhamnose, précédemment testé pour les effets antiradicalaires par l'effet protecteur de l'hyaluronane contre la baisse de viscosité provoquée par des radicaux OH^{\bullet} dégagés par l'acide ascorbique en présence de Fer et d'EDTA (Deguine *et al.*, 1998). Dans la réaction de cytotoxicité décrite ci-dessus, La L-Carnosine et la Catalase, ainsi que les polysaccharides riches en α -L-Rhamnose, se sont montrés efficaces en protégeant les cellules de la mort provoquée par les AGE-s. En revan-

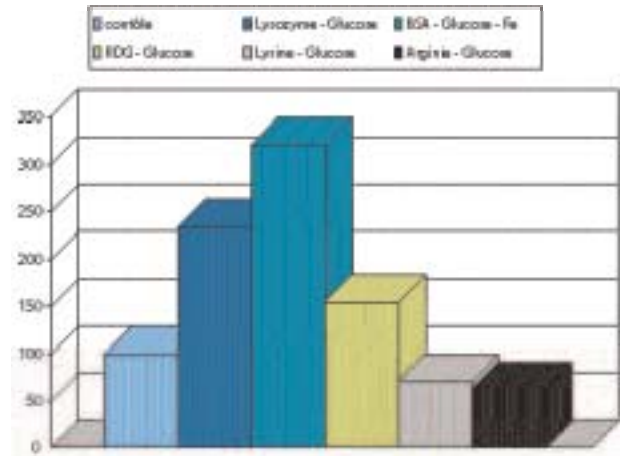


FIG. 3. – Effet de rémanence : augmentation de la prolifération cellulaire au cours de la deuxième phase de culture, en l'absence d'AGE-s. Les cellules précédemment cultivées en présence des AGE-s (voir Fig. 1) sont remises en culture dans un milieu sans AGE-s, et le nombre de cellules à confluence est déterminé à la fin de cette deuxième phase de la culture. Pour plus de détails, voir le Matériel et Méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation par rapport au contrôle mis à 100 %

che, la N-acétyl-Cystéine et la SOD (SuperOxide Dismutase) se sont révélées inefficaces.

Quant aux récepteurs, l'utilisation d'anticorps spécifiques a permis de confirmer leur rôle – et surtout celui des RAGE-s – dans le déclenchement de ces réactions (Peterszegi *et al.*, 2006).

DISCUSSION

Les expériences décrites montrent que plusieurs AGE-s, préparés par incubation de protéines (BSA, Lysozyme), de peptides (RGD) ou d'acides aminés (Lysine, Arginine) avec du Glucose ou du Fructose, parfois en présence de FeCl_2 pour accélérer la glycoxydation, ont provoqué une augmentation importante de la cytotoxicité ou encore de la prolifération cellulaire. L'augmentation maximale de ces deux effets, cytotoxicité et prolifération, n'ont pas été obtenus pour les mêmes AGE-s. L'effet le plus surprenant qui ait été constaté a été la rémanence de ces modifications, observée dans des cultures successives, en l'absence d'AGE-s (Fig. 2 et 3). Cet effet de rémanence a été observé aussi bien avec l'augmentation de la mort cellulaire qu'avec celle de la vitesse de prolifération. Ces faits suggèrent des voies de transmission de l'effet des AGE-s à travers des générations cellulaires, probablement médiées par des récepteurs « reconnaissant » les AGE-s selon leur nature et leur taille moléculaire, ainsi que par des mécanismes épigénétiques. Ces mécanismes restent encore à être explorés. Il paraît néanmoins probable que le même effet cytotoxique, observé ici pour les fibroblastes, puisse se manifester in vivo, au contact des AGE-s et d'autres cellules du derme et d'autres tissus. Un tel effet cytotoxique pourrait être impliqué dans la perte cellulaire, avec l'âge, des tissus cutanés et autres. Au

niveau de la peau, cette perte est estimée à environ 7 % du capital cutané original, tous les 10 ans. Une telle perte, relativement importante, implique une mort cellulaire progressive, attribuable au moins en partie, à la réaction de Maillard. Ces résultats confirment encore le rôle important des mécanismes post-génétiques (post-transcriptionnelles) dans le déclin des fonctions tissulaires, avec l'âge.

BIBLIOGRAPHIE

Baynes J. W., Monnier V. M., Ames J. M. & Thorpe S. R. eds, The Maillard Reaction: Chemistry at the interface of nutrition,

- aging, and disease. Annals of the New-York Academy of Sciences, New York. Vol. 1043, 2005.
- Deguine V., Menasche M., Ferrari P., Fraisse L., Pouliquen Y. & Robert L., Free radical depolymerization of hyaluronan by Maillard reaction products: role in liquefaction of aging vitreous. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1998, 22, 17-22.
- Maillard L. C., Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *C. R Hebd. Séances Acad. Sci.*, 1912, 154, 66-68.
- Péterszegi G., Molinari J., Ravelojaona V. & Robert L., Effect of advanced glycation end-products on cell proliferation and cell death. *Pathol. Biol. (Paris)*, 2006, 54, 396-404.
- Thornalley J., Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell. Mol. Biol.*, 1998, 44, 1013-1023.