

Importance de la réaction de Maillard en ophtalmologie

par G. Péterszegi, A. M. Robert, L. Robert L & G. Renard

Laboratoire de recherche ophtalmologique, Hôpital Hôtel-Dieu, Université Paris 5, 1, place du Parvis Notre-Dame, 75181 Paris cedex 04. Courriel :lrobert5@wanadoo.fr

Reçu le 21 février 2007

RÉSUMÉ

La glycosylation non-enzymatique (glycation) des protéines a été décrite par Louis Camille Maillard en 1912. Cette réaction aboutit à la formation de produits avancés de la glycation (AGE-s : Advanced Glycation End products) qui représentent un facteur de risque dans le vieillissement tissulaire. En pathologie oculaire, leur rôle a été démontré dans la rigidification de la cornée, ou dans la pathologie du vitré susceptible de favoriser le détachement de la rétine. Les AGE-s interviennent également dans la pathologie des vaisseaux rétinien et dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

L'étude comparative de la susceptibilité aux AGE-s des fibroblastes de la peau humaine et des kérato-

cytes a montré que les kératocytes sont nettement moins endommagés par ces produits que les fibroblastes. Au contact des AGE-s, en culture cellulaire, on trouve beaucoup moins de cellules mortes et une nettement meilleure conservation de la capacité de prolifération chez les kératocytes que chez les fibroblastes. L'origine de cette différence de phénotype entre fibroblastes et kératocytes pourrait être l'exposition fréquente de ces derniers aux rayons UV, ce qui pourrait favoriser l'apparition chez les kératocytes, au cours de l'évolution, d'une meilleure résistance contre des effets cytotoxiques déclenchés par des mécanismes radicalaires.

SUMMARY The importance of the Maillard reaction in ophtalmology

Non enzymatic glycosylation (glycation) of proteins, described by L. C. Maillard in 1912, results in the formation of advanced glycation end products (AGE-s). These exhibit a number of harmful reactions, increasing with age and involved in several age-associated pathologies. In ocular pathology, their role was demonstrated at several levels of age-associated eye-diseases, such as the rigidification of cornea, in the separation of vitreous fibers from the hyaluronan jelly, which might result in retinal detachment. AGE-s are involved also in retinal microvascular alterations

in diabetics as well as in age-related macular degeneration. We compared the cytotoxic effect of several AGE-s on human skin fibroblasts and corneal keratocytes. Keratocytes were shown to be much more resistant to the cytotoxic effect of several AGE-products than fibroblasts. This higher resistance of keratocytes to the free radical mediated cytotoxic effect of AGE-s might be the result of the constant exposure of cornea to UV-light possibly mediating the appearance of more efficient protective mechanisms during evolution.

INTRODUCTION

La réaction de Maillard ou glycosylation non-enzymatique des protéines (glycation) joue un rôle important dans le vieillissement tissulaire et dans des pathologies associées au vieillissement. Elle génère des produits appelés "Advanced Glycation End-products" (AGE-s) qui réagissent avec leurs récepteurs (RAGE-s et autres) (Thornalley, 1990). Ces produits sont mutagènes et libèrent des radicaux libres (Baynes *et al.*, 2005 pour une revue).

Les tissus oculaires riches en matrice extracellulaire sont parmi les cibles potentielles de la réaction de Maillard

(Stitt, 2000, 2005). Tous les segments de l'œil sont concernés. Dans cette revue succincte nous citerons les résultats les plus importants de ces dernières décennies, ainsi que nos propres expériences effectuées avec les kératocytes de la cornée en comparaison avec des fibroblastes cutanés, les deux types de cellules d'origine humaine.

Nous avons pu montrer précédemment que la condensation d'un acide aminé basique comme la lysine, avec le glucose, produit des AGE-s qui catalysent la dépolymérisation de l'hyaluronane médiée par des radicaux libres (Deguine *et al.*, 1998). Cette réaction peut jouer un rôle important dans la liquéfaction du vitré avec l'âge.

Afin de poursuivre ces études, une gamme de produits de glycation a été préparée, non seulement à partir d'acides aminés basiques comme la lysine et l'arginine, mais aussi à partir du tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD), signal de reconnaissance des intégrines, ainsi qu'à partir de protéines de poids moléculaires plus ou moins importants comme la sérum albumine bovine (BSA, 70 000 Da) et le lysozyme (14 600 Da).

Jusqu'à présent, ces préparations d'AGE-s ont été testées sur des fibroblastes issus de peau humaine et de phénotype normal (Péterszegi *et al.*, 2006). Plusieurs de ces préparations AGE-s que nous avons obtenues à partir de BSA-AGE-Fe pour faciliter la glyco-oxydation, se sont révélées cytotoxiques sur les fibroblastes de peau *in vitro* (Péterszegi *et al.*, 2006). En effet, ces AGE-s induisent la mort cellulaire. Le degré de cytotoxicité diffère selon le produit AGE (Péterszegi *et al.*, 2006; Ravelojaona *et al.*, dans ce numéro).

TRAVAUX SUR LA RÉACTION DE MAILLARD EN OPHTALMOLOGIE

Avant d'exposer nos résultats obtenus avec des kératocytes humains, nous proposons un rapide parcours des résultats essentiels d'autres chercheurs concernant l'importance de la réaction de Maillard en ophtalmologie.

Il ressort des deux revues citées de A. W. Stitt que tous les segments de l'œil sont concernés par la réaction de glycation, et en particulier chez les diabétiques. Parmi les tissus les plus étudiés il y a le **cristallin**. En effet la réaction de Maillard paraît jouer un rôle important dans la progression de la cataracte. Des AGE-s agissent déjà comme photo-sensibilisateurs et accélèrent la photo-oxydation du tryptophane et de l'acide ascorbique (de la Rochette *et al.*, 2003). Parmi les AGE-s plusieurs ont été détectés dans le cristallin âgé et diabétique, comme l'argyrimidine, un fluorophore bleu, dosé par ELISA (Padayatti *et al.*, 2001). Sa concentration est fortement augmentée dans les cataractes brunes : $254,0 \pm 155$ pmol/mg protéine contre $16,1 \pm 8$ pmol/mg protéine dans les cristallins de même âge, sans cataracte, ou avec cataracte nucléaire : $49,0 \pm 26$ pmol/mg protéine. Après fractionnement des homogénats de cristallins on retrouve les AGE-s, surtout dans la fraction à plus haut poids moléculaire (Zarina *et al.*, 2000). Curieusement, le taux d'AGE-s déposés dans le cristallin est plus élevé chez les fumeurs. Le tabac contribue fortement à l'inhalation et à l'ingestion des AGE-s que l'on retrouve jusque dans le cristallin (Nicholl *et al.*, 1998).

La **cornée** est aussi affectée, la kératopathie diabétique est accompagnée par une rigidification de la cornée et par son épaississement, en particulier au niveau des lames basales. On observe de l'œdème et des érosions répétés (Schulz *et al.*, 1981). La membrane de Bowman est fortement glyquée. Les AGE-s s'accumulent dans la cornée vieillissante, fixés sur les macromolécules de la matrice extracellulaire. L'aspirine paraîtrait exercer un effet anti-glycation dans ce tissu (Malik & Meek, 1996).

Le **vitré** subit aussi des modifications par glycation. On connaît la vitréopathie diabétique (Sebag, 1996). La glycation des fibres de collagène du vitré contribue apparemment à la dissociation du gel d'hyaluronane de la structure fibreuse du vitré, contribuant ainsi à sa dissociation du segment postérieur ce qui peut faciliter le décollement de la rétine.

Mais c'est certainement la **rétine** qui a canalisé la plupart des travaux impliquant la glycation. La rétinopathie diabétique est fortement tributaire des effets néfastes des AGE-s pouvant résulter dans l'obturation des capillaires. Des AGE-s ont été identifiés au niveau des vaisseaux rétinien ainsi que de la névroglie (Stitt *et al.*, 1997). Les AGE-s induisent au niveau des cellules endothéliales rétinien des anomalies de l'oxydase nitrique endothéliale (eNOS), ce qui contribue sans doute au désordre de la vasorégulation (Chakravarthy *et al.*, 1998) et à la rupture des fonctions de barrière.

Un autre aspect de l'accumulation des AGE-s est la forte augmentation du dépôt de lipofusine et la rupture des voies de signalisation intra- et extracellulaires.

Des mécanismes similaires ont été invoqués pour expliquer le rôle des AGE-s dans la **dégénérescence maculaire liée à l'âge**. Parmi ces effets, la phagocytose incomplète des produits de dégradation des photorécepteurs par les cellules de l'épithélium pigmentaire paraît jouer un rôle important dans la formation des Drusen (Ishibashi *et al.*, 1986; Hammes *et al.*, 1999).

D'autres anomalies oculaires et localisations d'AGE-s permettent d'invoquer leur implication dans plusieurs autres pathologies oculaires. Les détails peuvent être trouvés dans les revues citées de Stitt (Stitt, 2001, 2005).

EXPÉRIENCES SUR LES KÉRATOCYTES

Après avoir démontré l'effet cytotoxique des AGE-s sur des cultures cellulaires de fibroblastes *in vitro* (Péterszegi *et al.*, 2006; Ravelojaona *et al.*, dans ce volume), nous nous sommes intéressés aux effets de ces différentes préparations d'AGE-s sur des cultures de kératocytes humains. Nous voulions aussi étudier les réponses induites par les AGE-s sur ces deux types cellulaires, fibroblastes et kératocytes, et en particulier, la susceptibilité de ces deux types de cellules à la cytotoxicité provoquée par les AGE-s. Un autre paramètre testé est la vitesse de prolifération cellulaire, accélérée par certains AGE-s chez les fibroblastes (Péterszegi *et al.*, 2006). La préparation des produits glyqués a été décrite dans la note précédente (Péterszegi *et al.*, 2006). Les AGE-s testés sur kératocytes sont décrits dans le tableau I.

La solution de glycation correspond à une solution saline physiologique contenant la protéine à glyquer, le sucre et des antibiotiques (100 U/ml de pénicilline (Gibco) et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco)). L'incubation dans une étuve à 37° C et sous agitation constante a duré huit semaines.

A la fin de cette incubation, une fraction aliquote de chaque solution a été déposée sur une colonne de chro-

TABLEAU I. – Préparation des produits de glycation dont l'effet a été testé sur les kératocytes.

AGE-s	Concentration de glycation		Concentration finale de la protéine ou peptide glyqué ajouté aux cellules
	Protéine ou peptide	Glucose	
BSA + glucose + 0,01 M Fe Cl ₂	149,25 µM	11,1 mM	0,84 mM
BSA + glucose	2,985 mM	1,67 M	16,83 mM
Lysozyme + glucose	1,65 mM	1,65 mM	8,8 MM
RGD + glucose	4,46 mM	4,46 mM	223 mM avec les fibroblastes 180 mM avec les kératocytes

matographie d'exclusion, Sephadex G-25 (Pharmacia). Le solvant utilisé ici était le D-PBS contenant 100 U/ml de pénicilline (Gibco) et 100 µg /ml de streptomycine (Gibco). Les molécules de glucose non liées sont alors éliminées de la solution par gel-filtration. Chaque éluat récupéré va pouvoir alors servir pour des tests *in vitro*.

Toutefois, la limite d'exclusion d'une colonne G-25 étant de 5 000 Da, la solution de RGD-AGE n'a pas été passée sur colonne, mais a été utilisée directement pour les tests *in vitro*.

Les fibroblastes de peau humaine de phénotype « normal » nous ont été fournis par Cambrex (Walkersville, USA). Ils ont été cultivés dans un milieu de Eagle modifié par Dulbecco (D-MEM), supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal, des antibiotiques et antifongiques (pénicilline 100 U/ml (Gibco), streptomycine 100 µg/ml (Gibco) et Fongisone). Les fibroblastes utilisés étaient au 12^{ème} passage.

Les kératocytes ont été cultivés dans un milieu de culture Eagle modifié par Dulbecco, D-MEM/F-12, supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal, des antibiotiques et antifongiques (pénicilline 100 U/ml (Gibco), streptomycine 100 µg/ml et Fongisone). Les kératocytes utilisés étaient au 6^{ème} passage pour le 1^{er} comptage et au 9^{ème} passage pour le deuxième comptage.

A chaque expérience, l'ensemencement s'est fait à 50 000 cellules/puits, dans une plaque de douze puits (Nunc).

TESTS DE CYTOTOXICITÉ SUR LES CULTURES DE CELLULES

Kératocytes humains

Une fois l'adhésion des cellules obtenue (soit deux jours après l'ensemencement), le milieu de culture est changé par du milieu frais contenant différentes concentrations des produits de glycation (100 µl/puits). Les cultures cellulaires sont alors mises dans une étuve à 37° C et à 5 % de CO₂ pendant deux jours. Au bout de ces 48 heures de culture des cellules avec les AGE-s, le milieu qui contenait les AGE-s est remplacé par du milieu frais sans AGE-s. Les plaques de 12 puits sont ensuite remises à l'étuve à 37° C et 5 % de CO₂ pendant trois jours. Une semaine après l'ensemencement (J7) les cellules sont comptées de manière électronique à l'aide du compteur Coulter. Le premier comptage permet une

estimation du nombre de cellules détachées et donc mortes dans le surnageant. Le comptage suivant est réalisé après deux lavages au PBS et cinq minutes de trypsination à 37° C. Le nombre de cellules présentes dans le tapis cellulaire est ainsi obtenu. Après ce comptage à J7, les plaques réensemencées sont remises à incuber à 37° C et 5 % de CO₂ pendant trois jours supplémentaires. Le comptage des cellules dans le surnageant ainsi que dans le tapis cellulaire, dix jours après l'ensemencement (J10) s'effectue de la même manière qu'à J7.

Fibroblastes de peau humaine

Une fois les cellules à confluence (soit quatre jours après l'ensemencement), le milieu de culture est changé par du milieu frais contenant différentes concentrations des produits de glycation (100 µl/puits). Les cultures cellulaires sont alors mises dans une étuve à 37° C et 5 % de CO₂ pendant trois jours. Au bout de ces 72 heures de culture des cellules avec les AGE-s, les cellules sont comptées au compteur Coulter. Le premier comptage permet une estimation du nombre de cellules détachées et donc mortes dans le surnageant. Le comptage suivant est réalisé après deux lavages au D-PBS et cinq minutes de trypsination à 37° C. Le nombre de cellules présentes dans le tapis cellulaire est ainsi obtenu.

Après ce comptage à J7, les plaques réensemencées sont remises à incuber à 37° C et 5 % de CO₂ pendant trois jours supplémentaires, sans ajouter des AGE-s. Le comptage des cellules dans le surnageant ainsi que dans le tapis cellulaire, dix jours après l'ensemencement (J10), s'effectue comme à J7.

Nous avons noté dans nos expériences précédentes (Péterszegi *et al*, 2006) qu'au cours d'une première phase de trois jours de culture des fibroblastes de peau humaine avec les AGE-s, soit sept jours après l'ensemencement (puisque'il a fallu 4 jours pour que les cellules soient à confluence), on note surtout un effet cytotoxique en présence d'AGE-s. Pour la deuxième phase, c'est-à-dire jusqu'au dixième jour après l'ensemencement, on n'ajoute plus d'AGE-s. On note à ce moment surtout une accélération de la prolifération des fibroblastes avec une mort cellulaire variable. Il s'agit, à ce niveau, d'un effet à retardement, transmissible entre générations cellulaires – accélération de la prolifération et de la mort cellulaire – sans présence d'AGE-s.

Pour les kératocytes, nous avons effectué, dans certains cas, ces deux expériences à des temps différents pour en tester la reproductibilité.

RÉSULTATS

Deux paramètres ont été relevés pour l'estimation de l'effet des AGE-s : le nombre de cellules mortes et la vitesse de prolifération cellulaire.

Comme on peut le voir sur le tableau II, le degré de cytotoxicité diffère selon la préparation d'AGE testée et selon le type de cellule. Les tableaux II et III récapitulent les effets obtenus avec les différents produits des glycation présentés dans le tableau I, respectivement à 7 et 10 jours après l'ensemencement. Pour les fibroblastes de peau humaine, pendant les quatre derniers jours de la première semaine, les AGE-s sont présents dans le milieu de culture, ensuite, jusqu'au 10^{ème} jour, ils ne sont plus présents. Quant aux kératocytes, ils sont incubés 48 heures avec les AGE-s une fois l'adhésion des cellules obtenue. A partir du cinquième jour, et cela jusqu'au dixième jour, les AGE ne sont plus présents dans le milieu de culture.

CULTURE EN PRÉSENCE D'AGE-S

Mort cellulaire

D'après les résultats du tableau II on constate que les fibroblastes de peau humaine sont beaucoup plus sensibles à l'effet cytotoxique des AGE-s, que les kératocytes. La mort cellulaire des fibroblastes est très fortement augmentée par la solution BSA-glucose-Fe, par celle de lysozyme glyquée et celle de RDG glyqué, alors que la mort cellulaire des kératocytes est même très légèrement diminuée avec ces trois produits AGE-s.

Prolifération cellulaire

En ce qui concerne la prolifération cellulaire, la différence de réponse aux AGE-s concernant ces deux types cellulaires est moins nette.

TABLEAU II. – Effet des AGE-s sur la mort cellulaire et sur les capacités prolifératives des fibroblastes de peau humaine et des kératocytes de cornée humaine.

AGE-s	Concentration finale en protéine ou peptide glyqué	Variation du nombre de cellules mortes par rapport au témoin				Variation du nombre de cellules à confluence par rapport au témoin			
		Fibroblastes		Kératocytes		Fibroblastes		Kératocytes	
		%	p	%	p	%	p	%	p
BSA + glucose + Fe Cl ₂	0,84 µM	+ 273	0,0001	- 8 - 9	NS NS	+ 6	NS	- 15 + 10	NS NS
Lysozyme glyqué	8,8 µM	+ 270	0,0003	- 2,5 - 11	NS NS	+ 11	NS	+ 5 + 41	NS 0,013
RDG glyqué	180 µM pour kératocytes 223 µM pour kératocytes	+ 33	0,028	- 4 - 17	NS NS	- 11	NS	+ 6 + 26	NS 0,036

Le comptage a eu lieu 7 jours après ensemencement (J7). Les cellules ont été incubées 72 heures avec les AGE-s. Le témoin correspond à des cellules cultivées sans AGE-s. Les différences statistiquement significatives sont imprimées en caractères gras. Les valeurs très différentes entre les deux types de cellules sont imprimées en italiques. NS = non significatif.

Tableau III. – Effet des AGE-s sur la mort cellulaire et sur les capacités prolifératives des fibroblastes et des kératocytes entre le septième et le dixième jour, en l'absence d' AGE-s.

AGE-s	Concentration finale en produit glyqué	Variation du nombre de cellules mortes vs témoin				Variation du nombre de cellules à confluence vs témoin			
		Fibroblastes		Kératocytes		Fibroblastes		Kératocytes	
		%	p	%	p	%	p	%	p
BSA + glucose + Fe Cl ₂	0,84 µM	- 8	NS	- 1 + 6	NS NS	+ 221	0,0000	+ 4 + 25	NS 0,047
Lysozyme glyqué	8,8 µM	+ 101	0,006	+ 6 + 5	NS NS	+ 132	0,001	+ 20 + 48	0,009 0,014
RDG glyqué	180 µM pour kératocytes 223 µM pour fibroblastes	+ 28	NS	- 23 + 2	NS NS	+ 37	NS	- 13 + 44	NS 0,027

Le comptage a eu lieu dix jours après l'ensemencement (J10). Le témoin correspond à des cellules qui n'ont jamais été en présence d'AGE-s. Les résultats statistiquement significatifs sont imprimés en caractères gras. Les valeurs très différentes entre les deux types de cellules sont imprimées en italique. NS = non significatif.

Cette différence est significative seulement avec la solution de RGD glyqué : cet AGE entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire chez les kératocytes de 6 % à 26 %, alors qu'il déclenche une baisse de 11 % de la capacité proliférative des fibroblastes.

La différence de phénotype est moins nette avec le lysozyme glyqué : la prolifération des kératocytes est augmentée de 5 à 41 %, alors que celle des fibroblastes n'augmente que de 11 %, la différence entre les deux types de cellules n'étant pas significative.

Après cette expérience de sept jours, les cellules sont réensemencées dans un milieu neuf, ne contenant plus d'AGE-s. On recherche ainsi la « rémanence » de l'effet des AGE-s en leur absence.

La différence de phénotype entre les fibroblastes de peau humaine et les kératocytes se manifeste dans cette deuxième partie de l'expérience surtout au niveau de la prolifération des cellules.

EFFET DE RÉMANENCE

Mort cellulaire

D'après les résultats du tableau III la différence de réponse la plus nette concerne le lysozyme-AGE. En effet, ce produit de glycation entraîne une très forte mortalité (augmentation de 100 % de la mort cellulaire par rapport au contrôle) chez les fibroblastes et est pratiquement sans effet sur les kératocytes (augmentation de 5 % par rapport aux cellules « contrôle », cette différence n'étant pas statistiquement significative).

Le RGD-AGE a également une action différente sur la mort cellulaire selon le type cellulaire visé : la mort cellulaire chez les fibroblastes est augmentée de 28 %, par contre, celle des kératocytes est à peine augmentée de 2 %, voir diminuée de 23 %. Cependant ces résultats ne sont pas significatifs à cause de l'écart type relativement important.

Quant à la BSA glyquée en présence de fer, elle affecte très peu la mort cellulaire des fibroblastes ou des kératocytes.

Prolifération cellulaire

Dans un premier temps, on remarque que tous les AGE testés ici déclenchent une réponse différente selon le type cellulaire. Les fibroblastes sont plus sensibles à l'action de la BSA-glucose-Fe : leur capacité proliférative est augmentée de 221 % contre 25 % pour les kératocytes. La différence de réponse au lysozyme glyqué est également claire : la capacité proliférative des fibroblastes est augmentée de 132 % contre 20 à 40 % pour les kératocytes. Quant au RGD glyqué, la différence de réponse des cellules est plus atténuée : la prolifération des fibroblastes est augmentée de 37 % (NS) et celle des kératocytes de 44 % ($p < 0,027$) avec la plus forte concentration du produit glyqué. La concentration plus faible testée n'a pas d'effet significatif.

DISCUSSION-CONCLUSION

On note une nette différence entre les fibroblastes et les kératocytes quant à leur réaction aux produits glyqués testés. Au cours des premiers sept jours d'incubation, on note une cytotoxicité plus élevée sur les fibroblastes que sur les kératocytes. Cette différence dépend de la nature de l'AGE testé.

Au cours de la deuxième partie de l'expérience, portant sur l'effet de rémanence (absence d'AGE-s dans le milieu), la différence de phénotype quant à la réaction aux AGE-s se manifeste surtout au niveau de la prolifération cellulaire. Celle-ci est nettement stimulée chez les fibroblastes et très peu, voire pas du tout, chez les kératocytes.

Ces résultats confirment nos travaux antérieurs, montrant une différence de phénotype entre les fibroblastes cutanés et les kératocytes de la cornée, les deux d'origine humaine, en particulier quant à la régulation de la biosynthèse des glycosaminoglycannes (Isnard *et al.*, 2002). Il paraît probable que l'exposition beaucoup plus forte des kératocytes aux rayons UV, surtout aux UVA très pénétrants, aurait permis, au cours de l'évolution, d'élaborer et de rendre héritable une meilleure résistance à l'effet cytotoxique des radicaux libres que pour les fibroblastes cutanés, protégés des UV par la mélanine de la couche épidermique.

L'ensemble des résultats de la littérature, brièvement résumé au début de cette note, ainsi que nos résultats personnels ci-dessus détaillés, confirment l'intérêt de l'étude de la réaction de Maillard en ophtalmologie. Quant aux résultats concernant la comparaison du phénotype des kératocytes et des fibroblastes, ils confirment l'existence de nettes différences entre ces deux types cellulaires. La résistance des kératocytes à l'effet nuisible des AGE-s paraît nettement plus importante que celle des fibroblastes cutanés.

BIBLIOGRAPHIE

- Baynes J. W., Monnier V. M., Ames J. M. & Thorpe S. R., editors. The Maillard reaction: chemistry at the interface of nutrition, aging, and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, 2005, vol. 1043.
- Chakravarthy U., Hayes R. G., Stitt A. W. & McAuley E., Archer D. B., Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes*, 1998, 47, 945-952.
- Deguine V., Menasche M., Ferrari M., Froisse L., Pouliquen Y. & Robert L., Free radical depolymerisation of hyaluronan by Maillard reaction products. Role in liquefaction of aging vitreous. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1998, 22, 17-22.
- Hammes H. P., Hoerauf H., Alt A., Schleicher E., Clausen J. T., Bretzel R. G. & Laqua H., N(epsilon)(carboxymethyl)lysine and the AGE receptor RAGE colocalize in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999, 40, 1855-1859.
- Ishibashi T., Sorgente N., Patterson R. & Ryan S. J., Pathogenesis of drusen in the primate. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1986, 27, 184-193.
- Isnard N., Fodil I., Robert L. & Renard G., Modulation of cell phenotype during *in vitro* aging. Glycosaminoglycan biosynthe-

- sis by skin fibroblasts and corneal keratocytes. *Exp. Gerontol.*, 2002, 37, 1377-1385.
- de La Rochette A., Birlouez-Aragon I., Silva E. & Morlière P., Advanced glycation endproducts as UVA photosensitizers of tryptophan and ascorbic acid: consequences for the lens. *Biocim. Biophys. Acta*, 2003, 1621, 235-241.
- Malik N. S. & Meek K. M., Vitamins and analgesics in the prevention of collagen aging. *Age, Ageing*, 1996, 25, 279-284.
- Nicholl I. D., Stitt A. W., Moore J. E., Ritchie A. J., Archer D. B. & Bucala R., Increased levels of advanced glycation end-products in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Mol. Med.*, 1998, 4, 594-601.
- Padayatti P. S., Ng A. S., Uchida K., Glomb M. A. & Nagaraj R. H., Argpyrimidine, a blue fluorophore in human lens proteins: high levels in brunescant cataractous lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001, 42, 1299-1304.
- Péterszegi G., Molinari J., Ravelojaona V. & Robert L., Effect of advanced glycation end-products on cell proliferation and cell death. *Pathol. Biol.*, 2006, 54, 369-404.
- Schultz R. O., Van Horn D. L., Peters M. A., Klewin K. M. & Schutten W. H., Diabetic keratopathy. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 1981, 79, 180-199.
- Sebag J., Diabetic vitreopathy. *Ophthalmology*, 1996, 103, 205-206.
- Stitt A. W., Vlassara H. & Bucala R., Atherogenesis and advanced glycation: promotion, progression and prevention. In : Chiorazzi N., Fujio-Numano R. G., Ross R. eds, "Atherosclerosis IV". *Ann. NY Acad. Sci.*, 1997, 811, 115-129.
- Stitt A. W., Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *Br. J. Ophthalmol.*, 2001, 85, 746-753.
- Stitt A. W., The Maillard reaction in eye diseases. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2005, 1043, 582-597.
- Thornalley P. J., Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGE-s. *Cell. Mol. Biol.*, 1998, 44, 1013-1023.
- Zarina S., Zhao H. R. & Abraham E. C., Advanced glycation end products in human senile and diabetic cataractous lenses. *Mol. Cell. Biochem.*, 2000, 210, 29-34.

La loi du 11 mars 1957, n'autorisant aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1^{er} de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal.