



**HAL**  
open science

# Un régime appauvri en acides aminés aromatiques freine la progression de l'insuffisance rénale chronique chez la souris

Christophe Barba

## ► To cite this version:

Christophe Barba. Un régime appauvri en acides aminés aromatiques freine la progression de l'insuffisance rénale chronique chez la souris. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-03634418

**HAL Id: dumas-03634418**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03634418v1>

Submitted on 7 Apr 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## **AVERTISSEMENT**

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'État de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2 - L 335.10

**UNIVERSITÉ DE PARIS**

Faculté de Santé

**UFR de Médecine**

**Année 2020**

**N° 71**

**THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

Présentée et soutenue publiquement le : 25 septembre 2020

Par

**Christophe BARBA**

**Un régime appauvri en acides aminés aromatiques freine la  
progression de l'insuffisance rénale chronique chez la souris**

Dirigée par Mme la Docteure Laetitia Koppe

JURY

Mme la Professeure Marie Noëlle Peraldi

Présidente

M. le Professeur Alexandre Hertig

Membre du jury

M. le Professeur Jean Jacques Boffa

Membre du jury

Mme la Docteure Laetitia Koppe

Directrice

Mme la Docteure Mathilde Nouvier

Membre du jury

## Remerciements

### **Madame le Professeur Peraldi**

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et je vous en remercie. Je vous suis également reconnaissant pour tout ce que vous m'avez appris durant mon semestre dans votre service. Merci pour votre disponibilité, votre patience et votre engagement auprès des étudiants.

### **Madame le Docteur Koppe**

Tu m'as fait l'honneur d'accepter de travailler avec moi pendant cette année de master puis dans ton service. Merci pour ton aide précieuse dans la réalisation de ce travail. C'est une grande joie de savoir que je vais travailler à tes côtés dans les années à venir.

### **Monsieur le Professeur Boffa**

Je vous remercie pour ces 6 mois d'enseignement dans votre service, et pour me faire l'honneur de juger ce travail. Soyez assuré de ma gratitude.

### **Monsieur le Professeur Hertig**

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de siéger dans mon jury, je vous suis reconnaissant pour votre enseignement et votre implication dans la formation des internes.

### **Madame le Docteur Nouvier**

Je te remercie pour ce semestre à tes côtés, ton humour, ton partage de connaissances, ta sincérité et tes qualités humaines. Ce fut un plaisir de travailler avec toi, sois assurée de mon profond respect, j'espère que l'aventure ne s'arrêtera pas là.

### **Monsieur le Professeur Soulage**

Grâce à toi, j'ai eu l'occasion de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche. Et ce fut un réel plaisir. Merci pour tes conseils avisés, ta bienveillance, tous ces moments partagés autour d'un café ou d'une souris. Ta sympathie et ton humour sont sans limite.

**A ma famille,**

A mes parents qui m'ont soutenu toutes ces années, à leurs conseils avisés et les valeurs qu'ils m'ont transmises, et leur écoute permanente. C'est vous qui m'avez donné envie de me lancer dans cette belle aventure.

A mon frère, toujours disponible dans les bons et les mauvais moments, tu es sans le savoir source de réconfort. Je me réjouis de partager tous ces instants précieux à tes côtés.

**A mes amis,**

Aux abonnés du 128, Léo, Vincent, Edouard, et la relève. Que de souvenirs inoubliables dans cette demeure. Merci pour l'animation qui y régnait. Vous m'avez appris, en plus de vivre en communauté, à quoi ressemblait une amitié infaillible.

A tous les autres, Martin, Hugo, Olivier, Carlo, Bolot, Deb, Simon, Fernoux, Laurine, Mylène, Margaux, Marine et j'en oublie, merci pour votre amitié sincère et tous ces moments partagés.

**A mes collègues**, parisiens comme lyonnais, médecins, chefs de clinique et co-internes, ce fut un plaisir de partager ces années avec vous.

**A Léa**, merci pour ton soutien affectif sans faille, ton humour et ton envie de me voir réussir. J'ai hâte de découvrir ce que l'avenir nous réserve.

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
<b>GENERALITES SUR L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE.....</b>	<b>5</b>
<b>LES TOXINES UREMQUES .....</b>	<b>6</b>
<b>STRATEGIES THERAPEUTIQUES VISANT A DIMINUER LES TOXINES UREMQUES.....</b>	<b>9</b>
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>12</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>13</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>14</b>
<b>A LOW AROMATIC AMINO-ACID DIET MAY IMPROVE RENAL FUNCTION AND PREVENT KIDNEY FIBROSIS IN MICE WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE .....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>17</b>
<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>18</b>
<b>ANIMALS.....</b>	<b>18</b>
<b>DIURESIS AND 24-HOUR PROTEINURIA .....</b>	<b>19</b>
<b>EUTHANASIA AND NECROPSY .....</b>	<b>19</b>
<b>BIOCHEMICAL ANALYSIS .....</b>	<b>20</b>
<b>RENAL HISTOLOGY .....</b>	<b>20</b>
<b>MEASUREMENT OF UREMIC TOXINS .....</b>	<b>21</b>
<b>ANALYSIS OF GENE EXPRESSION .....</b>	<b>21</b>
<b>STATISTICAL ANALYSIS .....</b>	<b>21</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>22</b>
<b>LOW AROMATIC AMINO-ACID DIET DOES NOT ALTER FOOD INTAKE AND BODY COMPOSITION IN CKD MICE .....</b>	<b>22</b>
<b>SPECIFIC REDUCTION OF DIETARY AROMATIC AMINO ACIDS ATTENUATES KIDNEY INJURY IN CKD MICE.....</b>	<b>23</b>
<b>LOW AROMATIC AMINO-ACID DIET HAS NO IMPACT ON METABOLIC PARAMETERS.....</b>	<b>24</b>
<b>RESTRICTION IN DIETARY AROMATIC AMINO ACIDS DECREASES FREE UREMIC TOXINS CONCENTRATION .....</b>	<b>25</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>25</b>
<b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>30</b>
<b>AUTHOR CONTRIBUTIONS .....</b>	<b>30</b>
<b>DISCLOSURE .....</b>	<b>30</b>
<b>TABLES .....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURES.....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURES LEGENDS .....</b>	<b>41</b>
<b>SUPPLEMENTARY TABLES .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>48</b>

## Introduction

### Généralités sur l'insuffisance rénale chronique

La maladie rénale chronique touche actuellement environ 10% de la population française. En 2017, plus de 80 000 patients en France avaient atteint le stade d'insuffisance rénale terminale selon le registre REIN, nécessitant une technique de suppléance rénale telles que l'épuration extra-rénale (hémodialyse ou dialyse péritonéale) ou la transplantation rénale. Le dosage de la créatinine plasmatique est utilisé en routine pour estimer le débit de filtration glomérulaire (DFG), et l'IRC est définie par un DFG inférieur à 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> durant plus de 3 mois (1).

**Tableau 1**  
**Stades de la maladie rénale chronique selon la National Kidney Foundation**

Stade	Description	DFG (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )
1	MRC* avec fonction rénale normale	≥ 90
2	MRC* avec insuffisance rénale légère	60-89
3A	Insuffisance rénale légère à modérée	45-59
3B	Insuffisance rénale modérée à sévère	30-44
4	Insuffisance rénale sévère	15-29
5	Insuffisance rénale terminale	< 15

Abréviations : MRC : Maladie Rénale Chronique ; DFG : Débit de Filtration Glomérulaire. \* : Signes rénaux (protéinurie, hématurie, leucocyturie persistant plus de 3 mois, anomalies morphologiques avec fonction rénale normale)

L'IRC a été identifiée comme un facteur de risque indépendant de maladies cardiovasculaires, favorisant entre autres la survenue d'accidents vasculaires cérébraux, d'infarctus du myocarde et d'artériopathie des membres inférieurs (2). En effet, un patient atteint de MRC a un risque de mortalité cardiovasculaire bien supérieur au risque d'insuffisance rénale terminale. Environ 50% des insuffisances rénales terminales dans le monde sont attribuables aux néphropathies

vasculaires et hypertensives (25%) et aux néphropathies diabétiques (22%). Viennent ensuite par ordre de fréquence les glomérulonéphrites chroniques, les néphropathies héréditaires, les néphropathies interstitielles et les néphropathies d'origine indéterminée. Face à l'augmentation inquiétante de l'obésité et du diabète (3), l'IRC est un problème de santé publique croissant dans les pays occidentaux. On constate également une progression fulgurante dans les pays en voie de développement, notamment en Afrique, du fait de l'urbanisation et de l'augmentation de la sédentarité des populations. De plus, le coût des traitements représente un obstacle majeur à une prise en charge adéquate dans ces pays.

La prise en charge du patient ayant une IRC est multimodale. Elle associe, outre le traitement étiologique de l'atteinte rénale, le contrôle optimal de l'HTA et d'un éventuel diabète, mais aussi l'utilisation de bloqueurs du système rénine angiotensine aldostérone (SRAA). S'y ajoutent la prise en charge des complications et la préparation aux traitements de suppléance rénale. Enfin, les stratégies nutritionnelles et notamment le régime pauvre en protéines ont montré des effets bénéfiques sur la progression de l'IRC et l'amélioration des paramètres métaboliques (4).

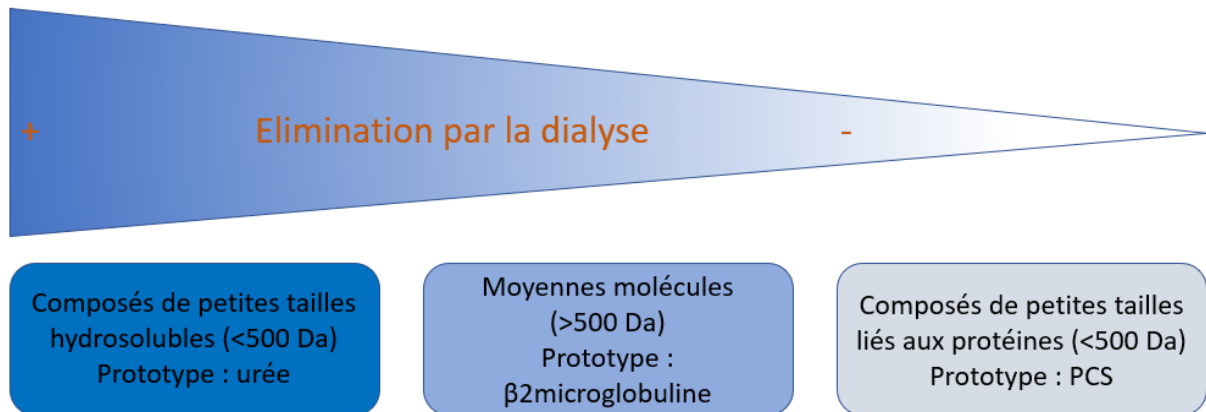
## **Les toxines urémiques**

L'IRC est caractérisée par l'accumulation de nombreux métabolites toxiques dans l'organisme, appelés « toxines urémiques ». Il s'agit de molécules normalement filtrées par le rein et éliminées dans les urines, exerçant une action biologique délétère sur l'organisme et jouant un rôle majeur dans les comorbidités du patient IRC (5). Elles sont actuellement recensées grâce au consortium EUtox (European Uremic Toxin Work Group). Ces toxines sont classées en fonction de leurs tailles et de leurs capacités à se lier aux protéines plasmatiques : les petites molécules hydrosolubles (< 500 Da, telles que l'urée et le TMAO),



les molécules de poids moléculaires intermédiaires (500 Da, 60 kDa, telles que la PTH et la bêta-2 microglobuline), mais aussi les molécules liées aux protéines (< 500 Da, comme le p-cresyl sulfate, PCS, et l'indoxyl sulfate, IS).

**Figure 1 : Élimination des toxines urémiques par les techniques de dialyse**

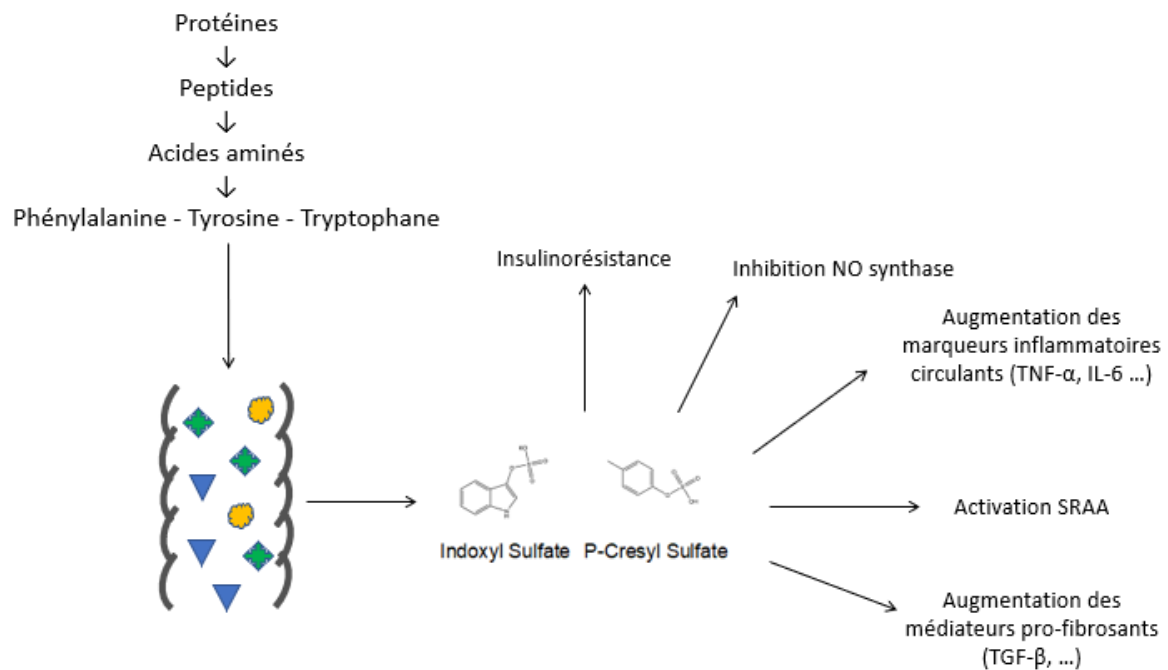


Elles sont aussi parfois classées selon leurs origines (6), on distingue trois différentes sources de toxines : celles issues du métabolisme exogènes (essentiellement liées à l'alimentation), celles produites par le microbiote intestinal (7), et celles dérivées du métabolisme endogène (comme par exemple l'urée). La perturbation du microbiote, aussi appelée dysbiose intestinale, est un élément clef dans la production de ces toxines urémiques (8). Des travaux récents ont montré que le microbiote intestinal des patients IRC présentait des différences notables avec les sujets sains, avec entre autres une diminution de la biodiversité (9). Ces modifications ont été rattachées à plusieurs mécanismes : l'urémie déstabilise l'épithélium intestinal, entraînant une augmentation de sa perméabilité et une translocation bactérienne à l'origine d'une inflammation systémique (10) ; les différents régimes alimentaires, la prescription d'antibiotiques ou de fer, et l'acidose métabolique sont autant de facteurs pouvant modifier le microbiote des patients (11). De plus, chez les hémodialysés, l'hypervolémie est source de congestion de la paroi intestinale, et l'ultrafiltration au cours

d'une séance de dialyse peut être à l'origine d'une hypoperfusion intestinale, entraînant une augmentation de sa perméabilité et une translocation bactérienne (12).

L'indoxyI sulfate (IS) et le p-cresyl sulfate (PCS) sont produits au niveau du microbiote intestinal via la fermentation de deux acides aminés aromatiques, le tryptophane et la tyrosine, respectivement. La phénylalanine participe également à la production du PCS. Des modèles murins ont mis en évidence que la production de ces deux toxines chez des souris *germ-free* était mise en défaut, soulignant bien le rôle du microbiote dans la synthèse de ces toxines (7). Une association forte a été identifiée entre l'accumulation de PCS et l'élévation des marqueurs inflammatoires circulants (TNF- $\alpha$ , IL-6 ...) et du stress oxydant, *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (13). Le PCS est aussi capable d'activer le SRAA et la voie du TGF- $\beta$ , contribuant au développement de la fibrose rénale. Il a également été démontré qu'il perturbait la signalisation de l'insuline, participant aux mécanismes d'insulino-résistance chez les patients IRC (14). Il a été montré que l'IS accélérât le processus d'athérosclérose et favorisait la survenue de calcifications vasculaires. Il semblerait qu'il soit aussi capable d'accélérer la progression du rétrécissement aortique calcifié via des mécanismes pro-inflammatoires (15). A l'échelle moléculaire, l'IS est à l'origine d'une altération des systèmes anti oxydatifs, provoquant des lésions du glycocalyx et une inhibition de la production de NO. L'aryl hydrocarbon recepneur (AhR) est un facteur de transcription qui est activé par l'IS au cours de la MRC (16). Il en résulte une activation de la cascade de coagulation ainsi qu'un phénotype pro-inflammatoire. Ces mécanismes sont responsables de lésions des cellules tubulaires rénales, contribuant à la progression de l'IRC. Par conséquent, cibler la production de ces toxines urémiques chez les patients IRC semble une stratégie pertinente pour prévenir la survenue d'évènements cardiovasculaires et la détérioration de la fonction rénale.

**Figure 2 : Altérations métaboliques secondaires au p-cresyl sulfate et à l'indoxyl sulfate**



## Stratégies thérapeutiques visant à diminuer les toxines urémiques

Bien que les techniques de suppléance rénale soient les plus efficaces pour réduire les concentrations de toxines urémiques, celles-ci ne sont accessibles qu'aux patients insuffisants rénaux terminaux (DFG < 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>). De plus, au cours d'une séance d'hémodialyse, seule la fraction libre des molécules liées aux protéines (soit 5 à 10% du total des toxines liées aux protéines) traverse la membrane de dialyse, résultant en une très faible épuration de ces toxines (environ 20%) comparées aux molécules hydro solubles de bas poids moléculaire (épuration > 80%).

Le régime pauvre en protéines semble efficace sur le ralentissement de la dégradation de la fonction rénale, bien que ses bénéfices soient parfois considérés comme modestes (17). Néanmoins, le rôle de la restriction protéique dans la protection de la fonction rénale

résiduelle reste peu clair. Des modèles animaux mais aussi des études cliniques ont prouvé qu'un régime riche en protéines induisait des modifications hémodynamiques rénales à l'origine d'une augmentation du flux sanguin rénal, ceci entraînant une hyperpression intra glomérulaire et une augmentation du DFG, et ayant pour conséquences des lésions glomérulaires progressives puis une glomérulosclérose (18–21).

**Tableau 2 : Apports protéiques recommandés**

	<b>Sujet sain</b>	<b>Sujet sain &gt; 65 ans</b>	<b>Pathologie aiguë ou chronique (hors IRC)</b>	<b>IRC et régime pauvre en protéines</b>	<b>IRC et régime très pauvre en protéines</b>	<b>HD chronique</b>
Apports protéiques recommandés (g/kg/j)	0.8	1.0-1.2	1.2-1.5	0.6-0.8	0.3	1.2-1.4

Abréviations : IRC : Insuffisance Rénale Chronique ; HD : hémodialysé.

La restriction protéique chez les patients IRC a montré un bénéfice sur la diminution de la protéinurie, réduisant le risque de progression de l'IRC via la réduction des lésions tubulaires liées à une protéinurie abondante (22). Un impact métabolique favorable a également été prouvé, ainsi qu'une augmentation de l'insulino-sensibilité (23). Une des hypothèses avancées concernant le bénéfice de ce régime est qu'il permettrait la réduction des apports en précurseurs des toxines urémiques, conduisant à un meilleur contrôle urémique (24).

Cette stratégie nutritionnelle a cependant plusieurs inconvénients, notamment la mauvaise observance et le risque de dénutrition (4,25). On sait aujourd'hui que la dénutrition au cours de l'IRC est un phénomène fréquent, les patients diminuant spontanément leurs apports caloriques et protéiques (26). De plus, au même titre que les complications cardiovasculaires, la dénutrition est un facteur de morbidité et mortalité chez les patients IRC. Les mécanismes à

l'origine de ce phénomène sont multiples, avec entre autres une augmentation du catabolisme protidique du fait de l'acidose métabolique, ainsi qu'une diminution de la synthèse d'albumine (27). Limiter les apports protéiques dans l'IRC peut donc s'avérer bénéfique sur la fonction rénale mais également délétère pour le patient si celui-ci n'est pas encadré par une prise en charge diététique rigoureuse.

Depuis des années, de nombreux chercheurs ont tenté de réduire la production de toxines urémiques chez les patients IRC, en ciblant notamment le PCS et l'IS. L'AST-120 est un adsorbant oral diminuant la production d'IS par la chélation de son précurseur, l'indole, dans la lumière intestinale. Plusieurs études ont démontré que l'administration d'AST-120 permettait de réduire les concentrations plasmatiques d'IS, ralentissant la dégradation de la fonction rénale chez les patients IRC (28). Cependant, un essai contrôlé randomisé récent a montré des résultats décevants, ne confirmant pas le bénéfice de l'AST-120. De plus, ce traitement pouvait être mal toléré par les patients, provoquant des effets indésirables gastro-intestinaux (29).

Une autre stratégie thérapeutique débattue depuis longtemps est l'utilisation d'un régime très pauvre en protéines (0,3 g/kg/J) associé à une supplémentation en céto-analogues. Il s'agit d'acides aminés essentiels dépourvus de leurs groupes amines, réduisant la production d'urée dans l'organisme. Cette stratégie est pour l'heure très controversée et la Haute Autorité de Santé a jugé que l'utilisation des céto analogues apportait un service médical rendu faible dans la prise en charge des patients atteints d'IRC, en association avec un régime hypo protidique strict.

Les prébiotiques sont des composés chimiques, utilisés par les microorganismes de l'hôte, et sensés apporter un bénéfice sur la santé. Les probiotiques sont des microorganismes vivants permettant de restaurer l'équilibre de la flore intestinale. Depuis que le rôle du microbiote intestinal dans la production des toxines urémiques a été mis en évidence, la supplémentation

en prébiotiques et/ou probiotiques est l'objet de nombreuses études dans l'IRC. Plusieurs travaux expérimentaux ont démontré que ces composés avaient la capacité de diminuer la production de toxines urémiques. Néanmoins, des essais randomisés contrôlés plus récents n'ont pas confirmé le bénéfice de cette supplémentation (30).

Il est ainsi urgent de développer de nouvelles stratégies (autres que les techniques de dialyse) pour réduire les concentrations de toxines urémiques liées aux protéines, afin de permettre de limiter leurs effets délétères. Pour l'heure, aucune donnée solide ne permet de déterminer si la diminution de la production des toxines urémiques en lien avec le régime pauvre en protéines est secondaire à la modification du microbiote intestinale (*via* les inégales concentrations de fibres/protéines ingérées) et/ou à la différence de compositions en acides aminés apportés par l'alimentation.

## **Objectifs de l'étude**

L'objectif de ce travail était de déterminer si un régime normoprotéique mais appauvri en acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) pourrait être bénéfique dans un modèle expérimental d'IRC.

Pour tester notre hypothèse, nous avons poursuivi, dans un modèle murin d'insuffisance rénale chronique, deux objectifs :

- 1) Évaluer si un régime pauvre en AA aromatiques est efficace pour réduire la production d'IS et de PCS chez des souris IRC
- 2) Déterminer si un régime appauvri en AA aromatiques pourrait suffire à ralentir la dégradation de la fonction rénale

## Abréviations

AA : acides aminés

AhR : Aryl hydrocarbon Recepteur

DFG : débit de filtration glomérulaire

EUtox : European Uremic Toxin Work Group

HD : hémodialyse

HTA : hypertension artérielle

IL-6 : interleukin-6

IRC : insuffisance rénale chronique

KIM-1 : kidney-injury molecule 1

MRC : maladie rénale chronique

N-GAL : neutrophil gelatinase-associated lipocain

NO : monoxyde d'azote

IS : indoxyl sulfate

PCS : p-cresyl sulfate

PTH : parathormone

SRAA : système rénine angiotensine aldostérone

TGF- $\beta$  : transforming growth factor bêta

TMAO : oxyde de triméthylamine

TNF-  $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha

## RESUME

---

Malgré des recommandations sur l'utilisation du régime pauvre en protéines au cours de la maladie rénale chronique (MRC), son intérêt est encore à ce jour débattu car son action reste mal comprise. Une diminution de la production de toxines urémiques pourrait expliquer le bénéfice de ce régime. Les acides aminés aromatique étant les précurseurs de nombreuses toxines urémiques telles que le p-cresyl sulfate (PCS) et l'indoxyl sulfate (IS), nous avons testé si un régime normoprotéique mais appauvri en acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane, phénylalanine) pourrait s'avérer aussi efficace qu'un régime pauvre en protéines, en limitant la production des toxines urémiques. La MRC a été induite chez des souris C57Bl/6 JRj par néphrectomie chimique via un régime adénine (0,25%, 4 semaines). Elles ont ensuite reçu 3 différents régimes sur une période de 6 semaines : standard (normoprotéique, NPD : 14,7% de protéines, AA aromatiques 0.019%), pauvre en protéines (LPD, protéines 5%, AA aromatiques 0.007%) ou pauvre en AA aromatiques (LAA : protéines 14%, AA aromatiques 0.007%). Il n'y avait pas de différence significative sur le poids des souris en fonction des régimes. La créatininémie était significativement plus basse dans le groupe LPD et LAA que dans le groupe NPD ( $71,6 \pm 4,2$  et  $73 \pm 3,8$   $\mu\text{mol/L}$  vs  $127 \pm 6,3$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,0001$ ), de même que la protéinurie ( $1,3 \pm 0,3$  et  $1,2 \pm 0,1$  mg/24h vs  $3,8 \pm 0,9$  mg/24h,  $p < 0,05$ ). La fibrose interstitielle était plus importante dans le groupe NPD versus LPD et LAA ( $17,3 \pm 1,1\%$  vs  $10,1 \pm 0,6\%$  et  $12,7 \pm 1,6\%$ ,  $p < 0,0001$  et  $p = 0,01$  respectivement). La fraction libre du PCS et de l'IS était plus basse dans le groupe LPD et LAA vs NPD ( $p = 0,0003$  et  $p = 0,10$ ). Ces résultats suggèrent qu'un régime normoprotéique appauvri en acides aminés aromatiques confère un bénéfice similaire au régime pauvre en protéines, ralentissant la progression de l'IRC grâce à la réduction de production des toxines urémiques, sans exposer au risque de dénutrition.



# **A LOW AROMATIC AMINO-ACID DIET MAY IMPROVE RENAL FUNCTION AND PREVENT KIDNEY FIBROSIS IN MICE WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE**

Christophe Barba <sup>1,2</sup>, Christophe O. Soulage <sup>1</sup>, Griet Glorieux <sup>3</sup>, Cécile Picard<sup>4</sup>, Denis Fouque <sup>1,2</sup>, Laetitia Koppe <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lyon, CarMeN lab, INSA-Lyon, INSERM U1060, INRA, Université Claude Bernard Lyon 1, Rhône, Villeurbanne, FRANCE.

<sup>2</sup> Hospices Civils de Lyon, Service de Néphrologie, Dialyse et Nutrition Rénale, Centre Hospitalier de Lyon Sud - Lyon (France)

<sup>3</sup> Nephrology Section, Department of Internal Medicine, University Hospital - Ghent (Belgique)

<sup>4</sup> Hospices Civils de Lyon - Centre de biologie et pathologie Est - Lyon (France)

**Running title:** low aromatic amino-acid diet in CKD

\* Corresponding author: Dr. Laetitia Koppe, MD, PhD Dept. Nephrology and Nutrition, Centre Hospitalier Lyon SUD, Chemin du grand Revoyet 69495 Pierre Bénite, France Tel: +33 4 72 67 87 15; Fax: + 33 4 72 67 87 10

**Key word:** aromatic amino-acids, tryptophan, tyrosine, chronic kidney disease, uremic toxins, low protein diet

**Word count abstract:** 248 words

**Word count text:** 3764 words

**References:** 33

**Figures:** 6

**Tables:** 4 + 2 Supplementary Tables

## ABSTRACT

Despite decades of use of low protein diets (LPD) in the management of chronic kidney disease (CKD) management, the mechanisms through which they delay the progression to end-stage renal disease (ESRD) remain controversial. A reduced production of uremic toxins could contribute to the benefits of LPDs. Aromatic amino-acids (AA) are precursors of major uremic toxins such as p-cresyl sulfate (PCS), indoxyl sulfate (IS), indole-3-acetic acid or phenol. We investigated the hypothesis that a low aromatic amino acid diet (LA-AAD, namely low intake of tyrosine, tryptophan and phenylalanine) while being normoproteic, could be as effective as a LPD, through the specific diminution of uremic toxins production. Kidney failure was chemically induced in mice with a diet containing 0.25% (w/w) of adenine. Thereafter, mice received three different diets for six weeks: normoproteic diet (NPD: 14.7% protein, aromatic AA 0.019%), LPD (5% protein, aromatic AA 0.007%) and LA-AAD (14% protein, aromatic AA 0.007%). LA-AAD and LPD had no significant effect on body weight. Both LPD and LA-AD significantly reduced proteinuria and plasma creatinine as compared with that observed in the NPD group. Kidney fibrosis and inflammation were reduced with LPD and LA-AAD. LPD slightly decreased plasma free PCS and IS compared to NPD; however, LA-AAD was associated with a decreased plasma concentration of uremic toxins. These results suggest that a LA-AAD confers similar benefits of a LPD in delaying the progression of CKD through a reduction in uremic toxins production, with a lower risk of malnutrition.

## INTRODUCTION

Because nutritional status often becomes unbalanced during the course of chronic kidney disease (CKD), nutritional intervention is a mandatory part of the management of patients with CKD (31). It has long been recognized that high protein intake has a deleterious impact on renal function in CKD patients, by increasing glomerular filtration, leading to progressive glomerular sclerosis (18,19). Hence, a low protein diet (LPD) (0.6 to 0.8 g/kg/day) is now commonly recommended for non-hemodialysis CKD patients, decreasing kidney workload and slowing renal function decline. For decades, various health benefits have been attributed to protein restriction in patients with CKD, such as favorable metabolic effects, reducing proteinuria and uremic symptoms and improvement in insulin-sensitivity (17). One of the hypotheses put forward to explain these effects is a potential decrease in uremic toxin concentrations, improving renal and metabolic parameters and leading to better uremia control (24). However, if LPD were shown to efficiently delay CKD progression, the underlying mechanisms remain poorly understood. Besides, this nutritional strategy has several drawbacks, such as a poor compliance and a potential risk of energy wasting (25).

P-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS) are protein-bound uremic toxins produced by the gut microbiota (6). Previous studies showed that CKD patients microbiota exhibited a loss of biodiversity and a decrease in bacterial operational taxonomic units (9). Indeed, dysregulation of intestinal microbiota, i.e. dysbiosis, is a key contributor to the generation of uremic toxins (8). IS and PCS are produced by intestinal bacteria from the fermentation of aromatic amino acids, tryptophan and tyrosine (and to a limited extent phenylalanine), respectively (7). A strong association has been demonstrated between accumulation of PCS and cardiovascular damages, and PCS concentrations are associated with the rise of inflammatory markers (e.g.: IL-6) and the increase in oxidative stress, through

the production of reactive oxygen species (13,32). It has also been shown that IS levels are negatively correlated with the glomerular filtration rate (GFR) and contributes to the progression of CKD (13). Consequently, lowering uremic toxin levels in CKD patients appears to be a relevant strategy to prevent cardiovascular events and deterioration of kidney function.

The aim of the present study was to determine whether a normoproteic diet (NPD) selectively deprived in aromatic amino acids (i.e. tyrosine, tryptophan and phenylalanine), could be as beneficial as LPD in an experimental model of CKD. To test our hypothesis, we addressed two specific aims: i) To decipher whether a low aromatic aminoacid diet (LA-AAD) could efficiently reduce renal fibrosis and inflammation in CKD mice ii) To assess if a tyrosine, tryptophan and phenylalanine-deficient diet is efficient to reduce IS and PCS production in CKD mice.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Seventy male four weeks old male C57BL/6JRj mice, were purchased from Janvier SA (Le Genest-Saint-Isle, France) and were group housed in an air-conditioned room with a controlled environment of  $21 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  and 60-70% humidity with a 12 hours light/dark cycle. Experimental design of the study is illustrated in **Figure 6**. Mice were randomly assigned in 6 groups and housed in 15 cages (4-5 mice per cage). Mice were allowed a one-week period of acclimatization with free access to food and water. They were then assigned in two groups with 40 mice (CKD mice) receiving a three weeks and a half adenine diet (0.25% w/w adenine on a A04 basis SAFE, Augy, France) to induce chronic kidney disease (CKD), and 34 mice (control group) fed with standard diet (SAFE, Augy, France). After one week of

washout, mice were divided into 6 subgroups to receive three different custom synthetic diets (SAFE, Augy, France) into each CKD and control group: LPD (5.0% proteins), a low aromatic amino-acid diet (LA-AAD) (14.0% proteins) and a normoproteic diet (NPD) (14.7% proteins) (see diet composition in **Table 1**). Body weight and food intake were measured once a week, and food intake was calculated for each cage as the difference between the amount given and that removed from the cage. The food spillage, evaluated in preliminary experiments, was lower than 5% and therefore considered as negligible. All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines laid down by the French Ministry of Agriculture (n°2013-118) and the European Union Council Directive for the protection of animals used for scientific purposes of September 22<sup>nd</sup>, 2010 (2010/63UE). The study protocol was approved by the local ethic committee (CETIL, Comité Ethique de l'INSA-Lyon, CNREEA n°102) on April 18<sup>th</sup>, 2018 under the reference # 11678.

### **Diuresis and 24-hour proteinuria**

After 6 weeks of each diet, mice were housed for 24h into metabolic cages (Charles River laboratories), to collect 24-hour diuresis. Urine volume was determined gravimetrically, and protein concentration was measured according to the method of Bradford (Bradford reagent, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

### **Euthanasia and necropsy**

At the end of the study, mice were euthanized with sodium pentobarbital (180mg/kg intraperitoneally, Doletal®). Body weight and body length were measured. Blood was drawn from cardiac puncture on heparinized syringe and centrifuged 4 minutes at 3600 x g to separate plasma. Plasma was collected, snap-frozen in liquid nitrogen and then stored at -

80°C until analysis. Kidneys, liver, heart, gastrocnemius muscle and two different pads of white adipose tissue (epididymal and retroperitoneal) were dissected out. One kidney was stored for 48h in a paraformaldehyde (PFA) 4% (w/v) solution for histology, and the second one was frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. All other tissues were weighted, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### **Biochemical analysis**

Plasma creatinine and urea concentrations were measured with colorimetric assays from Cayman (Ann Arbor, USA) and Sobioda (Montbonnot, France), respectively. Plasma total cholesterol and triacylglycerol concentrations were measured with colorimetric kits Cholesterol RTU and Triglycerides PAP, respectively (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Plasma albumin was assessed using BCG Albumin Assay Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). After a 5-hour fast, animals were injected i.p. with 1 g/kg dextrose in sterile water. Blood glucose was measured prior to and 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 minutes after injection. Blood glucose values were determined from a drop of blood sampled from the tail using an automatic glucose monitor.

### **Renal histology**

Kidneys were paraffin-embedded, cut and stained using hematoxylin and eosin, and Sirius red staining (Cellimaps, Dijon, France). Pictures of non-overlapping fields were taken with Olympus microscope. We used Sirius red staining and FIJI software to quantify the area corresponding to collagen fibrils (i.e. interstitial fibrosis) for each image.

## **Measurement of uremic toxins**

Free and total uremic toxins were analyzed by using reverse-HPLC coupled to a fluorescence detector as previously described (33). The limit of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ) for each analyte are resumed in **Supplementary table 1**. In statistical analysis, values comprised between LOD and LOQ were replaced by  $(\text{LOD}+\text{LOQ})/2$ .

## **Analysis of gene expression**

Kidney tissue was crushed into liquid nitrogen, and total RNA was extracted using TRIzol Reagent, according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Purity and concentration of RNA were determined using NanodropOne (Ozyme) and quality checked using Bioanalyser (Agilent). First-strand cDNAs were synthesized from 1  $\mu\text{g}$  of total RNAs using PrimeScript RT kit (Ozyme). Real-time PCR assays were performed with Rotor-Gene 6000 (Qiagen) using SYBR qPCR Premix Ex Taq (Ozyme). TATA-box binding protein (TBP) was used as reference gene to normalize the results. Primers sequences are listed in **Supplementary Table 2**.

## **Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. All statistical analyses were performed using R version 3.5.1 and GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). D'Agostino & Pearson test was used to assess normality. Student t test or Mann-Whitney U test were used for simple comparison, whereas ANOVA or Kruskal-Wallis analyses were performed for multiple comparisons. Welch's correction was applied in case of variance inhomogeneity. Multiple post-hoc comparisons using Tukey test and Dunnett correction were performed to

identify significant differences between groups. The different groups were compared to the CKD mice with NPD. A p value < 0.05 was considered as statistically significant.

## RESULTS

### **Low aromatic amino-acid diet does not alter food intake and body composition in CKD mice**

In order to study in CKD mice the specific effects of reducing dietary intake of three aromatic amino acids on uremic toxins production and renal function, we designed and constructed an amino acid-defined normal protein diet (NPD) modeled on a 14 % protein diet used as standard (AO4 diet). We also examined two additional diets: a low protein diet (LPD) with a global decrease in amino acids content, in which 5% of calories were derived from amino acids through a uniform reduction of every amino acid in the NPD diet; and a low aromatic amino acid diet (LA-AAD) in which all aromatic amino acids were reduced by two-thirds to match the levels of the LPD, while all other amino acids were kept at the level of the NPD. All three diets were isocaloric with identical levels of dietary fat; the exact formulations of these diets are provided in **Table 1**.

We first verified that LA-AAD diet had no impact on food intake and body composition in the control group. Energy intake was similar in all diets. Control LPD mice gained less weight than mice on NPD or LA-AAD over the course of six weeks as previously described (34) (*data not shown*). However, there were no significantly difference in body weight between mice fed either NPD, LPD or LA-AAD. We therefore proceeded to use control mice with NPD as baseline for investigation of the specific contribution of reduced dietary aromatic acids in CKD mice.



Dietary intakes are summarized in **Figure 1**. Food intake (**Figure 1A**) and energy intake (**Figure 1B**) were lower in CKD mice, compared to the control group. CKD mice fed with LPD had a higher food and energy intake compared to CKD-NPD. However, there was no difference on food intake between CKD-NPD and CKD-LA-AAD. The average protein intake was 57% ( $p<0.001$ ) and 54% ( $p<0.001$ ) lower in CKD-LPD group, compared to CKD-NPD and CKD-LA-AAD groups, respectively (**Figure 1C**). Aromatic amino-acid intakes were significantly lower in both LPD ( $p<0.0001$ ) and LA-AAD ( $p<0.0001$ ) groups, compared to mice fed with NPD (**Figure 1D**). There was no statistical difference in aromatic amino-acid intakes between CKD-LPD and CKD-LA-AAD groups (**Figure 1D**).

Biometric data and organ weights are presented in **Table 2**. At the end of the experimental study, the body weights of CKD mice were lower than those of control mice. However, among CKD mice, no statistical difference in body weight was observed between the specific diets. CKD-LPD had a slightly fat mass accumulation that can be explained by the higher food intake but CKD-NPD and CKD-LA-AAD had similar lean and fat mass. Kidney weights were lower in CKD compared to control groups. The kidney weight of CKD-LPD mice was significantly lower than in CKD-NPD and CKD-LA-AAD groups ( $54 \pm 2$  mg/10 g BW versus  $86 \pm 3$  mg/10 g BW and  $76 \pm 1$  mg/10 g BW, respectively,  $p<0.001$ ).

### **Specific reduction of dietary aromatic amino acids attenuates kidney injury in CKD mice**

Eight weeks after the end of the adenine diet, circulating creatinine and urea levels were in the same range as those observed in moderate uremic patients in CKD-NPD (**Figure 2A-B**). Serum creatinine levels were significantly decreased in CKD-LPD and CKD-LA-AAD compared to CKD-NPD ( $p<0.0001$ ), (**Figure 2A**). Blood urea nitrogen levels (**Figure 2B**) were lower in CKD-LPD as compared with that with NPD, but no significant difference was

observed between CKD-NPD and CKD-LA-AAD. CKD-LA-AAD and CKD-LPD exhibited a similar reduction of urinary protein excretion compared to the NPD group ( $p < 0.05$ ) (**Figure 2C**). Ten to 18 non-overlapping 10X field images were analyzed for each entire kidney section, which represented a total of 1109 pictures. Kidney fibrosis was evaluated with morphometric method using Sirius red staining (**Figure 3A-D**). Sirius-red positive areas were significantly reduced in CKD-LPD and CKD-LA-AAD groups compared to CKD-NPD group ( $10 \pm 1\%$  and  $13 \pm 2\%$  vs  $17 \pm 1\%$ ,  $p < 0.0001$  and  $p = 0.01$ ). There were no statistical differences in terms of percentage of fibrosis area between a LPD and a LA-AAD (**Figure 3E**).

We further conducted an analysis of gene expression of kidney fibrosis markers and pro-inflammatory cytokines, using real time PCR (**Figure 4**). Quantitative PCR indicated a significant reduction in the expression of renal fibrosis-related genes (*Tgfb1* (Transforming Growth Factor beta 1), *TIMP1* (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1) and *Col1a1* (collagen alpha-1 type 1),) and inflammatory cytokines (*TNF $\alpha$*  (*Tumor Necrosis Factor alpha*), *IL-6* (*Interleukin 6*) and *MCP-1* (Monocyte Chemoattractant protein 1)) in the kidneys of the CKD-LPD group compared with the CKD-NPD group. The expression of *Smad3* (Small Mothers Against Decapentaplegic 3) was not significantly different between groups (*data not shown*). LA-AAD also ameliorated the progression of renal fibrosis and local inflammation. By comparison with the CKD-NPD, *Col1A1* and *IL-6* expression was reduced with LA-AAD. Expressions of *TIMP1*, *TGF- $\beta$ 1*, *TNF $\alpha$*  and *MCP-1* mRNA were not significantly different between CKD-NPD and CKD-LA-AAD but tended to be reduced.

### **Low aromatic amino-acid diet has no impact on metabolic parameters**

Fasting glycaemia was lower in CKD mice fed with the LPD and no significant difference were observed between CKD-mice fed with the NPD and LA-AAD. (**Table 3**). In good

agreement, CKD mice fed the LPD diets for six weeks again showed improved glucose tolerance, but mice fed the LA-AAD diet showed no improvement in glucose tolerance (*data not shown*).

### **Restriction in dietary aromatic amino acids decreases free uremic toxins concentration**

To elucidate the mechanism of the renoprotective effect induced by LA-AAD and LPD, we investigated the effect of these diets on uremic toxins production. Total uremic toxin levels are presented in **Table 4** and free uremic toxin concentrations in **Figure 5**. Although non-significant, total PCS and total p-cresyl glucuronide (PCG) tended to be lower in CKD mice fed a LA-AAD diet, compared to those fed with LPD and NPD. Total IS levels tended to be higher in CKD LA-AAD diet compared to CKD LPD and NPD group without significantly difference. We found no statistical differences for total indole-3-acetic-acid (IAA) concentrations between groups. CKD mice fed with LA-AAD diet exhibited a significant lower free PCS ( $p < 0.01$ ) and IS ( $p < 0.05$ ) while LPD only modestly decreased the concentration of these uremic toxins. We failed to find any significant difference between groups for PCG and IAA, even if CKD mice fed with LA-AAD exhibited lower concentrations of PCG ( $p = 0.07$ ).

## **DISCUSSION**

In this study, we demonstrated first that a LA-AAD exhibited a similar kidney protective effect as a LPD without the need of reducing total protein content. Indeed, the concomitant observation of kidney fibrosis, serum creatinine and urinary protein improvement provides support that reducing aromatic amino acids is efficient to metabolically mimic the action of a LPD. It is recognized from previous studies (25) that patients under a LPD are more prone to

malnutrition. This experiment was not designed to explore the nutritional status in the different groups. Nevertheless, we failed to find any difference in weight in CKD groups, neither for the LPD group nor LA-AAD group.

In this study, we showed secondly that a specific restriction in the intake of aromatic amino acids lowered uremic toxin concentrations and mitigated inflammation that play a major role in the progression of renal damage. Surprisingly, in our CKD experimental models, LPD was able to decrease only to a limited extent the free uremic toxin concentration, and total uremic toxin concentrations were not significantly different between each CKD diet groups. Black & al reported in a longitudinal study with 30 non-dialysis CKD patients (stage 3-4) a favorable effect of LPD to improve renal function and decrease uremic toxins concentrations after six months of nutritional intervention (24). However, they only found a significant effect on total PCS values, but neither on IS nor on IAA serum concentration. It is very likely that lower uremic toxin concentrations could have been reached using either very low protein diet (VLPD), or aromatic amino acid corresponding concentrations. Indeed, a recent study showed that VLPD was effective to beneficially modulate gut microbiota, improving intestinal permeability and reducing serum levels of total and free IS and PCS in CKD patients (35).

These previous results, along with the present study, raise the issue that mechanisms, other than reduction in uremic toxin levels, could account for the positive effect of LPD. In an elegant experiment (10), Vaziri & al explored the impact of urea concentration on intestinal permeability in cultured CACO-2 cells. These results were consistent with the fact that the higher blood urea nitrogen, the higher the gut barrier was permeable, leading to endotoxemia, systemic inflammation and supposedly organ fibrosis. It is widely accepted that blood urea nitrogen is directly related to protein intake. Based on this assumption, we would have expected that the LPD but not LA-AAD group could improve renal function. However, with

normoproteic intakes and blood urea nitrogen levels similar to the standard diet, the LA-AAD had comparable reno-protective effects as the LPD group, challenging this view.

Renal hemodynamics variation in response to protein feeding is a well-established process, and is nowadays being explored through the renal functional reserve concept (36). Several studies have shown that a high protein intake was associated with a higher intra-glomerular pressure, glomerular hyper-filtration and damage to glomerular structure (18,19). Hence, the benefit of a protein-restricted diet in patients with CKD, through this hemodynamic effect, is thought to promote preservation of kidney function. Once more, our results challenge this hypothesis, given that the LA-AAD group had a comparable protein intake to the standard diet group. Amino acids, either given through stomach tube or as an intravenous perfusion, have the same renal hemodynamic effects as an acute protein ingestion, leading to renal vasodilation and GFR rise (37–39). Different hypotheses have been discussed regarding the physiological mechanisms that may play a role in hemodynamic variations. First, amino acids could influence renal vasodilation through metabolic substrates that influence tubular sodium reabsorption or renal oxygen consumption. Secondly, humoral mechanisms have also been discussed, based on the notion that renal hemodynamic variations occurring during post-prandial state could be directly related to the release of a humoral mediator into the systemic circulation, acting on the kidney vasodilation and glomerular filtration rate. The third hypothesis regarding amino acid impact on renal hemodynamic variations focuses on intrinsic renal mechanisms, such as tubuloglomerular feedback and tubular transport (21). It may be possible that some specific amino acids, but not all, have significant effects on renal hemodynamics (37). In the renal proximal tubule, amino acids are co-transported with sodium, resulting in reabsorption of both through epithelial transporters. Basolateral transporters also play an important role to regulate intracellular concentration of different amino acids. Among others, the uniporter TAT1 (T-Type Amino Acid Transporter

1) is present in the small intestine and in renal proximal tubule epithelial cells. TAT1 acts as an aromatic amino acid efflux transporter and is important for the absorption of aromatic amino acids in the kidney and intestine (40,41). It could therefore be interesting to measure TAT1 expression in a future study, to assess whether or not these three specific diets could have modified TAT1 expression or function.

The process by which a LA-AAD may delay renal function decline remains unclear. Tryptophan is the precursor of indoxyl sulfate, but also of serotonin and kynurenin. It has been shown that plasma tryptophan levels are decreased during CKD, proportionately to the stage of disease (42). Accordingly, several tryptophan metabolites are also decreased in CKD patients, such as melatonin and 5-methoxytryptophan, related to a lower tryptophan hydroxylase-1 (TRP-1) expression, its main regulatory enzyme (43). Conversely, some tryptophan metabolites are increased in CKD patients, among others IS, kynurenines, kynurenic acid and quinolonic acid (42). Recent studies have involved tryptophan metabolites in the modulation of inflammation and fibrosis (44,45), and anti-fibrotic therapy studies targeting these tryptophan metabolic byproducts are currently under trial (46). Further experimental studies are however needed to explore if tryptophan metabolism pathways are involved in the development of kidney fibrosis.

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a serine/threonine kinase which participates in several key cell functions such as cellular protein synthesis and cell growth. The mTOR pathway has recently been studied in kidney pathology, as it was involved in renal hypertrophy and urinary excretion (47). In a 5/6 nephrectomized rat model, Ohkawa & al demonstrated that LPD and the use of mTOR inhibitor (rapamycin) had similar renoprotective effects, decreasing proteinuria and improving kidney histological damage (48). Chang & al demonstrated in a bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BM-MSC) model that 5-methoxytryptophan (5-MTP), a recently discovered tryptophan metabolite, had the ability to

inhibit pro-inflammatory mediators and protects BM-MSC against stress-induced senescence. Moreover, they showed that beneficial effects of 5-MTP was mediated through FoxO3a and mTOR pathway (49). Because mTOR activity is regulated by aminoacid intake, it would be interesting to explore the hypothesis that qualitative modulation of aminoacid intake could influence mTOR pathway. It could be interesting, as a second step, to explore mTOR pathway and tryptophan metabolite concentrations in mice fed a LA-AAD. Likewise, we did not analyze intestinal microbiota composition of our different groups. It might be interesting to explore the abundance and diversity of the gut microbiome, according to each specific diet.

A further issue to study is whether such a LA-AAD could be deleterious to the body. Indeed, tryptophan metabolism has been studied for decades by psychiatrists, as it is the precursor of serotonin, the so-called “happiness neurotransmitter”. Several animal and human experiments have been carried out to test the hypothesis of tryptophan supplementation’s beneficial effect on depressive symptoms, with thus far ambivalent results (50). However, the present LA-AAD was not completely deprived in tyrosine, tryptophan and phenylalanine, and intake levels were similar to the LPD. Tryptophan and phenylalanine are essential amino acids, meaning they cannot be synthesized *de novo* by the organism, and thus they must be supplied in diet. Conversely, tyrosine is considered as a conditionally essential amino acid, which means its synthesis can be limited under certain pathological conditions. Minimal dietary amounts of each aminoacid have been well established and any attempt to define a LA-AAD in human should comply with these requirements. However, current protein intakes in Western countries do bring essential aminoacids far above the minimal requirements.

In conclusion the present study in CKD mice suggests that an experimental LA-AAD (i.e. low tyrosine, tryptophan and phenylalanine intake) has beneficial systemic effects, mimicking those of a LPD. Indeed, a LA-AAD appears efficient to delay renal function decline and prevent kidney fibrosis, without exposing to malnutrition.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Institut National des Sciences Appliquées de Lyon (INSA-Lyon). CB was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

CB carried out the experiment, contributed to the interpretation of the results, wrote the manuscript with support. CS and LK conceived the original idea and were in charge of overall direction and planning. GG performed uremic toxin assay. CP aided in interpreting the results. LK, CS and DF supervised the findings of this work and the manuscript writing. LK is the guarantor of this work and accept full responsibility for the conduct of the study.

## **DISCLOSURE**

None



## Tables

**Table 1. Food composition and energy value of the different diets**

	NPD	LPD	LA-AAD
<b>Protein (%)</b>	<b>14.7</b>	<b>5.0</b>	<b>14.0</b>
Carbohydrates (%)	13.8	13.8	13.8
Fat (%)	7.1	7.2	7.1
Fibers (%)	3.6	3.6	3.6
Starch (%)	47.6	59.0	48.8
Minerals (%)	2.3	2.3	2.3
Energy density (kcal/g)	3.89	3.84	3.89
<b>Aromatic amino acids (mg/g)</b>	<b>19.62</b>	<b>6.44</b>	<b>6.40</b>

Data are expressed as percentage for food composition and kcal/g for energy value. Aromatic amino acids include tyrosine, tryptophan and phenylalanine. Note that the low aromatic AA diet concentration of aromatic amino acids was similar to that low protein diet. Abbreviations: NPD: normoproteic diet, LPD: low protein diet; LA-AAD: low aromatic amino-acid diet

**Table 2. Biometric data**

Variable	Control mice			CKD mice								
Diet	NPD			NPD		LPD		LA-AAD				
N	9			11		8		13				
<b>Biometric data</b>												
BW (g)	29	±	1***	22	±	0.1	20	±	1	21	±	0.1
BL (cm)	9.5	±	0.1***	8.7	±	0.1	8.6	±	0.1	8.6	±	0.1
<b>White adipose tissue weights, mg/10g BW</b>												
Total WAT	297	±	24***	208	±	14	333	±	14*	228	±	9
rWAT	55	±	6***	33	±	2	67	±	3*	35	±	2
eWAT	242	±	18***	175	±	12	266	±	12*	194	±	7
<b>Organ weights, mg/10g BW</b>												
Heart	45	±	1***	55	±	3	50	±	1	51	±	1
Gastrocnemius	48	±	2*	57	±	2	50	±	2	54	±	1
Liver	413	±	8	395	±	14	347	±	8	374	±	11
Kidneys	119	±	2***	86	±	3	54	±	2*	76	±	1

Data are expressed as mean ± SEM. Abbreviations: BL: body length, BW, body weight, NPD, normoproteic diet, LPD, low protein diet, LA-AAD, low aromatic amino-acids, WAT, white adipose tissue. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 vs CKD-NPD (ANOVA and Dunnett post hoc test).

**Table 3. Biochemical data**

Variable	Control mice		CKD mice	
	NPD	NPD	LPD	LA-AAD
Fasting glucose (mmol/L)	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.2	3.2 ± 0.1*	4.5 ± 0.1
Fed glucose (mmol/L)	8.2 ± 0.4	8.8 ± 0.5	6.8 ± 0.5	8.1 ± 0.5
Total cholesterol (mmol/L)	4.0 ± 0.3	3.3 ± 0.4	3.6 ± 0.1	3.9 ± 0.2
Triglycerides (mmol/L)	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2*	3.0 ± 0.2
Plasma proteins (g/L)	46.7 ± 1.9	45.7 ± 1.5	47.8 ± 4.4	46.9 ± 1.9
Serum albumin (g/L)	15.8 ± 0.8	18.9 ± 0.5	18.1 ± 0.5	21.1 ± 0.8
Diuresis (mL/24h)	0.2 ± 0.1***	2.0 ± 0.5	1.7 ± 0.3	2.6 ± 0.3

Data are expressed as mean ± SEM for n = 5-11 animals in each group. Abbreviations: NPD, normoproteic diet, LPD, low protein diet, LA-AAD, low aromatic amino-acids, CKD, chronic kidney disease. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs CKD-NPD (ANOVA and Dunnett post hoc test).

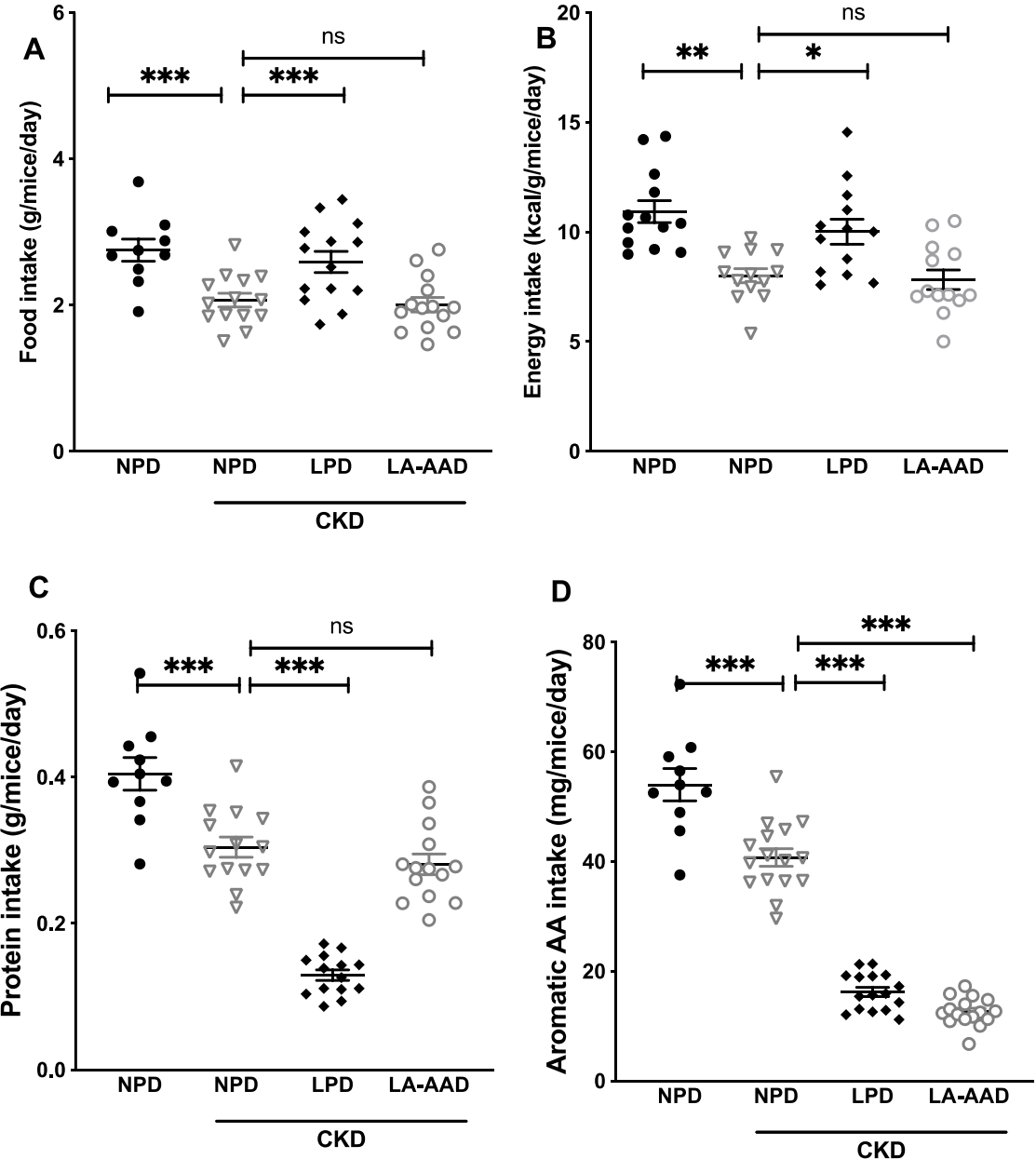
**Table 4. Serum concentration of total uremic toxins ( $\mu\text{mol/L}$ )**

Variable	Control mice		CKD mice	
	NPD	NPD	LPD	LA-AAD
PCS	0.6 $\pm$ 0.2**	4.5 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 1.1	2.5 $\pm$ 0.7
PCG	0.1 $\pm$ 0.1 *	0.6 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.1
IS	8.2 $\pm$ 1.2 ****	37.5 $\pm$ 3.1	28.6 $\pm$ 2.3	42.6 $\pm$ 4.7
IAA	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
HA	290 $\pm$ 52	284 $\pm$ 48	298 $\pm$ 38	276 $\pm$ 14
Uric acid	64.5 $\pm$ 9.8	87 $\pm$ 19	78 $\pm$ 25	64 $\pm$ 13

CKD: chronic kidney disease. PCS: p-cresyl sulfate. PCG: p-cresyl glucuronide. IS: indoxyl sulfate. IAA: indole-3-acetic-acid. HA: hippuric acid. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. NPD: normoproteic diet. LPD: low protein diet. LA-AAD: low aromatic amino-acids diet. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs CKD-NPD (ANOVA and Dunnett post hoc test).

# FIGURES

Figure 1: Food, energy, protein and aromatic amino acids intakes according to each specific diet and renal condition



**Figure 2: Renal function and urinary protein excretion in control and CKD mice**

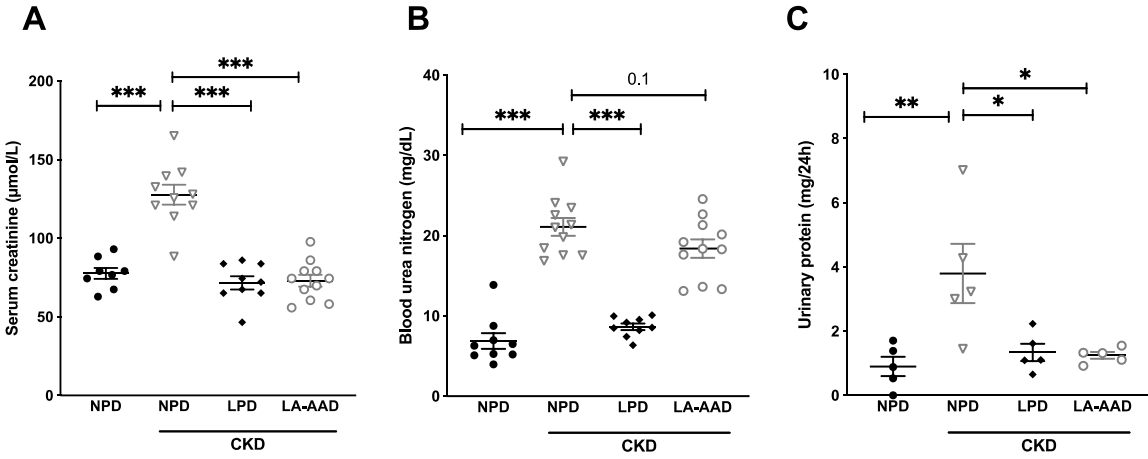
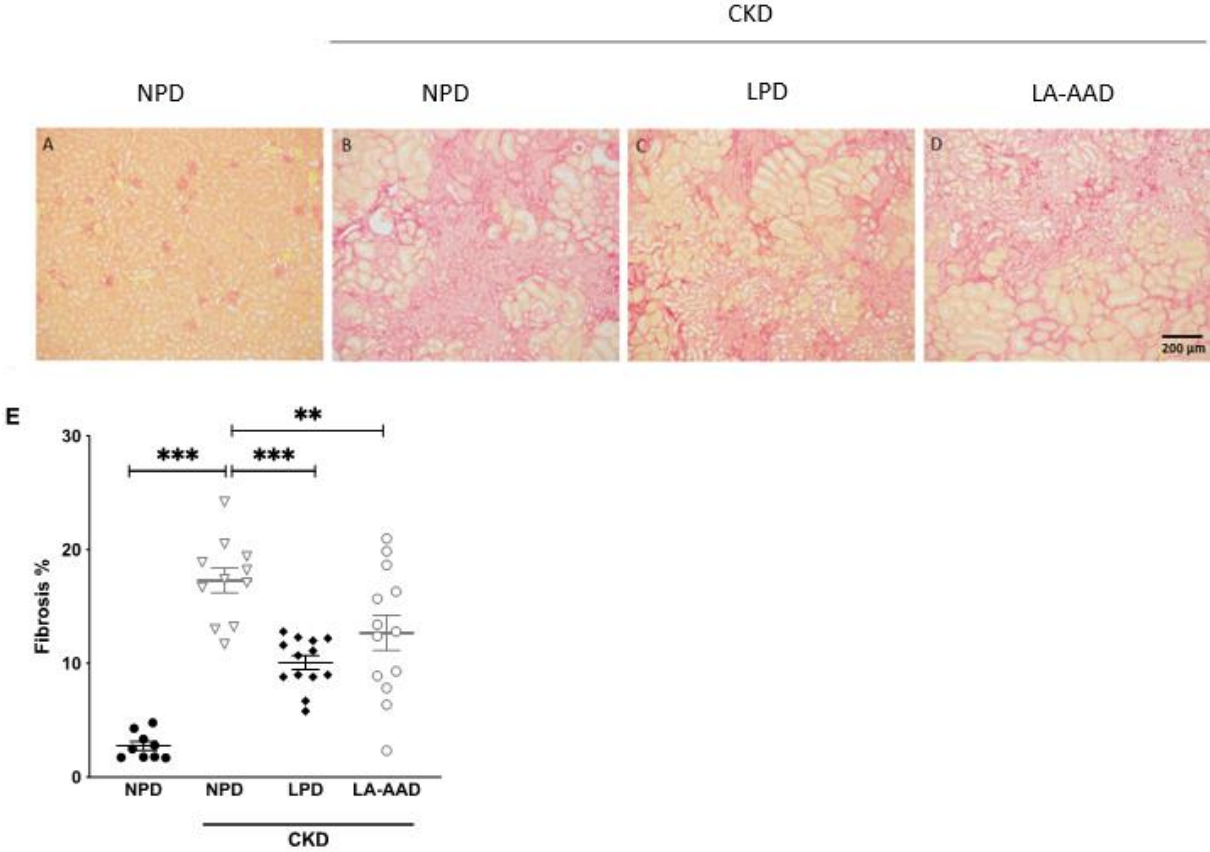


Figure 3: Evaluation of kidney fibrosis in control and CKD mice



**Figure 4: Gene expression of fibrosis and pro inflammatory markers in kidney**

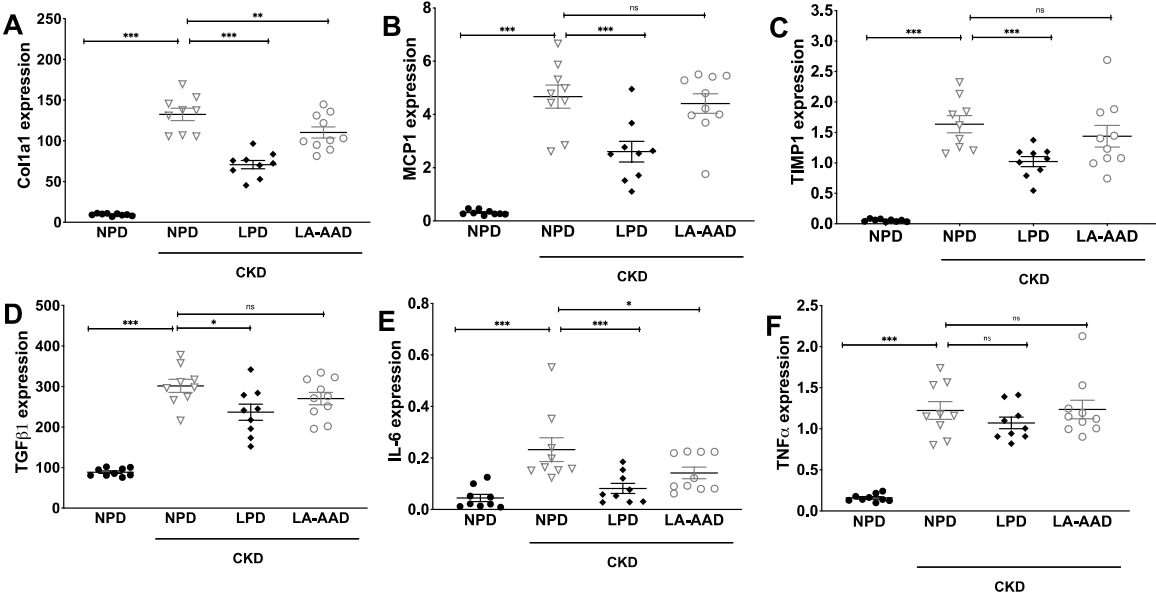
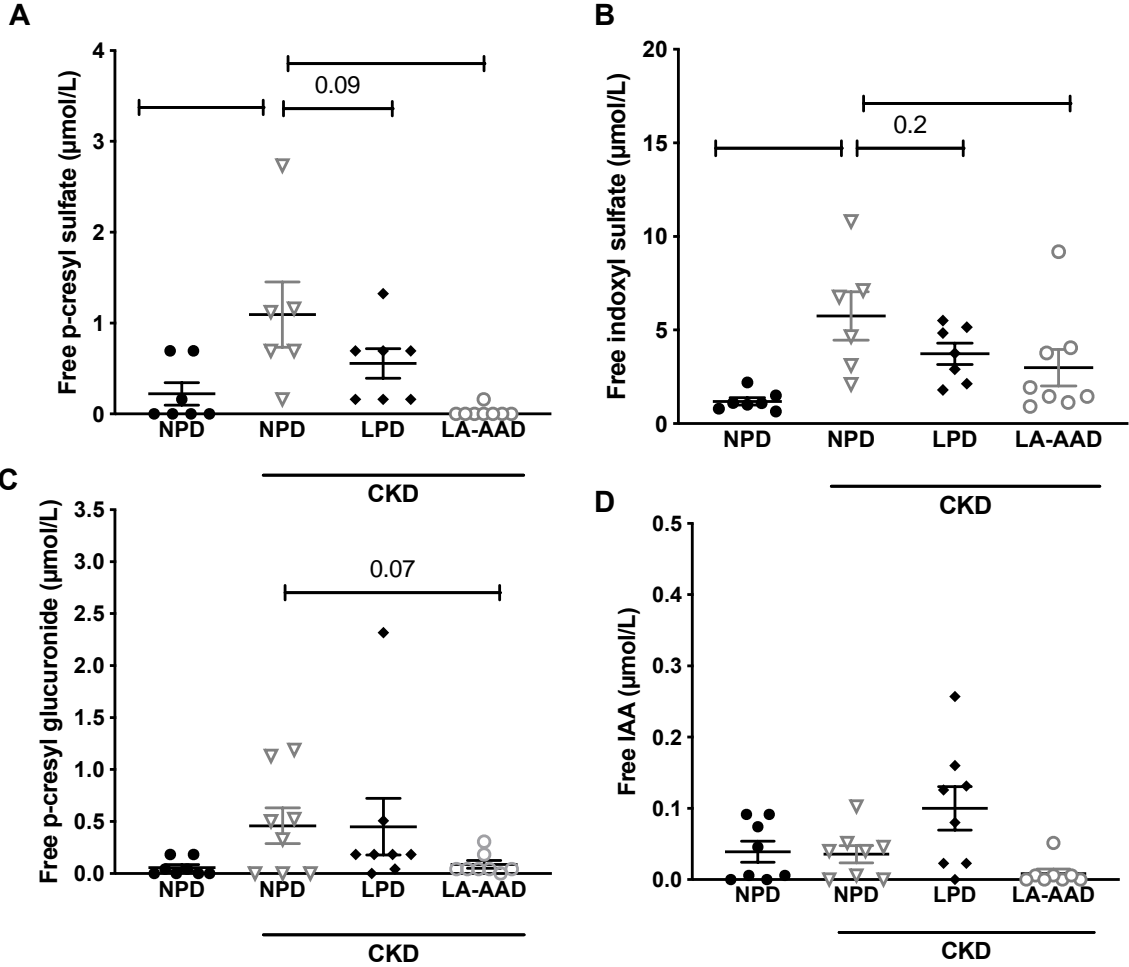
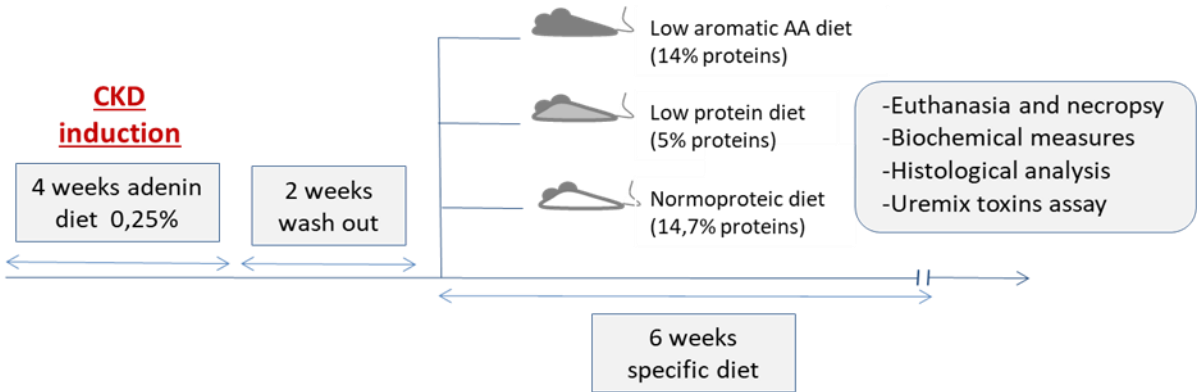




Figure 5: Free uremic toxin concentrations in control and CKD mice



**Figure 6: Experimental design of the study**



## FIGURES LEGENDS

### **Figure 1: Food, energy, protein and aromatic amino acids intakes according to each specific diet and renal condition**

Food intake (A), energy intake (B), protein intake (C) and aromatic amino-acid intake (D) in control fed with normoproteic diet (NPD) and chronic kidney disease (CKD) mice fed with NPD, low protein diet (LPD) or low aromatic amino-acid diet (LA-AAD). Data are presented as mean  $\pm$  SEM for n = 10-13 animals in each group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs CKD-NPD; (ANOVA and Dunnett post hoc test).

### **Figure 2: Renal function and urinary protein excretion in control and CKD mice**

Serum creatinine (A), blood urea nitrogen (B) and urinary proteins (C) in control and CKD mice fed with normoproteic diet (NPD), low protein diet (LPD) or low aromatic amino-acid diet (LA-AAD). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for n = 9-11 animals in each group. Proteinuria was only measured on 5 animals per groups. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs CKD-NPD; (ANOVA and Dunnett post hoc test).

### **Figure 3: Evaluation of kidney fibrosis in control and CKD mice**

Representative images of kidney sections stained with Sirius Red viewed under bright field x10. (A) Control mice fed with normoproteic diet. (B) CKD mice fed with normoproteic diet, (C) low protein diet, (D) low aromatic amino acid diet. Scale bar represents 200  $\mu$ m. (E) Sirius red morphometric evaluation in control and CKD mice treated with normoproteic diet, low protein diet and low aromatic amino-acid diet. CKD: chronic kidney disease. NPD: normoproteic diet. LPD: low protein diet. LA-AAD: low aromatic amino-acids diet. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for n = 9-13 animals in each group. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs CKD-NPD; (ANOVA and Dunnett post hoc test).

#### **Figure 4: Gene expression of fibrosis and pro inflammatory markers in kidney**

Effects of normoproteic diet (NPD), low protein diet (LPD) and low aromatic amino-acid diet (LA-AAD) on relative mRNA expression of (A) Col1a1 (collagen alpha-1 type 1), (B) MCP-1 (Monocyte Chemoattractant protein 1), (C) TIMP1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1), (D) Tgfb1 (Transforming Growth Factor beta 1), (E) IL-6 (Interleukin 6) and (F) TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) in control and CKD mice . TBP (TATA-Box Binding Protein) was used as reference gene to normalize the results. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for n = 9-10 animals in each group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs CKD-NPD; (ANOVA and Dunnett post hoc test).

#### **Figure 5: Free uremic toxin concentrations in control and CKD mice**

Effects of normoproteic diet (NPD), low protein diet (LPD) and low aromatic amino-acid diet (LA-AAD) on free (A) p-cresyl sulfate, (B) indoxyl sulfate, (C) p-cresyl glucuronide and (D) and indole 3-acetic-acid in control and CKD mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for N= 8 animals in each group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs CKD-NPD; (ANOVA and Dunnett post hoc test). CKD: chronic kidney disease. IAA: indole-3-acetic-acid.

#### **Figure 6: Experimental design of the study**

Schematic representation of the experimental study. Half of the C57BL/6J mice were fed with an adenine diet 0.25% for 4 weeks to induce chronic kidney disease (CKD). After 2 weeks of washout, mice were divided into 6 subgroups to receive either a low protein diet, a low aromatic amino-acid diet or a normoproteic diet until terminal sacrifice after 6 weeks of specific diet.

## SUPPLEMENTARY TABLES

**Supplementary Table 1.**

**Values of LOD and LOQ for the HPLC fluorescence assay of uremic toxins (mg/dL)**

Toxin	Abbreviation	LOD	LOQ	(LOD+LOQ) /2
Indoxyl-sulfate	IS	0.001	0.001	0.00025
p-Cresyl sulfate	PCS	0.013	0.013	0.003
p-Cresyl glucuronide	PCG	0.0052	0.0052	0.0012
Indole-3-acetic acid	IAA	0.00025	0.00025	0.00005
Hippuric acid	HA	0.012	0.04	0.026
Uric acid	UA	0.0012	0.004	0.0026

LOD and LOQ values for the HPLC Fluorescence method for analysis of the uremic toxins.

LOD: limit of detection. LOQ: limit of quantification

**Supplementary Table 2.**

**Sequence of primers used for qPCR analysis**

Gene name	Gene ID	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Smad3</i>	17127	GGACGCAGGTTCTCCAAACC	AAGTTCCACGGCTGCATTCC
<i>Tgfb1</i>	21803	AGGGCTACCATGCCAACTTC	GTAAGTACTGAGTTCTGACAGTG
<i>Timp1</i>	21857	TGGCATCTGGCATCCTCTTGT	CATAACGCTGGTATAAGGTGG
<i>Colla1</i>	12842	CAACATGGAGACAGGTCAGA	CTTGCAGTGATAGGTGATGT
<i>MCP1 (Ccl2)</i>	20296	TGGAGCATCCACGTGTTGGC	ACTACAGCTTCTTTGGGACA
<i>TNF alpha</i>	21926	CCAGACCCTCACACTCAGATC	CACTTGGTGGTTTGCTACGAC
<i>IL6</i>	16193	AGTTGCCTTCTTGGGACTGAT	TCCACGATTTCCAGAGAAC
<i>TBP</i>	21374	TGGTGTGCACAGGAGCCAAG	TTCACATCACAGCTCCCCAC

DNA sequences of primers used for qPCR analysis. Abbreviations: qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction, Smad3: Small Mothers Against Decapentaplegic 3, Tgfb1: Transforming Growth Factor beta 1, Timp1: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1, Colla1: alpha-1 type 1 collagen, MCP1: Monocyte Chemoattractant protein 1, TNF alpha: Tumor Necrosis Factor alpha, IL-6: Interleukin 6, TBP: TATA-box binding protein.

## REFERENCES

1. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Iii AFC, Feldman HI, Kusek JW, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. 2009;16.
2. Go AS, McCulloch CE. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *The New England Journal of Medicine*. 2004;10.
3. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet*. 2016 Apr 9;387(10027):1513–30.
4. Metzger M, Yuan WL, Haymann J-P, Flamant M, Houillier P, Thervet E, et al. Association of a Low-Protein Diet With Slower Progression of CKD. *Kidney Int Rep*. 2018 Jan;3(1):105–14.
5. Fujii H, Goto S, Fukagawa M. Role of Uremic Toxins for Kidney, Cardiovascular, and Bone Dysfunction. *Toxins*. 2018 May 16;10(5):202.
6. Koppe L, Fouque D, Soulage C. The Role of Gut Microbiota and Diet on Uremic Retention Solutes Production in the Context of Chronic Kidney Disease. *Toxins*. 2018 Apr 13;10(4):155.
7. Mishima E, Fukuda S, Mukawa C, Yuri A, Kanemitsu Y, Matsumoto Y, et al. Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. *Kidney International*. 2017 Sep;92(3):634–45.
8. Lau WL, Savoj J, Nakata MB, Vaziri ND. Altered microbiome in chronic kidney disease: systemic effects of gut-derived uremic toxins. *Clinical Science*. 2018 Mar 15;132(5):509–22.
9. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney International*. 2013 Feb;83(2):308–15.
10. Vaziri ND, Yuan J, Norris K. Role of Urea in Intestinal Barrier Dysfunction and Disruption of Epithelial Tight Junction in Chronic Kidney Disease. *American Journal of Nephrology*. 2013;37(1):1–6.
11. Chen Y-Y, Chen D-Q, Chen L, Liu J-R, Vaziri ND, Guo Y, et al. Microbiome-metabolome reveals the contribution of gut-kidney axis on kidney disease. *Journal of Translational Medicine*. 2019 Jan 3;17(1):5.
12. Szeto C-C, McIntyre CW, Li PK-T. Circulating Bacterial Fragments as Cardiovascular Risk Factors in CKD. *JASN*. 2018 Jun 1;29(6):1601–8.
13. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, Nagler EV, Glorieux G. The Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate: A Systematic Review. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Sep;25(9):1897–907.

14. Koppe L, Pillon NJ, Vella RE, Croze ML, Pelletier CC, Chambert S, et al. p-Cresyl Sulfate Promotes Insulin Resistance Associated with CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013 Jan 1;24(1):88–99.
15. Adijiang A, Goto S, Uramoto S, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Jun 1;23(6):1892–901.
16. Ito S, Osaka M, Edamatsu T, Itoh Y, Yoshida M. Crucial Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in Indoxyl Sulfate-Induced Vascular Inflammation. *J Atheroscler Thromb*. 2016 Aug 1;23(8):960–75.
17. Ko GJ, Obi Y, Tortorici AR, Kalantar-Zadeh K. Dietary protein intake and chronic kidney disease: Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2017 Jan;20(1):77–85.
18. De Miguel C, Lund H, Mattson DL. High Dietary Protein Exacerbates Hypertension and Renal Damage in Dahl SS Rats by Increasing Infiltrating Immune Cells in the Kidney. *Hypertension*. 2011 Feb;57(2):269–74.
19. Jia Y, Hwang SY, House JD, Ogborn MR, Weiler HA, O K, et al. Long-Term High Intake of Whole Proteins Results in Renal Damage in Pigs. *J Nutr*. 2010 Sep 1;140(9):1646–52.
20. Renal functional reserve in humans. Effect of protein intake on glomerular filtration rate. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sirius.parisdescartes.fr/pubmed/6650549>
21. Woods LL. Mechanisms of renal hemodynamic regulation in response to protein feeding. *Kidney International*. 1993 Oct;44(4):659–75.
22. Bellizzi V, Di Iorio BR, De Nicola L, Minutolo R, Zamboli P, Trucillo P, et al. Very low protein diet supplemented with ketoanalogues improves blood pressure control in chronic kidney disease. *Kidney International*. 2007 Feb;71(3):245–51.
23. Rigalleau V, Combe C, Blanchetier V, Aubertin J, Aparicio M, Gin H. Low protein diet in uremia: Effects on glucose metabolism and energy production rate. *Kidney International*. 1997 Apr 1;51(4):1222–7.
24. Black AP, Anjos JS, Cardozo L, Carmo FL, Dolenga CJ, Nakao LS, et al. Does Low-Protein Diet Influence the Uremic Toxin Serum Levels From the Gut Microbiota in Nondialysis Chronic Kidney Disease Patients? *Journal of Renal Nutrition*. 2018 May;28(3):208–14.
25. Noce A, Vidiri MF, Marrone G, Moriconi E, Bocedi A, Capria A, et al. Is low-protein diet a possible risk factor of malnutrition in chronic kidney disease patients? *Cell Death Discov*. 2016 May 9;2:16026.
26. Wright M, Southcott E, MacLaughlin H, Wineberg S. Clinical practice guideline on undernutrition in chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2019 Dec;20(1):1–10.

27. Eustace JA, Astor B, Muntner PM, Ikizler TA, Coresh J. Prevalence of acidosis and inflammation and their association with low serum albumin in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004 Mar;65(3):1031–40.
28. Asai M, Kumakura S, Kikuchi M. Review of the efficacy of AST-120 (KREMEZIN®) on renal function in chronic kidney disease patients. *Ren Fail.* 2019 Feb 7;41(1):47–56.
29. Schulman G, Berl T, Beck GJ, Remuzzi G, Ritz E, Arita K, et al. Randomized Placebo-Controlled EPPIC Trials of AST-120 in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2015 Jul 1;26(7):1732–46.
30. Poesen R, Evenepoel P, Loor H de, Delcour JA, Courtin CM, Kuypers D, et al. The Influence of Prebiotic Arabinoxylan Oligosaccharides on Microbiota Derived Uremic Retention Solutes in Patients with Chronic Kidney Disease: A Randomized Controlled Trial. *PLOS ONE.* 2016 Apr 21;11(4):e0153893.
31. Kalantar-Zadeh K, Fouque D. Nutritional Management of Chronic Kidney Disease. Ingelfinger JR, editor. *New England Journal of Medicine.* 2017 Nov 2;377(18):1765–76.
32. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, et al. p -Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney International.* 2013 Apr;83(4):582–92.
33. Boelaert J, Lynen F, Glorieux G, Eloot S, Van Landschoot M, Waterloos M-A, et al. A novel UPLC–MS–MS method for simultaneous determination of seven uremic retention toxins with cardiovascular relevance in chronic kidney disease patients. *Anal Bioanal Chem.* 2013 Feb;405(6):1937–47.
34. Fontana L, Cummings NE, Arriola Apelo SI, Neuman JC, Kasza I, Schmidt BA, et al. Decreased Consumption of Branched-Chain Amino Acids Improves Metabolic Health. *Cell Reports.* 2016 Jul;16(2):520–30.
35. Di Iorio BR, Rocchetti MT, De Angelis M, Cosola C, Marzocco S, Di Micco L, et al. Nutritional Therapy Modulates Intestinal Microbiota and Reduces Serum Levels of Total and Free Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate in Chronic Kidney Disease (Medika Study). *JCM.* 2019 Sep 10;8(9):1424.
36. Ronco C, Bellomo R, Kellum J. Understanding renal functional reserve. *Intensive Care Med.* 2017 Jun;43(6):917–20.
37. Glomerular filtration rate following administration of individual amino acids in conscious dogs. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sirius.parisdescartes.fr/pubmed/?term=Glomerular+filtration+rate+following+administration+of+individual+amino+acids+in+conscious+dogs>.
38. Mechanisms controlling renal hemodynamics and electrolyte excretion during amino acids. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sirius.parisdescartes.fr/pubmed/3740277>



39. Effect of amino acid infusion on glomerular filtration rate. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6401352>
40. Verrey F, Singer D, Ramadan T, Vuille-dit-Bille RN, Mariotta L, Camargo SMR. Kidney amino acid transport. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2009 May;458(1):53–60.
41. The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827462>
42. Debnath S, Velagapudi C, Redus L, Thameem F, Kasinath B, Hura CE, et al. Tryptophan Metabolism in Patients With Chronic Kidney Disease Secondary to Type 2 Diabetes: Relationship to Inflammatory Markers. *International Journal of Tryptophan Research*. 2017 Jan;10:117864691769460.
43. Chen D-Q, Cao G, Chen H, Argyopoulos CP, Yu H, Su W, et al. Identification of serum metabolites associating with chronic kidney disease progression and anti-fibrotic effect of 5-methoxytryptophan. *Nature Communications*. 2019 Dec;10(1):1476.
44. Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nature Communications*. 2018 Aug 17;9(1):3294.
45. Ogiso H, Ito H, Ando T, Arioka Y, Kanbe A, Ando K, et al. The Deficiency of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Aggravates the CCl4-Induced Liver Fibrosis in Mice. *Ryffel B, editor. PLOS ONE*. 2016 Sep 6;11(9):e0162183.
46. Dolivo DM, Larson SA, Dominko T. Tryptophan metabolites kynurenine and serotonin regulate fibroblast activation and fibrosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018 Oct;75(20):3663–81.
47. Diekmann F, Rovira J, Carreras J, Arellano EM, Bañón-Maneus E, Ramírez-Bajo MJ, et al. Mammalian Target of Rapamycin Inhibition Halts the Progression of Proteinuria in a Rat Model of Reduced Renal Mass. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007 Oct;18(10):2653–60.
48. Ohkawa S, Yanagida M, Uchikawa T, Yoshida T, Ikegaya N, Kumagai H. Attenuation of the activated mammalian target of rapamycin pathway might be associated with renal function reserve by a low-protein diet in the rat remnant kidney model. *Nutrition Research*. 2013 Sep;33(9):761–71.
49. Chang T-C, Hsu M-F, Shih C-Y, Wu KK. 5-methoxytryptophan protects MSCs from stress induced premature senescence by upregulating FoxO3a and mTOR. *Sci Rep*. 2017 Dec;7(1):11133.
50. Mood, food, and cognition: role of tryptophan and serotonin. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26560523>

## Conclusion et perspectives

---

Le but de ce travail était à la fois de déterminer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à diminuer la production de toxines urémiques, mais aussi de mieux comprendre le mécanisme du régime pauvre en protéine au cours de l'IRC. Les données de cette étude suggèrent que dans un modèle expérimental d'IRC chez la souris, un régime normoprotéique mais appauvri en AA aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) présente des effets bénéfiques très similaires au régime pauvre en protéines recommandé chez les patients IRC. En effet, le régime appauvri en AA aromatiques semble être aussi néphroprotecteur que le régime pauvre en protéines, ralentissant la dégradation de la fonction rénale et l'apparition de la fibrose rénale. De plus, l'un des bénéfices de ce régime en comparaison au régime pauvre en protéines est qu'il permettrait de prévenir la dénutrition protéique chez les patients IRC, bien connus comme étant à haut risque.

En pratique, cette étude doit être interprétée avec prudence, ces résultats apportent plus une preuve de concept quant à la participation des AA aromatiques dans les mécanismes de fibrose rénale et de déclin du DFG, qu'un véritable nouvel outil thérapeutique dans la stratégie de prise en charge de ces patients. En effet, quand on s'intéresse aux aliments contenant des AA aromatiques, on constate qu'ils sont présents dans la quasi-totalité des aliments riches en protéines, que ce soit la viande, le poisson, les légumineuses, etc ... et qu'il serait impossible de sélectionner un régime normoprotéique dépourvu d'AA aromatiques. De plus, notre hypothèse première qui consistait à réduire les apports en AA aromatiques afin de diminuer la production de toxines urémiques est prise en défaut par le fait que les concentrations de ces toxines étaient peu modifiées, laissant supposer que le bénéfice de ce régime passe peut-être par une autre voie métabolique.

Les perspectives de ce travail seraient de mettre en place de nouveaux modèles expérimentaux afin de mieux définir la voie métabolique par laquelle la soustraction des AA aromatiques du régime est bénéfique à la protection de la fonction rénale résiduelle. On pourrait confirmer le degré d'atteinte rénale en utilisant d'autres marqueurs de la fonction rénale tels que la Cystatine C, N-GAL ou KIM1 mais également utiliser un autre modèle d'IRC comme la néphrectomie des 5/6<sup>ème</sup>, pour donner plus de valeurs à ces résultats.

Dans un objectif de recherche translationnelle, nous pouvons très bien imaginer la production de compléments alimentaires destinés aux patients IRC, hyperprotéinés mais dépourvus d'acides aminés aromatiques, afin de limiter les effets délétères de ces derniers sur l'organisme tout en réduisant le risque de dénutrition protéique. Il serait intéressant de mettre en œuvre une étude prospective randomisée incluant des patients IRC, qui bénéficieraient de compléments alimentaires hyperprotéinés et dépourvu ou non d'AA aromatiques.

La détermination des facteurs contribuant à l'activation de la fibrose rénale et au déclin du DFG pourrait être la cible de nouvelles thérapeutiques permettant de ralentir la dégradation de la fonction rénale au cours de l'IRC.

**Titre en français :** Un régime appauvri en acides aminés aromatiques freine la progression de l'insuffisance rénale chronique chez la souris

**Résumé :**

Malgré des recommandations sur l'utilisation du régime pauvre en protéines au cours de la maladie rénale chronique (MRC), son intérêt est encore à ce jour débattu car son action reste mal comprise. Une diminution de la production de toxines urémiques pourrait expliquer le bénéfice de ce régime. Les acides aminés aromatiques (AAA) étant les précurseurs de toxines urémiques majeures telles que le p-cresyl sulfate (PCS) et l'indoxyl sulfate (IS), nous avons émis l'hypothèse qu'un régime normoprotéique mais appauvri en AAA (tyrosine, tryptophane, phénylalanine) pourrait s'avérer aussi efficace qu'un régime pauvre en protéines, en limitant la production des toxines urémiques. La MRC a été induite chez des souris C57Bl/6 par néphrectomie chimique via un régime adénine (0,25%, 4 semaines). Elles ont ensuite été exposées à 3 différents régimes pendant 6 semaines : standard, pauvre en protéines ou pauvre en AAA. Il n'y avait pas de différence significative sur le poids des souris en fonction des régimes. La créatininémie était significativement plus basse dans le groupe LPD et LAA que dans le groupe NPD, de même que la protéinurie. La fibrose interstitielle et l'inflammation était plus importante dans le groupe NPD versus LPD et LAA. La fraction libre du PCS et de l'IS était plus basse dans le groupe LPD et LAA vs NPD. Ces résultats suggèrent qu'un régime normoprotéique appauvri en AAA confère un bénéfice similaire au régime pauvre en protéines, ralentissant la progression de la MRC grâce à la réduction de production des toxines urémiques, sans exposer au risque de dénutrition.

**Mots clés :** acides aminés aromatiques, tryptophane, tyrosine, insuffisance rénale chronique, toxines urémiques, régime pauvre en protéine

**Titre en anglais :** A low aromatic amino-acid diet may improve renal function and prevent kidney fibrosis in mice with chronic kidney disease

**Abstract:**

Despite decades of use of low protein diets (LPD) in the management of chronic kidney disease (CKD) management, the mechanisms through which they delay the progression to end-stage renal disease (ESRD) remain controversial. A reduced production of uremic toxins could contribute to the benefits of LPDs. Aromatic amino-acids (AAA) are precursors of major uremic toxins such as p-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS). We investigated the hypothesis that a low aromatic amino acid diet (LA-AAD, namely low intake of tyrosine, tryptophan and phenylalanine) while being normoproteic, could be as effective as a LPD, through the specific diminution of uremic toxins production. Kidney failure was chemically induced in mice with a diet containing 0.25% (w/w) of adenine. Thereafter, mice received three different diets for six weeks: normoproteic diet, low protein diet and LA-AAD. LA-AAD and LPD had no significant effect on body weight. Both LPD and LA-AAD significantly reduced proteinuria and plasma creatinine as compared with that observed in the NPD group. Kidney fibrosis and inflammation were reduced with LPD and LA-AAD. Plasma free PCS and IS were decreased with LPD and LA-AAD compared to NPD. These results suggest that a LA-AAD confers similar benefits of a LPD in delaying the progression of CKD through a reduction in uremic toxins production, with a lower risk of malnutrition.

**Keywords:** aromatic amino-acids, tryptophan, tyrosine, chronic kidney disease, uremic toxins, low protein diet

**Université Paris Descartes  
Faculté de Médecine Paris Descartes  
15, rue de l'École de Médecine  
75270 Paris cedex 06**