

L'INFLUENCE DE L'INGESTION DE PROPOLIS SUR L'ÉTAT D'OXYDO-RÉDUCTION DE L'ALBUMINE DU SÉRUM HUMAIN : UNE ÉTUDE EFFECTUÉE SUR DES MALADES SOUFFRANT DE STRESS OXIDATIF SÉVÈRE

S. ERA¹, H. IMAI¹, T. HAYASHI¹, K. OKIHARA², A. NAKATSUMA²,
H. YAMADA²

¹Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, JAPON

Tel.: +81-58-267-2225, Fax: +81-58-267-2962, E-mail: era@gifu-u.ac.jp, imai@cc.gifu-u.ac.jp

²Yamada Apiculture Center, Inc. 194 Ichiba, Kagamino-cho, Tomata-gun, Okayama 708-0393, JAPON

Tel.: +81-868-54-1199, Fax: +81-868-54-7004, E-mail: 0342@yamada-bee.com, 0438@yamada-bee.com

Résumé

L'albumine du sérum humain (HSA) est une mixture de mercaptalbumine (HMA, la forme réduite) et de non-mercaptalbumine (HNA, la forme oxydée). HMA, ayant un seul résidu de sulfhydryle, est responsable de la plus grande fraction de sulfhydryle réactif dans les fluides extracellulaires et, par conséquent, elle semble prendre part largement au système antioxydant extracellulaire. Nous avons mis au point un système convenable de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), dans le but de séparer clairement le HSA en HMA et HNA. Par cette méthode, on a obtenu une valeur moyenne de $[HMA/(HMA+HNA)]$, par exemple : $f(HMA)$ a été de 73.2% (n = 20) pour les jeunes sujets mâles sains. Dans la présente étude, on a examiné l'influence de l'ingestion de propolis sur l'état d'oxydo-réduction de l'HSA des malades souffrant de stress oxydatif sévère, à savoir la thérapie du cancer. Dans le cas d'un malade souffrant de cirrhose hépatique et de cancer oesophagique (mâle, 68 ans), la valeur $f(HMA)$ avant la thérapie à radiation sans ingestion de propolis a été de 66.6%. Tout de même, pendant les deux semaines de thérapie à radiation, il a pris chaque jour 10 tablettes de propolis (525 mg d'extrait de propolis brésilienne / jour) et a continué d'en prendre pendant 4 semaines. Les valeurs $f(HMA)$ avant, tout de suite et après 4 semaines de radiothérapie ont été de 63,5, 67,7 et de 74,1%, respectivement. Ces évidences suggèrent que l'état oxydatif dû à la radiothérapie peut être atténué par la supplémentation de la propolis. En plus, une augmentation graduelle de la valeur $f(HMA)$ indique que les propriétés antioxydantes de la propolis pourraient augmenter la capacité antioxydante totale des malades souffrant de cancer.

Mots-clé: Propolis / stress oxydatif / état d'oxydo-réduction / albumine du sérum (humain)

Introduction

L'albumine du sérum humain (HSA) est la protéine la plus abondante du système circulatoire et présente toute une série de fonctions. Il est très connu le fait qu'elle joue un rôle important dans la régulation osmotique du fluide circulatoire du système vasculaire, étant à même de transporter dans le corps une grande variété de substances endogènes et exogènes (PETERS, 1996). Un autre rôle fonctionnel de cette molécule semble être la préservation du potentiel d'oxydo-réduction dans les fluides extracellulaires, car elle est un mélange de mercaptalbumine (la forme réduite ; chez les humains HMA) et de non-mercaptalbumine (la forme oxydée ; chez les humains, HNA), par exemple le couple d'oxydo-réduction du plasma (SOGAMI et al., 1984 ; SOGAMI et al., 1985a ; SOGAMI et al., 1985b). L'HMA dispose d'un groupe libre de sulfhydryle à la position 34 (Cys-34) et est responsable de la plus grande fraction de sulfhydryl libre des fluides extracellulaires. L'HNA est faite d'au moins trois types de composants. Le composant majeur de l'HNA est constitué par le mélange de disulfide et de cystéine ou de glutathion (HNA(Cys) ou HNA(Glut)), et l'autre est un produit d'oxydation qui dépasse la mixture de disulfide, à savoir l'état sulfénique (-SOH), sulfonique (-SO₂H) ou sulfonique (-SO₃H), (HNA(Oxi)) étant un composant mineur des fluides extracellulaires (ERA et al., 1989).

On a élaboré un système convenable de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour séparer de façon claire l'HSA en HMA et HNA, tout en utilisant un Shodex-Asahipak GS-520H ou une colonne ES-502N, et on a largement étudié les changements dynamiques de l'état d'oxydo-réduction de l'HSA dans les différents états pathologiques et physiologiques (SUZUKI et al., 1992 ; HAYAKAWA et al., 1997 ; HAYASHI et al., 2000 ; KAWAI et al., 2001 ; SOEJIMA et al., 2002 ; TOMIDA et al., 2003). A base

des résultats obtenus, on a constaté que la fraction d'HMA (f(HMA)) a décroît de manière substantielle dans différentes maladies, en comparaison avec celle des sujets sains, pour lesquels on n'a constaté aucun changement de la valeur f(HMA).

Le but de cette présente étude a été l'investigation de l'influence de l'ingestion de propolis sur l'état d'oxydo-réduction des malades souffrant de stress oxydatif sévère, comme le sont les malades traités de cancer, car on considère que la propolis, l'un des produits issus des abeilles, joue un rôle bénéfique en tant que supplément (BANSKOTA et al., 2001).

Matériel et Méthodes

On a étudié deux malades de cancer gastro-intestinal. Un malade (femme, âgée de 56 ans) souffrait de cancer gastrique et avait fait une gastrectomie curative. Un autre malade (mâle, âgé de 68 ans) souffrait de cirrhose de foie et de cancer oesophagique à la fois, les maladies étant indépendantes l'une de l'autre, et il avait été soumis à la radiothérapie contre le cancer oesophagique. Un sujet mâle sain (mâle, âgé de 45 ans), ayant aucun antécédent de maladies rénales ou hépatiques, a pris part à cette étude en tant que contrôle (l'un des auteurs ; H.I.). Comme supplément de propolis on a utilisé la propolis brésilienne extraite par l'éthanol (chaque tablette de propolis contenait 52,5 mg d'extrait de propolis, Yamada Apiculture Center Inc., Okayama, Japon). On a obtenu le consentement informé de chaque sujet, toutes les procédures étant effectuées en conformité avec la Déclaration d'Helsinki. Les échantillons de sang ont été introduits dans des éprouvettes collectrices de sang dans le vide (EDTA-2K, Terumo Co., Tokyo, Japon), qui ont été centrifugées pendant 20 minutes à 3.000 rpm dans une centrifuge Kubota 2100 (Kubota Manufacturing Co., Tokyo, Japon). Le plasma résulté a été par la suite soumis à la filtration sous pression, en se servant d'un filtre Cosmonice (0.45 μ m, Nacalai Tesque., Inc., Kyoto, Japon) et les échantillons ont été stockés jusqu'au moment de l'analyse HPLC à -80°C .

Le système HPLC est composé d'un auto-préleveur d'échantillons, du type AS-8010, d'une pompe à plongeur double du type CCPM et d'un détecteur à fluorescence du type FS-8000 (la longueur d'onde de l'excitation, 280 nm ; la longueur d'onde de l'émission, 340 nm), en conjonction avec un système de contrôle supplémentaire du type SC-8020, tous en provenance de Tosoh Co., Japon. On a employé une colonne Shodex-Asahipak ES-502N (10 x 0.76 cm I.D., à forme DEAE pour l'échange de ions HPLC, Showa Denko., Japon ; la température de la colonne, $35.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$). L'élution a été effectuée avec un gradient linéaire pour augmenter la concentration d'éthanol de 0 à 5%, dans 0,05 M d'acétate de sodium – 0,40 M de sulfate de sodium (pH 4.85) (tampon d'acétate et de sulfate) à une vitesse d'écoulement de 1,0 ml/min. Les échantillons de sérum ont été injectés à l'aide d'un auto-préleveur d'échantillons à volume fixe de 2 μ l.

Pour déterminer la valeur de chaque fraction d'albumine, par exemple, $f(\text{HMA}) = [\text{HMA}/(\text{HMA} + \text{HNA})]$ et $f(\text{HNA}) = [\text{HNA}/(\text{HMA} + \text{HNA})]$, les profils HPLC obtenus ont été soumis à l'adaptation à une courbe numérique; chaque forme de pointe a été approximée par une fonction Gaussienne.

Résultats et Discussion

On sait que l'HSA est une mixture d'HMA et d'HNA. Par surcroît, il y a plusieurs types d'HNA, à savoir l'HNA(Cys), HNA(Glut) and HNA(Oxi). Une séparation claire des trois fractions d'HSA, à savoir l'HMA, [HNA(Cys) et HNA(Glut)] (nommée HNA-1 dans cette étude) et l'HNA(Oxi) (nommée HNA-2) a été effectuée dans cette étude à l'aide de notre système HPLC. Nos études antérieures ont démontré que l'état d'oxydo-réduction HSA peut être utilisée comme un indice bio marqueur du stress oxydatif du corps (ERA et al., 1995 ; HAYASHI et al., 2000 ; IMAI et al., 2002 ; TOMIDA et al., 2003).

Les profils représentatifs HPLC d'HSA d'un sujet sain (mâle, âgé de 45 ans) et respectivement d'un malade atteint de cirrhose hépatique et de cancer oesophagique (mâle, âgé de 68 ans) sont montrés dans la Figure 1A et respectivement B. On a enregistré une claire séparation des fractions HMA, HNA-1 et HNA-2. Les valeurs obtenues pour les fractions HMA, HNA-1 et HNA-2 ont été de 74,0, 24,3 et de 1,7% (Figure 1A)

et respectivement de 63,5, 34,8 et 1,7% (Figure 1B). La valeur f(HMA) de 74,0% pour le sujet sain de cette étude ne s'est pas distinguée de la valeur moyenne f(HMA) antérieurement rapportée pour des sujets sains ($73,2 \pm 2,3\%$) (IMAI et al., 2002). Toutefois, la valeur f(HMA) de 63,5% du malade atteint de cancer oesophagique a été significativement plus basse que celle des sujets normaux, ce qui indique que pour ce malade souffrant de cancer le mécanisme de défense contre le stress oxydatif a été considérablement moins puissant. Puisque il n'y a pas des études *in vivo* sur l'effet antioxydant de la propolis, on a d'abord examiné les influences de l'ingestion de propolis sur l'état d'oxydo-réduction de l'HSA pour un sujet sain (mâle, âgé de 45 ans). Il a pris chaque jour 12 tablettes pendant une période de 4 semaines. De manière surprenante, la valeur de f(HMA) a graduellement monté de 74,0 (Figure 1A) à 79,2%, et celle de f(HNA-1) a décroît progressivement pendant cette période de 4 semaines de 24,3 (Figure 1A) à 19,9%. Ce résultat suggère que le niveau antioxydant pourrait avoir augmenté par la suite de la supplémentation de propolis. Pour cette raison, on a examiné l'influence de l'ingestion de propolis sur l'état d'oxydo-réduction de l'HSA chez deux malades souffrant de cancer gastro-intestinal et soumis aux thérapies anti-cancer.

Cas 1 : Une femme de 56 ans atteinte de cancer gastrique, soumise à une gastrectomie curative ; elle a accusé le manque de l'appétit, probablement causé par la gastrectomie. Elle a pris 5 tablettes de propolis chaque jour pendant une semaine, ensuite 6 tablettes chaque jour pendant 12 semaines et a continué de prendre 10 tablettes chaque jour pour une période de 8 semaines. Pendant la période de supplémentation de la propolis, la sensation d'appétit s'est améliorée et la valeur f(HMA) s'est maintenue entre 73 et 79%, ce qui suggère que la propolis est une substance potentiellement efficace dans le combat du stress oxydatif.

Cas 2 : Un homme âgé de 68 ans atteint de cirrhose hépatique et de cancer oesophagique, soumis à une thérapie à radiations. La valeur f(HMA) avant la radiothérapie et l'ingestion de propolis a été de 66,6%. Toutefois, pendant la radiothérapie de 2 semaines, il a pris 10 tablettes de propolis chaque jour et a continué d'en prendre pour une période de 4 semaines. Les valeurs f(HMA) juste avant, tout de suite après et à 4 semaines suivant la radiothérapie ont été de 63,5 (un profil HPLC est montré dans la Figure 1B), 67,7 et 74,1%, respectivement. On connaît que, bien que la thérapie à radiations de ^{60}Co soit une dose thérapeutique pour les êtres humains, produit toute une série de radicaux d'oxygène, dont on pense généralement qu'ils sont responsables pour les nombreux états de stress oxydatif (DAVIES, 1987). Pourtant, nos constatations sur la valeur f(HMA) dans le 2^{ème} cas suggèrent que l'état oxydatif causé par la radiothérapie peut être atténué par la supplémentation de propolis. De plus, l'augmentation progressive de la valeur f(HMA) indique que les propriétés antioxydantes de la propolis pourraient agrandir la capacité antioxydante totale des malades souffrant de cancer.

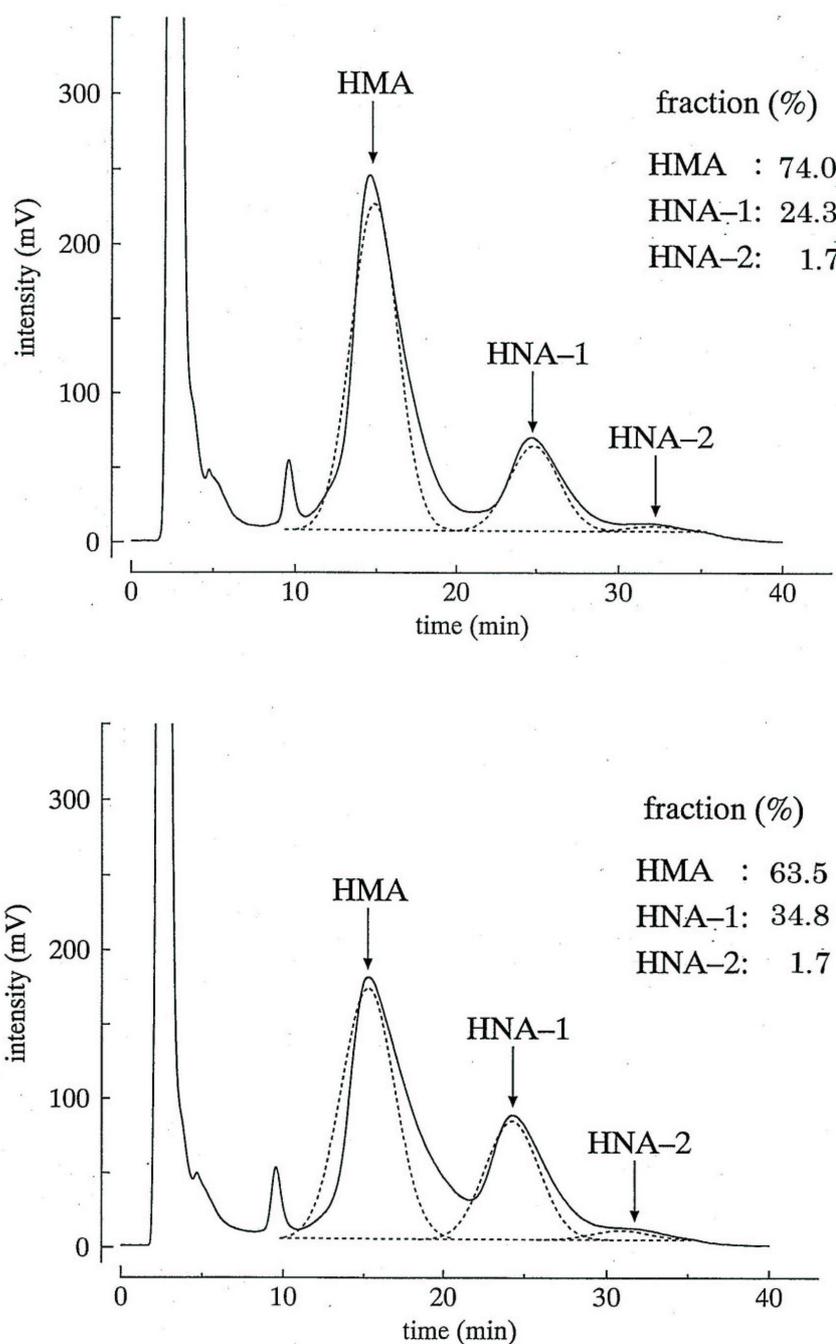


Fig. 1 – Des profils HPLC représentatifs pour le sérum (A) provenant d'un sujet sain (mâle, âgé de 45 ans) et (B) d'un malade atteint de cirrhose hépatique et de cancer oesophagique (mâle, âgé de 68 ans), obtenus à l'aide d'un système HPLC de détection fluorescente (la longueur d'onde de l'excitation, 280 nm ; la longueur d'onde de l'émission, 340 nm). Voir le texte pour les conditions détaillées de l'éluion. Les profils ont été soumis à l'adaptation à une courbe numérique (la ligne pointillée); les valeurs obtenues pour chaque fraction sont indiquées dans la partie droite des figures.

On pense que ces constatations sont fortement soutenues aussi par le fait que la propolis joue un rôle bénéfique en tant que supplément antioxydant également. Selon nos connaissances, le présent travail est la première étude *in vivo* qui analyse l'albumine oxydée et réduite chez les malades atteints de cancer et de stress oxydatif sévère, et qui ait soumis à l'observation l'effet antioxydant de la propolis également. Certainement, pour que la validité de ces constatations soit confirmée et pour que la signification clinique des données rapportées lors de cette étude soit déterminée, des études futures qui se fondent sur plusieurs cas sont encore nécessaires.

RÉFÉRENCES

- Banskota HA., Tezuka Y., Kadata S., Recent progress in pharmacological research of propolis, *Phytotherapy Res.*, 15(2001), 561-571
- Davies K.J.A., Protein damage and degradation by oxygen radicals, *J. Biol. Chem.*, 262(1987), 9895-9901
- Era S., Hamaguchi T., Sogami M. et al., Further studies on the resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 31(1989), 435-442
- Era S., Kuwata K., Imai H. et al., Age-related change in redox state of human serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1247(1995), 12-16
- Hayakawa A., Kuwata K., Era S. et al., Alteration of redox state of human serum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery, *J. Chromatogr. B*, 98(1997), 27-33
- Hayashi T., Era S., Kawai K. et al., Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract, *Pathophysiology*, 6(2000), 237-243
- Imai H., Hayashi T., Negawa T., et al., Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training, *Jpn. J. Physiol.*, 52(2002), 135-140
- Kawai K., Yoh M., Hayashi T. et al., Effect of diabetic retinopathy on redox state of aqueous humor and serum albumin in patients with senile cataract, *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 26(2001), 93-99
- Peters T. Jr., All about albumin, New York, Academic Press, 1996
- Soejima A., Kaneda F., Manno S. et al., Useful markers for detecting decreased serum antioxidant activity in hemodialysis patients, *Am. J. Kidney Dis.*, 39(2002), 1040-1046
- Sogami M., Nagaoka S., Era S., et al., Resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 24(1984), 96-103
- Sogami M., Era S., Nagaoka S., et al., HPLC-studies on nonmercapt-mercapt conversion of human serum albumin, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 25(1985), 398-402
- Sogami M., Era S., Nagaoka S. et al., High-performance liquid chromatographic studies on mercapt = nonmercapt conversion of human serum albumin II, *J. Chromatogr.*, 332(1985), 19-27
- Suzuki E., Yasuda K., Takeda N. et al., Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus, *Diabetes Res. Clin. Prac.*, 18(1992), 153-158
- Tomida M., Hayashi T., Ishimaru J. et al., Observation for the redox state of human synovial fluid albumin from patients with temporomandibular joint disorders, *Acta Sch. Med. Univ. Gifu*, 51(2003), 21-28