

Stress oxydatif en Cancer, SIDA, & Maladies Neurodégénératif

e d i t e d b y

LUC MONTAGNIER

*Centre National de la Recherche Scientifique
Institut Pasteur
Paris, France*

RENE OLIVIER

*Institut Pasteur
Paris, France*

CATHERINE PASQUIER

*Centre National de la Recherche Scientifique
Faculté Xavier-Bichat
INSERM U294
Paris, France*



MARCEL DEKKER, INC.

NEW YORK • BASEL • HONG KONG

42. MODULATION NUTRACEUTIQUE DU GLUTATHION AVEC UN ISOLAT DE PROTÉINES DE LACTOSÉRUM

INDIGÈNE HUMANISÉ, IMMUNOCAL_{MT} ET SON APPLICATION DANS LE CANCER ET LE SIDA

Sylvain Baruchel et Ginette Viau

Institut de recherche de l'Université McGill — Hôpital de Montréal pour enfants, Montréal, Québec, Canada

René Olivier

Institut Pasteur de Paris, France

Gustavo Bounous

Hôpital général de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Mark A. Wainberg

Hôpital général juif, Institut Lady Davis, Montréal, Québec, Canada

IMMUNOMODULATION NUTRITIONNELLE ET SA RELATION AVEC LA SYNTHÈSE DU GLUTATHION

Le lait frais et cru comprend le groupe de protéines qui restent solubles dans le « lactosérum ». Ces protéines peuvent être conservées dans leur forme native si elles sont soigneusement extraites de leur source naturelle.

En 1981, on a découvert que des souris normales nourries avec un concentré de protéines de lactosérum (spécialement préparé dans des conditions non dénaturantes) présentaient une augmentation marquée de la réponse immunitaire humorale à un antigène dépendant des cellules T auxiliaires (1). Au cours des années suivantes, de nombreuses expériences ont confirmé la cohérence de ce phénomène (2-10). Sur une période de 12 ans et sur la base de ces résultats, un isolat de protéines de lactosérum humanisées natives (HNMPI) appelé IMMUNOCAL_{MT} a été développé chez (Immunotec Research Corporation Ltd., Montréal, Québec, Canada).

Il a été découvert que cette propriété était liée, au moins en partie, à une augmentation de la production de glutathion splénique (L-aglutamylcystéinyglycine) (GSH) au cours de l'expansion clonale du pool de lymphocytes, induite par l'antigène nécessitant de l'oxygène, chez les animaux nourris avec ce HNMPI bioactif (9). Des niveaux adéquats de GSH sont nécessaires à la prolifération des lymphocytes dans le développement de la réponse immunitaire (11,12). Une élévation modérée mais soutenue du GSH cellulaire a également été observée dans le foie et le cœur de souris âgées et en bonne santé nourries avec ce HNMPI pendant une période prolongée. De plus, les HNMPI ont augmenté de manière significative leur durée de vie par rapport aux animaux témoins nourris avec des régimes nutritionnellement équivalents (13).

Le glutathion est d'une grande importance dans l'activité antioxydante cellulaire dans ce que Meister appelle « le système antioxydant GSH » car il est directement impliqué dans la destruction des composés réactifs de l'oxygène et aussi parce qu'il maintient sous forme réduite l'ascorbate (vitamine C) et l' α -tocophérol (vitamine E), qui exerce également un effet antioxydant (14).

Fonction du HNMPI comme système de distribution de cystéine

Quel ingrédient contient IMMUNOCAL_{MT} en fait-il un « système d'administration de cystéine » efficace ?

La disponibilité systémique du GSH oral est négligeable chez l'homme (15) et il n'existe aucune preuve de transport du GSH dans les cellules (16). Il doit donc être synthétisé de manière intracellulaire. Cela se produit en deux étapes : (a) la synthèse de la glutamylcystéine ; (b) synthèse du glutathion. Bien que l'afflux de cystéine, de glutamate et de glycine puisse s'avérer quelque peu limitant dans certaines circonstances, de nombreuses observations ont montré que c'est le transport de la cystéine (ou cystine, qui est généralement rapidement réduite en cystéine à l'entrée dans la cellule) qui tend à être l'événement limitant la vitesse de synthèse du GSH, alors que la cystéine libre ne représente pas un système de distribution idéal (17) car elle est toxique et s'oxyde spontanément.

La cystéine présente sous forme de disulfure de cystine libérée lors de la digestion dans le tractus gastro-intestinal est plus stable que l'acide aminé libre. La synthèse du GSH est soumise à une rétroaction négative inhibée par le produit final GSH. La liaison disulfure est résistante à la pepsine et à la trypsine, mais peut être clivée par la chaleur et le stress mécanique (9). La cystine représente

Environ 90 % de la faible masse moléculaire de la cystéine se trouve dans le plasma sanguin, tandis que la cystéine réduite n'est présente qu'à une très faible concentration (18).

Dans une étude comparative, il a été constaté que le lactosérum commercial était concentré et présentait une bioactivité bien moindre, notamment une moindre promotion de l'activité GSH, contenait environ la moitié de la quantité d'albumine sérique (9) et 4 fois moins de lactoferrine que le HNMPi, exprimé en pourcentage de la protéine totale du lactosérum. Immunocal est produit selon un procédé exclusif et autorisé qui permet de préserver les protéines les plus thermolabiles dans leur conformation native.

Dans l'albumine sérique, il y a 17 résidus de cystine par molécule de 66 kDa et 6 dipeptides Glu Cys (19) ; Dans la lactoferrine, il y a 17 par molécule de 77 kDa et 4 dipeptides Glu-Cys (20) ; et dans l' α -lactalbumine, il y a 4 cystines dans une molécule de 14 000 kDa

- **kDa signifie kilodaltons (poids moléculaire)**

Table 1.

	Molecular Mass (kDa)	Residues	Cysteine residues per molecule	Cysteine (Cys) ₂ (disulfide)	Glu-(Cys) ₂
β -Lactoglobulin	18,400	162	5	2	0
α -Lactalbumin	14,200	125	8	4	0
Serum albumin	66,000	582	35	17	6
Lactoferrin	77,000	708	40	17	4

Source: Refs. 19, 20.

MODULATION NUTRACEUTIQUE DU GLUTATHION

(19). En revanche, la bêta-lactoglobuline ne possède que 2 cystines dans une molécule de 18 400 kDa (19), et l'IgGI, l'immunoglobuline prédominante dans le lactosérum de lait de vache, ne possède que 4 ponts disulfures dans une molécule de 166 000 kDa (tableau 1). De plus, Meister et ses collègues (16) ont montré que les précurseurs du GSH, la γ -glutamylcystéine (Glu-Cys), peuvent facilement pénétrer dans la cellule et être synthétisés en GSH. Il convient donc de souligner que les protéines du lait les plus labiles – l'albumine sérique et la lactoferrine – sont celles qui contiennent ces composants peptidiques putatifs favorisant le GSH.

Enfin, la biodisponibilité de ce composant actif présumé (cystine et groupe Glu-Cys) peut être influencée par la coexistence d'autres protéines tout au long du processus d'absorption digestive.

Cette propriété nouvellement découverte du HNMPi s'est avérée indépendante de sa valeur nutritionnelle, car d'autres protéines d'efficacité nutritionnelle similaire ne présentent pas cette propriété unique (1-10). Le concept selon lequel il pourrait y avoir une activité biologique spécifique ainsi qu'un effet systémique indépendant d'Immunocal en tant que bonne source de protéines est soutenu par des essais in vitro récents (21).

L'apport alimentaire en cystine est particulièrement important pour le système immunitaire. La réponse coordonnée des macrophages et des lymphocytes dans la réponse immunitaire médiée par les cellules T est régulée, en partie, par l'absorption de cystéine par les macrophages et la libération ultérieure de la cystéine réduite dans l'environnement local pour être absorbée par les lymphocytes. Lorsque les macrophages présentateurs d'antigènes entrent en contact étroit avec les cellules T spécifiques de l'antigène, ils fournissent à ces cellules des quantités supplémentaires de cystéine et augmentent ainsi leur taux de GSH intracellulaire (18).

La validité de cette hypothèse est confirmée par la démonstration que les promoteurs immuno-améliorants et GSH (données non montrées) effet d'IMMUNOCAL^{MT} Elle est abolie par la sulfoximine buthionine, qui inhibe la γ -glutamylcystéine synthétase, première étape de la synthèse du GSH (17).

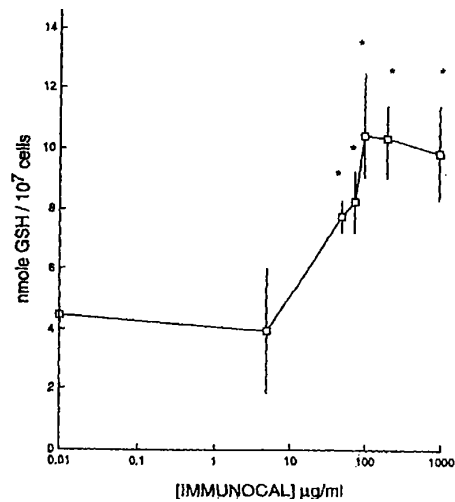


Figure 1. Incubation de PBMC pendant 72 h en présence de différentes quantités d'IMMUNOCAL_{MT}.
Chaque point représente la moyenne ± l'écart type (ET) de 3 mesures de glutathion intracellulaire. * pc

450 Baruchel et al.

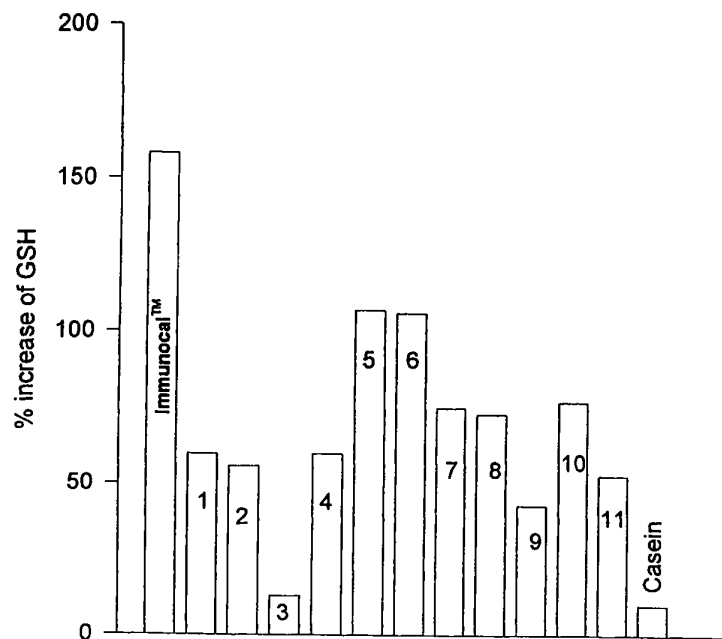


Figure 2. Incubation de PBMC pendant 72 h en présence d'IMMUNOCAL_{MT} et autres produits laitiers à base de lactosérum : Pourcentage d'augmentation du glutathion.

MODULATION IN VITRO DU GLUTATHION INTRACELLULAIRE PAR IMMUNOCAL_{MT}

Nous avons montré que les lymphocytes humains normaux cultivés pendant 3 jours avec HNMP1 10014/ml montrent une augmentation de la teneur en GSH intracellulaire de $4,5 \pm 0,4$ à $10,5 \pm 3,4$ nmo1/106 cellules, $p < 0,01$ (Figure 1). Cette augmentation du GSH est corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire mesurée par l'incorporation de thymidine (données non présentées). L'augmentation du GSH dépend de la dose et n'a pas été observée pour la caséine ou tout autre concentré de protéines de lactosérum disponible dans le commerce (Figure 2).

Tableau 2 Présence d'effets cytopathiques dans les cellules MT-4

IMMUNOCAL™ (µg/ml)	TCID ₅₀ /well ^a			
	2000	200	20	2
0	+++	++	+	-
1	+++	++	+	-
10	++	+	+	-
100	-	-	-	-
500	-	-	-	-
1000	-	-	-	-

+ Présence d'effets cytopathiques ; - absence d'effets cytopathiques.

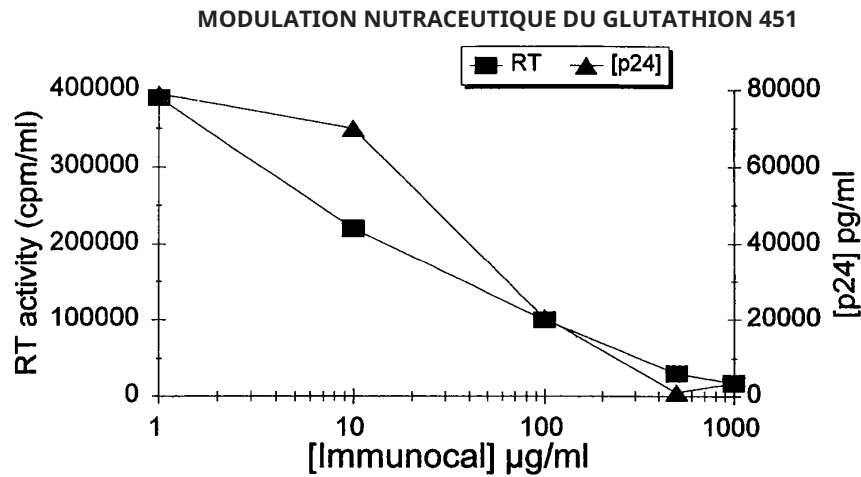


Figure 3. IMMUNOCAL_{MT} ont montré qu'ils inhibent la réplication du VIH

DANS LA LUTTE CONTRE LE VIH IN VITRO ET L'ACTIVITÉ ANTI-APOPTOTIQUE DE L'HNMPI

Cliniquement, il n'existe aucune preuve directe que l'infection par le VIH soit associée à un déficit en GSH dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) (18). L'épuisement du GSH intracellulaire suggère une association entre le stress oxydatif et l'infection par le VIH. Le stress oxydatif peut être l'un des mécanismes contribuant à la progression de la maladie et au syndrome de dépérissement par l'intermédiaire de médiateurs inflammatoires tels que le TNF-α et le 1L-6. Durant cette période de progression, le glutathione est consommé en raison d'un stress oxydatif accru. L'épuisement du GSH, conséquence du stress oxydatif chronique, fait partie du spectre de l'infection par le VIH. Le GSH joue également un rôle crucial dans la fonction des lymphocytes et la survie des cellules.

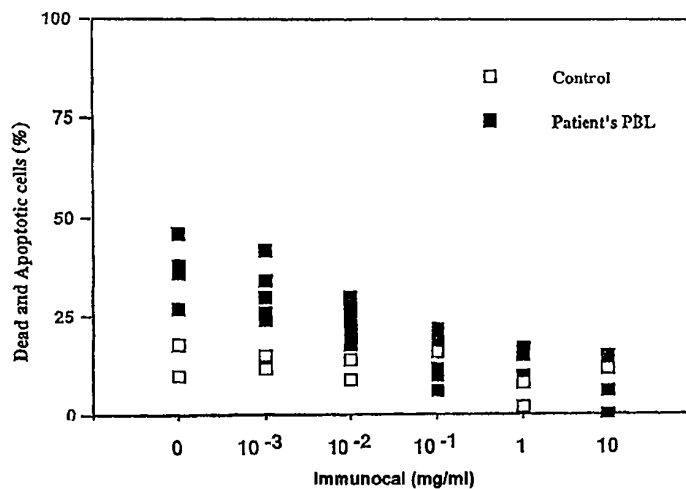


Figure 4. Inhibition de la mort cellulaire précoce par IMMUNOCAL_{MT}

452 Baruchel et al.

IMMUNOCAL_{MT}II fonctionne comme un système d'administration de cystéine qui peut améliorer la synthèse de GSH in vitro (Figure 1) et inhibe la réplication du VIH dans un système infecté par des cellules mononucléaires spinales, HTL V-IIIB (Figure 3). IMMUNOCAL_{MT}II inhibe également la formation de syncytium entre les cellules infectées et non infectées. L'inhibition de la formation de syncytium s'est produite à la même concentration que l'inhibition de la réplication du VIH (tableau 2). Cette inhibition virale n'était associée à aucune cytotoxicité.

IMMUNOCAL_{MT}, grâce à son activité de promotion du GSH, réduit l'apoptose dans les cellules infectées par le VIH. L'apoptose a été évaluée par cytométrie de flux dans les PBMC provenant d'individus infectés par le VIH (Dr R. Olivier, Département des rétrovirus du SIDA, Institut Pasteur). PBMC infectés par le VIH cultivés dans des concentrations IMMUNOCAL_{MT}de 100 Rg/m1 ou plus étaient moins susceptibles de mourir par apoptose que les cellules non traitées : 15 % ± 2,6 % contre 37 % ± 2,4, p < 0,001 (Figure 4).

- - cellules mononucléaires du sang périphérique ((**cellule mononucléaire du sang périphérique**Les PBMC sont des cellules sanguines qui ont un noyau rond (par opposition à un noyau lobé).

SUPPLÉMENTATION EN HNMPI DANS LE SIDA ET LE SYNDROME DE DÉPÊCHEMENT

Sur la base de ces données précliniques, un essai clinique canadien (Réseau canadien pour les essais VIH) a été mené avec IMMUNOCAL_{MT}chez les enfants atteints du SIDA et du syndrome de dépérissement. L'objectif principal était d'évaluer l'effet de la supplémentation orale avec IMMUNOCAL_{MT} sur les paramètres nutritionnels et la concentration intracellulaire de GSH des lymphocytes sanguins chez les enfants atteints du SIDA et du syndrome de dépérissement. Il s'agissait d'une étude pilote ouverte à un seul bras d'une durée de 6 mois. Le syndrome de dépérissement et la perte de poids sévère dans les 6 mois précédant l'entrée dans l'étude étaient un critère absolu d'entrée.

IMMUNOCAL_{MT}II était administré deux fois par jour sous forme de poudre diluée dans de l'eau. Chez certains patients, IMMUNOCAL_{MT}II a été administré par sonde nasogastrique lorsque cela était nécessaire. La dose initiale administrée était basée sur 20 % des besoins quotidiens totaux en protéines et a été augmentée de 5 % chaque mois pendant 4 mois pour atteindre 35 % de l'apport total en protéines à la fin de l'étude. La durée totale de l'étude était de 6 mois.

Les circonférences musculaires, le poids, la taille, les plis cutanés des triceps et des muscles du milieu du bras, les numérations CD4/CD8 et les concentrations de GSH dans les lymphocytes périphériques (mesurées par dosage spectrophotométrique) ont été mesurés mensuellement. L'apport énergétique a été évalué à l'aide de deux enregistrements alimentaires indépendants de 2 jours avec une période de 2 à 3 semaines entre les enregistrements alimentaires. Chaque enregistrement alimentaire comprenait un jour de la semaine et un week-end, et la moyenne de ces enregistrements a été calculée pour refléter l'apport nutritionnel quotidien. Sur 14 patients inclus, 10 étaient évaluables. L'âge des patients variait de 8 mois à 15 ans. Les 10 patients étudiés ont été recrutés dans quatre centres différents au Canada : l'Hôpital pour enfants de Montréal (Dr S. Baruchel), l'Hôpital pour enfants malades de Toronto (Dr S. King), l'Hôpital pour enfants de l'est de l'Ontario (Dr U. Allen) et le Centre hospitalier Laval à Québec (Dr F. Boucher). Parmi les 4 patients restants, 2 n'étaient pas conformes après 2 mois, tandis que les 2 autres sont décédés de la progression du SIDA dans les 2 premiers mois suivant leur entrée dans l'étude. Aucun des décès n'était lié au produit testé.

Aucun des patients n'a présenté de toxicité majeure, telle que diarrhée ou vomissements, ou de manifestation d'intolérance au lait. Un patient a dû arrêter IMMUNOCAL_{MT}transitoirement pour une intolérance digestive mineure telle que nausées et vomissements (< 2 fois/jour) à 3 mois et a pu ensuite reprendre le traitement sans aucun problème.

À la fin de l'étude, tous les patients ont connu une prise de poids allant de 3,2 % à 22 % de leur poids initial. Le gain de poids moyen du groupe était de 8,4 % ± 5,7 %. Dans l'analyse du pourcentage moyen des besoins en nutriments (RNI) par mois pour tous

Dans l'analyse du pourcentage moyen d'apport en nutriments essentiels (RNI) par mois pour tous les patients, aucune corrélation n'a été trouvée entre la prise de poids et une augmentation significative du pourcentage moyen de RNI, suggérant une réduction du catabolisme plutôt qu'un effet anabolique d'IMMUNOCAL_{MT}. Six patients sur dix ont montré une amélioration de leurs paramètres anthropométriques tels que le pli cutané du triceps ou la circonférence musculaire moyenne du bras, indépendamment d'une augmentation de l'apport énergétique (tableau 3),

Tableau 3. Variations initiales (exprimées en pourcentage) aux semaines 24 et 36 du poids, des mesures anthropométriques et du GSH chez les patients traités par IMMUNOCAL^{MT}

Patient no.	Weight change (%)		Mid-arm muscle circumference change		Triceps skinfold change (%)		PBMC GSH change (%)	
	wk 24	wk 32	wk 24	wk 32	wk 24	wk 32	wk 24	wk 32
1	22.1	29.8	9.5	14.3	50.0	25.0	12.2	-9.0
2	14.0	17.3	18.7	25.3	20.0	-20.0	84.0	56.0
3	5.1	9.2	-3.0	-2.0	-17.0	-3.0	37.0	55.0
4	3.8	3.4	4.2	NA	-42.0	NA	305.0	550.0
5	7.1	4.5	13.1	11.4	-24.0	-16.0	-18.0	14.3
6	3.7	5.6	-2.0	-2.0	16.0	16.0	7.1	174.0
7	2.5	NA	5.0	NA	-13.0	NA	54.2	NA
8	14.2	18.2	-3.1	2.0	41.0	43.0	17.3	62.4
9	8.9	7.9	-4.0	-8.0	-30.0	-39.0	-6.6	50.9
10	7.0	NA	1.0	NA	41.0	NA	-1.6	NA

Deux groupes de patients ont été identifiés en termes de modulation du GSH : les répondeurs et les non-répondeurs. Les répondeurs étaient ceux qui avaient commencé l'étude avec un faible taux de GSH.

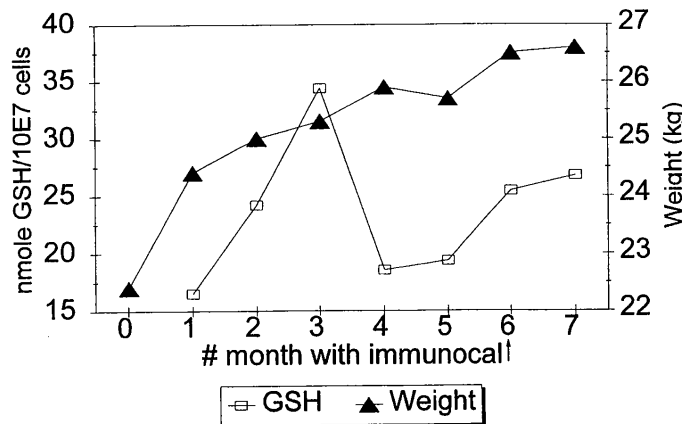


Figure 5. Glutathion intracellulaire dans les CSH 4. Chaque point représente la moyenne \pm ET de 3 mesures.

↑ indique la fin de l'étude.

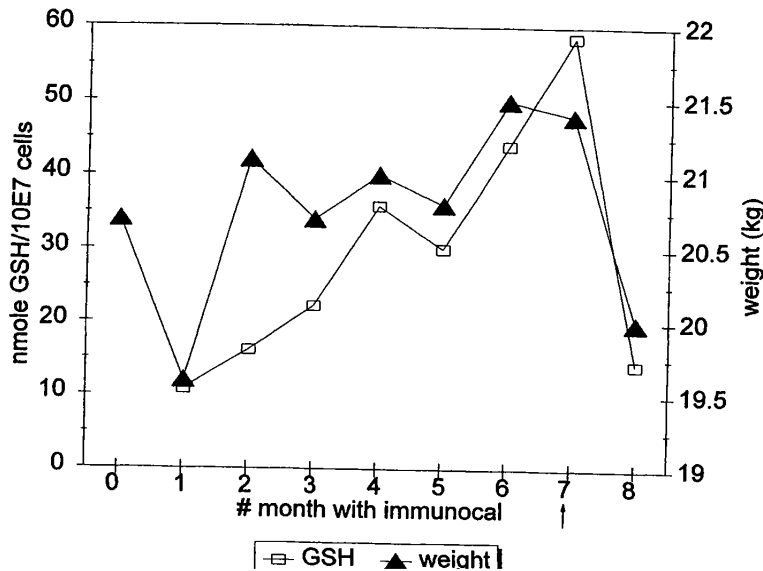


Figure 6. Glutathion intracellulaire dans CHUL 1. Chaque point représente la moyenne \pm ET de trois mesures.

↑ indique la fin de l'étude.

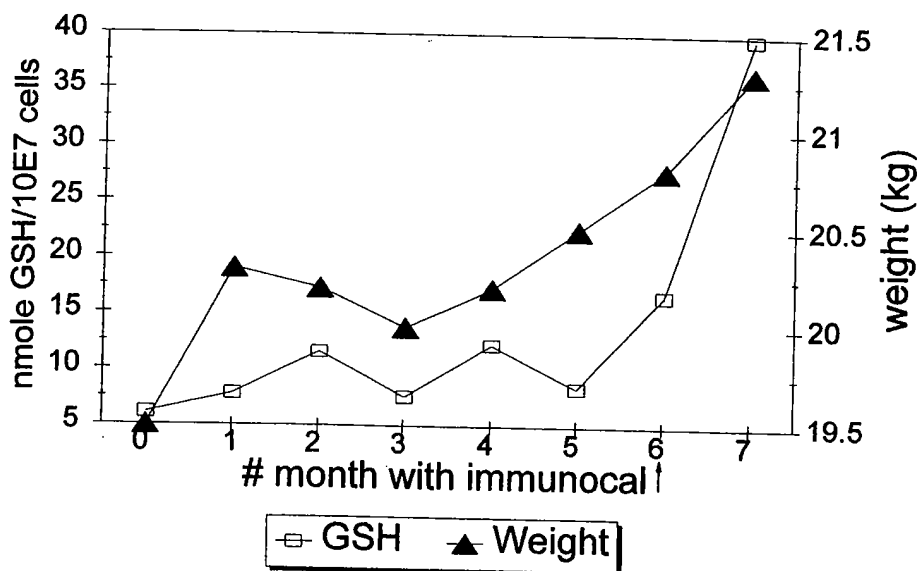


Figure 7. Glutathion intracellulaire dans MCH 3. Chaque point représente la moyenne +/- SD de trois mesures.

▲ indique la fin de l'étude.

Les non-répondeurs étaient ceux qui avaient commencé avec un taux de GSH normal. Une corrélation positive a été trouvée entre la prise de poids et l'augmentation du GSH (Figures 5, 6, 7). Aucun changement n'a été constaté en termes de numération des lymphocytes CD4 dans le sang, mais 2 patients ont montré une augmentation du pourcentage de leurs cellules CD8 et 4 patients ont montré une tendance à l'augmentation du nombre de cellules NK.

En conclusion, cette étude pilote démontre qu'IMMUNOCAL_{MTI} est très bien toléré chez les enfants atteints du SIDA et du syndrome de dépérissement et est associé à une amélioration de l'état nutritionnel du patient, comme en témoignent le poids et les paramètres anthropométriques. D'autre part, l'activité de promotion du GSH d'IMMUNOCAL_{MTI} in vivo, cela semble être validé chez 6 patients sur 10. Un essai randomisé multicentrique international est actuellement en cours en France et au Canada chez des patients adultes atteints du SIDA et du syndrome de dépérissement.

Modulation sélective du glutathion dans les cellules cancéreuses du sein et son impact sur la croissance des cellules cancéreuses

L'implication spécifique du GSH dans le processus cancérigène est soutenue par le rôle important joué par ce composé dans la détoxification des substances cancérogènes par conjugaison (26).

Nous avons montré que l'administration de HNMPI favorisant le GSH à des souris traitées chroniquement à la diméthylhydrazine (DMH) réduit significativement le nombre et la taille des carcinomes du côlon induits par la DMH (27,28). Ces tumeurs du côlon semblent être similaires à celles trouvées chez l'homme en ce qui concerne le type de lésions et les caractéristiques de réponse aux chimiothérapies (26). L'alimentation avec HNMPI semble exercer un effet inhibiteur non seulement sur l'initiation (27) du cancer, mais également sur la progression des tumeurs (28).

Récemment, un effet inhibiteur direct du HNMPI sur la réplication des cellules cancéreuses humaines a été confirmé (21,29,30). Dans d'autres études sur les cellules cancéreuses humaines, il a été découvert que l'effet inhibiteur était lié à l'albumine sérique, un composant du lactosérum (31) et plus récemment à la lactalbumine (32). L'administration de lactoferrine à des souris a inhibé la croissance des tumeurs solides et a également réduit la colonisation pulmonaire par les mélanomes (33). Contrairement à d'autres protéines, l'albumine sérique s'est avérée avoir et présenter un fort effet antimutagène dans un test in vitro utilisant des cellules de hamster (34). Il est donc intéressant de noter que dans ce HNMPI, nous avons réussi à concentrer l'albumine sérique, l' α -lactalbumine et la lactoferrine, qui contiennent toutes un nombre important de précurseurs du GSH. Une explication possible de ces propriétés nouvellement découvertes de la protéine de lactosérum alimentaire pourrait être trouvée dans les découvertes récentes sur le rôle du GSH dans la biologie tumorale (35).

La recherche de moyens d'inhiber les cellules cancéreuses sans nuire aux cellules normales s'est basée ces dernières années sur un effort vain visant à identifier les paramètres métaboliques dans lesquels les cellules cancéreuses sont en désaccord avec les cellules normales. L'une de ces fonctions pourrait être la synthèse du GSH cellulaire le plus important.

Des preuves expérimentales récentes ont révélé une réponse intrigante d'une tumeur contre des cellules normales dans la synthèse de composés favorisant le GSH. Il a été constaté que les niveaux cellulaires de GSH sont plusieurs fois plus élevés dans les cellules cancéreuses humaines que dans les cellules normales adjacentes (35). Cette découverte est probablement liée à son activité proliférative. En fait, le cancer est la seule maladie pour laquelle une élévation d'un système aussi étroitement régulé que le GSH a été signalée. Cependant, lorsqu'un composé favorisant la cystéine et le GSH tel que le 2-loxothiazolidine-4-carboxylate (OTZ) a été ajouté à des cellules cancéreuses pulmonaires humaines en culture qui présentaient initialement des niveaux très élevés de GSH, aucune augmentation intracellulaire n'a été observée, alors que le GSH a augmenté considérablement dans les cellules normales (35). Cette réponse différentielle est encore plus prononcée « in vivo ». Nous avons montré que chez les rats porteurs de tumeurs, le traitement par OTZ entraînait en réalité une diminution du GSH dans les tumeurs (36).

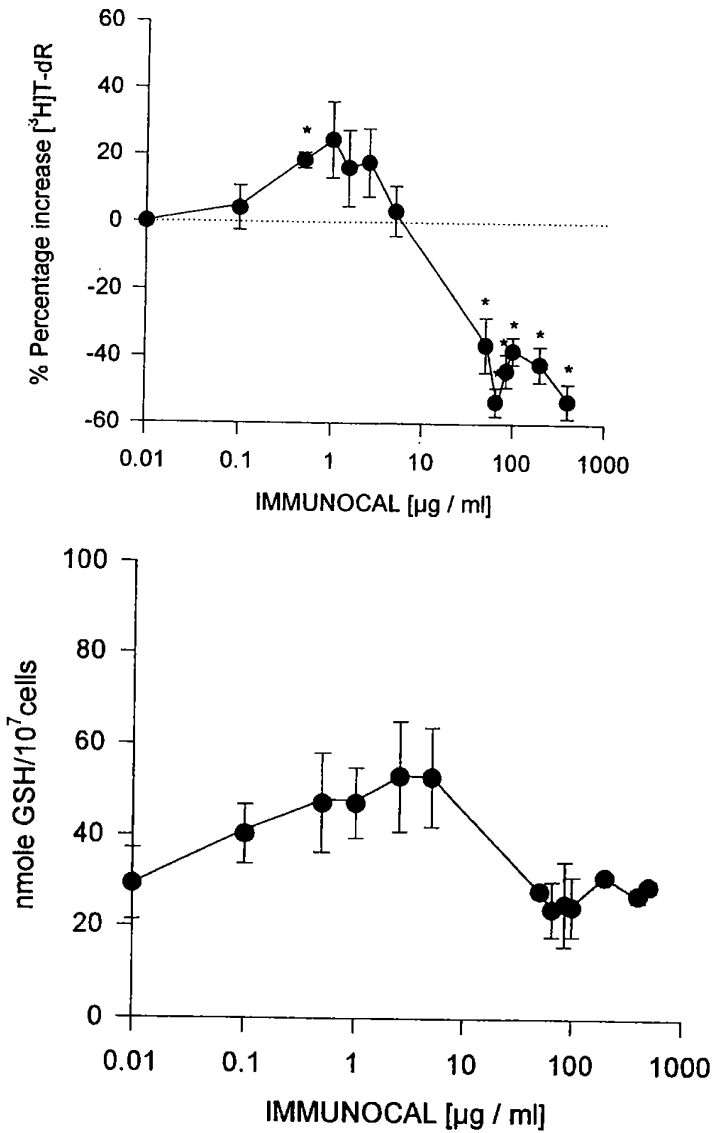


Figure 8. Glutathion intracellulaire dans MATB WT. Chaque point représente la moyenne \pm SE de trois mesures. *p <0,05.

Plus spécifiquement, un test in vitro a montré qu'à des concentrations qui induisent la synthèse et la prolifération du GSH dans les cellules humaines normales (Figure 1), IMMUNOCAL_{Mra} provoqué une déplétion du GSH et une inhibition de la prolifération cellulaire dans un carcinome mammaire de rat (Figure 8) et des cellules T Jurkat (Figure 9) (21).

La sélectivité démontrée dans ces expériences peut s'expliquer par le fait que la synthèse du GSH est inhibée négativement par sa propre synthèse et puisque, comme mentionné, le GSH intracellulaire de base dans les cellules tumorales est beaucoup plus élevé que dans les cellules normales, il est plus facile d'atteindre le niveau auquel l'inhibition par rétroaction négative se produit dans ce système cellulaire que dans un système cellulaire non tumoral.

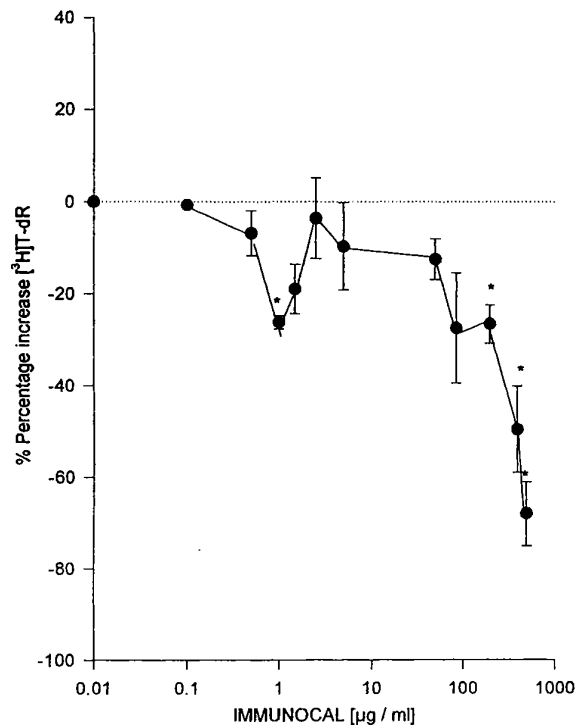


Figure 9. Glutathion intracellulaire dans Jurkat. Chaque point représente le \pm SE de trois mesures. *p <0,05.

HNMPI DANS LES ESSAIS CLINIQUES SUR LE CANCER

Sur la base de ces expériences, 5 patients atteints d'un carcinome métastatique du sein, 1 du pancréas et 1 du foie ont été nourris avec 30 g d'IMMUNOCAL_{MT} quotidiennement pendant 6 mois. Chez 6 patients, les taux de GSH dans les lymphocytes sanguins étaient sensiblement plus élevés que la normale au départ, reflétant probablement des taux élevés de GSH dans la tumeur. Au bout de 6 mois de supplémentation quotidienne, 2 patients ont montré des signes de régression tumorale, une normalisation du taux d'hémoglobine et de lymphocytes périphériques et une baisse soutenue des lymphocytes vers des niveaux normaux de GSH. Deux patients ont montré une stabilisation tumorale et une augmentation des taux d'hémoglobine. Chez 3 patients, la maladie a progressé avec une tendance vers des niveaux élevés de lymphocytes GSH (37).

L'un des principaux défis de l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques dans le traitement du cancer est la protection offerte par les mécanismes de défense des cellules cancéreuses. Un élément important de protection est représenté par le GSH, qui est un agent de détoxification efficace et relativement abondant dans les cellules tumorales. En fait, lorsque la synthèse du GSH est inhibée par la buthionine sulfoximine (BSO), l'activité de plusieurs agents chimiothérapeutiques tels que les agents alkylants est augmentée et la résistance aux médicaments peut être inversée (36-38). Cependant, l'épuisement concomitant du GSH dans les cellules normales limite considérablement l'utilité pratique de cette modalité de traitement.

Nous avons récemment montré qu'un promédicament sélectif du GSH tel que l'OTZ protège certains tissus normaux (36), mais potentialise également l'activité de certains agents alkylants (38).

La réduction sélective apparente des niveaux de GSH tumoral par la fourniture d'un précurseur naturel de GSH comme le montre IMMUNOCAL_{MT} semble être associée à l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses in vitro. Ce précurseur naturel du GSH influence favorablement la synthèse du GSH dans les cellules normales.

Ces résultats in vitro et cliniques préliminaires indiquent que cette propriété nouvellement découverte du HNMPI pourrait être un complément prometteur au traitement nutritionnel des patients cancéreux subissant une chimiothérapie. Nous menons actuellement une étude de phase II sur le cancer du sein, cherchant à confirmer que cette déplétion sélective de GSH peut, en fait, rendre les cellules tumorales plus vulnérables à la chimiothérapie et, en fin de compte, protéger les tissus normaux des effets nocifs de la chimiothérapie.

ANALOGIE ENTRE IMMUNOCAL_{MT}(HNMPI) ET LAIT HUMAIN

Le lait maternel contient environ 80 % de protéines de lactosérum et 20 % de caséine. Et c'est le contraire pour le lait de vache. Une analyse du rapport massique de la caséine à la protéine de lactosérum dans le lait de divers mammifères indique clairement que le lait humain présente le rapport le plus faible de toutes les espèces de mammifères (39). Sur la base de nos études en laboratoire démontrant les effets immunoprotecteurs et anticancéreux du concentré de protéines de lactosérum de lait de vache, il est tentant de supposer que cette prédominance des protéines de lactosérum dans le lait maternel est avantageuse et représente donc une adaptation évolutive.

Données scientifiques basées sur la similitude entre les composants bioactifs de cet isolat de protéines de lait natives (HNMPI) issu du lait de vache, IMMUNOCAL_{MT}, et les protéines de lactosérum humain semblent confirmer cette théorie, comme nous le verrons plus en détail ci-dessous.

Il est bien connu que l'allaitement maternel est supérieur à l'utilisation de formules à base de lait de vache nutritionnellement similaires pour la santé des nourrissons humains. L'allaitement maternel protège contre l'otite moyenne et la pneumonie (40,41). Le lait maternel a également un effet protecteur sur l'incidence de plusieurs types de cancer chez l'enfant, notamment la leucémie, les lymphomes, les tumeurs osseuses et les tumeurs cérébrales (42). Les enfants nourris artificiellement ou allaités pendant une courte période présentent un risque plus élevé de développer plusieurs types de cancer avant l'âge de 15 ans par rapport à ceux qui ont été allaités pendant une longue période (43). Ainsi, le concept d'une activité biologique, en plus de, mais indépendante de l'efficacité nutritionnelle, a été formulé pour décrire l'immunopotenteur et le promoteur GSH de l'activité de HNMPI IMMUNOCAL_{MT}, peut en fait s'appliquer à l'allaitement des nouveau-nés et des nourrissons. La synthèse du glutathion semble être le facteur décisif pour les bienfaits du HNMPI sur la santé.

Il pourrait alors être approprié d'identifier les caractéristiques communes aux protéines HNMPI et sériques humaines qui sont capables d'influencer la synthèse de GSH chez l'hôte. La cystéine, un facteur limitant crucial dans la synthèse du GSH, est aussi abondante dans les protéines du lactosérum du lait de vache que dans toutes les protéines du lait humain et plusieurs fois plus abondante que dans tout le lait de vache (39), puisque la plupart des caséines ne contiennent pas de cystéine ou un ou deux résidus de cystéine (19). Comme mentionné ci-dessus, des études ont montré que plus les protéines du lait sont thermolabiles, sont spécifiquement l'albumine sérique, α -la lactalbumine et la lactoferrine sont essentielles à l'expression de la bioactivité du HNMPI. Comme le montre le tableau 1, ces protéines sont riches en résidus de cystine et de glutamylcystine, précurseurs naturels du GSH. La présence de ces dipeptides dans le produit IMMUNOCAL_{MT} s'agit d'une caractéristique partagée avec le lait maternel (tableau 4).

Traditionnellement, on a soutenu que le lait de vache « humanisé » devrait contenir plus α -la lactalbumine car cette protéine est deux fois plus abondante dans le lait maternel. Sur la base de nos résultats expérimentaux, il est proposé plutôt que le principal facteur de santé dans le lait maternel, non dénaturé par la chaleur de la pasteurisation, soit dû à la prédominance de protéines riches en cystine thermolabiles contenant le dipeptide Glu-Cys qui sont caractéristiques du HNMPI bioactif, en particulier l'albumine sérique, α -lactalbumine et lactoféline. Ce HNMPI diffère des autres concentrés de protéines de lactosérum disponibles dans le commerce par sa teneur relativement élevée en albumine sérique (environ 10 %), en lactoferrine (environ 0,65 %) et α -lactalbumine (environ 28%). La variété des maladies contre lesquelles l'allaitement semble efficace suggère un mécanisme de protection plus large impliquant le GSH cellulaire et son effet sur les radicaux libres, la prolifération des lymphocytes et la détoxification des cancérigènes et autres xénobiotiques.

Tableau 4. Composition des protéines de vache et composition du lait maternel (g/litre)

Component	Cow milk	Human milk
Casein (g/L)	26	3.2
β -Lactoglobulin (g/L)	3.2	Negligible
α -Lactalbumin (g/L)	1.2	2.8
Serum albumin (g/L)	0.4	0.6
Lactoferrin (g/L)	0.14	2.0
Total cystine (mol/L)	8.19×10^{-4}	13.87×10^{-4}
Total cystine (mg/g protein)	6.4	38.7

Source: Ref. 19; Jennes R. Inter-species comparison of milk proteins. In Fox, ed. *Developments in dairy chemistry*–1. New York: ASP; 1982:8

CONCLUSION

L'activité biologique des protéines isolées du lait de vache dans IMMUNOCAL^{MT} Cela dépend de la préservation des protéines labiles qui partagent les mêmes protéines prédominantes du lait maternel et le même composant promoteur GSH extrêmement rare. L'épuisement du GSH cellulaire a été impliqué dans la pathogenèse d'un certain nombre de maladies dégénératives et d'états pathologiques, notamment la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, l'artériosclérose, la cataracte, la fibrose kystique, la malnutrition, le vieillissement, le SIDA et le cancer (9).

Cette modulation nutraceutique du GSH récemment découverte par l'utilisation d'un isolat de protéines de lactosérum natives humanisées d'origine bovine dans le SIDA et le cancer pourrait trouver d'autres applications où la maladie du stress oxydatif et la pathologie du métabolisme du GSH sont largement impliquées. Une étude pharmacoépidémiologique approfondie du métabolisme du GSH et des méthodes standardisées de mesure du GSH intracellulaire applicables aux essais cliniques sont nécessaires pour mieux définir l'application clinique de ce nouveau type de thérapie.

RÉFÉRENCES

1. Bounous G, Stevenson MM, Kongshavn PAL. Influence de l'hydrolysate de lactalbumine alimentaire sur le système immunitaire des souris et la résistance à la salmonellose J Infect Dis 1981; 144:281.
2. Bounous G, Kongshavn PAL. Influence des protéines alimentaires sur le système immunitaire des souris. J Nutr 1982; 112:1747--1555. 460 Baruchel et al.
3. Bounous G, Letoumeau L, Kongshavn PAL. Influence du type de protéines alimentaires sur le système immunitaire des souris. J Nutr 1983; 113:1415--1421.
4. Bounous G, Kongshavn PAL. Effet différentiel du type de protéines alimentaires sur les cellules B et les cellules T réponse immunitaire chez la souris. J Nutr 1985; « 521403--1408.
5. Bounous G, Shenouda N, Kongshavn PAL, Osmond DG. Mécanisme de la réponse altérée des cellules B induite par des changements dans le type de protéines alimentaires chez la souris. J Nutr 1985; 115:1409--1417.
6. Bounous G, Kongshavn PAL, Gold P. La propriété immuno-améliorante du concentré de protéines de lactosérum alimentaire. Clin Invest Med 1988; 11:271--278.
7. Bounous G, Kongshavn PAL. Influence du type de protéines dans les régimes alimentaires nutritionnellement adéquats sur le développement de l'immunité. Dans Friedman M, éd. Absorption et utilisation des acides aminés. Boca Raton, Floride : CRC Press ; 1989; 2:219--223.
8. Parker N, Goodrum KJ. Comparaison de l'effet de la caséine, de la lactalbumine et des protéines de soja sur la réponse immunitaire à un antigène T-dépendant. Nutr Res 1990; 10:781--792.
9. Bounous G, Gold P. L'activité biologique des protéines de lactosérum non dénaturées : rôle du glutathion. Clin Invest Med 1991; 14:296--309.
10. Hirai R, Nakai S, Kikuishi H, Kawai K. Évaluation des activités d'amélioration immunologique d'Immuncal. Institut de technologie cellulaire d'Otsuka Pharmaceutical Co. ; 13 décembre 1990.
11. Noëlle R], Lawrence DA. Détermination du glutathion dans les lymphocytes et association possible entre l'état redox et la capacité proliférative des lymphocytes. Biochem J 1981; 198:571--579.
12. Fidelus RK, Tsan MF. Glutathion et activation des lymphocytes : une fonction du vieillissement et de l'auto-

maladie immunitaire. *Immunologie* 1987; 61:503--508.

13. Bounous G, Gervais F, Amer V, Batist G, Gold P. L'influence des protéines de lactosérum alimentaires sur glutathion tissulaire et maladies du vieillissement. *Clin Invest Med* 1989; 12:343--349.

14. Meister A. Les effets antioxydants du glutathion et de l'acide ascorbique. Dans Pasquier et al., éd. *Stress oxydatif. Activation cellulaire et infection virale*. Bâle : Birkhauser Verlag ; 1994 : 101--110.

15. Williamson JM, Boettcher B, Meister A. Système d'administration intracellulaire de cystéine qui protège contre la toxicité en favorisant la synthèse du glutathion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:6246--6249.

16. Anderson ME, Meister A. Transport et utilisation directe de la gamma-glutamylcyst(e)ine pour la synthèse du glutathion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:707--711.

17. Bounous G, Batist G, Gold P. Propriété immuno-améliorante des protéines de lactosérum alimentaire chez la souris : rôle du glutathion. *Clin Invest Med* 1989; 12:154--161.

18. Droege W, Eck HP, Mimm S, Galter D. Régulation redox anormale dans l'infection par le VIH et d'autres maladies d'immunodéficience. Dans Pasquier C et al., éd. *Stress oxydatif, activation cellulaire et Infection virale*. Bâle : Birkhauser Verlag ; 1994 : 285--301.

19. Eigel WM, Butler JE, Emstrom CA, et al. Nomenclature des protéines du lait de vache, cinquième révision ; *J Dairy Sci* 1984; 67:1599--1631.

20. Goodman RE, Schanbacher FL. ARNm de la lactoferrine bovine : séquence, analyse et expression dans la glande mammaire. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180:75--84.

21. Baruchel S, Viau G. Modulation sélective in vitro du glutathion cellulaire par un isolat de protéines de lait natives humanisées dans des cellules de mammifères et un modèle de carcinome mammaire de rat. *Anticancer Res* Avril 1996; 15 : 1095--1100.

22. Reynolds P, Jellinger K, Youdim MBH. Métaux de transition, ferritine, glutathion et acide ascorbique dans le cerveau parkinsonien. *J Neurochem* 1989; 52:515--520.

23. Belleville F, Penin F, Cuny G. Peroxydation lipidique et piègeurs de radicaux libres dans la maladie d'Alzheimer. *Gérontologie* 1989; 35:275--282.

24. Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Hayashi T, Asai K, Kuzuya F. Rôle protecteur du glutathion intracellulaire contre les lipoprotéines de basse densité oxydées dans les cellules endothéliales en culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163:1466--1472.

Modulation nutraceutique du glutathion 461

25. Calvin HI, Medvedovsky C, Worgul BV. Épuisement quasi total du glutathion et cataractes spécifiques à l'âge induites par la buthionine sulfoximine chez la souris. *Sciences* 1986; 28:553--555.

26. Orrenius S, Thor H, Bellomo G, Moldeus P. Glutathion et toxicité tissulaire Dans Paton W, Mitchell I, eds. *9e Congrès international de pharmacologie, Londres, Angleterre*. Londres : MacMillan ; 1984:57--68.

27. Bounous G, Papenburg R, Kongshavn PAL, Gold P, Fleiser D. Les protéines de lactosérum alimentaires inhibent le développement de la malignité induite par la diméthylhydrazine. *Clin Invest Med* 1988; 11:213--217.
28. Papenburg R, Bounous G, Fleischer D, Gold P. Les protéines du lait alimentaire inhibent le développement de la malignité induite par la diméthylhydrazine. *Tumor Biol* 1990; 11:129--136.
29. Bourtourault M, Buleon R, Samperes S, Jouans Effets des protéines de lactosérum bovin sur la multiplication des cellules cancéreuses humaines. *CR Soc Biol* 1991; 185:2319--323.
30. Barta O'Barta VD, Crisman LM, Akers RM. Inhibition de la blastogenèse lymphocytaire par le lactosérum. *Am J Vet Dis* 1991; 512:247--253.
31. Laursen L, Briand P, Lykkesfildt AE. L'albumine sérique comme modulateur de la croissance de la lignée cellulaire du cancer du sein humain MCF-7. *Anticancer Res* 1990; 10:343--352.
32. Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, Sabharwal H, Svargorg C. Apoptose induite par une protéine du lait humain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:8064--8068.
33. Bezault J, Bhimani R, Wiprovnich J, Furmanski P. La lactoferrine humaine inhibe la croissance des tumeurs solides et le développement de métastases expérimentales chez la souris. *Cancer Res* 1994; 54:2310--2312.
34. Bosselaers 1E, Caessens PW, Banboeket MA. Effets différentiels des protéines du lait, du BSA et du soja sur les cellules ub V79 de SCE induites par 4NOO ou MNNG. *Food Chem Toxicol* 1994; 32:905--909.
35. Russo A, Degraff W, Friedman N, Mitchell FB. Modulation sélective des niveaux de glutathion dans les cellules humaines normales par rapport aux cellules tumorales et réponse différentielle ultérieure aux médicaments de chimiothérapie. *Cancer Res*. 1986; 26:2845--2848.
36. Baruchel S, Wang T, Farah R, Batist G. Modulation sélective in vivo du glutathion tissulaire dans un modèle de carcinome mammaire de rat. *Biochem Pharmacol* 1995; 50:1505--1508.
37. Kennedy RS, Konok GP, Bounous G, Baruchel S, Lee T. L'utilisation d'un concentré de protéines de lactosérum dans le traitement des patients atteints d'un carcinome métastatique : étude clinique de phase 1 à 11. *Anticancer Res* 1995; 15:2643--2650.
38. Jamali M, Wang T, Baruchel S, Lee T. La modulation du glutathion par un promédicament à base de cystéine améliore les réponses tumorales in vivo. *Je Pharrn Exp Ther* 1996; 276:1169--1173.
39. Bounous G, Kongshavn PAL, Taveroff A, Gold P. Caractéristiques évolutives des protéines du lait maternel. *Hypothèse médicale* 1988; 27:133--140.
40. Duncan B, Par J, Holberg CJ, Wright AL, Martinez F, Taussig LM. L'allaitement exclusif pendant au moins 4 mois protège contre l'otite moyenne. *Pédiatrie* 1993; 91:867f872.
41. Aniasson G, Alm B, Andersson B, Hakansson A. Étude de cohorte prospective sur l'allaitement maternel et l'otite moyenne chez les nourrissons suédois. *Pédiatrie* 1982; 70:239--245.
42. Mather G, Gupta N, Mathur S, Gupta U, Pradan S. Allaitement maternel et cancer infantile. *Pédiatrie indienne* 1993', 30:652--657.
43. Davis MK, Savitz DA, Grau'oard BI. Alimentation du nourrisson et cancer de l'enfant. *Lancet* 1988; 1:3