

## UN ENVIRONNEMENT CELLULAIRE BIEN OXYGENE PERMET DE LUTTER CONTRE LA GLYCATION DES PROTEINES

BEATRICE MERCIER<sup>1</sup>, JOSIANE PROST<sup>1</sup>, et MICHEL PROST<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université de Bourgogne, Dijon, France - Faculté des Sciences de la Vie

<sup>2</sup> Lara-Spiral SA, Couternon, France

### Résumé :

**Objectifs :** Les taux d'hémoglobines glyquées (*Glycated Haemoglobin Levels* - GHL) d'échantillons sanguins de rats Wistar normoglycémiques présentent une différence dose-dépendante entre des groupes témoins et des groupes respirant des extraits peroxydés d'huile essentielle de térébenthine. Ces extraits permettent d'optimiser la présence de l'oxygène au niveau cellulaire, pendant et après la session respiratoire. Plus les rats respirent le nébulisat d'huile essentielle peroxydée, plus leur GHL est bas. Cette étude a pour but de vérifier, sur des échantillons sanguins *ex-vivo*, l'impact des terpènes peroxydés sur les GHL. **Matériel et méthodes :** Les globules rouges sont séparés du plasma par centrifugation. Les échantillons plasmatiques sont traités par du nébulisat d'huile essentielle de térébenthine (peroxydée et non peroxydée) ou sont non traités pour les groupes témoins. Ils sont ensuite mis en présence des globules rouges lavés, trois heures avant l'estimation du taux des hémoglobines glyquées. La méthode d'évaluation utilisée est celle de Habeed. **Résultats :** les expériences *ex-vivo* démontrent que les terpènes peroxydés réduisent les GHL après une incubation de trois heures. Les mêmes résultats sont obtenus avec les terpènes oxydés. Par contre, les témoins et les échantillons sanguins traités avec une huile essentielle usagée montrent des résultats opposés. **Conclusion :** une oxygénation optimale, particulièrement quand elle est générée par les éléments peroxydés les plus volatils d'une huile essentielle de térébenthine, peuvent protéger les organismes (Mammifères dans cette étude) de la glycation des protéines. Une oxygénation améliorée peut également réduire les GHL d'échantillons sanguins traités, après trois heures d'incubation.

### Mots-clefs :

Bol d'Air Jacquier®, terpènes peroxydés, hémoglobines glyquées, oxygène.

### INTRODUCTION

L'appareil "Bol d'Air Jacquier®" génère des terpènes volatils peroxydés extrait d'une huile essentielle biologique de térébenthine (extrait naturel de *Pinus pinaster*). Ces terpènes peroxydés sont inhalés puis pris en charge par l'hémoglobine. Le groupe instable composé par l'hémoglobine, le pinène et l'oxygène, est capable d'améliorer la libération de cet oxygène au niveau cellulaire, plus efficacement que l'hémoglobine elle-même [1, 2]. Lors de précédentes études concernant l'évaluation de la capacité antiradicalaire de l'appareil [2, 3], et du fait que les protéines glyquées génèrent des radicaux libres

nous avons été amenés à évaluer :

- le taux des hémoglobines glyquées dans le sang des rats testés,
- l'impact des éléments volatils de *Pinus pinaster* peroxydés et non peroxydés sur des échantillons sanguins *ex-vivo*, à partir d'échantillons différents d'huile essentielle de térébenthine (huile neuve, vieillie/oxydée et usagée).

### MATERIEL ET METHODES

#### Evaluation du taux d'hémoglobines glyquées dans le sang des rats

Des rats Wistar, issus de l'élevage Dépré (F-18230 Saint Doulchard), sont répartis en trois séries et gardés par groupe de 4 à 6 dans une salle

d'élevage (alternance lumière/obscurité de 12 heures, température moyenne de 24°C et humidité moyenne de 60 %). Les rats ont une nourriture standard, adaptée aux rongeurs de laboratoire (Lab-blocks, de Scientific Animal Food & Engineering (SAFE) F-89290 AUGY). La nourriture et l'eau leur sont accessibles en permanence. Les taux de vitamines et de sels minéraux sont conformes à leurs besoins standards [4].

Nous avons suivi les principes généraux pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire, conformément aux recommandations du Conseil de la Communauté Européenne [5].

Les rats bénéficient de sessions respiratoires de 3, 6 ou 9 minutes, variant d'une session pour deux semaines à trois sessions par semaine. Les rats "peroxydés" respirent pendant 3, 6 ou 9 minutes le nébulisat issu de l'appareil Bol d'Air® (ils respirent des terpènes peroxydés, c'est-à-dire la partie volatile transformée d'une huile essentielle de térébenthine issue de l'arbre *Pinus pinaster*). Les rats "témoins" respirent 3, 6 ou 9 minutes de vapeur d'eau ; les rats "non-peroxydés" respirent pendant 6 minutes les terpènes volatils de *Pinus pinaster* sans transformation.

### Taux des hémoglobines glyquées des échantillons sanguins

Les échantillons sanguins concernant les expérimentations *ex-vivo* ont été donnés par le groupe vétérinaire de F-Marcigny. Le plasma est obtenu par centrifugation à faible vitesse (1600 g pendant 10 min). Les globules rouges sont lavés dans du tampon KRL (300 mosm/l). Les plasmas sont dilués avec du tampon KRL (300 mosm/l, v:v 1:12) et traités (ou non traités en ce qui concerne les plasmas témoins) pendant 3 minutes.

Les globules rouges lavés sont mis en présence, trois heures avant l'évaluation, avec les échantillons de plasma non traités (témoins) et traités (c'est-à-dire des échantillons dans lesquels ont barboté des extraits volatils peroxydés et non peroxydés de l'huile essentielle de térébenthine ; ces nébulisats sont générés par l'appareil Bol d'Air®).

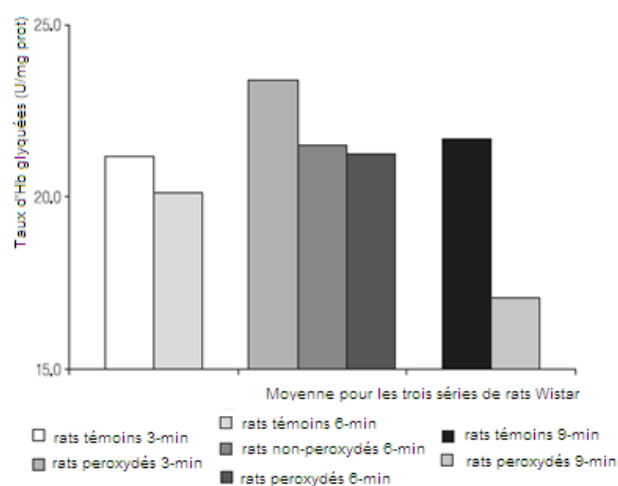
La glycation de la protéine hémoglobine est quantifiée par la mesure du pourcentage des

résidus aminoacides libres des protéines (TNBS assay) selon la méthode de Habeeb [6].

Les analyses statistiques sont pratiquées à l'aide du logiciel Statistica 5® (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Les données obtenues sont présentées sous forme de moyennes avec leurs écart-types ( $\pm$  SD). Les tests statistiques utilisés sont les tests Anova Manova à une ou plusieurs variances. Une différence entre les groupes  $< 0.05$  est considérée comme significative.

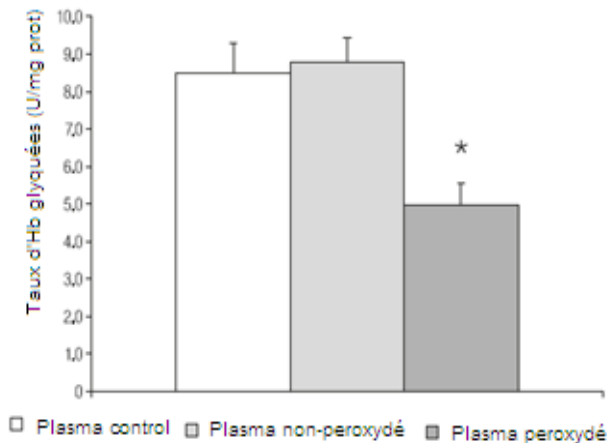
## RESULTATS

Tout d'abord (voir Fig. 1), nous observons un taux d'hémoglobines glyquées inférieur chez les rats Wistar traités, par rapport aux groupes témoins, de manière dose-dépendante. De fait, plus les rats respirent le nébulisat Bol d'Air®, plus leur taux d'hémoglobines glyquées est faible.



Trois séries de rats mâles Wistar bénéficient de 3, 6 ou 9 minutes de sessions respiratoires (vapeur d'eau pour les témoins, terpènes peroxydés et non-peroxydés pour les autres séries). En ce qui concerne l'analyse statistique (Anova Manova à une ou plusieurs variances), une probabilité de  $p < 0.05$  est considérée comme statistiquement significative. Les valeurs représentent les moyennes des groupes  $\pm$  SD (écart-types). Série des rats 3 min : groupe contrôle =  $21.2 \pm 8$  ; groupe peroxydé =  $20.1 \pm 7$  ;  $p = 0.7$  ;  $n = 4$ /groupe, avec 5 essais différents. Série des rats 6 min : groupe contrôle =  $23.4 \pm 5$  ; groupe non peroxydé =  $21.5 \pm 7$  ; groupe peroxydé =  $21.2 \pm 5$  ;  $p = 0.16$  ;  $n = 6$ /groupe, avec 6 essais différents. Série des rats 9 min : groupe contrôle =  $21.7 \pm 6$  ; groupe peroxydé =  $17.1 \pm 8$  ;  $p = 0.059$  ;  $n = 5$ /groupe, avec 5 essais différents.

**Fig. 1.** Niveau moyen des hémoglobines glyquées pour les trois séries de rats Wistar



A partir de sang de Bovidés, des globules rouges lavés sont incubés trois heures avant l'évaluation dans du plasma non traité (témoin) et du plasma dans lequel des extraits volatils peroxydés et non-peroxydés issus d'une huile essentielle de térébenthine biologique ont barboté pendant trois minutes. L'huile essentielle de térébenthine était récemment fabriquée par hydrodistillation. Les valeurs représentent les moyennes des groupes  $\pm$  SD (écart-types) ; n = 3 pour le plasma témoin, n = 3 pour les terpènes non-peroxydés et n = 6 pour le plasma peroxydé.  $p < 0.05$  pour le plasma peroxydé *versus* les plasmas témoins et non-peroxydés.

**Fig. 2.** Niveau moyen des hémoglobines glyquées pour le sang de Bovidés – Première étude

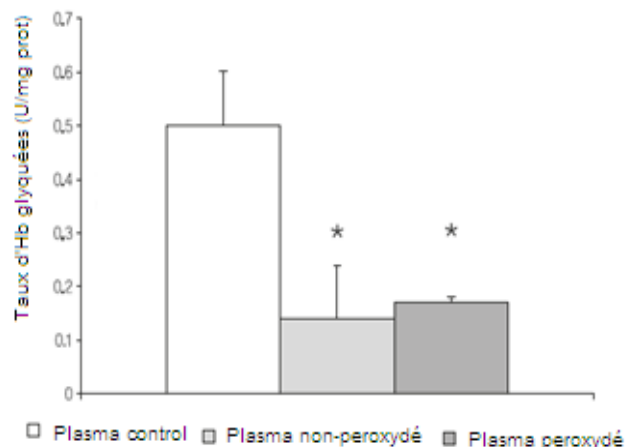
En ce qui concerne les tests *ex-vivo* (voir Fig. 2), nous obtenons un GHL significativement réduit avec un plasma traité aux terpènes peroxydés *versus* les plasmas témoins et traités aux terpènes non peroxydés.

Dans ce cas, l'huile essentielle utilisée est récemment obtenue par hydrodistillation de la résine de pin.

Une autre incubation de trois heures entre des hémoglobines et des plasmas (voir Fig. 3) donne des résultats différents.

Dans ce cas, nous obtenons une réduction significative du taux de GHL pour les plasmas peroxydés et non peroxydés *versus* le plasma témoin. L'huile essentielle de térébenthine utilisée provenait d'une bouteille entamée de moitié, fermée depuis plusieurs années. En d'autres termes, l'huile riche en terpènes utilisée était oxydée.

Aucune différence entre les trois échantillons n'est observée dans la Fig. 4. Dans ce cas, l'huile utilisée était usagée, c'est-à-dire qu'elle avait



A partir de sang de Mammifères, des globules rouges lavés sont incubés trois heures avant l'évaluation dans du plasma non traité (témoin) et du plasma dans lequel des extraits volatils peroxydés et non-peroxydés issus d'une huile essentielle de térébenthine biologique ont barboté pendant trois minutes. L'huile essentielle de térébenthine provenait d'une bouteille entamée de moitié, fermée depuis plusieurs années. Les valeurs représentent les moyennes des groupes  $\pm$  SD (écart-types) ; n = 4 pour le plasma témoin, n = 4 pour les terpènes non-peroxydés et n = 6 pour le plasma peroxydé.  $p < 0.05$  pour le plasma peroxydé et non peroxydé *versus* le plasma témoin.

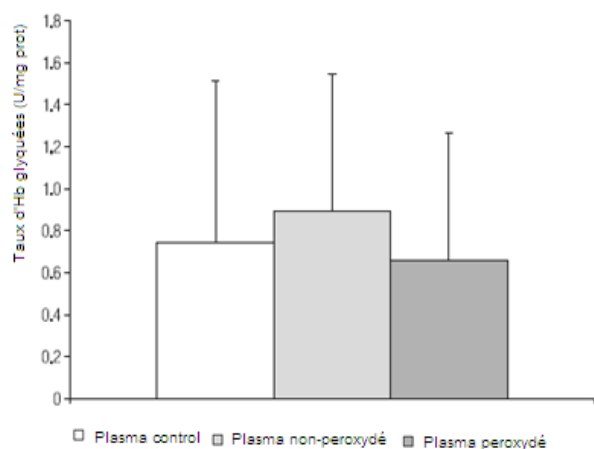
**Fig. 3.** Niveau moyen des hémoglobines glyquées pour le sang de Mammifères – Deuxième étude

perdu une grande partie de ses composants volatils (une analyse de laboratoire [2] démontre que ces composants volatils sont des alpha- et des bêta-pinènes).

A partir de ces observations, trois conclusions :

1. Puisque les liquides terpéniques récents et oxydés agissent positivement sur la glycation des protéines alors que l'huile usagée n'agit pas, nous pouvons dire que la capacité de l'huile essentielle de térébenthine à améliorer l'oxygénation cellulaire est due à ses composés les plus volatils.
2. Puisque les liquides terpéniques récents et oxydés agissent positivement sur la glycation des protéines et que l'huile usagée n'agit pas, nous pouvons en déduire que c'est l'oxygène qui est l'agent qui s'oppose à la glycation des hémoglobines.

3. Pour les mêmes raisons, il apparaît que l'oxygène est également l'agent permettant la réduction du taux des hémoglobines glyquées.



A partir de sang de Mammifères, des globules rouges lavés sont incubés trois heures avant l'évaluation dans du plasma non traité (témoin) et du plasma dans lequel des extraits volatils peroxydés et non-peroxydés issus d'une huile essentielle de térébenthine biologique ont barboté pendant trois minutes. L'huile essentielle de térébenthine était usagée. Les valeurs représentent les moyennes des groupes  $\pm$  SD (écart-types) ; n = 3 pour chaque groupe ; il n'existe aucune différence statistiquement significative entre les groupes.

**Fig. 4.** Niveau moyen des hémoglobines glyquées pour le sang de Mammifères – Troisième étude

## DISCUSSION

### L'huile essentielle de térébenthine : un joker anti-âge

Après le nickel, les parfums sont les substances allergisantes les plus répandues au monde [7]. Cette propriété est liée au fait que la majorité des huiles essentielles sont sensibles à l'oxydation [8]. Cependant, dans certains cas, comme pour l'huile essentielle de *Chaulmoogra* [9] – et celle de térébenthine – le vieillissement/oxydation rend le coefficient thérapeutique de ces produits très favorable (pour ceux qui travaillent sur ces huiles, le vieillissement implique l'oxydation) [10]. La capacité de la térébenthine à capturer puis redonner de l'oxygène est connue depuis les travaux de Berthelot [11]. Cette huile essentielle est ainsi capable d'améliorer le taux de saturation de l'HbO<sub>2</sub> [12] et de la PaO<sub>2</sub> [13]. Cette capacité a été confirmée par les travaux de Mercier *et al.* à

l'aide de l'appareil Bol d'Air Jacquier® (où la partie volatile de la térébenthine peroxydée a pour but de lutter contre l'hypoxie cellulaire). La particularité unique des sessions respiratoires Bol d'Air® est de maintenir un niveau légèrement plus élevé d'oxygène au niveau cellulaire, non seulement pendant les séances de respiration, mais aussi après l'arrêt de ces sessions [2, 3].

Puisque les liquides terpéniques récents et oxydés agissent positivement alors que l'huile usagée n'agit pas, nous pouvons en déduire que l'amélioration de la capacité d'oxygénation cellulaire est due aux composants les plus volatils de l'huile essentielle (*i.e.* à la capacité des alpha- et bêta pinènes à se peroxyder).

Dans tous les cas, l'amélioration du taux d'oxygène agit positivement sur la glycation des protéines, que ce soit chez les rats ou dans les échantillons sanguins.

Il existe une relation connue entre le diabète et l'hypoxie [14]. Cependant, nos expériences mettent en évidence pour la première fois (pour autant que nous le sachions) une relation directe entre l'oxygène et un taux inférieur d'hémoglobines glyquées, aussi bien chez des organismes que lors d'expérimentations *ex-vivo*. Respirer des alpha-pinènes (*i.e.* le composant majoritaire du nébulisat) peut également soutenir un traitement antidiabétique (la plante *Nigella sativa*, capable de régénérer partiellement les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, possède en effet ces éléments dans sa composition [15]). Enfin, respirer cette vapeur peroxydée améliore l'oxygénation cellulaire et contribue également à la prévention des dommages radicalaires (études faites sur des Mammifères en bonne santé) [2, 3].

### L'importance de la réduction du taux de protéines glyquées

La glycation est une association pathologique dans l'organisme entre le glucose et les protéines. Elle engendre un changement de forme de la protéine, et, en conséquence, une perte de fonction [16]. Ces protéines non-fonctionnelles, connues sous le nom d'AGEs (*Advanced Glycation End Products*) sont à l'origine d'un grand nombre d'effets organiques indésirables. En premier lieu, la réactivité chimique des protéines glyquées

augmente [17], ce qui génère un stress oxydatif majeur. Par exemple, une injection intraveineuse de ces protéines anormales chez des rats de laboratoire en bonne santé accroît de manière spectaculaire leurs taux de cytokines pro-inflammatoires, rappelant l'état inflammatoire ordinairement présent chez les rats âgés ou diabétiques [18]. Second point, ces produits dégradent le tissu organique en modifiant la structure et la fonction des membranes cellulaires [19]. Ne pouvant jouer leur rôle, les protéines anormales limitent les fonctions membranaires comme la fluidité, la conduction chimique, la régulation des fluides et des électrolytes [20]. Quand des protéines structurelles comme le collagène sont atteintes, elles contribuent à la perte de l'élasticité et de la jeunesse de la peau et à l'affaiblissement de la paroi des vaisseaux, contribuant au manque de fermeté d'un visage. S'y ajoute une augmentation du temps de cicatrisation, une sensibilité accrue aux infections, l'affaiblissement de la fonction rénale ou encore le risque de cataracte [21]. Quand ce sont les protéines qui forment les structures intracellulaires qui sont touchées par ce phénomène, la cellule perd sa capacité de transmission des signaux chimiques, détériorant de nombreuses fonctions cellulaires. Ces pertes de fonctions cellulaires, pouvant amener la mort cellulaire et spécialement dans les tissus nerveux, contribuent à l'installation de maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer [22]. Le taux de protéines glyquées est un facteur significatif de la mortalité. Le diabète, en particulier, génère des dommages dans les tissus en accélérant le processus de glycation. Chez les patients atteints de diabète de type 2, l'âge est un facteur aggravant. La glycation est l'un des plus importants facteurs à l'origine de l'accélération du vieillissement. Il existe une relation frappante entre les complications dues au diabète et les changements négatifs de santé dus au vieillissement [23-25].

## CONCLUSION

Pour toutes ces raisons, développer une méthode apte à éliminer les protéines glyquées tend à agir

sur un des mécanismes du vieillissement. C'est aussi un pas en direction d'un complément de traitement efficace pour les diabétiques.

Plusieurs méthodes existent pour ralentir le processus toxique de glycation. Par exemple, des études scientifiques mettent en évidence l'impact de la pyridoxamine (vitamine B6) dans la prévention des maladies chroniques ou pour limiter leur progression. Cette vitamine est efficace quand les dommages générés par les maladies sont dus à la glycation : problèmes liés à l'âge comme le plissement de la peau, l'athérosclérose, l'inflammation chronique, la dysfonction rénale, les complications liées au diabète et la maladie d'Alzheimer [26].

Cependant, rien ne peut complètement arrêter la glycation ou réduire le taux de protéines glyquées présentes. Nous espérons que l'utilisation d'une bonne oxygénation pourra être bénéfique (en complément d'autres méthodes, antidiabétiques ou curatives), même si cela peut sembler, tout simplement un "Back to basics".

## REMERCIEMENTS

De nombreuses personnes ont permis la réalisation de ce travail. Nous voudrions remercier Madame Marie-Laure Delanef, Directrice du laboratoire Holiste, et tout particulièrement Bernard Colnat et le Dr Dan C. Kenner pour la relecture anglaise de cet article, ainsi que Mesdames Emilie Julien et Christiane Galland pour la version française.

## REFERENCES

1. Jacquier R. *From atom to life*, Guy Trédaniel Ed., 2008; 505 pp., ISBN: 978-2-84445-937-4 [in French].
2. Mercier B. *Bol d'Air Jacquier®: biological and antiradicalizing effects of peroxidising terpenes*, 2008; PhD thesis, 2008DIJS019, University of Burgundy 440-16 pp. [in French].
3. Mercier B, Prost J, Prost M. *Antioxidant Activity of Bol d'Air Jacquier® Breathing Sessions in Wistar Rats - First Studies*. *Int J Occup Med Environ Health*. 2008, Jan 1;21(1):31-46.
4. American Institute of Nutrition. *Guidelines for describing diets for experimental animals*. *J. Nutr*. 1987; 117:16-17.

5. CEC Council of European Communities. *Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations*. Off J Eur Common (JO86/609/CEE) 1986, 358:1-28.
6. Habeeb AF. *Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid*. *Analyt Biochem*. 1966; 14:328-336.
7. De Groot AC, Frosch PJ. *Adverse reactions to fragrances. A clinical review*. *Contact Dermatitis*. 1997; 36, 57-86.
8. Karlberg AT, Bergström MA, Börje A, Luthman K, Nilsson JL. *Allergic contact dermatitis-formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers*. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21(1):53-69.
9. Lefèvre R, Baranger P. *Peroxides and polyphenol derivatives in the treatment of cancer*. *G Ital Chemioter*. 1956; 3(3-4):397-407 [in French].
10. Kleinschmidt J, Römmelt H, Zuber A. *The pharmacokinetics of the bronchoreolytic ozothin after intravenous injection*. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1985; 23(4):200-3.
11. Berthelot M. *Vegetable and agricultural chemistry*, Vol. 3, Masson Paris Ed. *Third chapter: Researches on the oxidizing properties of turpentine*, 476-496. [in French].
12. Chalchat JC, Garry RP, Michet A, Bastide P, Malhuret R. *Correlation between chemical composition and pesticide activity. I. Effect of several chemotypes of essential oil of Pinus sylvestris on Escherichia coli*. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 1987; XXI (1):26-35.
13. Schafer R, Schafer W. *Percutaneous absorption of various terpenes - menthol, camphene, limonene, isoborneol-acetate, alpha-pinene - from foam baths*. *Arzneimittelforschung*. 1982. 32(1):56-8 [In german].
14. Yeh HC, Punjabi NM, Wang NY, Pankow JS, Duncan BB, Cox CE *et al*. *Cross-sectional and prospective study of lung function in adults with type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study*. *Diabetes Care*, 2008; 31(4):741-6.
15. Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H, Demir H. *Partial regeneration/proliferation of the beta-cells in the islets of Langerhans by Nigella sativa L. in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Tohoku J Exp Med*. 2003; 201(4):213-9.
16. Onorato JM, Jenkins AJ, Thorpe SR, Baynes JW. *Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions*. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 21177-21184.
17. Suji G, Sivakami S. *DNA damage during glycation of lysine by methylglyoxal: assessment of vitamins in preventing damage*. *Amino Acids*, 2007; 33(4):615-621.
18. Prasad R, Lakshmi AV, Bamji MS; *Impaired collagen maturity in vitamins B2 and B6 deficiency-probable molecular basis of skin lesions*. *Biochem Med*. 1983; 30(3):333-41.
19. Nakagawa K, Ibusuki D, Yamashita S, Miyazawa T. *Glycation of plasma lipoprotein lipid membrane and screening for lipid glycation inhibitor*. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1126:288-90.
20. Williams ME, Bolton WK, Khalifah RG, Degenhardt TP, Schotzinger RJ, McGill JB. *Effects of pyridoxamine in combined phase 2 studies of patients with type 1 and type 2 diabetes and overt nephropathy*. *Am J Nephrol*. 2007; 27(6):605-14.
21. Padival S, Nagaraj RH. *Pyridoxamine inhibits maillard reactions in diabetic rat lenses*. *Ophthalmic Res*. 2006; 38(5):294-302.
22. Kojro E, Postina R. *Regulated proteolysis of RAGE and AbetaPP as possible link between type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*. 2009; 16(4):865-78.
23. Kopf D, Frölich L. *Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials*. *J Alzheimers Dis*. 2009; 16(4):677-85.
24. Gul A, Rahman MA, Salim A, Simjee SU. *Advanced glycation end products in senile diabetic and nondiabetic patients with cataract*. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2009; 23(5):343-348.
25. Makita Z, Yanagisawa K, Kuwajima S, Yoshioka N, Atsumi T, Hasunuma Y *et al.*, *Advanced glycation endproducts and diabetic nephropathy*. *Journal of Diabetes and its Complications*, 1995; 9(4):265-268.
26. Faloon W. *What makes pyridoxamine so special?* *Life extension (lef.org magazine)*, July 2009, As we see it, 7-12.