

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université Aboubekr Belkaïd –Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre
et de l'Univers

Département de Biologie
Laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la
Nutrition

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en
biologie
Option : physiologie cellulaire et physiopathologie

Effets des vitamines sur la fonction des lymphocytes

Présenté par : Mlle GHIZLENE MEHADJI

Soutenu le /06/2017, devant le Jury suivant :

Présidente LOUKIDI Bouchra, MCA, Université Tlemcen.

Examinatrice MEDJDOUB Amel, MCB, Université Tlemcen

Promotrice MERZOUK Hafida, Professeur, Université de Tlemcen.

Année Universitaire : 2016 / 2017



Remerciement

C'est avec un réel plaisir que je réserve ces lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens tout particulièrement et chaleureusement à remercier Mme MERZOUK Hafida, professeur à la faculté des sciences de la nature, Vie, Terre et Univers, département de biologie, Université de Tlemcen, qui m'a aidé tout le long de ce travail, par ses orientations, ses précieux conseils, sa compréhension et son infatigable dévouement, Merci madame.

Je remercie également Mme LOUKIDI Bouchra, Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen, pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce travail en acceptant de présider le jury. Je tiens à vous exprimer tout mon respect et mon estime.

Mes sincères remerciements vont également à Mme Medjdoub Amel, Maître de conférences à l'Université de Tlemcen, qu'elle trouve ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier ma chère cousine Mme SAIDI Amel pour son aide, son temps consacré à me fournir les informations auxquelles j'ai eu besoin.

Je remercie également tous les enseignants et les enseignantes qui m'ont suivi tout le long de mes études. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude, et aussi tous les membres du laboratoire PPABIONUT.

Enfin, un grand merci à mes parents, ma très chère grand-mère Zoubida, ma grande et chère sœur Amel, mon beau frère Tewfik, mon frère Sid Ahmed, mes oncles Abdellatif et Hadjou, mes cousins Omar, Riadou et Chakir, ma cousine Mina et mes cousines Mounia et Sihem pour leurs soutiens et leur aide très précieuse.





Dédicace



C'est avec un énorme plaisir et une immense joie, et grand hommage de tout cœur que je dédie ce modeste travail,

*À mes très chers parents LATIFA et ABDELMADJID
qui m'ont soutenu tout au long de ma Vie.*

*Ainsi qu'à mon frère SID AHMED et ma sœur AMEL et
mon neveu MOHAMED WASSIM.*

A toute la famille

*A toute la promotion du master physiopathologie cellulaire
2016-2017 avec qui j'ai partagé d'agréables moments*

*Enfin, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment de près et de
loin.*



*Les plus belles choses quittent un jour nos yeux mais
jamais notre cœur.*





Liste des Figures



Figure 1. Structure des tocophérols et tocotriénols.	10
Figure 2. Voies d'absorption et de sécrétion de la vitamine E.	12
Figure 3. Structure de la vitamine C.	14
Figure 4. Nature et relations entre les principaux radicaux libres et espèces réactives de l'azote et de l'oxygène intervenant dans le phénomène de stress oxydant.	21
Figure 5. Cascade radicalaire et les niveaux d'action de certains antioxydants (enzymes).	22
Figure 6. Méthode d'isolement et purification des lymphocytes.	27
Figure 7. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.	34
Figure 8. Teneurs en vitamine C des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.	35
Figure 9. Teneurs en Glutathion réduit (GSH) des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.	37
Figure 10. Activité de l'enzyme catalase des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.	38
Figure 11. Teneurs en Malondialdéhyde (MDA) des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.	40
Figure 12. Teneurs en Protéines carbonylées (PCAR) des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.	41



Liste des Tableaux



Tableau 1. Les différentes vitamines.	6
Tableau 2. Vitamines, source et rôles.	8
Tableau 3. Taille et densité des cellules sanguines	26

Tableaux en Annexes

Tableau A1. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.	60
Tableau A2. Teneurs en vitamine C des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.	61
Tableau A3. Statut antioxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.	62
Tableau A4. Statut oxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.	63



Liste des abréviations



ABCA1	ATP Binding Cassettes 1
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGPI	Acide Gras Poly Insaturé
ATP	Adénosine triphosphate
CAT	Catalase
CEHC	Carboxy Ethyl Hydroxy Chromane
ConA	Concanavaline A
DTNB	5,5'-Dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid]
GluT	Glucose Transporter ; Transporteur du Glucose
GPx	Glutathion Peroxydase
GSH	Glutathion Réduit
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HDL	High Density Lipoprotein ; Lipoprotéine de haute densité
HCL	Acide Chlorhydrique
IL	Interleukine
IMS	Iodoacétate Monosodique
IP	Indice de prolifération
LDL	Low Density Lipoprotein ; Lipoprotéine de basse densité
LDH	Lactate déshydrogénase
LP	Lipoprotéine
MDA	Malondialdéhyde
MMP	Métallo Protéinase Matricielle
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltétrazolium bromide
NaOH	Hydroxyde de Sodium
NFK_β	Nuclear Factor Kappa β; Facteur de transcription β

NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like1
NPC	Niemann-Pick C
NO	Monoxyde d'azote
O²⁻	Anion superoxide
OH	Radical hydroxyle
PBS	Phosphate Buffered Saline ; Tampon Phosphate
PCAR	Protéine Carbonylée
PLTP	Plasma Phospholipid transfert protein
PGE	Prostaglandine
ROS	Espèces réactives oxygénées
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
1640	
SOD	Superoxyde dismutase
SR-B₁	Scavenger Receptor Type B ₁
SVCT₁	Sodium-dependent Vitamin C Transporter 1 ; Transporteur de Vitamine C dépendant du Sodium 1
SVCT₂	Sodium-dependent Vitamin C Transporter 2 ; Transporteur de Vitamine C dépendant du Sodium 2
TAP	Tocopherol Associated Protein
TBA	Acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloroacétique
TGFb	Transforming Growth Factor b ; Facteur de Croissance Transformant b
TNF_α	Facteur de Nécrose Tumorale Alpha
TNB	Acide thionitrobenzoïque
VLDL	Very Low Density Lipoprotein ; Lipoprotéine de très faible densité
α-TCP	Alpha Tocopherol
α-TTP	Alpha Tocopherol Transfer Protein



SOMMAIRE

Introduction	1
Connaissances actuelles du sujet	4
1. Différents types de vitamines	5
1. 1. Définition	5
1. 2. Rôles des vitamines	5
1. 3. Vitamine E	7
1. 4. Vitamine C	13
2. Stress oxydatif et vitamines	17
2. 1. Stress oxydatif	17
2. 2. Rôles antioxydants des vitamines	19
Matériels et méthodes	23
1. Choix du modèle d'étude <i>in vitro</i>	24
2. Isolement des lymphocytes humains	24
3. Culture des lymphocytes	25
4. Comptage des lymphocytes	28
5. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT	28
6. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau des lymphocytes	29
6. 1. Détermination du taux de Glutathion des lymphocytes	29
6. 2. Détermination de l'activité de la Catalase des lymphocytes (CAT, EC 1.11.1.6)	30
6. 3. Dosage de la vitamine C intra-lymphocytaire	30
6. 4. Dosage du malondialdéhyde (MDA) des lymphocytes	30
6. 5. Détermination des protéines carbonylées des lymphocytes	31
7. Analyse statistique	31
Résultats et interprétation	32
1. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E	33
2. Teneurs en vitamine C des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E	33
3. Statut antioxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E	36
4. Statut oxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E	39
Discussion	42
Conclusion	47
Références bibliographiques	49
Annexes	59



Introduction

Introduction

Aujourd'hui, la prise en charge du stress oxydatif se justifie pleinement dans toute stratégie de prévention des maladies dégénératives et celle du vieillissement. En effet, de nombreuses études ont apporté la preuve de l'efficacité des antioxydants dans la prévention des maladies cardiovasculaires, métaboliques, neurodégénératives et des cancers (Kumar, 2016 ; Graffouillère et al., 2016 ; Höhna et al., 2017).

Les antioxydants sont des substances qui peuvent compenser les effets néfastes des processus d'oxydation se produisant dans le corps permettant ainsi de diminuer le risque de survenue de nombreuses pathologies. Les antioxydants peuvent être des nutriments (vitamines et minéraux) ou des enzymes (protéine dans le corps qui aide au cours des réactions chimiques) ayant une fonction cruciale dans la lutte contre le stress oxydatif et dans la prévention des pathologies. Les antioxydants sont nombreux et ont des propriétés complémentaires. En dehors des vitamines antioxydantes classiques (C, A, ou E), on peut citer l'acide alphasébacique, la curcumine, de nombreux polyphénols et certains minéraux (Se, Zn).

Le stress oxydatif se produit lorsque la production de molécules nocives (les radicaux libres) excède la capacité de neutralisation du système de défense antioxydant. Les radicaux libres sont des ions instables très réactifs dont la durée de vie est très courte. Afin de se stabiliser, ils s'approprient les électrons libres d'autres molécules. Au cours d'un fonctionnement normal, le corps produit des radicaux libres qui sont normalement neutralisés et détruits par les antioxydants. Avec l'âge et dans certaines situations pathologiques, la production d'antioxydants se détériore, et dans ce cas, il est important de prendre des antioxydants pour neutraliser les radicaux libres en excès. Dans le cas des carences en antioxydants, l'équilibre se rompt avec apparition du stress oxydatif annonciateur de maladies diverses (Favier, 2006; Burton et Jauniaux, 2011; Sosa et al., 2013; Surapon, 2015).

Plusieurs études précédentes ont montré l'efficacité des antioxydants dans la réduction des taux de cholestérol et du risque de maladies cardio-vasculaires, dans la réduction du risque de cancer, dans la protection de l'œil et de la vision, dans le retardement du vieillissement, dans le traitement des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson et même dans la réduction des complications associées à de nombreuses pathologies (Bentley et al., 2012 ; Agarwal et al., 2014; Shirley et al., 2014).

Introduction

De plus, des suppléments nutritionnels contenant des vitamines permettent de renforcer l'efficacité du système immunitaire, de lutter contre les infections et le stress oxydatif (Wintergerst et al., 2007).

Les vitamines C et E peuvent participer comme antioxydants dans la modulation du système immunitaire et la protection contre les radicaux libres. Elles constituent une ligne de défense forte pour retarder les lésions cellulaires induites par les espèces réactives oxygénées. Elles sont impliquées dans diverses fonctions biologiques comme la prolifération des cellules, la production de cytokines, la protection contre l'apoptose cellulaire et contre les dommages induits par les oxydants exogènes ou endogènes, le métabolisme énergétique, la fonction mitochondriale et l'expression des gènes (Serafini, 2000; Block et al, 2008; Strohle et Hahn, 2009).

Bien que les données précédentes fournissent des informations sur les rôles importants immunitaires et antioxydants des vitamines (C, E), il existe encore des doutes concernant leur utilisation prolongée. En effet, la prise non contrôlée d'antioxydants, en vente libre, n'est pas toujours bénéfique, parfois inefficace et dangereuse. La prise non contrôlée de vitamine A ou vitamine C ou E peut s'avérer pro-oxydante (Bouayed et Bohn, 2010).

Il est essentiel aujourd'hui de proposer une démarche scientifique et rationnelle dans le domaine de l'exploration du stress oxydatif et de sa prise en charge par l'utilisation des antioxydants.

Dans ce contexte, nous proposons une technique de culture cellulaire, afin de tester l'efficacité de deux vitamines largement utilisées, à savoir la vitamine C et E. L'utilisation des cellules isolées à partir des personnes concernées va permettre de voir la réponse de la cellule aux antioxydants, et de proposer par la suite de nouvelles pistes thérapeutiques mettant en jeu les antioxydants. Les lymphocytes peuvent être isolés facilement à partir du sang total, et offrent la possibilité de culture pendant un certain temps en présence d'agent mitogène spécifique. Dans ce travail de master, nous avons utilisé les lymphocytes en culture afin de déterminer les effets in vitro de la vitamine C et E à différentes concentrations sur la prolifération cellulaire et sur les marqueurs du stress oxydatif intracellulaire.

Connaissances actuelles sur le sujet

Connaissances actuelles

1. Différents types de vitamines

1.1. Définition

Les vitamines au sens strict du terme sont un ensemble de substances organiques actives à très faible dose et indispensables à la vie que l'organisme ne sait pas synthétiser. Elles ont des rôles très variés et leur classification repose sur leur solubilité (Guilland et al., 2007). C'est un groupe diversifié de composés organiques essentiels qui participent à la croissance normale, au métabolisme et au maintien de la vie. Afin de conserver une alimentation adéquate en vitamines, on doit consommer une grande variété de produits alimentaires soit naturellement soit enrichis en vitamines soit en supplément avec des médicaments multi vitaminiques car le corps humain ne peut pas les synthétiser ou alors la quantité peut ne pas satisfaire les besoins corporels (Zhang et al., 2015). Les vitamines hydrosolubles sont solubles en milieu aqueux, comme la vitamine C ou acide ascorbique et les vitamines du groupe B soit la vitamine B₁ ou thiamine, la vitamine B₂ ou riboflavine, la vitamine PP ou niacine ou acide nicotinique (ou vitamine B₃), l'acide pantothénique ou vitamine B₅, la vitamine B₁₂ ou cobalamine, la choline ou vitamine B₄, la biotine ou vitamine H ou B₈, la vitamine B₆ ou pyridoxine, les acides foliques ou vitamine B₉ et l'inositol (Guilland et al., 2007). Les vitamines liposolubles sont solubles dans les lipides et solvants des lipides comme les vitamines A ou rétinoles, les vitamines D, les vitamines K et les vitamines E.

Les vitamines sont micronutriments, sans valeur énergétique propre, présentes à l'état de trace dans l'organisme (Guilland et al., 2007). Les différentes vitamines sont données dans le Tableau 1.

1.2. Rôles des vitamines

Les vitamines sont indispensables à la croissance et aux différentes fonctions de l'organisme. Les vitamines sont impliquées dans quatre types de fonctions. Une fonction de type hormonal est observée pour les vitamines A et D. Une fonction de coenzyme et de cofacteur est notée pour la plupart des vitamines. Une fonction de stabilisation des membranes est caractéristique de la vitamine E. Une fonction antioxydante est observée pour les vitamines A, C et E.

Tableau 1. Les différentes vitamines (Guilland et al., 2007)

<i>Molécule</i>	<i>Abréviation</i>	<i>Unité usuelle</i>
VITAMINES HYDROSOLUBLES		
Thiamine	Vitamine B1	mg
Riboflavine	Vitamine B2	mg
Acide pantothénique	Vitamine B5*	mg
Pyridoxine	Vitamine B6	mg
Niacine	Vitamine PP ou B3*	mg
Acide folique	Vitamine B 9	µg
Cobalamine	Vitamine B12	µg
Acide ascorbique	Vitamine C	mg
Biotine	Vitamine H ou B8	µg
VITAMINES LIPOSOLUBLES		
Rétinol	Vitamine A	unité internationale 1 UI = 0,3 µg
Calciférol	Vitamine D	unité internationale 1 UI = 0,025 µg
Tocophérol	Vitamine E	unité internationale 1 UI = 1 mg acétate dl alpha-tocophérol
Phytoménadione Phylloquinone	Vitamine K1	µg

* Attention, dénomination à éviter car aux USA vitamine B3 = acide pantothénique.

Connaissances actuelles

Le Tableau 2 résume les différents rôles des vitamines. On comprend donc facilement que les épuisements des réserves en vitamines conduisent à des carences entraînant à long terme une altération de l'état de santé (Bouayed et Bohn, 2010). Certaines déficiences vitaminiques peuvent augmenter le risque de pathologies comme les maladies cardiovasculaires, la cataracte, les maladies métaboliques, Plusieurs mécanismes peuvent provoquer des carences en vitamines, comme défaut d'apport, malabsorption, défaut de stockage, augmentation de l'élimination et augmentation des besoins (Guilland et al., 2007).

1.3. Vitamine E

La vitamine E couvre un groupe de huit composés liposolubles différents qui consistent en quatre formes de tocophérols et quatre formes de tocotriénols attachés à la famille des vitamères alpha (α), bêta (β), gamma (γ) et delta (δ) qui supportent collectivement l'anti-oxydation dans le corps (Adalier et al., 2016). La structure moléculaire de la vitamine E contient une extrémité hydrophile par son noyau chromanol mono-, di-, ou tri-méthylé et une extrémité hydrophobe (chaîne hydrocarbonée) dont les tocophérols et les tocotriénols ont une chaîne latérale qui diffèrent par l'insaturation de la première et la saturation de la deuxième (Vasson et al., 2007; Bruneton, 2009). La structure de la vitamine E est représentée dans la Figure 1.

De façon général, la vitamine E se trouve surtout dans les noix, graines, huiles végétales (huiles de tournesol, huile de germe de blé, margarine, huile de maïs, huile de noix de coco, huile de noix, huile de palme, huile de noisette, beurre de cacao,), céréales, fruits secs (amandes, noisettes,...) et dans une moindre mesure dans les légumes à feuilles vertes (épinards, choux, brocolis, ou encore l'avocat) (Vasson et al., 2007).

L'apport nutritionnel recommandée en vitamine E est fixé à 12 mg par jour réglé par une alimentation équilibrée contenant des fruits et des légumes (Vasson et al., 2007; Guilland et Lequeu, 2009; Medart, 2009).

Tableau 2. Vitamines, sources et rôle (Guilland et al., 2007)

Vitamines			
Nom	Rôle	quantité quotidienne	aliments riches
Vitamine A liposoluble	Nécessaire à la croissance, à la vue nocturne, essentielle au développement des os, de la peau et des cheveux.	1 à 1,5 mg	Lait, beurre, œufs, foie, légumes verts et jaunes.
Vitamine D liposoluble	Intervient dans la formation des os, le métabolisme du calcium et du phosphore, nécessaire à l'absorption du calcium.	0,05 mg Exposition aux rayons UV indispensable.	Lait, huile de foie de morue, huile de saumon, thon, jaune d'œuf
Vitamine E (Tocophérol) liposoluble	Protège les tissus de l'oxydation.	12 mg (estimation)	Huiles végétales, grains de céréales, germe de blé, laitue.
Vitamine K liposoluble	Combat les hémorragies et les divers troubles hépatiques.	0,03 à 0,1 mg	Chou frisé, navet, épinard, chou de bruxelles.
Vitamine B1 hydrosoluble	Participe à la dégradation des hydrates de carbones, influence la fonction cardiaque et les nerfs.	1 à 2 mg	Céréales complètes, poisson, viande maigre, levure, lait, œufs.
Vitamine B2 (Riboflavine) hydrosoluble	Nécessaire au métabolisme cellulaire et à la transformation des aliments en énergie. influence la production hormonale.	1,5 à 2 mg	Céréales complètes, légumes verts, viande maigre, levure, lait, œufs.

Vitamine B3 (Vitamine PP) hydrosoluble	Possède une action vasodilatatrice et intervient comme réparateur de la molécule d'ADN lorsque celle-ci est endommagée par des rayonnements, des polluants, des toxines, ou des médicaments.	30 à 35 mg	Levure de bière, levure de boulanger, paprika, thon, saumon, sardine, riz complet, pain complet.
Niacine (Acide nicotinique) hydrosoluble	Rôle central dans le métabolisme et les fonctions hépatiques.	15 à 20 mg	Céréales complètes, levure, viande maigre, foie, œufs
Vitamine B5 (Acide Pantothénique) hydrosoluble	Favorise la croissance et la résistance de la peau et des muqueuses. Prévient les troubles de la pilosité et des ongles. Impliquée dans le développement du système nerveux.	10 mg	Levure de bière, foie et abats des animaux, jaune d'oeuf, cacahuètes, champignons crus, saumon, riz complet.
Vitamine B6 (Pyridoxine) hydrosoluble	Présente dans la formation des globules rouges et des anticorps.	2 mg	Céréales complètes, levure, viande, germe de blé, bananes, légumes.
Vitamine B8 hydrosoluble	Intervient dans la composition des constituants majeurs des muscles. Intervient dans la synthèse des acides gras et dans l'action de la testostérone sur la synthèse des proéines dans les testicules.	-	Levure, foie, oeufs, flocons d'avoine, champignons, riz, avocat, haricots, bananes, viande rouge, fraise, tomate, pain complet.
Vitamine B9 (Acide Folique) hydrosoluble	Comparable à la vitamine B8. Détruite par la chaleur et l'oxydation, une partie est synthétisée par les bactéries intestinales. Synthèse des acides nucléiques et des globules rouges.	0,4 mg	Levure, foie, germes de blé, épinards, oeufs, fenouil, fromages à pâte molle, tomate, laitue, brocolis, flocons d'avoine, banane, riz, thon, carotte, viande rouge.
Vitamine B12 (Cyanocobalamine) hydrosoluble	Favorise la croissance et la formation des globules rouges.	5 à 10 µg	Poisson, viande, foie, lait.

Vitamine H (Biotine) hydrosoluble	Nécessaire au métabolisme des hydrates de carbones, des proteines et des graisses.	2 mg	Jaune d'œuf, légumes verts, lait, foie, rognons.
Vitamine C (Acide ascorbique) hydrosoluble	Participe à la synthèse du tissu conjonctif, des hormones et à la cicatrisation.	75 mg	Agrumes, baies, chou, pommes de terre, légumes frais, tomates, acérola, kiwis, cassis.

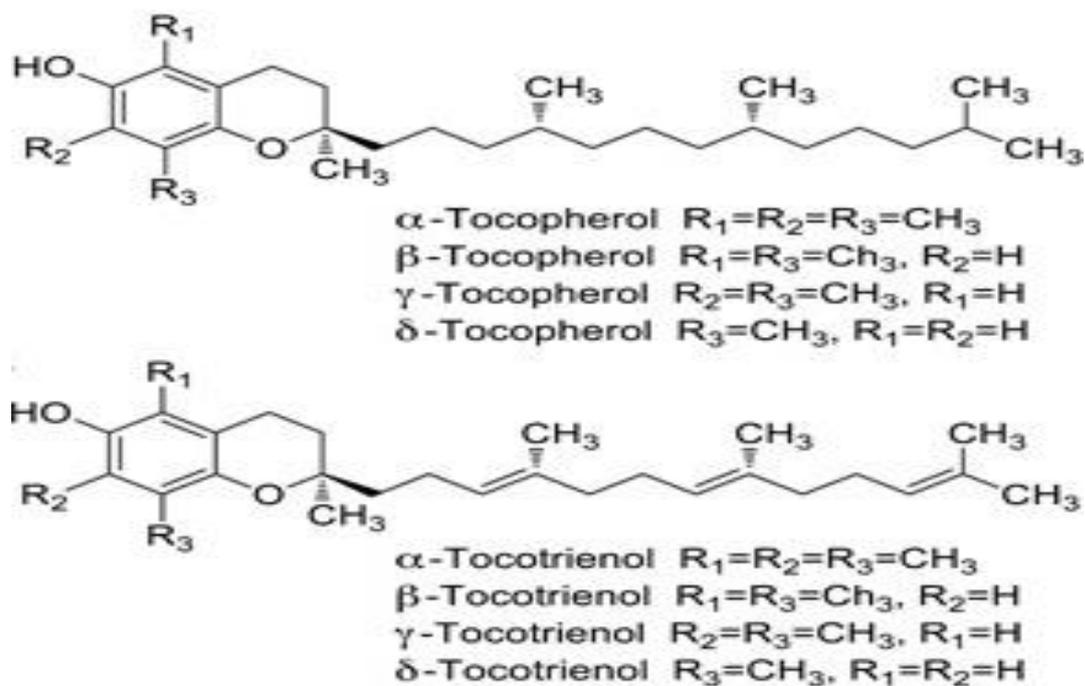


Figure 1. Structure of tocophérols and tocotriénols (Zhidong et al., 2015)

En plus, la vitamine E est un puissant antioxydant qui est apportée par l'alimentation et n'est pas dégradée par le tube digestif humain (Borel et al., 2001). Une partie de la vitamine E est contenue dans les aliments absorbés dont la digestion suit celle des lipides alimentaires, incorporés dans les micelles mixtes et absorbés dans le duodénum par les transporteurs scavenger receptor type B1 (SR-B1) (Reboul et al., 2006) et Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) (Narushima et al., 2008). Ensuite, elle se retrouve sous forme libre dans les chylomicrons (Anwar et al., 2007).

Connaissances actuelles

Alors en cas de faible apport alimentaire de lipides, les chylomicrons ne peuvent pas être sécrétés et une partie de la vitamine E semble être excrétée dans les HDL (high density lipoproteins; lipoprotéines de haute densité) d'origine intestinale par un transporteur de la famille des ATP binding cassettes, ABCA1 (Anwar et al., 2006; Reboul, 2011). La vitamine E restante dans les chylomicrons résiduels est captée par le foie. L'alpha-tocophérol (α -TCP) est incorporé dans les VLDL (very low density lipoproteins; lipoprotéines de très faible densité), ce qui va permettre sa distribution aux tissus périphériques qui met en jeu la protéine de transfert α -TTP (l'alpha-tocopherol transfert protein) qui possède une stéréospécificité forte pour le RRR-tocophérol, ce qui explique la prépondérance de cette vitamine dans le plasma (Figure 2) (Traber, 2007).

La vitamine E se répartit entre les différentes classes de lipoprotéines par des échanges dépendants de la protéine de transfert PLTP (plasma phospholipid transfer protein) (Lemaine-Ewing et al., 2010). La captation de la vitamine E au niveau tissulaire pourrait faire intervenir soit le catabolisme des lipoprotéines (LP) sous l'action de la lipase endothéliale, soit un captage direct après endocytose des LDL ou des HDL. Le transport intracellulaire de la vitamine E fait intervenir des transporteurs spécifiques appelés tocopherol associated protein (TAP) (Zingg et al., 2008).

Toutes les formes de vitamine E sont dégradées au niveau hépatique par un mécanisme commun d' ω -hydroxylation catalysée par des enzymes à cytochrome P450 suivie d'une β -oxydation (Brigelius-Flohe et al., 2010). Les produits de dégradation vont être conjugués en acide glucuronique ou sulfatés puis éliminés par voie biliaire ou urinaire. Il existe une forme phosphorylée de l'alpha-tocophérol présente en petites quantités dans divers échantillons biologiques (plasma, tissus...) qui proviendrait d'une phosphorylation de l'alpha-tocophérol et qui possède de nombreuses activités biologiques (Zingg et al., 2010). La quantité majeure de la vitamine E est stockée dans le tissu adipeux, le muscle, le foie et certaines glandes endocrines (Traber et al., 1987).

La vitamine E joue un rôle essentiel dans la protection de la membrane de toutes les cellules de l'organisme. Par son action antioxydante, elle neutralise les radicaux libres dans l'organisme, c'est-à-dire, elle empêche ou réduit l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) associé à l'apparition de l'athérosclérose et les maladies

Connaissances actuelles

cardiovasculaires (Desmarchelier et al., 2014). Elle a des propriétés anti-inflammatoires, antiplaquettaires et vasodilatatrices.

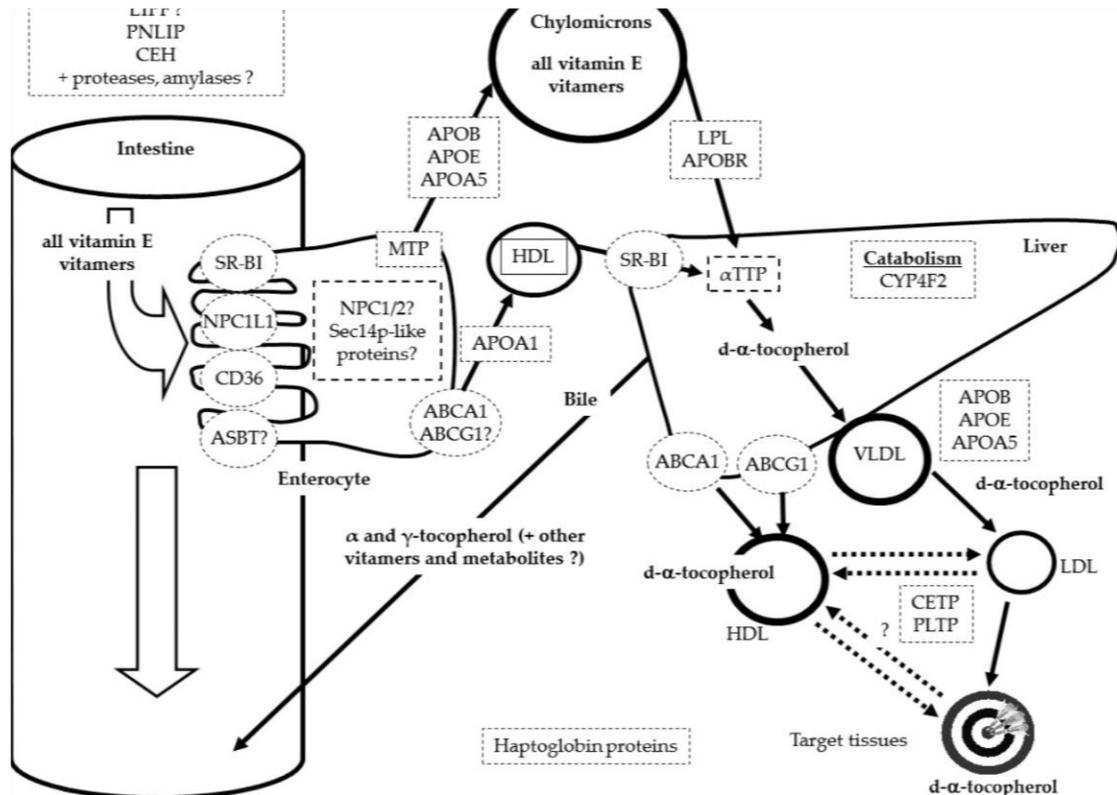


Figure 2. Voies d'absorption et de sécrétion de la vitamine E (Borel et al., 2016).

De plus, elle prédit le risque du cancer (Weinstein et al., 2007). Aussi, la forme alpha-tocophérol est une voie de défense et de réduction des dommages causés par les substances toxiques qui provoquent une destruction des enzymes et la fragmentation de l'ADN (acide désoxyribo nucléique) des cellules fibroblastiques (Fusi et al., 2010). La vitamine E est considérée comme une voie de protection contre la peroxydation lipidique (Sodhi et al., 2013). La teneur en vitamine E est réduite chez les nouveau-nés allaités par des femmes ayant une grossesse compliquée, ce qui augmente le stress oxydatif chez les nouveau-nés (Samano et al., 2017). Elle permet de réduire les marqueurs de l'inflammation TNF α (facteur de nécrose tumorale alpha), prostaglandine (PGE) et permet d'augmenter la résistance à l'exercice particulièrement chez les hommes âgés (Capo et al., 2016). En plus, sa diminution chez les personnes âgées est associée à des troubles des métabolismes notamment

Connaissances actuelles

l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie qui peuvent être corrigées par une supplémentation en vitamine E (Stuetz et al., 2016). Elle est aussi utilisée dans les formulations cosmétiques, car elle se retrouve naturellement dans la peau humaine où elle empêche la peroxydation lipidique au niveau des membranes cellulaires à fortes teneurs en acides gras polyinsaturés (AGPI). On la trouve concentrée dans les couches les plus profondes de l'épiderme, et constitue la défense primaire de la peau contre le stress oxydatif induit par l'exposition aux ultraviolets et les polluants (Montenegro et al., 2015).

Une supplémentation en vitamine E à long terme chez des femmes présentant un risque élevé de maladie cardiovasculaire a montré qu'il y a une protection du risque cardio-vasculaire mais aucun effet important sur le risque de développer un diabète de type 2 (Song et al., 2009). Aussi, elle permet de retarder la neuro-dégénérescence au cours de la maladie de Niemann-Pick C (NPC) qui est un trouble neuro-dégénératif fatal caractérisé par l'accumulation du cholestérol libre dans les lysosomes suite à un stress oxydatif causé par une diminution potentielle de la biodisponibilité de la vitamine E; cette dernière est utile pour le traitement des patients NPC (Marin et al., 2014).

Une étude portant sur une population américaine a montré que les performances de la mémoire sont liées à la vitamine E. Précisément, les performances faibles de la mémoire sont toujours associées à des niveaux plasmatiques faibles en vitamine E (Perkins et al., 1999). Une autre étude de Lu et al. (2016) montre que la vitamine E alimentaire augmente les performances de croissance et le statut antioxydant, améliore l'immunité innée et protège contre les infections bactériennes.

1.4. Vitamine C

La vitamine C ou acide L-deshydroascorbique ou L-ascorbique est constituée d'un cycle lactonique insaturé, substitué de deux fonctions alcools primaires et d'un groupe cétone. En solution, elle est thermolabile, photosensible et facilement oxydable (Guilland et al., 2007).

Les deux formes physiologiques, L-deshydroascorbique (forme oxydée) et L-ascorbique (forme réduite) forment un couple oxydo-réducteur (Figure 3). Donc, c'est une vitamine qui possède un pouvoir d'acide faible et de potentiel réducteur (Guilland et al., 2007).

Connaissances actuelles

Dans le cas de l'acide déhydroascorbique, soit la forme oxydée de la vitamine C, ce sont les transporteurs GLUT (glucose transporter) qui assurent le passage par diffusion facilitée au sein des membranes plasmiques. C'est un transport qui ne nécessite pas d'apport d'ATP.

-Par diffusion passive, c'est-à-dire que le transport ne consomme pas d'énergie et que la molécule en question traverse librement la membrane plasmique en fonction du gradient de concentration. C'est le cas lorsque les doses ingérées sont importantes soit plus de 1g/jour.

L'absorption de l'acide déhydroascorbique est plus importante au sein de notre organisme. Cependant, c'est l'acide L-ascorbique qui prédomine dans les tissus ainsi que dans le sang. Cela s'explique car les cellules vont réduire rapidement la forme oxydée pour obtenir de l'acide L-ascorbique. C'est le cas notamment des globules rouges qui possèdent un transporteur GLUT 1 capable de capter la forme oxydée pour la réduire ensuite. Ce système de recyclage est propre aux espèces incapables de synthétiser l'acide L-ascorbique et permet d'expliquer pourquoi nos besoins en vitamine C sont moindres comparés aux espèces qui peuvent la produire.

Une fois que la Vitamine C a diffusé au sein de l'ensemble tissulaire, elle ne peut être stockée. C'est pourquoi il est nécessaire d'en consommer régulièrement car au bout de 2 à 3 semaines les réserves chutent (Ball, 2004 ; Iqbal et al., 2004).

Son élimination se fait en majeure partie par voie urinaire, sous sa forme originelle et sous forme de métabolites secondaires (en majorité l'acide oxalique 55%).

Dès que la dose ingérée atteint les 100 mg/jour, elle est excrétée via les urines. A l'état physiologique, le pourcentage d'excrétion urinaire augmente en fonction de la dose ingérée. La vitamine C est aussi éliminée par voie fécale et sudoripare. L'absorption digestive et l'excrétion urinaire, qui sont doses dépendantes, vont être responsables de la limitation du taux plasmatique de la vitamine C dans l'organisme (Traxer et al., 2003 ; Ball, 2004).

La vitamine c agit comme un donneur d'électron (agent réducteur) pour huit enzymes différentes qui fonctionnent comme des monooxygénases ou des dioxygénases (Padayatti et al., 2003 ; Ball, 2004). Dont, trois participent à l'hydroxylation et l'élaboration du collagène, protéine constitutive des fibres des tissus conjonctifs tout en participant à la formation mais surtout à la réparation des structures riche en ces tissus : os, cartilages, ligaments et vaisseaux sanguins.

Connaissances actuelles

Alors que, les deux autres enzymes hydroxylases à fer ferreux dont L'un des cofacteurs essentiels est l'acide ascorbique, nécessaire pour la synthèse de la carnitine à partir de lysine et méthionine. La carnitine est essentielle pour le transport des acides gras dans les mitochondries où ils sont oxydés pour générer de l'ATP, et les trois enzymes restantes ont les fonctions suivantes : participation à la biosynthèse de la norépinephrine à partir de la dopamine, l'ajout des groupes amides aux hormones peptidiques en augmentant ainsi leurs stabilités et modulation du métabolisme de tyrosine. Même, elle participe à la régénération d'autres antioxydants comme la vitamine E donc contribution dans la prévention des dommages lipidiques et le glutathion (puissant antioxydant endogène) et les maintenir à leurs états actifs. En plus, les vitamines C et E travaillent en synergie pour réduire les processus de la peroxydation lipidique (Iqbal et al., 2004 ; Ball, 2004). En plus, elle réduit les réactions allergiques en diminuant le taux de l'histamine dans le sang, intervient dans la conversion du cholestérol en acides biliaires tout en permettant à l'organisme de se débarrasser du cholestérol en excès. Puis, Elle contribue au renforcement du système immunitaire tout en stimulant les défenses de l'organisme vis-à-vis des infections microbiennes et elle possède un effet antiviral, favorise la synthèse de l'interféron. Ensuite, elle intervient dans la synthèse des catécholamines, la transformation d'adrénaline en noradrénaline et elle les protège contre l'oxydation en adrénochrome neurotoxique dans le tissu nerveux puis la favorisation de la synthèse de cortisone et elle est nécessaire pour le métabolisme microsomal des médicaments et la participation à la détoxification de divers polluants : métaux lourds, pesticides, xénobiotiques (Guilland et al., 2007). Aussi, la vitamine c est un antioxydant majeur qui inhibe l'oxydation des LDL en réduisant l'athérosclérose. De plus, sa carence est associée à un risque accru de mortalité de maladie cardiovasculaire. Elle améliore la fonction endothéliale et les profils lipidiques particulièrement chez les personnes ayant un taux faible en vitamine C (Moser et al., 2016). L'association du sélénium et vitamines A, C, E est efficace dans le traitement de tout type d'arthrite (Canter et al., 2007).

La vitamine C est contenue en concentration élevée au niveau des neutrophiles (cellules qui défendent le corps contre les agents pathogènes envahissants) pour améliorer la fonction immunitaire (Bozonet et al., 2015). Elle réduit les dégâts des radicaux libres sur la peau tout en ralentissant le vieillissement et en réduisant la

Connaissances actuelles

formation de mélanine (Yang et al., 2013). La vitamine C peut prévenir les infections causées par des bactéries, des protozoaires surtout le rhume qui est réduit chez les personnes physiquement actives mais pas dans la population générale. Aussi, elle est bénéfique chez les personnes atteintes de pneumonie et de tétanos (Hemila, 2017).

En plus, la vitamine C protège les cellules hôtes contre les actions des substances réactives oxygénées (ROS) libérées par des phagocytes qui ont un système de transport spécifique par lequel la forme oxydée de la vitamine C est importée dans la cellule où elle est convertie en une forme réduite de vitamine C (Hemila.,2017). Aussi, elle a des concentrations élevée dans le cerveau où elle assure de nombreuses fonctions, y compris le balayage des ROS, la neuromodulation et l'implication dans l'angiogénèse (Hansen et al., 2014). En plus, c'est une vitamine hydrosoluble essentielle chez l'homme et qui est bénéfique pour sa capacité antioxydante et sa stimulation du système immunitaire (Zhang et al., 2015).

Sur les lignées cellulaires de chondrosarcome (tumeur du cartilage maligne) mise en culture in vitro et traitées par la iodoacétate monosodique (IMS) et chez les rats avec une arthrose induite par la même molécule, ce traitement a inhibé la croissance cellulaire et a provoqué l'augmentation du stress oxydatif, de l'apoptose et de la perte de protéoglycane avec augmentation des niveaux d'expression des cytokines pro inflammatoires, Interleukine 6 (IL-6), Interleukine 17 (IL-17), facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et les métallo protéinases matricielles (MMP1, MMP3 et MMP13). Toutes ces altérations vont être évité par la supplémentation en vitamine C (Chiu et al., 2017).

2. Stress oxydatif et vitamines

2.1. Stress oxydatif

Actuellement, le stress oxydatif est considéré comme un facteur de risque et un paramètre aboutissant à des complications à l'origine de l'apparition de nombreuses pathologies. Le stress oxydatif est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux libres oxygénés et ceci malgré la présence d'un système de défense antioxydante (Favier, 2006).

Connaissances actuelles

En réalité, le métabolisme de l'oxygène dans les cellules peut entraîner le stress oxydant et des anomalies métaboliques importantes, conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la capacité de défense des antioxydants (Koechlin - Ramonatxo, 2006). Les radicaux libres ou espèces radicalaires de l'oxygène les plus souvent connus sont l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, le monoxyde d'azote (Figure 4).

La réactivité chimique et l'agressivité du radical est augmentée suite à la présence de l'électron célibataire. Vu l'instabilité du radical, une réaction en chaîne se produit à la suite d'échanges de l'électron célibataire, et entraîne l'apparition de nouvelles espèces radicalaires.

L'origine exogène des radicaux libres est liée à l'environnement (fumées, rayonnements ionisants) ou au mode de vie (tabac, alcool, erreurs alimentaires, sport intense..). Mais, il ne faut pas oublier que les radicaux libres sont produits également par divers mécanismes physiologiques (respiration mitochondriale, lutte anti infectieuse, activités enzymatiques) et sont indispensables à l'organisme. Cependant, une production excessive de ces espèces radicalaires et/ou une diminution des systèmes de défense anti-radicalaires peuvent avoir des effets néfastes du stress oxydant (Favier, 2006).

La réactivité des radicaux libres entraîne la formation d'autres radicaux par réaction avec les molécules biologiques (lipides, protéines, glucides, acides nucléiques). Les produits engendrés peuvent modifier la structure des composants de la cellule et altérer son fonctionnement. La peroxydation des lipides entraîne une réduction de la fluidité et de la perméabilité des membranes cellulaires, une augmentation de l'oxydation des LDL impliquées dans la genèse de l'athérome (Chen et al., 2012). L'oxydation des protéines s'accompagne d'une perte de groupements thiols (SH) et d'une modification des acides aminés avec formation de groupements carbonyles, conduisant à la dégradation des protéines. L'oxydation du glucose conduit à la formation de produits intermédiaires réactifs qui s'accumulent au niveau des protéines entraînant une perte d'élasticité tissulaire au niveau des vaisseaux sanguins (Favier, 2006). Au niveau de l'ADN, les radicaux libres seraient responsables de modifications des bases, et sont impliquées dans la mutagenèse, la carcinogenèse, le vieillissement et la mortalité cellulaire (Valco et al., 2007). Le stress oxydatif touche l'ensemble des tissus et des métabolismes (Pincemail, 2004).

Connaissances actuelles

Les modifications génomiques, métaboliques et fonctionnelles induites par un stress oxydant ont été impliquées dans le développement de maladies comme le cancer, l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires... (Pincemail, 2004; Koechlin-Ramonatxo, 2006). L'organisme dispose de plusieurs systèmes cellulaires ou extracellulaires de protection incluant les systèmes de défense enzymatique (superoxyde dismutase SOD, glutathion peroxydase, catalase, thioredoxine reductase, glutathion réductases et transférases) et de petites molécules (vitamines A, C, E, caroténoïdes, glutathion, albumine, ubiquinone..). Ces systèmes permettent d'éviter l'accumulation des radicaux libres (Figure 5).

La superoxyde dismutase (SOD) constitue la première ligne de protection contre les dérivés radicalaires de l'oxygène. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . La catalase est une enzyme qui permet de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau (Souchard et al., 2002). Le glutathion est un tripeptide (Glutamyl-cystéinyl-glycine) qui sous la forme réduite (GSH) agit comme antioxydant. Les fonctions du GSH incluent le maintien des thiols des protéines, ainsi que le maintien de certains composés sous leur forme réduite comme les vitamines C ou E.

Certains marqueurs du stress oxydatif peuvent facilement être dosés dans le sang par des méthodes biochimiques et permettent ainsi d'apprécier la présence d'un stress oxydatif chez une personne. Le principal marqueur biologique de l'oxydation des protéines est la formation de carbonyles protéinés. Les principaux marqueurs de la peroxydation lipidique sont le malondialdéhyde (MDA), les diènes conjugués, les hydroperoxydes lipidiques et les isoprostanes.

2.2. Rôles antioxydants des vitamines

Les vitamines C et E sont considérées comme de puissants antioxydants, permettant la lutte contre le stress oxydatif. La vitamine C est un excellent piègeur des radicaux libres qui peut protéger divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) de l'oxydation. Aux concentrations physiologiques, la vitamine C est capable d'empêcher l'oxydation des LDL produite par divers systèmes générateurs de radicaux libres.

Connaissances actuelles

La vitamine C agit principalement comme un « donneur d'électrons ». Cette qualité est utile au fonctionnement d'enzymes diversement impliquées dans l'hydroxylation du collagène (hydroxylation de la proline et de la lysine, responsable d'une fragilité capillaire en cas de carence), la synthèse de la carnitine, des catécholamines, des hormones peptidiques et le métabolisme de la tyrosine (Renaud, 2003).

La vitamine C est aussi un puissant agent réducteur qui agit comme un antioxydant. Par cet effet réducteur, elle a le pouvoir de réduire des composés oxydants présents dans le suc gastrique (Renaud, 2003).

Par les réactions d'oxydation, la vitamine C participe au métabolisme du cholestérol avec augmentation du HDL-cholestérol, diminution du cholestérol total, du LDL-cholestérol et des triglycérides (Chepda et al., 1999). La vitamine C facilite l'absorption du fer, intervient dans la synthèse de plusieurs hormones et neurotransmetteurs, et participe aux mécanismes de défense immunitaire (Bachmeyer et al., 2006). La vitamine E est aussi un puissant antioxydant et elle module l'activité de facteurs de transcription tels que NF-kB, des éléments importants de la signalisation cellulaire (Cynober, 2008). Les tocophérols protègent les acides gras polyinsaturés contre les agressions oxydatives des membranes biologiques (Sebei et al., 2007). Cependant, la vitamine E a d'autres activités biologiques liées aux propriétés anti-oxydantes. En fait, les différentes formes de vitamine E sont impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire, la modulation de la signalisation cellulaire, les enzymes liées à la membrane, l'expression des gènes, la prolifération cellulaire, et plusieurs voies moléculaires (Brigelius-Floh et al., 2009; Boccardi et al., 2016). La vitamine E régule l'expression des gènes spécifiques non seulement liés au stress oxydatif, mais aussi impliqués dans l'homéostasie du cholestérol, les voies inflammatoires, et le trafic cellulaire, y compris le transport vésiculaire synaptique et la libération des neurotransmetteurs. Les gènes régulés par un tocophérol comprennent ceux codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, l'adhésion cellulaire, la croissance cellulaire, la formation de la matrice extracellulaire et / ou la dégradation, les récepteurs de lipoprotéines, de l'inflammation (IL-1b, IL-2, IL- 4 et TGF-b), le contrôle de la transcription, le métabolisme, et d'autres fonctions biologiques (leptine et b-sécrétase dans les neurones) (Ahsan et al., 2014). Toutes ces régulations métaboliques permettent à la vitamine E de lutter contre les radicaux libres et le stress oxydatif.

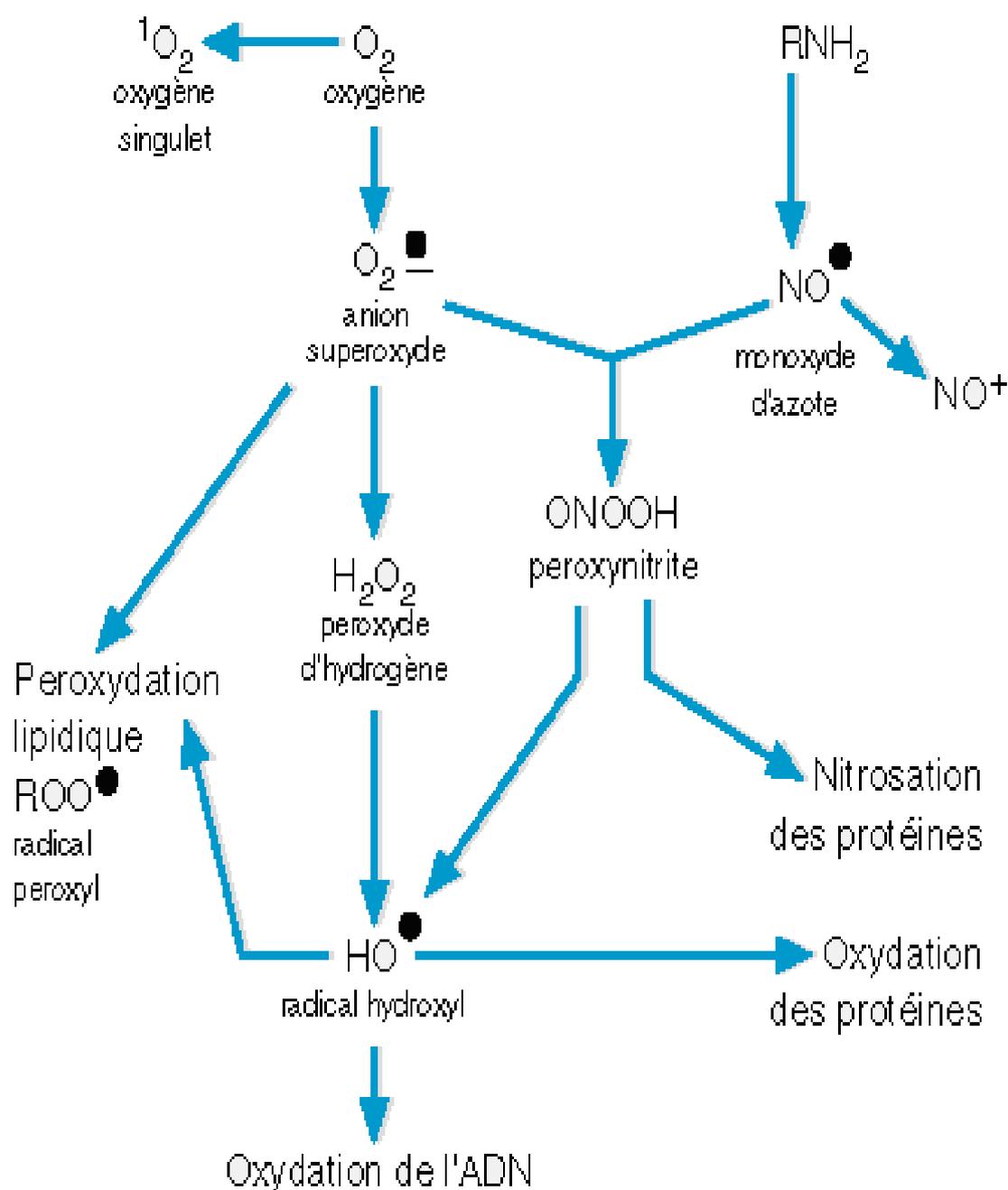


Figure 4. Nature et relations entre les principaux radicaux libres et espèces réactives de l'azote et de l'oxygène intervenant dans le phénomène de stress oxydant (Noori, 2012).

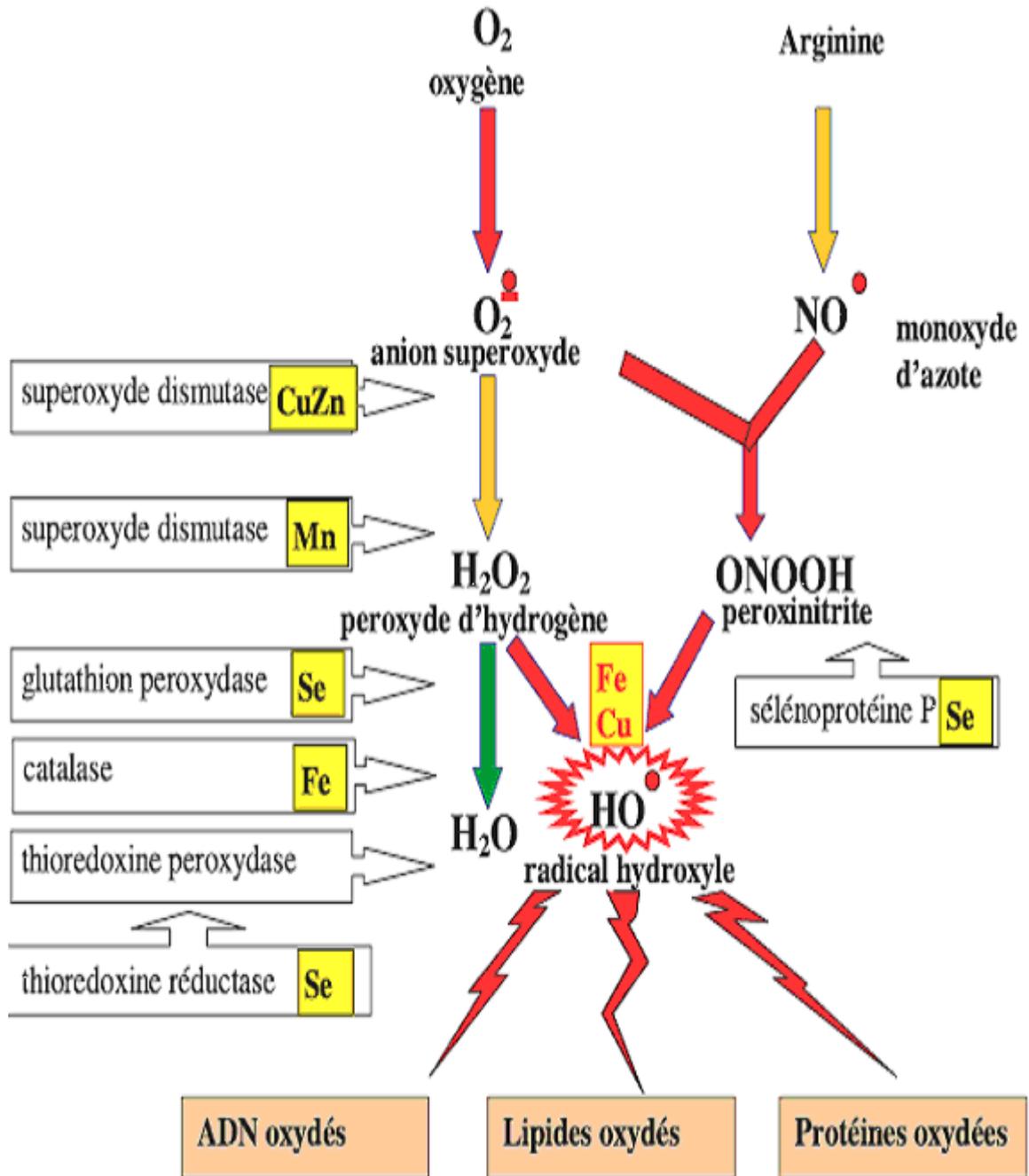


Figure 5. Cascade radicalaire et les niveaux d'action de certains antioxydants (enzymes) (Favier, 2006).

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1. Choix du modèle d'étude *in vitro*

Pour étudier les effets des deux vitamines (Vitamine C et E) *in vitro*, nous avons travaillé sur un modèle de cellules humaines d'origine lymphocytaire.

Les donneurs de sang sont des étudiantes du département de Biologie, Faculté SNVTU de l'université de Tlemcen (n = 5), âgés entre 24 – 26 ans, en bonne santé et ne présentant aucune pathologie chronique. De plus, aucune des étudiantes volontaires ne prennent des suppléments en vitamines.

Les prélèvements sanguins se font le matin à jeun, au niveau de la veine du pli du coude.

Le sang prélevé est recueilli à raison de 4 ml dans des tubes héparinés, préalablement étiquetés et numérotés. Les échantillons collectés servent directement à l'isolement des cellules.

2. Isolement des lymphocytes humains

L'isolement des lymphocytes se fait à partir du prélèvement sanguin, par centrifugation dans un gradient d'Histopaque (Sigma). L'Histopaque, dont la densité est de 1,075, permet l'agrégation des hématies. La migration différentielle durant la centrifugation permet de séparer différentes couches contenant les divers types de cellules sanguines. Dans ce cas, les érythrocytes ou globules rouges et les granulocytes sédimentent complètement au fond du tube et se localisent dans le culot. Les lymphocytes possédant une densité inférieure à celle d'histopaque (Tableau 3) se localisent dans une zone à l'interface entre l'histopaque et le plasma après centrifugation. Ils sont cependant contaminés par d'autres cellules comme les Monocytes et les plaquettes (Figure 6). Les lymphocytes sont récupérés à partir du noyau visible à l'interphase puis sont lavés avec une solution saline équilibrée pour éliminer tous les contaminants (Histopaque, plasma, plaquettes,...).

Après mélange et centrifugation, le surnageant est éliminé. Le lavage est recommencé deux fois, et les lymphocytes isolés sont prêts à l'emploi.

Matériels et méthodes

Les lymphocytes lavés sont par la suite remis en suspension dans 400µl de milieu de culture RPMI 1640.

Afin de tester la viabilité des lymphocytes isolés, 50µl de la suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et sont mélangés à 50µl d'une solution de bleu de trypan 0,4 % et 50µl de milieu RPMI 1640. Les cellules sont comptées dans une chambre quadrillée de la Cellule de Malassez qui est utilisée pour les comptages cellulaires. Par la suite, la suspension cellulaire est diluée pour avoir une concentration de 4.10^6 cellules/ml.

3. Culture des lymphocytes

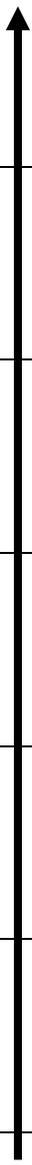
La culture des lymphocytes permet d'étudier la prolifération in vitro des lymphocytes T stimulés par des agents mitogènes spécifiques. La Concanavaleine A (Con A, Sigma, St. Louis, MO, USA), mitogène spécifique des cellules T est utilisée à une concentration finale de 5 µg/ml. Les cultures sont réalisées sur des plaques ELISA de 96 puits à fond plat (Nunc- Elisa).

Les lymphocytes sont mis en culture (4×10^5 cellules/puits) dans le milieu RPMI 1640 au quel sont ajoutés la pénicilline (100 UI/ml) et la streptomycine (100 (µg/ml) (pour éviter la prolifération des bactéries et des champignons) en présence ou en absence de la Con A.

Les essais sont réalisés en triples. Afin de déterminer les effets des vitamines C et E sur la prolifération in vitro des lymphocytes, les cellules sont mises en culture en présence des deux vitamines à différentes concentrations finales [0 µM, 25 µM -50 µM]. Les plaques sont ensuite mises à incuber 24 heures à 37°C, dans un incubateur à 5% de CO₂.

A la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées dans une nouvelle plaque Elisa 96 puits. Les puits sont lavés avec le milieu RPMI 1640 afin de récupérer l'ensemble des cellules. La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par comptage des cellules (cellule de Malassez), puis elle est confirmée par la méthode du MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide].

Tableau 3. Taille et densité des cellules sanguines

	Taille (µM)	Densité	Vitesse de sédimentation
Globules rouges	7 (6.5-7.5)	1.098 (1.098-1.105)	+ 
Éosinophiles	12 (12-15)	1.091 (1.087-1.096)	
Neutrophiles	12 (12-15)	1.088 (1.082-1.097)	
Basophiles	9.5 (9-10)	1.078 (1.074-1.082)	
Monocytes	15 (15-20)	1.071 (1.065-1.075)	
Lymphocytes	9 (8-10)	1.063 (1.057-1.067)	
Plaquettes	2-3	1.040	-

Matériels et méthodes

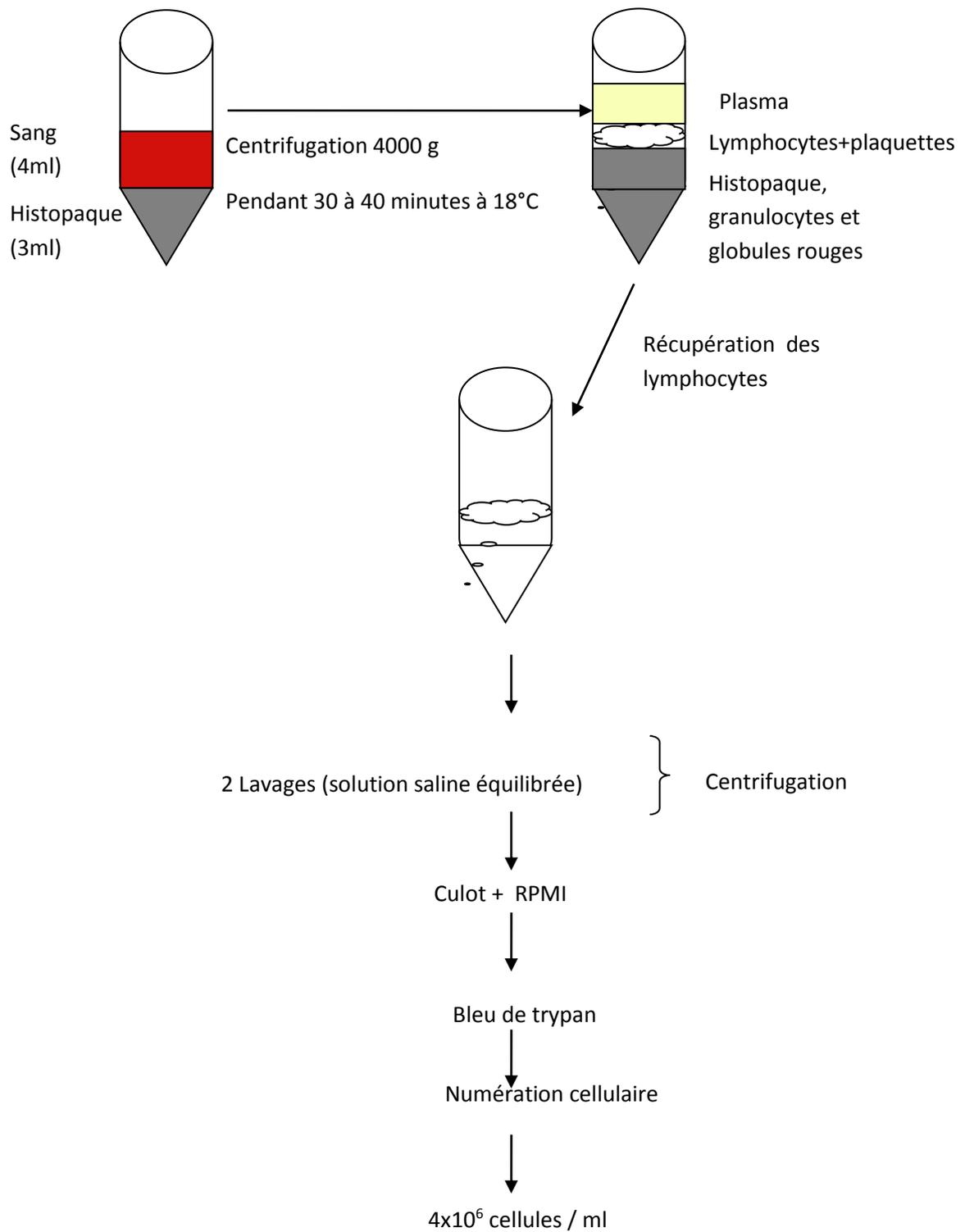


Figure 6. Méthode d'isolement et purification des lymphocytes.

Matériels et méthodes

Une prise aliquote des suspensions cellulaires sert au comptage et à la méthode MTT. Les cellules restantes sont lysés par NaOH 1M. Après centrifugation, le lysat lymphocytaire est récupéré pour le dosage des marqueurs intracellulaires du stress oxydatif.

4. Comptage des lymphocytes

Le comptage des lymphocytes se fait à l'aide de la cellule de Malassez. Le principe est basé sur le décompte au microscope optique des cellules après coloration au bleu de Trypan, contenues dans un volume de suspension cellulaire déterminé et à dilution connue. Le dénombrement des cellules viables s'effectue sous microscope optique. Les cellules mortes sont perméables au bleu trypan et se présentent comme des cellules foncées colorées en bleu. Le dénombrement des cellules viables s'effectue donc sur les cellules qui excluent le bleu trypan et apparaissent incolores transparentes visiblement.

5. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT

La méthode du MTT est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des enzymes mitochondriales (succinate déshydrogénase) dans les cellules vivantes de transformer les sels de tétrazolium (couleur jaune) en produits insolubles de formazan (couleur bleue violacée).

La concentration du produit Formazan obtenu est directement proportionnelle au nombre de cellules présentes dans la solution cellulaire. Cette technique permet de mesurer la viabilité et la prolifération des lymphocytes. La solution de MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] (Sigma, USA) est préparée à une concentration de 5 mg/ml dans le tampon phosphate (PBS, PH 7,5), elle est filtrée et conservée à 4° C à l'abri de la lumière.

100µL de suspension cellulaire des différents puits sont incubés en présence de 10µL de MTT (5 mg/ml) à 37° C, 5% CO₂ pendant 3 heures.

Matériels et méthodes

L'addition de 100 μ L de HCL 0,04M dans l'isopropanol permet la dissolution des cristaux bleus formazan.

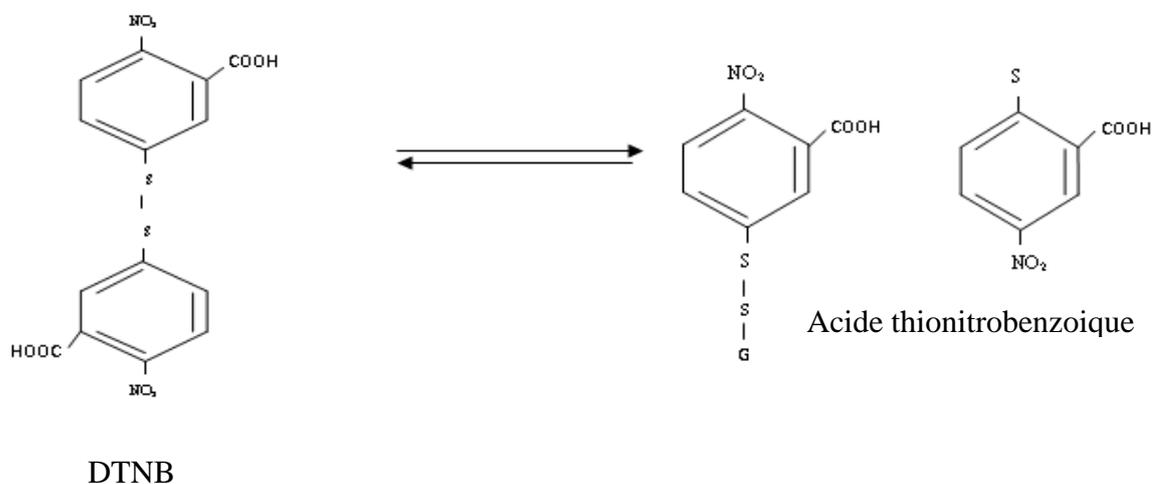
La lecture des densités optiques se fait au spectrophotomètre à 630 nm. L'indice de prolifération (IP) est calculé :

IP= (densité optique des cellules stimulées/ densité optique des cellules non stimulées) \times 100 (Medjdoub et al., 2011).

6. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau des lymphocytes

6.1. Détermination du taux de Glutathion des lymphocytes

Le dosage du glutathion réduit (GSH) lymphocytaire est réalisé par la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB). La réaction est basée sur la coupure de la molécule d'acide 5,5dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction suivante :



Le thionitrobenzoïque (TNB) à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 nm avec un coefficient d'extinction égal à 13,6 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Matériels et méthodes

6.2. Détermination de l'activité de la Catalase des lymphocytes (CAT, EC 1.11.1.6)

Cette activité enzymatique est mesurée dans le lysat lymphocytaire par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (Aebi, 1974). En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H₂O₂ en fonction du temps.

Après incubation de 5 min, les concentrations du H₂O₂ restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de H₂O₂. La lecture se fait à 420 nm. L'activité de la catalase est exprimée en Unité (U).

6.3. Dosage de la vitamine C intra-lymphocytaire

La vitamine C est déterminée dans le lysat lymphocytaire par la méthode décrite par Jagota et Dani (1982). Après précipitation des protéines par le TCA à 10% et centrifugation, le surnageant obtenu est mélangé avec le réactif de Folin à 10%. Après incubation pendant 15 minutes à température ambiante, les densités optiques sont obtenues par lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 769 nm. Les concentrations en vitamine C sont déterminées à partir de la courbe d'étalonnage réalisée par l'acide ascorbique.

6.4. Dosage du malondialdéhyde (MDA) des lymphocytes

Le malondialdéhyde (MDA) est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique. Ce dosage est réalisé selon la méthode de Draper et Hadley (1990), par un traitement acide à chaud, grâce à l'utilisation de l'acide thiobarbiturique (TBA). Le lysat lymphocytaire est incubé 20 minutes à 100°C avec le TBA et l'acide trichloroacétique (TCA). Après incubation, refroidissement et centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min, la lecture est réalisée sur le surnageant qui contient le MDA. Le TBA réagit avec les aldéhydes pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA dont l'absorption se fait à 532 nm. La concentration en MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ($E=1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 532 nm).

Matériels et méthodes

6.5. Détermination des protéines carbonylées des lymphocytes

Les protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine selon la méthode de Levine et al., (1990).

Le lysat lymphocytaire est incubé 1h à température ambiante en présence de la dinitrophénylhydrazine ou avec seulement du HCL pour le blanc. Ensuite, les protéines sont précipitées avec l'acide trichloroacétique (TCA) et lavées 3 fois par l'éthanol: ethylacetate 1:1 (v/v) et 3 fois par le TCA. Le culot est solubilisé dans une solution de NaOH. Les lectures se font à 350 et 375nm ; la moyenne des densités optiques est calculée. La concentration des groupements carbonylés est calculée selon un coefficient d'extinction ($E = 21,5 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

7. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 4.1, Statsoft, Paris, France). La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

Résultats et interprétations

Résultats et interprétations

1. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E

Nos résultats concernant l'indice de prolifération des lymphocytes sont représentés dans la Figure 7 et le Tableau A1 en annexes.

La concanavaline A, agent mitogène, stimule significativement la prolifération des lymphocytes.

La vitamine C augmente significativement la prolifération des lymphocytes par rapport à l'état basal. L'effet est dose dépendant, puisque la concentration de la vitamine C à 50 μM stimule la prolifération plus que la concentration 25 μM .

La vitamine E augmente aussi de façon significative la prolifération des lymphocytes par rapport à l'état basal. L'effet dépend aussi de la dose, et on constate que la concentration de la vitamine E à 50 μM stimule plus fortement la prolifération comparée à la concentration 25 μM .

La vitamine E semble avoir un effet plus accentué que celui de la vitamine C. En effet, le pouvoir stimulant de la vitamine E sur la prolifération est plus important que celui de la vitamine C, quelque soit la concentration utilisée.

2. Teneurs en vitamine C des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E

Les résultats des teneurs en vitamine C des lymphocytes sont représentés dans la Figure 8 et le Tableau A2 en annexes.

La concanavaline A ne semble pas avoir un effet sur les teneurs intracellulaires en vitamine C.

L'addition de la vitamine C dans le milieu de culture provoque une augmentation significative de la teneur intracellulaire en vitamine C des lymphocytes par rapport à l'état basal. Les teneurs les plus élevées en vitamine C sont obtenues avec la concentration de 50 μM .

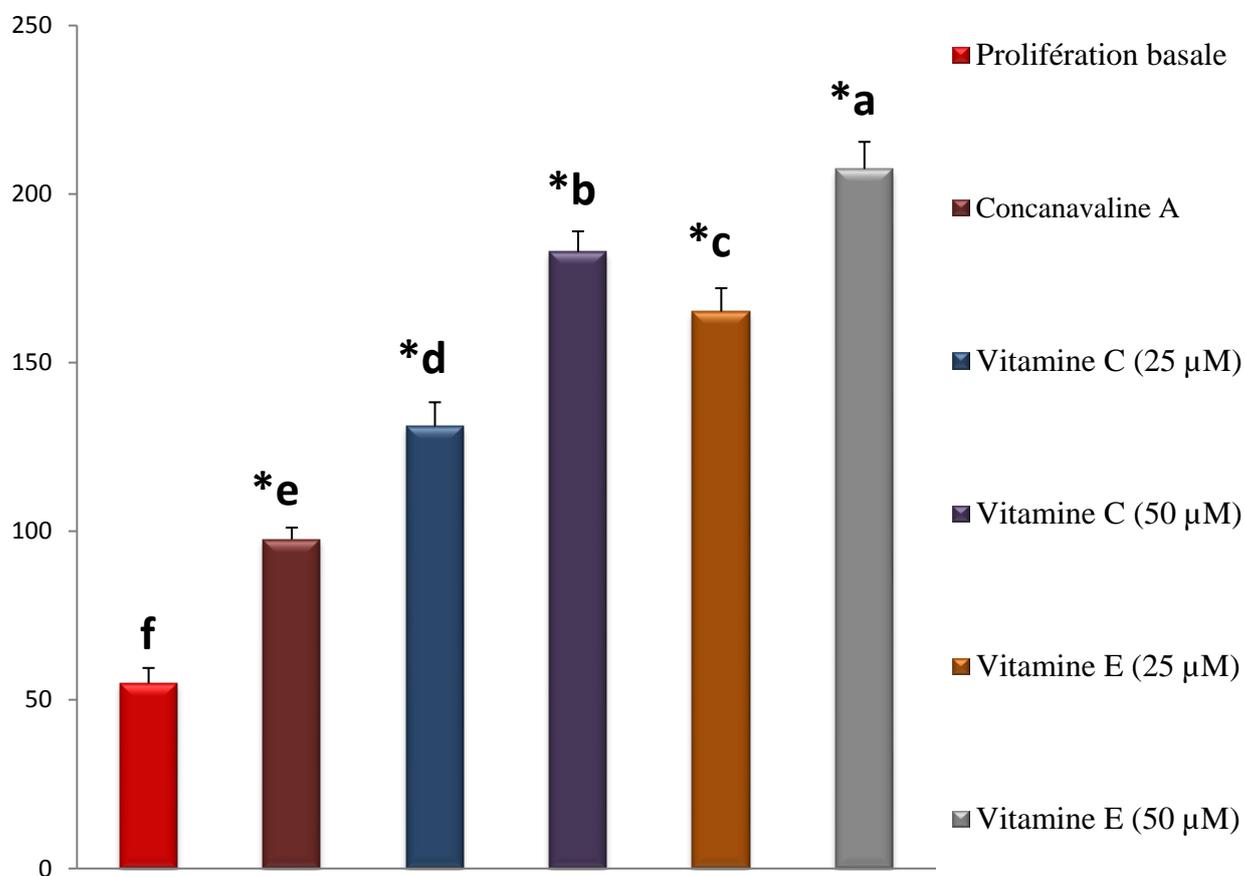


Figure 7. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type. La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student: * $P < 0,01$.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

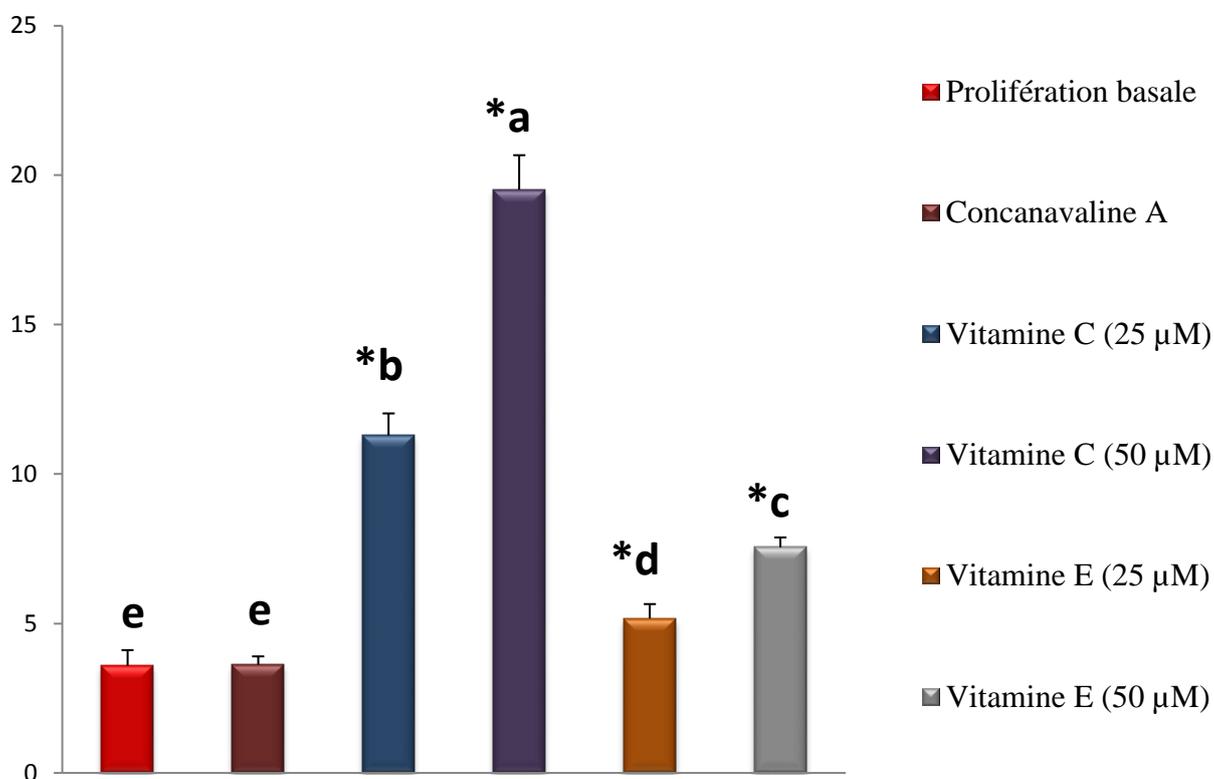


Figure 8. Teneurs en vitamine C des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type. La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student: * $P < 0,01$.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

Résultats et interprétations

L'addition de la vitamine E dans le milieu de culture des lymphocytes augmente aussi les teneurs en vitamine C intracellulaires, mais beaucoup moins que la supplémentation en vitamine C.

3. Statut antioxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E

Les résultats sur les teneurs en glutathion réduit (GSH) et activité de l'enzyme catalase des lymphocytes sont représentés dans les figures 9 et 10, et le Tableau A3 en annexes.

La concanavaline A n'a aucun effet sur les teneurs en GSH des lymphocytes (Figure 9).

La vitamine C dans le milieu de culture induit une augmentation significative des teneurs lymphocytaires en GSH par rapport à l'état basal. De plus, la concentration de 50 μM augmente plus le GSH intracellulaire par rapport à la concentration de 25 μM .

La vitamine E dans le milieu de culture induit aussi une augmentation significative des teneurs lymphocytaires en GSH par rapport à l'état basal. L'effet est aussi dose dépendant.

On constate aussi que la vitamine C et la vitamine E ont le même effet sur les teneurs lymphocytaires en GSH.

L'effet de la Concanavaline A, la vitamine C et la vitamine E est le même sur l'activité de la catalase des lymphocytes parce qu'elle augmente significativement et de la même façon cette activité par rapport à la prolifération basale (Figure 10).

Résultats et interprétations

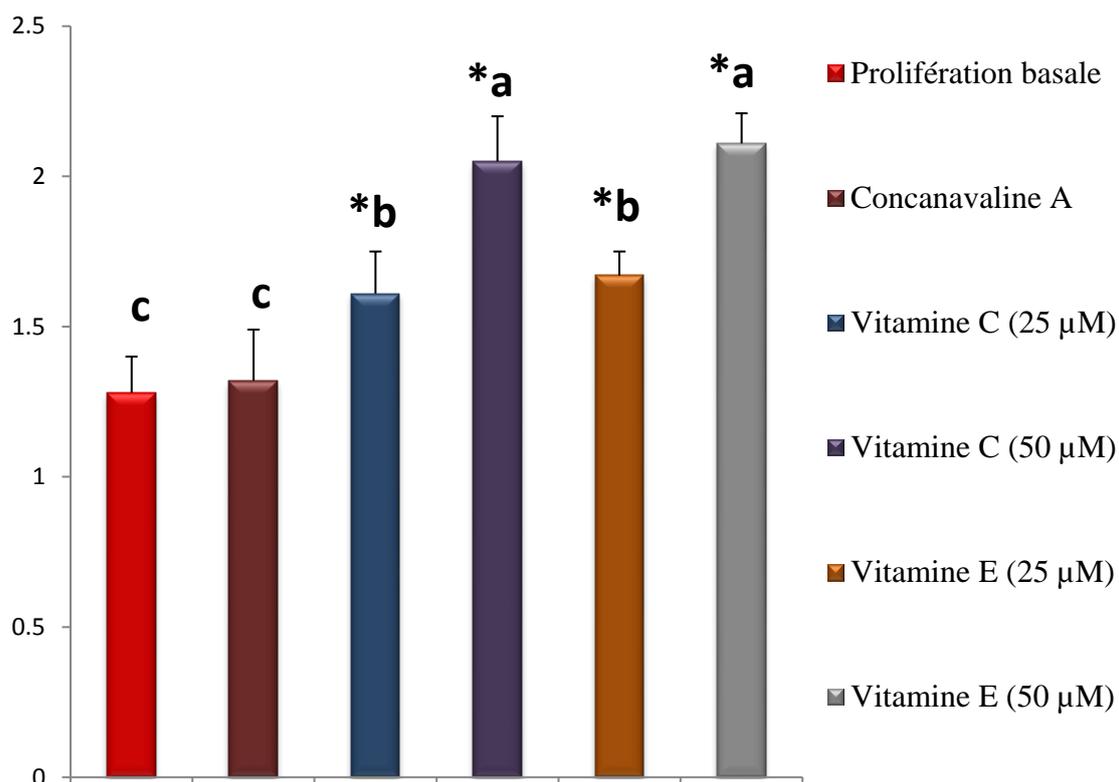


Figure 9. Teneurs en Glutathion réduit (GSH) des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type. GSH : glutathion réduit. La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student: * $P < 0,01$.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

Résultats et interprétations

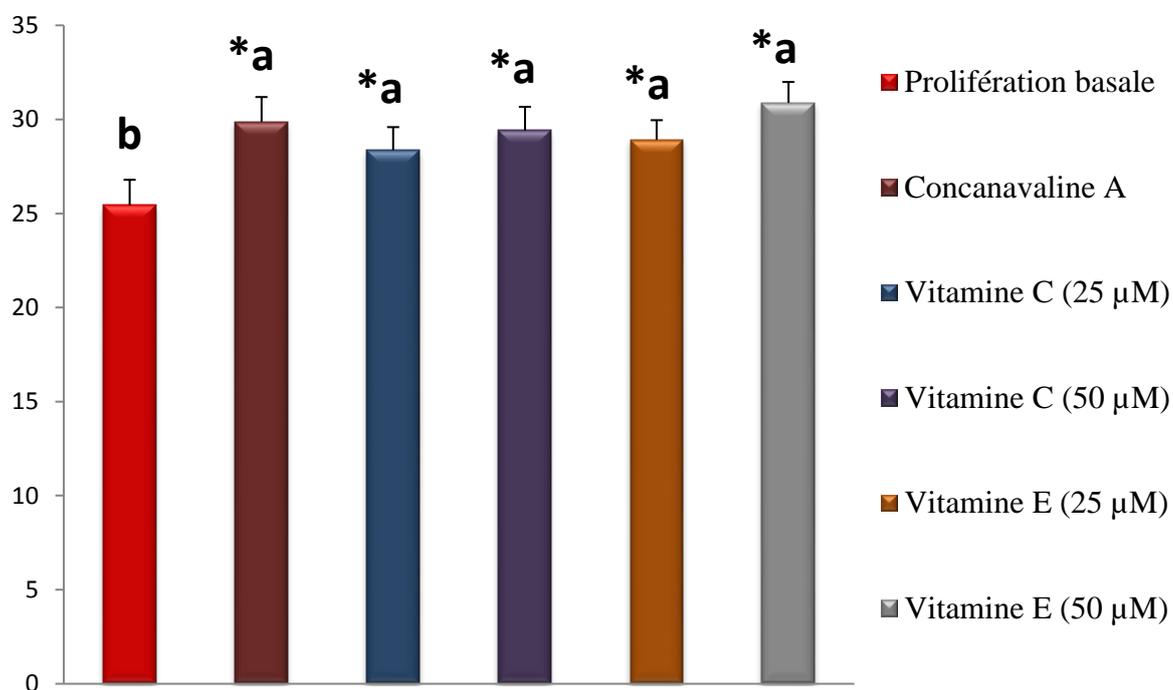


Figure 10. Activité de l'enzyme catalase des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type. La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student: * $P < 0,01$.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

Résultats et interprétations

4. Statut oxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E

Les résultats sur les teneurs en malondialdéhyde (MDA) et en protéines carbonylées (PCAR) des lymphocytes sont représentés dans les Figures 11 et 12, et le Tableau A4 en annexes.

La concanavaline A stimule significativement la production du malondialdéhyde (MDA) par les lymphocytes en culture par rapport à l'état basal. La supplémentation en vitamine C ou en vitamine E provoque aussi une augmentation significative des taux en MDA intracellulaire comparés aux taux à l'état basal, et ceci quelque soit la concentration des vitamines utilisée (Figure 11). Néanmoins, comparé à l'effet de la concanavaline A, l'addition des vitamines C et E au milieu de culture induit une réduction des teneurs intracellulaires en MDA.

Concernant les taux en protéines carbonylées lymphocytaires (PCAR), le même effet est observé, à savoir une augmentation par la concanavaline A et par la vitamine C à 25 et 50 μM et par la vitamine E seulement à 25 μM (Figure 12). En effet, la vitamine E à 50 μM régule les taux lymphocytaires en PCAR et les ramène à des taux semblables à ceux de l'état basal.

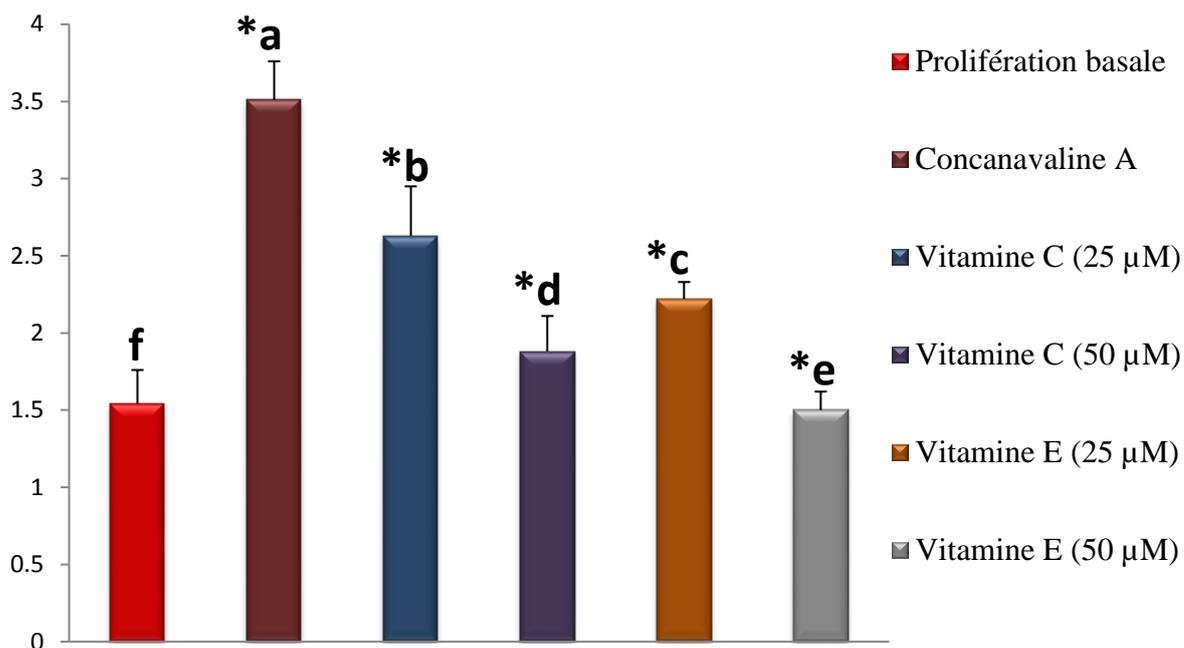


Figure 11. Teneurs en Malondialdéhyde (MDA) des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type. MDA : Malondialdéhyde.

La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student: * $P < 0,01$.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

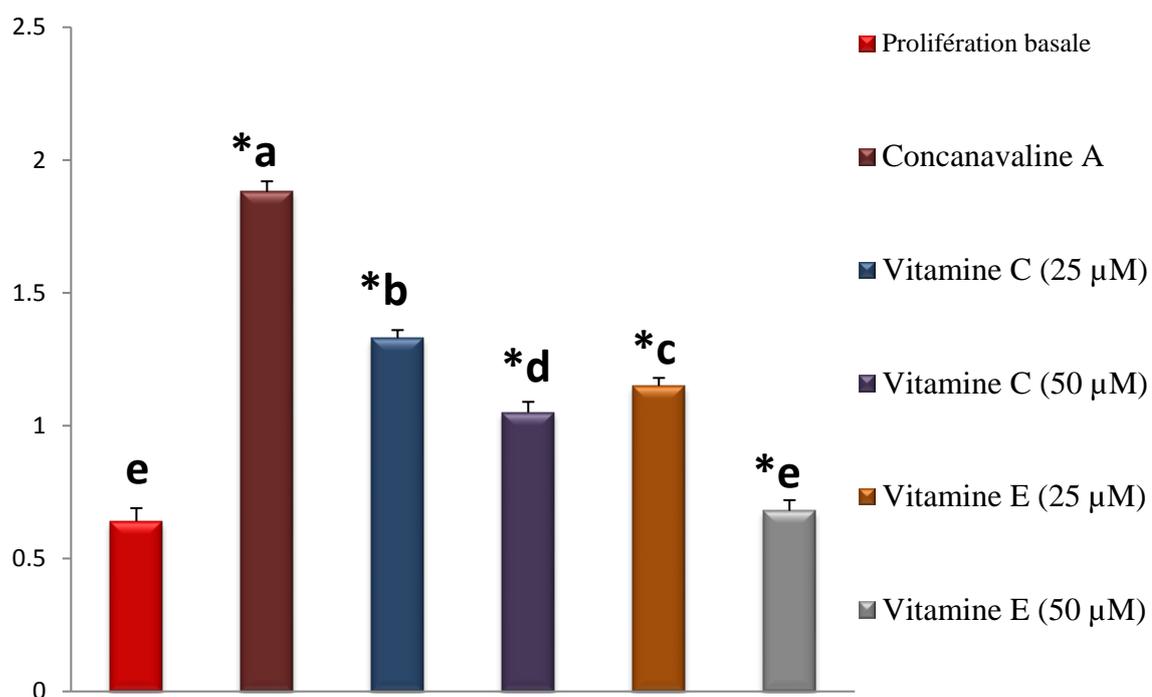


Figure 12. Teneurs en Protéines carbonylées (PCAR) des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type. PCAR : Protéines carbonylées.

La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student: * $P < 0,01$.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

Discussion

Discussion

Plusieurs nutriments sont reconnus pour leur capacité à moduler les fonctions immunitaires, en particulier en présence du stress oxydatif. De nombreuses études ont montré l'effet bénéfique d'une supplémentation en vitamines, surtout la vitamine C et E chez les personnes présentant une pathologie et un état de stress oxydatif important (Favier, 2006; Noori, 2012; Moser et Chun, 2016).

La relation existant entre les fonctions physiologiques, le système immunitaire et les nutriments est connue depuis de nombreuses années. En effet, l'ensemble des fonctions essentielles des tissus et des organes, ainsi que celles du système immunitaire requièrent de l'énergie, des acides aminés, des lipides, des vitamines et des oligoéléments. Ainsi, toute altération du statut nutritionnel chez une personne aura des conséquences importantes sur les fonctions immunitaires et le fonctionnement de l'organisme en général.

Le stress oxydant représente l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des radicaux libres, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants. Les modifications fonctionnelles induites par un stress oxydant sont impliquées dans le développement de différentes pathologies (Favier, 2006). Les suppléments en antioxydants, de manière nutritionnelle (alimentation) ou à doses plus fortes, de type pharmacologique, peuvent lutter contre le stress oxydatif, et protéger les cellules contre les dégâts oxydatifs, ce qui favorisera le fonctionnement normal et optimal de l'organisme.

Bien que les suppléments en vitamines C et E sont largement utilisés, leurs effets directs sur les cellules restent mal élucidés.

Dans ce travail de Master, nous avons orienté notre recherche sur la détermination des effets *in vitro* des vitamines C et E sur la prolifération lymphocytaire et le statut redox intracellulaire des lymphocytes chez des personnes volontaires. Ces nutriments sont utilisés à deux concentrations finales de 25 et 50 μ M pour les vitamines C et E.

L'isolement des lymphocytes se fait à partir d'un prélèvement sanguin réalisé chez des volontaires, utilisant un gradient d'Histopaque pour la récolte des cellules qui sont par la suite mise en culture dans le milieu RPMI contenant tous les nutriments nécessaires pour permettre la survie cellulaire. L'utilisation de la Concanavaleine A (Con A), agent mitogène spécifique des lymphocytes T, permet d'activer seulement la prolifération des cellules T.

Discussion

Le suivi *in vitro* de la prolifération cellulaire est largement utilisé et est considéré comme l'une des techniques indispensables afin de déterminer la réponse immunitaire suite à l'exposition des cellules à différentes concentrations des micronutriments comme les vitamines.

Nos résultats ont prouvé que la supplémentation *in vitro* en vitamines a des effets modulateurs importants sur la fonction des cellules T chez les personnes volontaires. La présence de la vitamine C stimule significativement la prolifération lymphocytaire chez les volontaires, et l'effet est dose dépendant. Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents montrant le rôle de la vitamine C dans l'amélioration de la capacité prolifératrice des lymphocytes T (Chang et al., 2009; Molina et al., 2014).

Plusieurs travaux précédents ont suggéré que la supplémentation avec la vitamine C améliore l'immunité (Ströhle et Hahn, 2009). La supplémentation en vitamine C augmente la production de cytokines par les cellules mononucléaires de sang périphérique, ce qui active la prolifération cellulaire (Pavlovic, 2010).

De plus, la vitamine E augmente significativement la prolifération lymphocytaire chez les volontaires de manière dose dépendante. Nos résultats sont en accord avec d'autres travaux qui confirment son effet puissant dans la stimulation de la prolifération cellulaire, la réduction de l'apoptose, l'amélioration de la fluidité membranaire et la protection des cellules (Lee et Wan, 2000).

Parmi les antioxydants, la vitamine E est le plus intensivement étudiée en ce qui concerne des effets immunostimulants. L'effet de la vitamine E sur l'immunité était intensivement étudié chez les sujets âgés qui ont été supplémentés avec la vitamine E. Cette étude montre que l'hypersensibilité est diminuée et la production des lymphocytes est augmentée chez les personnes supplémentées en vitamine E (Han et Meydani, 2006).

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'action de la vitamine E. Le fonctionnement le plus connu est que la vitamine E protège les lipides membranaires contre les radicaux libres. Cependant, ce dernier n'est pas le seul mécanisme d'action de cette vitamine sur l'immunité, étant donné que la vitamine E influence les différentes voies de signalisation cellulaire. La vitamine E aussi s'insère au niveau de la bicouche lipidique en stabilisant les structures membranaires cellulaires (Flohe et Traber, 1999).

Discussion

Dans notre étude, l'agent mitogène Con A stimule la prolifération *in vitro* des lymphocytes et provoque une altération du système redox de la cellule. En effet, la Con A induit une augmentation des teneurs intracellulaires en MDA et en protéines carbonylées par rapport à la prolifération basale. Il faut rappeler que le MDA est le marqueur de la peroxydation des lipides et que les protéines carbonylées sont les marqueurs de l'oxydation des protéines. Ainsi, la Con A semble générer un stress oxydatif dans la cellule. Cependant, la Con A provoque une augmentation de l'activité catalase intracellulaire, en faveur d'une augmentation de la défense antioxydante des lymphocytes. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes montrant une modification du statut redox lors de l'activation des lymphocytes par des mitogènes (Yan et Banerjee, 2010).

Les vitamines C et E sont connues pour leur pouvoir antioxydant. Nos résultats ont prouvé que le traitement des lymphocytes par la vitamine C ou E a modulé le statut oxydant / antioxydant des lymphocytes en culture. Les vitamines C et E induisent une augmentation significative d'activité de la catalase avec une diminution concomitante des teneurs en MDA et en protéines carbonylées au niveau des lymphocytes traités. De plus, la vitamine C et la vitamine E augmentent les teneurs cellulaires en GSH. Ces résultats suggèrent que le statut oxydant/ antioxydant des lymphocytes est amélioré par les vitamines C et E. Nos résultats sont en accord avec les rapports précédents qui ont montré le pouvoir antioxydant de la vitamine C et E (Traber et Stevens, 2011). Nos résultats ont également confirmé des résultats précédents prouvant que les vitamines C et E peuvent moduler l'immunité et réduire le stress oxydant dans les lymphocytes (Zingg, 2007 ; Ströhle et Hahn, 2009; Traber et Stevens, 2011).

Nos résultats confirment aussi que les vitamines C et E renforcent la capacité antioxydante des cellules par leur puissant effet contre la génération des radicaux libres et par la stimulation de la protection antioxydante. En effet, la défense antioxydante est améliorée par les vitamines C et E qui induisent une augmentation significative des teneurs intracellulaires en vitamine C et en GSH et de l'activité catalase. Nos résultats sont en accord avec des travaux qui précèdent (Mezouar et al., 2016; Meraou et al., 2016) et confirment les effets bénéfiques des vitamines C et E par leurs effets antioxydants qui protègent les cellules contre les dommages infligés par les radicaux libres.

Discussion

L'étude de Lu et al. (2016) montre que la vitamine E alimentaire augmente les performances de croissance et le statut antioxydant. De plus, une autre étude montre que la vitamine E protège les acides gras polyinsaturés contre les agressions oxydatives au niveau des membranes biologiques (Traber et Stevens, 2011).

De plus, à côté de leurs effets bénéfiques, certaines vitamines ont un double caractère vis-à-vis de leur effet antioxydant telle que la vitamine C qui est un antioxydant diététique puissant à caractère double où elle présente un effet pro-oxydant qui génère des radicaux libres réactifs et qui induisent des effets cytotoxiques à des concentrations élevées pharmacologiques. Les doses utilisées lors des suppléments doivent être donc bien étudiées afin d'éviter les effets pro-oxydants des vitamines.

Dans notre étude, les deux doses utilisées (25 et 50 μM) des vitamines C et E semblent être bénéfiques puisqu'on n'a pas observé d'effet oxydant. Seul l'effet antioxydant (réduction de MDA et de protéines carbonylées) est noté suite à la supplémentation en ces deux vitamines.

Conclusion

Conclusion

De nombreux nutriments tels que les vitamines sont reconnus pour leur capacité à moduler les fonctions immunitaires, en particulier en situation pathologique, inflammatoire, et en présence du stress oxydatif. Les carences en micronutriments et en antioxydants sont à l'origine de l'installation de plusieurs maladies, et deviennent très fréquentes de nos jours. Ceci représente un problème de santé publique qui doit être pris en charge.

Nos résultats dans le cadre du Master en physiopathologie cellulaire mettent en évidence les effets des vitamines C et E sur la prolifération des lymphocytes T, ainsi que sur le statut oxydant / antioxydant lymphocytaire. Nos résultats permettent de prouver que les vitamines C et E, à la concentration de 25 et 50 μM , possèdent des effets immuno-stimulateurs puisqu'ils induisent la prolifération des lymphocytes in vitro. De plus, ces deux vitamines réduisent le stress oxydatif intracellulaire en abaissant les oxydants (MDA, Protéines carbonylées) et en augmentant les antioxydants (vitamine C, GSH, catalase). Leur effet au niveau de la cellule est donc très effectif et significatif.

Ces vitamines peuvent donc constituer une nouvelle approche préventive ou thérapeutique, qui mettrait davantage l'accent sur l'aspect nutritionnel et moléculaire. La mise en évidence de carences ou de déséquilibres du statut antioxydant, ou de perturbations du statut oxydant expose toute personne à un risque plus ou moins élevé de développer des maladies chroniques et d'accélérer les phénomènes de son vieillissement.

La prise en charge du stress oxydatif se justifie pleinement par la supplémentation en vitamines; la preuve de l'efficacité des antioxydants dans la prévention des maladies cardiovasculaires, métaboliques, et des cancers n'est plus à discuter. Cependant, la prise non contrôlée d'antioxydants, en vente libre, n'est pas toujours bénéfique, parfois inefficace et dangereuse.

Néanmoins, une prise contrôlée et modérée de vitamines va permettre d'enrichir la cellule en antioxydants afin de lutter contre le stress oxydatif et peut ainsi constituer de nouvelles pistes thérapeutiques mettant en jeu les antioxydants.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Aebi H (1974). Catalase. In: H.U. Bergmeyer (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim. 673-684.
2. Adalier L, Parker H (2016). Vitamin E, turmeric and saffron in treatment of alzheimer's disease. *Antioxydants*. 40: 1-14.
3. Ahsan H, Ahad A, Iqbal J, Siddiqui WA (2014). Pharmacological potential of tocotrienols: a review. *Nutr Metab (Lond)*. 11:52.
4. Agarwal A, Durairajanayagam D, Plessis S (2014). Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12:112-120.
5. Anwar K, Kayden HJ, Hussain MM (2006). Transport of vitamin E by differentiated caco-2-cells. *The journal of lipid research*. 47: 1261-1273.
6. Anwar K, Iqbal J, Hussain MM (2007). Mechanisms involved in vitamin E transport by primary enterocytes and in vivo absorption. *The journal of lipid research*. 48:2028-2038.
7. Bachmeyer C, Rohaut B, Cazier A, Turc Y (2006). Scorbut. *Presse Med*. 35:35-78.
8. Ball GF (2004). *Vitamins: their role in the human body*. Black well publishing, Oxford. 449p.
9. Bentley AR, Kritchevsky SB, Harris TB, Holvoet P, Jensen RL, Newman AB, Lee JS, Yende S, Bauer D, Cassano PA (2012). Dietary antioxidants and FEV1 decline: the health, aging and body composition study. *Eur Respir J*. 39(4): 979–984.
10. Birben E, Sahiner MD, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO journal*. 5: 9-19.
11. Block G, Jensen CD, Morrow JD, Holland N, Norkus EP, Milne GL, Hudes M, Dalvi TB (2008). The Effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. *Free Radical Biology & Medicine*. 45: 377-384.
12. Boccardi V, Baroni M, Mangialasche F, Mecocci P (2016). Vitamin E family: Role in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 1-10.

Références bibliographiques

13. Borel P, Desmarchelier C (2016). Genetic variations involved in vitamin E status. *International journal of molecular sciences*. 17:1-11.
14. Borel P, Pasquier B, Armand M, Tyssandier V, Grolier P, Alexandre-Gouaban MC, Peyrot J, Jaussan V, Lairon D, Azais-Braesscol (2001). Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. *American journal of physiology*. 280:95-103.
15. Bouayed J, Bohn T (2010). Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 3: 228-237.
16. Bozonet MS, Carr CA, Pullar MJ, Vissers MCM (2015). Enhanced Human neutrophil vitamin C status, chemotaxis and oxidant generation following dietary supplementation with vitamin C-rich Sungold Kiwifruit. *Nutrients*. 7: 2574-2588.
17. Brigelius-Floh R (2009). Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radic Biol Med*. 46: 543–54.
18. Brigelius-Flohe R, Galli F (2010). Vitamin E: a vitamin still the detection of its biological function. *Molecular nutrition food research*. 54:583-587.
19. Burton GJ, Jauniaux E (2011). Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 25(3): 287-299.
20. Canter PH, Wider B, Ernst E (2007). The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. *Rheumatology*. 46:1223–1233.
21. Capó X, Martorell M, Sureda A, Riera J, Drobic F, Tur JA, Pons A (2016). Effects of Almond- and Olive oil-based docosahexaenoic- and vitamin E-enriched beverage dietary supplementation on inflammation associated to exercise and age. *Nutrients*. 619:1-18.
22. Chang, H.H., Chen, C.S. and Lin, J.Y. (2009). High dose vitamin C supplementation increases the Th1/Th2 cytokine secretion ratio, but decreases eosinophilic infiltration in broncho-alveolar lavage fluid of ovalbumin-sensitized and challenged mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 10471-10476.

Références bibliographiques

23. Chiu PR, Hu CY, Hunang CT, Hsieh SB, Yeh PJ, Cheng LH, Hunang LW, Chang LK (2017). Vitamin c protects chondrocytes against monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis by multiple pathways. *International journal of molecular sciences*. 38:1-15.
24. Chepda T, Perrier C, Chamson A, Frey J (1999). Effets pro et anti oxydants de l'ascorbate. *Nutr Clin Métabol*. 13: 115-120.
25. Chen AF, Chen DD, Daiber A, Faraci FM, Li H, Rembold CM, Laher I. (2012). Free radical biology of the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)* 123: 73-91.
26. Cynoberl (2008). Complément alimentaire, aliment, médicament : qui est qui ? *Cah Nutr Diét*. 43: 15-21.
27. Desmarchelier C, Tourniaire F, Nowicki M, Bott R, Borel P (2014). La variabilité génétique qui module la biodisponibilité de la vitamine E peut-elle expliquer l'hétérogénéité des effets biologiques observés suite à la supplémentation en vitamine E? *Elsevier*. 28: P52.
28. Draper H, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186: 421-431.
29. Favier AE (2006). Oxidative stress in human diseases. *Ann Pharm Fr*. 64(6): 390-396.
30. Flohe BR, Traber MG (1999). Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J*. 13: 1145-1150.
31. Fusi E, Rebucci R, Pecorini C, Campagnoli A, Pinotti L, Saccone F, Cheli F, Purup S, Sejrnsen K, Baldi A (2010). Alpha-Tocopherol counteracts the cytotoxicity induced by ochratoxin A in primary porcine fibroblasts. *Toxins*. 2: 1265-1278.
32. Graffouillère L, Deschasaux M, Mariotti F, Neufcourt L, Shivappa N, Hébert J R, DWirth M, Latino-Martel P (2016). Prospective association between the dietary inflammatory index and mortality: modulation by antioxidant supplementation in the SU.VI.MAX randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 103:878-885.
33. Guillard JC, Herbeth B, Le Moel G (2007). Les vitamines. *Biologie Médicale*. 38 : 17-80.

Références bibliographiques

34. Guillaud JC, Lequeu B (2009). Encyclopédie des vitamines, du nutriment au médicament, Volume 1- Données fondamentales : métabolisme et fonctions, Edition TEC et DOC, Paris.
35. Han SN, Meydani SN (2006). Impact of vitamin E on immune function and its clinical implications. *Expert Rev Clin Immunol.* 2:561-567.
36. Hansen SN, Tveden-Nyborg P, Lykkesfeldt J (2014). Does vitamin C deficiency affect cognitive development and function? *Nutrients.* 6: 3818-3846.
37. Hemila H (2017). Vitamin C and infections. *Nutrients.* 339:1-28.
38. Höhna A, Webera D, Junga T, Otta C, Hugoa M, Kochlika B, Kehma R (2017). Happily (n) ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology.* 11: 482–501.
39. Iqbal K, Khan A, Khattak M (2004). Biological significance of ascorbic acid (vitamin c) in human health. *Pakistan journal of nutrition.* 3:5-13.
40. Jacob RA (1999). Vitamin C. *Modern nutrition in health and disease.* 9th edition. Williams et Wilkins, Baltimore, MD. 467-483.
41. Jagota SK, Dani HM (1982) A new colorimetric technique for estimation of vitamine C using folin phenol reagent. *Analytical Biochemistry.* 127(1):178-182.
42. Koechlin-Ramonatxo C (2006). Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolisme.* Elsevier Masson. P 165 - 177.
43. Kumar SB (2016). Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* ID 5698931, 9 pages.
44. Lee CYJ, Wan F (2000). Vitamin E Supplementation Improves Cell-Mediated Immunity and Oxidative Stress of Asian Men and Women. *J Nutr.* 130: 2932-2937.

Références bibliographiques

45. Lemaine-Ewing S, Desrumaux C, Neel D, Lagrost L (2010). Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: is α -tocopherol in lipid rafts and oar in the lifeboat? *Molecular Nutrition Food Research*. 54: 631-640.
46. Levine RL, Garlan D, Olivier CN, Amici A, Lenz AG, Stadtman ER (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 186: 464-478.
47. Lu Y, Liang XP, Jin M, Sun P, Ma HN, Yuan Y, Zhou QC (2016). Effects of dietary vitamin E on the growth performance, antioxidant status and innate immune response in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*. 464: 609–617.
48. Marin T, Contreras P, Castro FJ, Chamorro D, Balboa E, Bosch-Morato M, Munoz JF, Alvarez RA, Zanlungo S (2014). Vitamin E dietary supplementation improves neurological symptoms and decreases C.Abl/p73 activation in Niemann-Pick c Mice. *Nutrients*. 6: 3000-3017.
49. Medart J (2009). Manuel pratique de nutrition, L'alimentation préventive et curative, 2^{ème} édition, Editions de Boeck, Paris.
50. Medjdoub A, Merzouk SA, Merzouk H, Chiali FZ, Narce M (2011) Effects of Mancozeb and Metribuzin on *in vitro* proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 101(1): 27-33.
51. Meraou A, Merzouk H, Saidi A, Medjdoub A, Merzouk SA, Belbraouet S (2016). Vitamins C, E, and NADH on *in vitro* lymphocyte proliferation and Redox Status among obese patients. *Food and Nutrition Sciences*. 7: 1082-1098.
52. Mezouar DJ, Merzouk H, Saidi A, Merzouk SA, Belarbi B, Narce M (2016). In vitro effects of vitamins C and E, n-3 and n-6 PUFA and n-9 MUFA on placental cell function and redox status in type 1 diabetic pregnant women. *Placenta*. 46 : 114-121.
53. Molina N, Morandi, A.C., Bolin, A.P. and Otton, R. (2014) Comparative Effect of Fucoxanthin and Vitamin C on Oxidative and Functional Parameters of Human Lymphocytes. *International Immunopharmacology*. 22: 41-50.

Références bibliographiques

54. Montegro L, Rapisada L, Ministeri C, Puglisi G (2015). Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic emulsions containing vitamin E. *Cosmetics*. 2: 35-47.
55. Moser AM, Chun OK (2016). Vitamin C and heart health: a review based on findings from epidemiologic studies. *International journal of molecular sciences*. 17: 1-9.
56. Narushima K, Takada T, Yamanashi Y, Suzuki H (2008). Niemann-pick c 1-like 1 mediates alpha-tocopherol transport. *Molecular pharmacology*.74: 42-49.
57. Noori S (2012). An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Scientific Reports*. 413: 1-9.
58. Padayatti SJ, Kate A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *American college of nutrition*. 22: 18-35.
59. Pavlovic V (2010). A short overview of vitamin C and selected cells of the immune system. *Cent Eur J Med*. 8:1-10.
60. Perkins AJ, Hendrie HC, Callahan CM, Gao S, Unverzagt FW, Xu Y (1999). Association of antioxidants with memory in a multiethnic elderly sample using the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 150: 37-44.
61. Pincemail J (2004). Comment évaluer votre état de stress oxydant ? *Journal Santé*. P 2-4.
62. Reboul , Klein A, Bietrix F, Gleize B, Malezet-Desmoulins C, Schneider M, Margotat A, Lagrost L, Lagrost L, Collet X, Borel P (2006). Scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *The journal of biological chemistry*. 281:4739-4745.
63. Reboul E (2011). Absorption intestinale des vitamines liposolubles. *Nutrition-santé*. 18: 53-58.
64. Renaud A (2003). Fer, vitamine C et acide folique : convergence sanguine. *Journal de pédiatrie et de puériculture*. 16 : 281–283.

Références bibliographiques

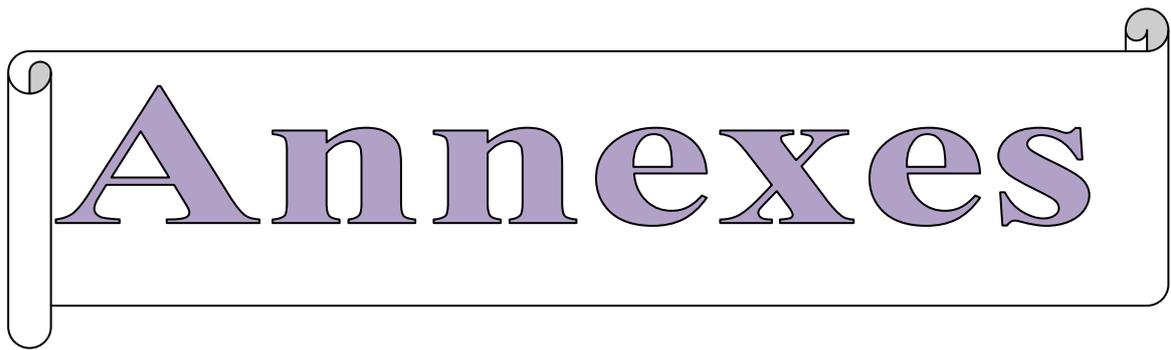
65. Sebei K, Boukhchina S, Kallel H (2007). Évolution des tocophérols en relation avec les acides gras insaturés au cours de la maturation des graines de colza de printemps (*Brassica napus* L.). *CR Biologies*. 330: 55–61.
66. Serafini M (2000). Dietary Vitamin E and T Cell-Mediated Function in the Elderly: Effectiveness and Mechanism of Action. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 18: 401-410.
67. Shirley R, Ord E, Work LM (2014). Oxidative stress and the use of antioxidants in stroke. *Antioxidants*. 3: 472–501.
68. Song Y, Cook RN, Albert MC, Van Denburgh M, Manson J (2009). Effects of vitamins C and E and β -carotene on the risk of type 2 diabetes in women high risks of cardiovascular disease: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 90:429-437.
69. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Leonart ME (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*. 12: 376–390.
70. Souchard J P, Arnal J F, Rochette L (2002). Les radicaux libres et le stress oxydatif radicalaire. *Techniques en biologie*. 23: 245 – 257.
71. Stuetz W, Weber D, Dollé MET, Jansen E, Loebenstein BG, Fiegl S, Toussain O, Bernhardt J, Gonos ES, Franceschi C, Sikora E, Villanueva MM, Breusing N, Grune T, Bürkle A (2016). Plasma carotenoids, tocopherols, and retinol in the age-stratified (35–74 years) general population: a cross-sectional study in six european countries. *Nutrients*. 6:1-17.
72. Strohle A, Hahn A (2009). Vitamin C and immune function. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*. 32: 49-54.
73. Surapon T (2015). Oxidative stress, insulinresistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 6(3): 456-480.
74. Thomas LM (2016). Source de vitamine C. *News medical life sciences*.

Références bibliographiques

75. Traber MG, Kayden HJ (1987). Tocopherol distribution and intracellular localization in human adipose tissue. *The American journal of clinical nutrition*. 46:488-495.
76. Traber MG (2007). Vitamin E regulatory mechanisms. *Annual review of nutrition*. 27:347-362.
77. Traber MG, Stevens JF (2011). Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med*. 51: 1000-1013.
78. Traxer O, Huet B, Poindexter J, Pack C, Pearle M (2003). Effect of ascorbic acid consumption on urinary stones risks factors. *J Urol*. 17: 397-401.
79. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 7: 44-84.
80. Vasson MP, Goudable J, Hininger-Favier I (2007). *Conseil en compléments alimentaires*. Editions groupe liaison SA. 50p.
81. Weinstein SJ, Wright ME, Lawson KA, Snyder K, Mannisto S, Taylor RP, Virtamo J, Albanes D (2007). Serum and dietary vitamin E in relation to prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 16: 1253-1259.
82. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH (2007). Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab*. 51: 301-323.
83. Yan Z, Banerjee R (2010). Redox remodeling as an immunoregulatory strategy. *Biochemistry*. 49:1059–1066.
84. Zhang ZH, Zeng AX, Brennan SC, Brennan M, Han Z, Xiong YX (2015). Effects of pulsed electric fields (PEF) on vitamin C and its antioxidant properties. *International Journal of Molecular Sciences*. 16: 24159-24173.
85. Zhidong XU, Harvey AK, Pavlina MT, Zaloga PG, Siddiqui AR (2015). Tocopherol and tocotriénols homologs in parenteral lipid emulsions. *European journal of lipid science and technology*. 114: 1-23.
86. Zingg JM (2007). Vitamin E: An overview of major research directions. *Mol Aspects Med*. 28:400–422.

Références bibliographiques

87. Zingg JM, Kempna P, Paris M, Reiter E, Villacorta L, Cipollone R, Munteanu A, De Pascale C, Menini S, Cueff A, Arock M, Azzi A, Ricciarelli RA (2008). Characterization of three human sec 14 p-like proteins: alpha-tocopherol transport activity and expression pattern in tissues. *Biochimie*. 90: 1703-1715.
88. Zingg JM, Meydani M, Azzi A (2010). Alpha-tocopheryl phosphate- an active lipid mediator? *Molecular nutrition food research*. 54:679-692.



Annexes

Annexes

Tableau A1. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E

Incubations	Indice de prolifération
Basale	54,95 ± 4,52 ^f
Concanavaline A	97,62 ± 3,47 ^{e*}
Vitamine C (25 µM)	131,19 ± 7,08 ^{d*}
Vitamine C (50 µM)	182,86 ± 6,11 ^{b*}
Vitamine E (25 µM)	165,22 ± 6,88 ^{c*}
Vitamine E (50 µM)	207,47 ± 8,03 ^{a*}

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type. La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student: * P < 0,01.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

Annexes

Tableau A2. Teneurs en vitamine C des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E

Incubations	Vitamine C (nmol/10 ⁶ cellules)
Basale	3,58 ± 0,53 ^e
Concanavaline A	3,62 ± 0,28 ^e
Vitamine C (25 µM)	11,29 ± 0,74 ^{b*}
Vitamine C (50 µM)	19,52 ± 1,15 ^{a*}
Vitamine E (25 µM)	5,17 ± 0,48 ^{d*}
Vitamine E (50 µM)	7,55 ± 0,33 ^{c*}

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type. La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student: * P < 0,01.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

Annexes

Tableau A3. Statut antioxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E

Incubations	GSH (nmol/10 ⁶ cellules)	Catalase (U/10 ⁶ cellules)
Basale	1,28 ± 0,12 ^c	25,44 ± 1,35 ^b
Concanavaline A	1,32 ± 0,17 ^c	29,88 ± 1,31 ^{a*}
Vitamine C (25 µM)	1,61 ± 0,14 ^{b*}	28,37 ± 1,22 ^{a*}
Vitamine C (50 µM)	2,05 ± 0,15 ^{a*}	29,41 ± 1,26 ^{a*}
Vitamine E (25 µM)	1,67 ± 0,08 ^{b*}	28,92 ± 1,04 ^{a*}
Vitamine E (50 µM)	2,11 ± 0,10 ^{a*}	30,88 ± 1,11 ^{a*}

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type. GSH : glutathion réduit. La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student: * P < 0,01.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

Annexes

Tableau A4. Statut oxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou des vitamines C et E

Incubations	MDA (nmol/10 ⁶ cellules)	PCAR (U/10 ⁶ cellules)
Basale	1,54 ± 0,22 ^f	0,64 ± 0,05 ^e
Concanavaline A	3,51 ± 0,25 ^{a*}	1,88 ± 0,04 ^{a*}
Vitamine C (25 µM)	2,63 ± 0,32 ^{b*}	1,33 ± 0,03 ^{b*}
Vitamine C (50 µM)	1,88 ± 0,23 ^{d*}	1,05 ± 0,04 ^{d*}
Vitamine E (25 µM)	2,22 ± 0,11 ^{c*}	1,15 ± 0,03 ^{c*}
Vitamine E (50 µM)	1,50 ± 0,12 ^{e*}	0,68 ± 0,04 ^{e*}

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type. MDA : Malondialdéhyde ; PCAR : Protéines carbonylées. La comparaison des moyennes entre les incubations supplémentées en agent mitogène ou en vitamines et l'incubation basale est réalisée par le test t de student: * P < 0,01.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

Résumé

Résumé

Afin de tester les effets des vitamines C et E *in vitro* sur des cellules en culture, nous avons travaillé sur un modèle de cellules humaines d'origine lymphocytaire. Les lymphocytes T sont isolées à partir d'un prélèvement sanguin et séparés par une centrifugation selon un gradient de densité de l'histopaque, puis incubés dans un milieu RPMI en présence d'un agent mitogène (la concanavaline A), des vitamines C et E à des concentrations différentes de 25 et 50 μM pendant 48 heures à 37°C et à 5% de CO_2 . Ces cellules sont par la suite utilisées pour analyser la prolifération cellulaire et le statut redox intracellulaire (vitamine C intra lymphocytaire, catalase, glutathion réduit, malondialdéhyde, protéines carbonylées). Nos résultats montrent que la concanavaline A stimule la prolifération des lymphocytes. Les vitamines C et E potentialisent cet effet d'une façon dose dépendante. En plus, la concanavaline A stimule la production du malondialdéhyde et des protéines carbonylées par les lymphocytes T en culture, avec une légère augmentation de la catalase. Les vitamines C et E régulent le stress oxydatif intracellulaire en diminuant les taux lymphocytaires en protéines carbonylées et en malondialdéhyde intracellulaires et en augmentant les défenses intracellulaires (vitamine C, GSH et catalase). De plus, l'effet protecteur de la vitamine C et E est plus important à la concentration de 50 μM . En conclusion, les vitamines C et E jouent un rôle immunostimulant et antioxydant ; la supplémentation en ces vitamines est donc à recommander.

Mots-clés : Vitamine C, vitamine E, cellule en culture, concanavaline A, statut redox intracellulaire, lymphocyte T, catalase, malondialdéhyde, glutathion réduit, protéines carbonylées.

Abstract

In order to test the *in vitro* effect of vitamins C and E on cells in culture, we have worked on a model of human cells of lymphocyte origin. T lymphocytes are isolated from blood sample and separated by centrifugation at a histopaque density gradient and then incubated in RPMI medium in the presence of a mitogen (concanavalin A), vitamins C and E at different concentrations of 25 and 50 μM for 48 hours at 37 °C and 5% CO_2 . These cells are subsequently used to analyze cell proliferation and intracellular redox status (vitamin C intra lymphocyte, catalase, reduced glutathione, malondialdehyde, carbonyl proteins). Our results show that concanavalin A stimulated lymphocyte proliferation. Vitamins C and E boosted this effect in a dose dependent manner. In addition, concanavalin A stimulated the production of malondialdehyde and carbonyl proteins by T lymphocytes in culture with a small increase in catalase activity. Vitamins C and E regulated intracellular oxidative stress by reducing lymphocyte levels of carbonyl proteins and malondialdehyde and by increasing intracellular antioxidant defense (vitamin C levels, GSH, catalase). In addition, the protective effect of vitamins was more pronounced at 50 μM . In conclusion, vitamins C and E displayed immune-stimulant and antioxidant effect; supplementation with these vitamins is then recommending.

Keywords: vitamin C, vitamin E, culture cell, concanavalin A, intracellular redox status, T lymphocyte, catalase, malondialdehyde, reduced glutathione, carbonyl proteins.

ملخص

لدراسة تأثير الفيتامينات C و E في المختبر على زراعة الخلايا عملنا ، على نموذج من أصل الخلية للمفاوية البشرية. يتم عزل الخلية للمفاوية التائية من عينة دم و فصل عن طريق الطرد المركزي و بالتدرج في كثافة Histopaque و حضنت في وسط RPMI بوجود وكيل القيلي (كونكانافالين A) و الفيتامينات C و E بتركيزات مختلفة (25 و 50) ميكرومول لمدة 48 ساعة عند 37 درجة مئوية و 5% CO_2 . ثم يتم استخدام هذه الخلايا لتحليل تكاثر الخلايا و حالة الأوكسدة داخل الخلايا (فيتامين C داخل الخلية للمفاوية، كاتالاز، glutathion réduit، Malondialdehyde و البروتين الكربونيل). نتائجا تظهر أن كونكانافالين A يحفز تكاثر الخلايا. الفيتامينات C و E تحفز بطريقة تعتمد على الجرعة و بالإضافة إلى ذلك ، الكونكانافالين A تحفز إنتاج ADM و البروتين الكربونيل من الخلايا للمفاوية التائية المزروعة مع زيادة طفيفة من الكاتالاز. الفيتامينات C و E تنظم الأوكسدة داخل الخلايا عن طريق خفض مستويات الخلايا للمفاوية في البروتين الكربونيل داخل الخلايا و كذلك DAM و زيادة دفاع الخلايا (فيتامين C، GSH ، و الكاتالاز) و بالإضافة إلى ذلك، فإن تأثير الوقائي للفيتامين C و E يكون أكبر بتركيز 50 ميكرومول. وفي الختام، فإن الفيتامينات C و E تلعب دور في تحفيز المناعة و كذلك مضاد للأوكسدة و يوصى بها كمكمل غذائي.

الكلمات المفتاحية : فيتامين C، فيتامين E، زراعة الخلايا، كونكانافالين A، حالة الأوكسدة داخل الخلايا، للمفاوية التائية، كاتالاز، GSH، البروتين الكربونيل