



République Algérienne Démocratique & Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université d'ABOU BEKR BELKAID de 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 recherche en physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition

Thèse en vue d'obtention du grade de docteur en biologie
Option : immunologie appliquée à la nutrition

Samia BOUAMAMA

**Troubles métaboliques et effets des vitamines et des huiles sur la
prolifération lymphocytaire, la sécrétion des cytokines et le statut
redox chez les personnes âgées dans la région de Tlemcen**

Soutenue le : 12 / 07 /2017

Devant le jury :

Présidente : Pr. Nassima MOKHTARI-SOULIMANE

Université Abou Bekr BELKAID-Tlemcen

Directrice de thèse : Pr. Hafida MERZOUK

Université Abou Bekr BELKAID-Tlemcen

Examinatrice : Pr. Dalila AIT YAHIA

Université Ahmed Ben Bella 1-Oran

Examinatrice Pr. Samira BOUANANE

Université Abou Bekr BELKAID-Tlemcen

Examineur Pr. Ahmed BOUALGA

Université Ahmed Ben Bella 1-Oran

Année Universitaire : 2016-2017

*Je dédie ce travail
À mes très chers parents, à mes frères et sœurs
Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers*

Remerciements

Merci à Dieu le tout puissant qui m'a accordé le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Je tiens à remercier infiniment mon encadreur **professeur Hafida MERZOUK**, directrice de laboratoire PPABIONUT, université de Tlemcen, Je voudrais lui exprimer ma profonde gratitude pour son accueil bienveillant au sein de son équipe de recherche et pour avoir guidé mes pas sur la voie de la recherche scientifique.

Permettez-moi Madame de vous exprimer ma reconnaissance, et mes remerciements les plus sincères pour votre patience, vos conseils précieux qui m'ont été très utiles et pour vos qualités humaines et scientifiques. Que Dieu le tout puissant vous protège, et vous garde pour nous inshallah.

Mes sincères remerciements vont aussi au **Professeur Sid Ahmed MERZOUK**, pour son soutien scientifique tout au long de ce travail, son implication, ses critiques constructives dans le domaine des statistiques qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie chaleureusement **Professeur Nassima Mokhtari-Soulimane** pour avoir accepté de présider le jury de la soutenance de ma thèse.

Je remercie également **Professeur Ahmed BOUALGA** pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

Mes remerciements chaleureux vont aussi au **professeur Dalila AIT YAHIA**, pour avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail de doctorat.

Je tiens à remercier aussi **professeur Samira BOUANANE** pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Mes remerciements sont destinés aussi à tous les membres de l'équipe du laboratoire PPABIONUT pour leur aide et leur soutien, je remercie spécialement Mme **Amel MEDJDOUB**, **Asmaa MERAOU**, **Djamila MEZOUAR**, **Fouzia DJELLOULI**, **Naima BADID**, **Amel MERZOUK-SAIDI**, tous mes collègues et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail de doctorat.

J'exprime mes remerciements aux autorités de l'APC Kiffane-Tlemcen et aux responsables du foyer des personnes âgées, et EPSP Tlemcen qui nous ont facilité l'accès à la population sélectionnée dans ce travail.

J'exprime ma gratitude à tous mes enseignants qui ont contribué à ma formation tout au long de mon cursus scientifique.

Valorisation des travaux de recherche

Ce présent travail est une thèse de doctorat qui fait partie d'un projet national PNR, supporté par l'agence algérienne de recherche scientifique en santé (ATRSS) et la société algérienne de nutrition et médecine ortho-moléculaire (SANMO). Toutes les manipulations lors de cette étude ont été effectuées au sein du laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et biochimie de la nutrition (PPABIONUT), département de biologie, Faculté des Sciences de la nature, vie, terre et univers, Université ABOU BAKER BELKAID, Tlemcen, Algérie.

Notre thèse de doctorat a fait l'objet d'un article scientifique international:

Samia BOUAMAMA, Hafida MERZOUK, Amel MEDJDOUB, Amel MERZOUK-SAIDI, Sid Ahmed MERZOUK. Effects of exogenous vitamin A, C, E and NADH supplementation on proliferation, cytokines release, and cell redox status of lymphocytes from healthy aged subjects. Applied physiology, nutrition and metabolism. 2017.

Nous avons aussi exposé les résultats de cette thèse de doctorat ainsi que d'autres travaux de recherche portant sur les cultures cellulaires au sein du laboratoire PPABIONUT lors des congrès scientifiques nationaux et internationaux:

Amel MERZOUK-SAIDI, Bouchra LOUKIDI, Hafida MERZOUK, Amel MEDJDOUB, Samia BOUAMAMA, Sid Ahmed MERZOUK. Prévention des altérations de la balance redox de l'adipocyte par les antioxydants. 6ème congrès de la biologie médicale et médecine de laboratoire. Alger, 19 et 20 novembre 2016.

Samia BOUAMAMA, Hafida MERZOUK. Effet de la vitamine E sur la prolifération lymphocytaire chez les femmes âgées. Deuxième journée nationale du département de pharmacie. Tlemcen, 28 novembre 2015.

Samia BOUAMAMA, Hafida MERZOUK. Investigational study of vitamin C effects on human lymphocytes during aging: its dual roles as antioxidant or prooxidant. The first international congress of Nutrition and food science "from Bench to bedside". Tlemcen November 20-22nd, 2015.

Samia BOUAMAMA, Hafida MERZOUK, Djamila BELGACEM. Evaluation du risque du diabète et d'HTA chez les personnes âgées de la région de Tlemcen. Premières journées nationales de médecine interne. Sidi Belabbes, les 09 et 10 octobre 2015.

Samia BOUAMAMA, Hafida MERZOUK, Djamila BELGACEM. Etude des paramètres biochimiques et de certains marqueurs de stress oxydant chez les sujets âgés de la région de Tlemcen. 5eme congrès de biologie médicale et médecine de laboratoire. Bordj el Kiffan-Alger, 18-19 Mai 2015.

Samia BOUAMAMA, Hafida MERZOUK. Vegetal oils affect proliferation and apoptosis of lymphocytes activated by T cell Mitogen. Premier colloque international de biotechnologie végétale et microbienne. Oran le 02 et 03 Décembre 2014.

Résumé

Le vieillissement est un événement biologique inévitable, associé à des altérations du système immunitaire. La supplémentation en nutriments pourrait améliorer ces anomalies. Le but de cette étude est d'établir des stratégies alimentaires simples afin d'améliorer la santé et la réponse immunitaire des personnes âgées. 50 personnes âgées (âge supérieur à 65 ans) et 80 personnes jeunes (âge compris entre 25 et 35 ans) sont sélectionnées dans la région Tlemcen. L'état nutritionnel est évalué en utilisant l'IMC, les scores MNA, SNAQ et dosage d'albumine plasmatique. Les paramètres biochimiques et métaboliques sont dosés par des kits colorimétriques et/ou enzymatiques. Le stress oxydant est évalué dans le lysat érythrocytaire en dosant le glutathion réduit (GSH), le malondialdéhyde (MDA), les protéines carbonylées (PC) et la catalase. Les lymphocytes du sang périphérique sont isolés en utilisant un gradient de densité d'Histopaque. Ils sont cultivés in vitro et stimulés par la Con A, en présence ou en absence de vitamines et des huiles. La prolifération cellulaire est déterminée par le test MTT et la sécrétion de l'interleukine-2 et de l'interleukine -4 est quantifiée par kit Elisa. Le statut oxydant / antioxydant intra-lymphocytaire était aussi déterminé. Nos résultats obtenus du score MNA montrent que 44 % des hommes âgés et 52% des femmes âgées ont un risque de malnutrition. Ces sujets présentent des altérations métaboliques et un stress oxydant évident. Le taux de prolifération des lymphocytes T est diminué avec l'âge résultant de l'altération de la sécrétion des cytokines, de la diminution du GSH et du stress oxydatif intracellulaire. Chez les personnes âgées, la vitamine C, E et le NADH, l'huile de nigelle améliorent de manière significative la prolifération des lymphocytes et le pouvoir antioxydant cellulaire, tandis que la vitamine A, les huiles de tournesol et de noix n'ont pas d'incidence sur la prolifération cellulaire ni sur l'état redox cellulaire dans cette population. Par contre, l'huile de lin diminue la prolifération lymphocytaire aussi bien chez les âgés que chez les jeunes. En conclusion, le traitement in vitro des lymphocytes par les vitamines et l'huile de nigelle améliore la réponse immunitaire chez les personnes âgées et peuvent être utiles dans la prévention des altérations immunitaires liées à l'âge.

Mots Clés: vieillissement, lymphocytes, nutrition, cytokines, stress oxydant.

Abstract

Aging is an inevitable biological event, associated with immune alterations, oxidative stress and malnutrition. Nutrient supplementation could improve these abnormalities. The purpose of this study is to establish simple dietary strategies to improve the health and immune response in the elderly. 50 old subjects (age over 65 years) and 80 young men and women (age between 25 and 35 years) were selected in Tlemcen area. The nutritional status was assessed by using BMI, MNA, SNAQ scores and plasma albumin assay. The biochemical and metabolic parameters were assayed by colorimetric and / or enzymatic kits. The oxidative stress was evaluated in the erythrocyte lysate by assaying reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), carbonyl proteins (CP) and catalase. Peripheral blood lymphocytes were isolated using histopaque density gradient. They were cultured in vitro and stimulated by Con A, in the presence or absence of vitamins and oils. Cell proliferation was determined by the MTT assay. Secretion of interleukin-2 and interleukin-4 was quantified by Elisa kit. The intra-lymphocyte redox status was also determined. Our results obtained from the MNA score show that 44% of elderly men and 52% of elderly women have a risk of malnutrition. These subjects exhibit metabolic alterations and oxidative stress. The rate of proliferation of T lymphocytes is decreased with age resulting from altered cytokine secretion, decreased GSH and intracellular oxidative stress. In the elderly, vitamin C, E, NADH, and Nigella oil significantly improve lymphocyte proliferation and cellular antioxidant power, while vitamin A, sunflower and walnut oils do not affect cell proliferation and the cellular redox status in this population. On the other hand, linseed oil decreases lymphocyte proliferation in both the elderly and the young. In conclusion, the in vitro treatment of lymphocytes with vitamins and Nigella oil improves the immune response in the elderly and may be useful in preventing age-related immune alterations.

Keywords: aging, lymphocytes, nutrition, cytokines, oxidative stress.

ملخص

الشيخوخة حدث بيولوجي لا مفر منه، يرتبط مع ضعف في الجهاز المناعي، زيادة في الأكسدة ونقص في التغذية. المكملات الغذائية يمكن أن تعالج هذا الاختلال. الغرض من هذه الدراسة هو وضع استراتيجيات غذائية بسيطة لتحسين الصحة والاستجابة المناعية للمسنين. تم تقييم الحالة الغذائية للمسنين في منطقة تلمسان باستخدام مقياس MNA، SNAQ وفحص الزلال في البلازما مع إجراء تحاليل بيوكيميائية وأيضيه باستخدام تجارب لونية وأنزيمية. تم تقييم الأكسدة الخلوية في خلايا الدم: GSH، MDA، PCAR وأنزيم الكاتلاز. تم عزل الخلايا اللمفاوية من الدم باستخدام تدرج الكثافة (Histopaque). زرعت هذه الخلايا في المختبر بعد تحفيزها بواسطة Con A في وجود أو عدم وجود الفيتامينات والزيوت، مع تحديد تكاثر الخلايا بواسطة فحص MTT وإفراز الانترلوكين-2 و الانترلوكين-4 بواسطة فحص ELISA. تم أيضا تحديد وضع الأكسدة داخل الخلايا اللمفاوية. بينت النتائج المتحصل عليها بواسطة مقياس MNA أن 44% من كبار السن من الرجال و 52% من النساء المسنات أكثر عرضة لخطر سوء التغذية مع زيادة في الأكسدة و تغيرات أيضيه لدى هذه الفئة. أظهرت أيضا النتائج أن معدل تكاثر الخلايا T انخفض مع التقدم في السن و صاحبه تغيير في إفراز السيتوكينات، و زيادة الأكسدة داخل الخلايا. لدى كبار السن، أدت كل من الفيتامينات ج، هـ، NADH، و زيت الحبة السوداء إلى زيادة كبيرة في تكاثر الخلايا اللمفاوية والقوة المضادة للأكسدة الخلوية، في حين أن فيتامين أ، زيت عباد الشمس و زيت الجوز لم تؤثر على الخلايا لدى هذه الفئة من السكان عكس زيت بذر الكتان سببت انخفاض في معدل تكاثر الخلايا اللمفاوية. في الختام، علاج الخلايا اللمفاوية بالفيتامينات ج، هـ، NADH و زيت الحبة السوداء يعزز الاستجابة المناعية لدى كبار السن ويمكن أن تكون مفيدة في الوقاية من امراض التقدم في السن.

الكلمات المفتاحية: الشيخوخة، الخلايا اللمفاوية، التغذية، السيتوكينات، الأكسدة.

Table des matières

| | |
|--|-----|
| Liste des tableaux..... | i |
| Liste des figures..... | ii |
| Liste des abréviations..... | iii |
| Introduction | 01 |
| Etat actuel du sujet | 04 |
| 1. Physiologie du vieillissement..... | 04 |
| 2. Vieillessement et stress oxydant..... | 08 |
| 3. Système immunitaire et vieillissement..... | 11 |
| 4. Nutrition, immunité et vieillissement réussi..... | 20 |
| Matériels et méthodes | 30 |
| 1. Population étudiée..... | 30 |
| 1 .1. Considérations éthiques..... | 30 |
| 2. Enquête nutritionnelle..... | 30 |
| 2.1. MNA (Mini Nutritional Assessment)..... | 33 |
| 2.2. SNAQ (Simplified nutritional appetite questionnaire)..... | 33 |
| 3. Prélèvements sanguins..... | 33 |
| 4. Méthodes de dosages utilisées..... | 33 |
| 4.1. Paramètres biochimiques plasmatiques..... | 33 |
| 4.1.1. Dosage de l'albumine..... | 33 |
| 4.1.2. Dosage du glucose..... | 34 |
| 4.1.3. Dosage du cholestérol total..... | 34 |
| 4.1.4. Dosage des triglycérides..... | 34 |
| 4.1.5. Détermination des lipoprotéines HDL et LDL..... | 34 |
| 4.1.6. Dosage de l'urée..... | 35 |
| 4.1.7. Dosage de la créatinine..... | 35 |
| 4.2. Paramètres du stress oxydatif..... | 35 |
| 4.2.1. Dosage de la vitamine C plasmatique..... | 35 |
| 4.2.2. Dosage du monoxyde d'azote (NO) plasmatique..... | 35 |
| 4.2.3. Dosage de l'anion super oxyde plasmatique..... | 36 |
| 4.2.4. Détermination de l'activité du catalase érythrocytaire..... | 36 |
| 4.2.5. Dosage de glutathion réduit GSH érythrocytaire..... | 36 |
| 4.2.6. Dosage du malondialdéhyde (MDA) érythrocytaire..... | 36 |
| 4.2.7. Dosage de protéines carbonylées érythrocytaires..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 5. Etude in vitro des effets des nutriments sur les lymphocytes..... | 37 |
| 5.1. Isolement des lymphocytes sanguins..... | 37 |
| 5.2. Test de viabilité et dénombrement des cellules..... | 37 |
| 5.3. Culture lymphocytaire..... | 37 |
| 5.4. Test de prolifération lymphocytaire..... | 39 |
| 5.5. Dosage des cytokines IL-2 et IL-4..... | 39 |
| 5.6. Equilibre oxydant/antioxydant intra-lymphocytaire..... | 39 |
| 6. Analyse statistique..... | 40 |
| Résultats et interprétations..... | 41 |
| 1. Marqueurs de l'état nutritionnel et paramètres biochimiques..... | 41 |
| 2. Marqueurs du stress oxydant..... | 45 |
| 3. Effets des nutriments sur les lymphocytes en culture..... | 45 |
| 3.1. Prolifération des lymphocytes chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 45 |
| 3.2. Sécrétion des cytokines..... | 47 |
| 3.3. Statut oxydant/antioxydant lymphocytaire..... | 53 |
| Discussion..... | 59 |
| Conclusion..... | 72 |
| Références bibliographiques..... | 75 |
| Annexes..... | 95 |

Liste des Tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Les tendances mondiales en matière de croissance de la population des personnes âgées | 04 |
| Tableau 2. Principales sources alimentaires de vitamines..... | 25 |
| Tableau 3. Caractéristiques de la population étudiée..... | 31 |
| Tableau 4. Composition des huiles étudiées..... | 38 |
| Tableau 5. Marqueurs de l'état nutritionnel chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 43 |
| Tableau 6. Paramètres biochimiques chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 44 |
| Tableau 7. Marqueurs plasmatiques et érythrocytaires du statut oxydant/antioxydant chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 46 |
| Tableau 8. Effets des différents nutriments sur la sécrétion de l'interleukine 2 (IL-2, Pg/mL) des lymphocytes in vitro chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 49 |
| Tableau 9. Effets des différents nutriments sur la sécrétion de l'interleukine 4 (IL-4, Pg/mL) des lymphocytes in vitro chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 51 |

Tableaux en annexes

| | |
|---|-----|
| Tableau A1. Critères de bonne santé pour les études sur le vieillissement immunitaire..... | 95 |
| Tableau A2. Prolifération des lymphocytes chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 102 |
| Tableau A3. Effets des nutriments sur le rapport IL-2/IL-4 des lymphocytes in vitro chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 103 |
| Tableau A4. Effets des différents nutriments sur le taux de glutathion lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 104 |
| Tableau A5. Effets des différents nutriments sur l'activité de l'enzyme Catalase (U/mg protéine) des lymphocytes chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 105 |
| Tableau A6. Effets des différents nutriments sur le taux de MDA lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 106 |
| Tableau A7. Effets des différents nutriments sur le taux des protéines carbonylées lymphocytaires chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 107 |

Liste des Figures

| | |
|---|----|
| Figure 1. Rôle du vieillissement dans l'altération musculaire liée à l'insulino-résistance..... | 06 |
| Figure 2. Rôle du stress oxydant dans le vieillissement..... | 10 |
| Figure 3. Balance lymphocytaire Th1/Th2..... | 13 |
| Figure 4. Différenciation des lymphocytes T naïfs en différents sous-populations dans une réponse immunitaire normale..... | 14 |
| Figure 5. Changements de la fonction oxydante et des paramètres inflammatoires des cellules immunitaires avec l'âge..... | 19 |
| Figure 6. Contrôle de la balance Th1/Th2 par les ERO..... | 19 |
| Figure 7. Effets des carences nutritionnelles sur l'organisme humain..... | 20 |
| Figure 8. Facteurs qui causent la malnutrition chez les personnes âgées..... | 22 |
| Figure 9. Effets directs ou indirects de la déficience de la vitamine A sur l'immunité..... | 26 |
| Figure 10. Mécanismes d'action des AGPI n-3 sur le système immunitaire..... | 29 |
| Figure11. Résumé graphique du protocole expérimental..... | 32 |
| Figure 12. Prévalence de la dénutrition chez les personnes jeunes et âgées en utilisant l'IMC..... | 42 |
| Figure 13. Prévalence de la dénutrition chez les personnes jeunes et âgées en utilisant le score MNA..... | 42 |
| Figure 14. Effets in vitro des nutriments sur la prolifération lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 48 |
| Figure 15. Effes des nutriments sur le rapport IL-2/IL-4 des lymphocytes chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 52 |
| Figure 16. Effets des différents nutriments sur le taux de glutathion lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 54 |
| Figure 17. Effets des différents nutriments sur l'activité de la catalase lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 55 |
| Figure 18. Effets des différents nutriments sur le taux de MDA lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 57 |
| Figure 19. Effets des différents nutriments sur le taux des protéines carbonylées lymphocytaires chez les hommes et les femmes jeunes et âgés..... | 58 |

Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| ADN : Acide désoxyribonucléique, | HPLC: Chromatographie liquide haute performance |
| AGE: Advanced glycation end-product (Produits de glycation) | HRP: Horseradish peroxidase |
| AGMI: Acides gras mono-insaturés | HTA : hypertension artérielle |
| AGPI : Acides gras polyinsaturés | HT : huile de tournesol, |
| AGS : Acides gras saturés | IGF-1: Insulin growth factor-1 |
| ALA : Acide alpha linoléique | IKK- β : inhibitor of κ B kinase (inhibiteur de kinase κ B) |
| ARE : Antioxidant response element | IL: Interleukine |
| ARN: acide ribonucléique | IMC: Indice de masse corporelle |
| ATP: Adénosine triphosphate | INF γ : l'Interféron-gamma |
| Cat: catalase | IP: indice de prolifération |
| CD : Clusters de différenciation | IRS1: insulin receptor substrate 1 |
| CMV : cytomégalovirus | JNK: c-Jun N terminal Kinase |
| Con A: Concanavaleine A | LA: acide linoléique, |
| CPA: Cellule présentatrice de l'antigène | LDL: lipoprotéines de faible densité, |
| CPG : Chromatographie en phase gazeuse | LDLox : low density lipoprotein oxide |
| CRP: C reactive protein | MDA: Malondialdéhyde |
| CT: cholestérol total | MNA : Mini nutritional assessment |
| DHA: Acide docosahexaénoïque | MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium |
| DMSO : Diméthylsulfoxyde | NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide |
| DNPH: 4- dinitrophénylhydrazine | NF- κ B: facteur nucléaire kappa B |
| ϵ : Coefficient d'extinction | NK: Natural killer |
| EDTA: acide éthylène diamine tétracétique | NO: Monoxyde d'azote |
| ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay | NO ₂ .: bioxyde nitrique |
| ERO: Espèces réactives d'oxygène ; | Nrf2: nuclear factor erythroid 2 related factor |
| EPA: Acide eicosapentaénoïque | OH: radical hydroxyle |
| GATA3: GATA binding protein 3 | OHCl: radical d'hypochlorite |
| GH :growth hormone | O ₂ .-: anion superoxyde |
| GSH: Glutathion réduit | OMS: Organisation Mondiale de la Santé |
| HLA : human leukocyte antigen | PCAR : protéines carbonylées |
| HDL: lipoprotéines de haute densité | |

HL : huile de lin

HNL : huile de nigelle,

HNX : huile de noix

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

HO : huile d'olive

PDGF : facteur de croissance dérivé par plaquette

PG: prostaglandins (prostaglandines)

PHA: Phytohemagglutinine

PPRA: Peroxisome proliferators activated receptors

PWM: Pokeweed mitogen

RNS: reactive nitrogen species (espèces réactifs de nitrogène)

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute

SOD: Superoxyde dismutase

STATs: Signal transducers and activators of transcription

TAD: tension artérielle diastolique

TAS: tension artérielle systolique

TBA: Acide thiobarbiturique

Tc: cellule T cytotoxique

TCA: Acide Trichloroacétique

TCR : T-cell receptor (récepteurs des cellules T)

TGF: Facteur de croissance tumorale

TG : triglycerides

TGO: aspartame aminotransférase (ASAT)

TGP: alanine aminotransférase (ALAT)

Th1 : T helper 1 (T auxiliaires de type 1)

Th2 : T helper 2 (T auxiliaires de type 2)

TMB: 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine

TNF: Facteurs de nécrose tumorale

TR1 : A type of regulatory T cell (type de cellules T régulatrices)

VAD: vitamin A deficient

Vit: vitamine

VLDL: very low density lipoprotein (lipoprotéines de très faible densité)

Introduction



Le vieillissement, un phénomène biologique normal qui affecte tout organisme vivant, constitue une des préoccupations majeures du monde entier et un passionnant sujet de recherche à différents niveaux: sociale, anthropologique, économique, et biologique...etc. Les preuves scientifiques suggèrent que la fréquence du vieillissement augmente dramatiquement dans le monde, considéré comme problème de santé publique (Bauduer, 2011). Au niveau mondial, le nombre de personnes âgées de 65 ans ou plus passe de 524 millions en 2010 à presque de 1.5 milliard en 2050 (Delgado et al., 2013). Aux États-Unis, le nombre actuel de la population âgée plus de 65 ans sera doublé en 2060, il sera environ de 98 millions avec un pourcentage de 24% de la population totale (Mather et al., 2015). Au Canada, plus du quart de la population québécoise serait âgée de 65 ans et plus et en 2041 une personne sur six aurait 75 ans et plus et une sur dix-huit, 85 ans et plus (Choinière, 2010). Dans les pays de l'Union Européenne, le pourcentage des personnes âgées plus de 65 ans s'élève de 17 à 30 % vers l'année 2060 (Santoro et al., 2013). Selon les rapports de la banque mondiale en 2012, dans le Moyen Orient et l'Afrique du Nord, le pourcentage de la population âgée de plus de 65 ans est estimé à 4,7% de la population totale (336 millions). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que de 2000 à 2050, le taux de croissance de la population au-dessus de 65 ans devrait être de 4% -5%, et le taux de croissance annuel moyen des vieux (85 ans et plus) dépassera 5% dans onze pays arabes (Hajjar et al., 2013). Selon les dernières enquêtes, en 2050, l'âge moyen des Algériens va atteindre les 42 ans ; les seniors seront alors 12 millions, ce qui représentera 25% de la population (Ait Sadi, 2014).

L'augmentation du pourcentage des personnes âgées a un impact social considérable à différents niveaux: pyramide des âges (papy boom), retraite et pensions, dépendance, institutions, santé publique (maladie d'Alzheimer, ostéoporose, etc.). L'aspect qualitatif du vieillissement doit également être envisagé comme le souligne un slogan émis par l'OMS en 1986 : « ajouter des années à la vie mais aussi de la vie aux années », ce qui a pu être traduit par «vieillesse réussie» (Bauduer, 2011).

Chez les personnes âgées, on a signalé que plusieurs paramètres hématologiques et immunologiques sont changés (Pandey et Rizvi, 2014). Ces changements relatifs à l'âge sont considérés comme des facteurs de risque pour l'apparition des pathologies graves telles que les cancers, des désordres inflammatoires chroniques, l'autoimmunité et les infections (Cannizzo et al., 2011).

Au cours du vieillissement, il y a un déclin dans la prolifération, la production de nouveaux lymphocytes naïfs, et une réduction de plusieurs cytokines impliqués dans ce processus tel

que l'interleukine 2 (Il-2) (De la Fuente, 2014). Ce processus, également appelé l'immunosénescence, est caractérisé par une augmentation du taux cellulaire d'apoptose, une involution thymique, un changement du répertoire de cellules de T, et une accumulation des cellules mémoires (Ostan et al., 2006 ; Álvarez-Rodríguez et al., 2012).

Les facteurs influençant le vieillissement sont multiples. Ils comprennent le mode de vie, le régime alimentaire, la consommation d'alcool, le tabagisme, le stress..., etc. En se concentrant sur les niveaux moléculaires, des facteurs de style de vie sont étroitement liés à la notion de stress oxydatif (Saeidnia et Abdollahi, 2013). Parmi les théories proposées pour le vieillissement, la théorie des radicaux libres proposée par Harman en 1956, également connue en tant que théorie de stress oxydant, a reçu un appui étendu. Elle propose que la détérioration de l'organisme liée à la longévité soit en particulier une conséquence de l'accumulation des molécules cellulaires endommagées par les radicaux libres (Zhang et al., 2003 ; Espino et al., 2012). Les radicaux libres sont des dérivés instables et toxiques de l'oxygène ou nitrogène qui réagissent et altèrent les biomolécules tels que l'ADN, les lipides et les protéines. D'ailleurs, le vieillissement est principalement caractérisé par un déséquilibre entre la production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et par un taux élevé de biomolécules oxydées (Cannizzo et al., 2012). Les fonctions lymphocytaires sont influencées par le vieillissement et sont liées aux changements dans les voies de signalisation intracellulaires provoqués par le stress oxydant (Hirokawa, 1999 ; Fulop et al., 2014). En outre à l'échelle lymphocytaire, le vieillissement est caractérisé par des niveaux accrus en radicaux libres et une capacité antioxydante diminuée (Gautam et al., 2010). En effet, les personnes âgées sont généralement déficientes en certains nutriments notamment les antioxydants (Visioli et Hagen, 2007 ; Mocchegiani et Malavolta, 2009). Pour cette raison, les micronutriments et les antioxydants sont des éléments clés pour le maintien d'un vieillissement en bonne santé (Saeidnia et Abdollahi, 2013). De plus, la nutrition a un rôle pivot dans la fonction du système immunitaire, particulièrement chez les individus âgés (De la Fuente, 2014). Les personnes âgées sont fréquemment affectées par la malnutrition pour beaucoup de raisons. Tout d'abord, l'état socio-économique faible peut mener à une consommation des nourritures peu coûteuses déficientes en micronutriments. Les problèmes digestifs, la difficulté de mastication, la perte de dents, et la consommation de médicaments contrecarrent l'absorption nutritive dans l'intestin (Ferry, 2013). Les données nationales de l'enquête d'examen de santé et de nutrition (NHANES) de 2003 à 2008 prouvent que les consommations des vitamines A, C, D, E, K et B9 sont basses chez une proportion significative de la population âgée aux Etats-Unis (Mohajeri et al., 2015). Une autre étude

relève qu'une prise insuffisante de protéines, insuffisance de vitamines, en particulier les vitamines A, C et E, et le manque d'oligoéléments peuvent avoir des conséquences néfastes en altérant la fonction immunitaire chez les personnes âgées (Wu et al., 2012). Pour cette raison, l'amélioration du statut nutritionnel chez les âgés pourrait favoriser un vieillissement sain et réussi (Momtaz et Abdollahi, 2012).

La supplémentation en nutriments (vitamines, acides gras...) peut avoir des effets favorables sur l'état général des personnes âgées et peut même améliorer leur réponse immunitaire.

Divers systèmes expérimentaux peuvent servir à élucider les effets de différents nutriments sur les cellules. Les caractéristiques cellulaires des lymphocytes en culture fournissent des avantages uniques pour les protocoles expérimentaux. En effet, plusieurs études récentes ont utilisé les lymphocytes en culture pour tester différentes substances chimiques (Medjdoub et al., 2011; Baba Hamed et al., 2012; Baba Ahmed et al., 2014). De plus, dans notre laboratoire, nous avons utilisé cette technique de culture afin de tester certains nutriments sur la fonction cellulaire (Djelti et al., 2014; Meraou et al., 2016; Mezouar et al., 2016).

Dans ce même contexte, notre thèse de doctorat a comme objectifs :

- Déterminer l'état nutritionnel des personnes âgées de la région de Tlemcen.
- Déterminer les paramètres biochimiques, métaboliques et les marqueurs de stress oxydant chez ces personnes âgées.
- Evaluer l'effet correctif in vitro de certains nutriments sur la fonction lymphocytaire chez les personnes âgées.

Le but de notre travail de doctorat est de mettre en relief des outils nutritionnels simples afin d'améliorer la santé des personnes âgées.

Etat actuel sur le sujet



1. Physiologie du vieillissement

Le vieillissement est un processus biologique inévitable non pathologique, caractérisé par des variations biochimiques et physiologiques spontanées comprenant la susceptibilité accrue aux maladies, aux états environnementaux défavorables et à la perte de mobilité et d'agilité (Mocchegiani et Malavolta, 2009).

Le vieillissement est accompagné par une diminution progressive de l'efficacité des fonctions biologiques. Il implique des déterminants socioéconomiques, environnementaux et génétiques qui régulent son rythme, sa durée et en modulent sa qualité. Dans l'espèce humaine, la durée de vie maximale (la longévité) est d'environ 120 ans. Globalement, les progrès culturels et techniques conjugués aux avancées biomédicales ont permis une augmentation de l'espérance de vie, du nombre de personnes âgées et même des centenaires à l'échelle de la planète (Ly et al., 2013). Le Tableau 1 montre la tendance de la croissance des personnes âgées dans le monde.

Tableau 1. Les tendances mondiales en matière de croissance de la population des personnes âgées de plus de 60 ans (en millions) (Amarya et al., 2015)

| | 1980 | 1990 | 2000 | 2010 | 2020 |
|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Le monde | 381,2 | 484,7 | 608,7 | 754,2 | 1011,6 |
| Pays développés | 173,3 | 203,6 | 234,6 | 232,4 | 308,2 |
| Pays en voie de développement | 207,9 | 281,8 | 374,1 | 491,8 | 703,4 |
| La Chine | 78,6 | 101,2 | 131,7 | 167,9 | 238,9 |
| L'Inde | 44,6 | 60,2 | 81,4 | 107 | 149,7 |

Au fil du temps, les grandes fonctions de l'organisme telles que l'appareil circulatoire et digestif, le système endocrinien ainsi que le système immunitaire, deviennent moins performants. De même, la régression des fonctions cognitives et mémorielles constitue un des marqueurs du vieillissement (Ly et al., 2013).

La perte de masse musculaire et l'augmentation du tissu graisseux sont caractéristiques du processus de vieillissement. La masse maigre atteint son maximum au cours de la troisième décennie. Après une phase de stabilité, un déclin est ensuite observé qui va s'accélérer à partir de la septième décennie. La masse corporelle s'accroît jusqu'à l'âge de 60 ans, avec ensuite une tendance à la perte de poids pour plus de 60 % de la population (Bonney, 2010).

Le vieillissement est associé à des altérations du métabolisme. Il conduit souvent à une augmentation de l'adiposité viscérale et sous-cutanée. Le dérèglement du métabolisme lipidique lié à l'âge dans les adipocytes sous-cutanés a pu en partie expliquer non seulement les augmentations de l'adiposité viscérale mais également le dépôt des lipides dans les tissus non-adipeux tels que les muscles, le foie et le pancréas (Garg et al., 2014). Avec l'âge, les molécules inflammatoires augmentent dans le tissu adipeux et peuvent contribuer à Inflamm-aging, le tissu adipeux a été impliqué dans le profil pro-inflammatoire des adipocytokines (faible taux d'adiponectine et de leptine, hausse du TNF- α et IL-6) observé au cours du vieillissement (Garg et al., 2014). La distribution des graisses corporelles est associée à l'expression des gènes pro-inflammatoires dans les cellules mononuclées du sang périphérique (Hermsdorff et al., 2010). Une augmentation des teneurs en protéines de réaction inflammatoire interviendrait aussi dans la survenue de la sarcopénie observée lors du vieillissement (Ferry, 2008).

Il est important de souligner que l'obésité compromet l'immunité avec accélération d'involution thymique liée à l'âge, réduction de la production de lymphocytes T naïves, et restriction de la diversité du répertoire TCR (Yang et al., 2009). Le TCR (T cell receptor) proprement dit permet la reconnaissance de l'antigène ; chaque lymphocyte T exprime un TCR à sa surface. On distingue deux types de TCR en fonction des chaînes qui le constituent: TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$. Ces derniers représentent un type de lymphocytes T particuliers minoritaires dans le sang circulant. Théoriquement, la taille du répertoire des lymphocytes T $\alpha\beta$ est très grande, 10^{15} TCR différents pourraient être générés. Le nombre de lymphocytes T dans l'organisme est toutefois limité à 10^{12} et la taille mesurée du répertoire est en fait de l'ordre de 10^8 TCR différents (Nikolich-Zugich et al., 2004).

L'obésité est en soi un facteur de risque de mauvais vieillissement, puisqu'elle est à l'origine de morts prématurées et qu'elle fait le lit du diabète de type II, mais aussi des maladies cardiovasculaires, de l'arthrose et autres maladies chroniques (Ferry, 2008).

Comme toute fonction physiologique, les mécanismes de glycorégulation subissent les effets du vieillissement, avec une augmentation régulière des glycémies postprandiales avec l'âge (mais qui restent dans les normes chez les non diabétiques) et une augmentation du risque d'hyperglycémie. Plusieurs facteurs interviennent dans ce vieillissement. Les modifications anthropométriques observées chez les sujets âgés vont dans le sens d'une diminution de la sensibilité à l'insuline, avec une augmentation de la masse grasse, une répartition plutôt abdominale du tissu adipeux, et une diminution de la masse musculaire. Chez les sujets âgés, le diabète constitue un véritable problème de santé publique, tant en termes d'importance

épidémiologique qu'en termes de retentissement de cette maladie sur l'état global de santé (Gonzalez et al., 2010).

La sarcopénie chez les personnes âgées est un problème de santé publique important car elle conduit au ralentissement du mouvement, à l'augmentation du risque de blessure et à la perte d'autonomie. La masse et la force musculaire sont faibles en raison d'un déclin de la transmission neuromusculaire, la structure, la fonction, le métabolisme et la performance musculaire (Heck et al., 2015). Les capacités d'anabolisme musculaire diminuent avec l'âge, Ces altérations sont dues aux modifications hormonales, comme la baisse de la sécrétion de l'hormone de croissance GH, d'IGF1 et des hormones sexuelles (Ferry, 2008). L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- α) favorise l'activation de JNK (c-jun amino terminal kinase) et IKK- β (inhibitor of κ B kinase) qui dans le muscle interfère avec la sensibilité à l'insuline, en activant la phosphorylation du IRS1.

A l'échelle moléculaire, la phosphorylation de résidu IRS1 (insulin receptor substrate 1) est responsable de l'altération de la voie de signalisation insulinique. Cette altération peut être la conséquence d'une inhibition de l'interaction IRS/récepteur insulinique. JNK et IKK- β altèrent à la fois la fonction du récepteur de l'insuline et interfèrent avec sa voie de signalisation en aval menant à une insulino-résistance (Heck et al., 2015). La Figure 1 illustre le rôle du vieillissement dans l'insulino-résistance.

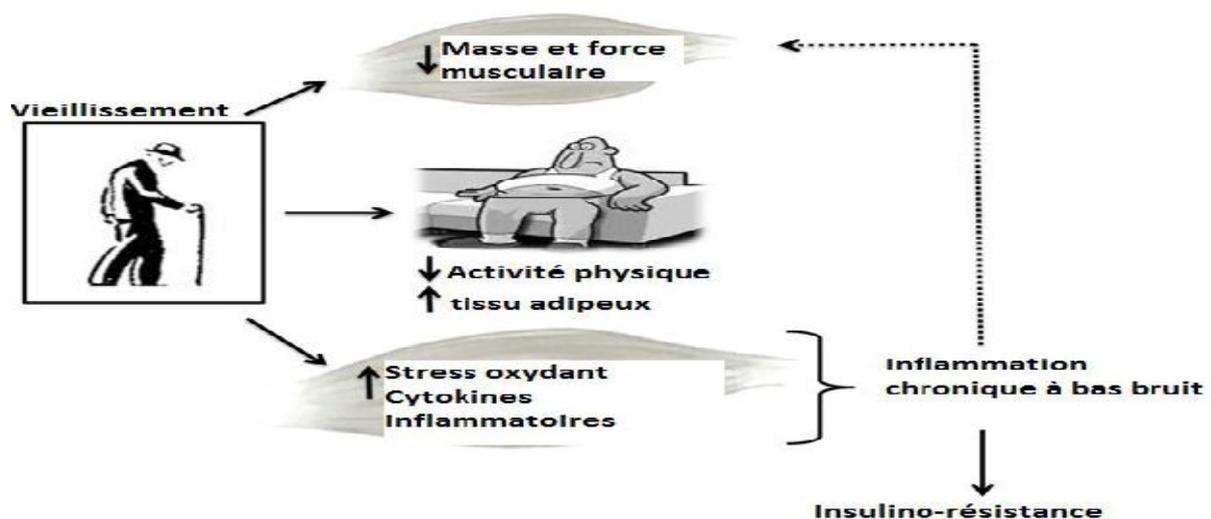


Figure 1. Rôle du vieillissement dans l'altération musculaire liée à l'insulino-résistance (Heck et al., 2015).

L'hypertension artérielle (HTA) est un facteur de risque cardiovasculaire dont l'incidence augmente avec l'âge. Au cours du vieillissement, l'HTA connaît des modifications quantitative et qualitative. Sa prévalence augmente significativement, avec une prévalence de près de 50 % pour la tranche d'âge des 60–65 ans et jusqu'à plus de 70 % pour la tranche d'âge 80–85 ans (Vogel et al., 2013).

On observe aussi chez le patient âgé des perturbations de la flore intestinale qui seraient à l'origine de l'état inflammatoire associé au vieillissement. Par conséquent, on assume que certains microbes peuvent tirer profit de nouveaux changements écologiques, menant à une variation dramatique dans la composition du microbiote d'intestin du sujet âgé. La structure du microbiote intestinal des personnes âgées saines est différente de celle des adultes jeunes en bonne santé. Ce phénomène est considéré comme un résultat du vieillissement, mais il peut également accélérer la sénescence. Des chercheurs ont comparé la flore fécale des personnes âgées (61-95 ans vieux) avec celles des jeunes adultes en bonne santé. Le recensement des bactéries totales, *Bifidobacterium veillonella* et *Eubacterium* ont été diminués sensiblement, tandis que *Clostridium perfringens* et *Lactobacillus* ont été augmentés. En outre, les fréquences de l'occurrence des *Bifidobacterium* et *Micrococaceae* ont été diminuées, alors que celles de *Clostridium perfringens* et d'autres espèces de *Clostridium* et les levures ont été augmentées significativement chez les personnes âgées comparées à celles des adultes en bonne santé. La diminution du *bifidobacterium* dans le microbiote intestinal peut être considérée comme une caractéristique importante du vieillissement (Ouwehand et Vaughan, 2006).

Il existe plusieurs théories explicatives du phénomène de vieillissement au niveau cellulaire et moléculaire à travers différentes hypothèses génétiques ou non génétiques, notamment oxydatives et celle de glycation. On dénombre plus de 350 théories du vieillissement. Alors que les théories stochastiques invoquent des événements isolés ponctuels aléatoires, comme les mutations de gènes, les théories systémiques invoquent des successions enchaînées d'événements. Dans les théories génétiques, on parle surtout de vieillissement programmé, d'une durée de vie programmée ou d'horloge biologique comme s'il existait un compteur interne à la cellule. Il semble qu'un tel compteur existe aux extrémités du chromosome sous forme du « télomère » (De Jaeger, 2011).

2. Vieillessement et stress oxydant

Les théories stochastiques attribuent un rôle prépondérant aux espèces réactives de l'oxygène. Par définition, l'oxydation désigne une réaction chimique dans laquelle un atome, un ion ou une molécule donne des électrons à son partenaire réactionnel. Ce transfert d'électrons change la chimie de la molécule réceptrice d'électrons. Un atome ou une molécule stable qui accepte un électron supplémentaire (et porte alors un électron non apparié) est appelé radical libre et peut devenir très réactif car il a un besoin intrinsèque de perdre et de transférer dès que possible cet électron supplémentaire qui est à la base de sa réactivité. L'oxygène présent en quantités élevées dans les mitochondries sera le plus souvent réduit à l'eau. Pendant ce processus, l'O₂ accidentellement reçoit des électrons supplémentaires devenant lui-même un radical (O₂⁻, radical superoxyde) et qui est alors à l'origine d'autres espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (Behl et Ziegler, 2014).

Dans la cellule, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont nécessaires pour quelques mécanismes physiologiques. Par exemple, les ERO jouent un rôle dans les voies de signalisation, l'expression des gènes et l'élimination de microbes pathogènes via la phagocytose (Behl et Ziegler, 2014). Cependant, les quantités excessives d'ERO causent des dégâts, elles peuvent endommager les composants cellulaires comme les hydrates de carbone, les acides gras polyinsaturés, l'ADN et les protéines. Par conséquent, les cellules mettent en jeu un système de défense contre les ERO. Elles contiennent une série de composés antioxydants capables de capturer et inactiver les ERO (Höhn et al., 2013).

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre entre la production des ERO soit les radicaux libres et le système de défense antioxydant mis en place pour combattre les dommages oxydatifs (Jacob et al., 2013).

Les radicaux libres sont des molécules qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés dans leur coquille externe. Ils sont très instables et réactifs, et essayent d'acquérir un électron de la molécule voisine et de déclencher une réaction en chaîne. Les radicaux d'oxygène, tels que l'anion superoxyde (O₂⁻), le radical hydroxyle (OH[·]), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical d'hypochlorite (OHCl[·]) et le radical de peroxy (ROO[·]) constituent le groupe fortement réactif des espèces de l'oxygène appelées les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les radicaux réactifs d'azote constituent également une autre catégorie de radicaux libres, tels que l'oxyde nitrique (NO) et le bioxyde nitrique (NO₂[·]), l'anion de peroxydinitrite, et l'ion de nitroxyl (Sharma et al., 2013).

La principale source endogène de production des ERO est le métabolisme mitochondrial, car la réduction de l'oxygène par la chaîne respiratoire mitochondriale produit également des radicaux d'anion superoxyde. En effet, une grande partie d'oxygène est réduite en l'eau par l'enzyme cytochrome C oxydase, mais une petite proportion des molécules de l'oxygène (1-2%) est convertie en radical d'anion superoxyde, la plupart du temps par l'intermédiaire du complexe I (NADH déshydrogénase), et le complexe III (coenzyme Q - cytochrome C - oxydoréductase). D'autres sources des ERO sont le métabolisme du cytochrome P450, l'inflammation et les facteurs environnementaux (Höhn et al., 2013).

Plusieurs études ont rapporté que dans les tissus animaux, le taux de production des ERO par les mitochondries augmente avec l'âge. Le taux d'ERO augmente aussi dans les fibroblastes sénescents et les cellules musculaires squelettiques des âgés (Beckerman et Ben Yehuda, 2009). Les radicaux libres sont neutralisés par le système antioxydant. Ce dernier fonctionne au niveau cellulaire, membranaire, et au niveau extracellulaire pour protéger contre l'attaque du radical libre. Il comporte différents composants enzymatiques incluant la catalase, la peroxydase, et des familles de dismutase aussi bien que le système de glutathion. La superoxyde dismutase (SOD) est l'enzyme qui converti le superoxyde en peroxyde d'hydrogène. la catalase élimine le peroxyde d'hydrogène, et la glutathion peroxydase élimine le peroxyde d'hydrogène produit par la SOD. En plus du système antioxydant enzymatique, des antioxydants additionnels jouent un rôle principal dans la défense contre les ERO comprenant les vitamines A, C, et E. Ces antioxydants sont classifiés dans deux groupes: ceux qui sont hydrophobes (vitamines A et E) protègent les membranes contre l'attaque du radical libre et ceux qui sont hydrophiles (vitamine C) agissent sur les radicaux libres dans le sang et le cytosol (Jacob et al., 2013).

Dans le corps, les lipides sont aussi très susceptibles à la peroxydation par les radicaux libres. Les lipides oxydés se produisent lorsqu'un atome d'hydrogène est enlevé du groupe méthyl d'un acide gras insaturé. Une fois ce processus a commencé, la peroxydation lipidique se propage comme une réaction en chaîne et elle peut endommager la membrane cellulaire en raison de la forte concentration de lipides présents dans les membranes. En outre, à la fin, les produits de peroxydation lipidique peuvent être à la fois mutagène et cancérigène et jouent un rôle dans le vieillissement (Jacob et al., 2013).

Puisque les protéines sont les molécules cellulaires les plus abondantes, il n'est pas étonnant qu'elles soient des cibles importantes pour des modifications oxydantes. Les ERO peuvent attaquer des protéines de différentes manières: directement à l'épine dorsale de la protéine, ou

sur les chaînes latérales de résidu d'acide aminé ou elles peuvent mener à la formation des protéines carbonylées (Höhn et al., 2013).

Les protéines carbonylées dérivent de l'oxydation des résidus d'acides aminés tels que l'arginine, lysine et la proline qui sont les plus touchés. Les protéines carbonylées peuvent aussi résulter des réactions des acides aminés lysine, cystéine et histidine avec les aldéhydes insaturés développés durant la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Cannizzo et al., 2011).

Deux systèmes protéolytiques sont responsables pour assurer l'entretien des fonctions cellulaires: le système proteasomal et lysosomal. Ces systèmes protéolytiques fournissent une dernière ligne de la protection antioxydante, enlevant les protéines endommagées irréversiblement et réutilisant des acides aminés pour la synthèse continue de nouvelles protéines. Mais pendant le vieillissement, les deux systèmes sont affectés et leurs activité protéolytiques diminuent de manière significative (Höhn et al., 2013).

Enfin, en ce qui concerne l'oxydation des protéines, il faut mentionner qu'une caractéristique liée au stress oxydatif dans les tissus est la glyco-oxydation, ce qui signifie l'addition chimique de sucre (glucose) sur les protéines. Cette réaction est irréversible et, en fin de compte, elle entraîne la formation des produits glyqués (AGE) (Behl et Ziegler, 2014).

Généralement, les radicaux libres entraînent la production des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF-a et IFN- γ). Il a été montré aussi que l'inflammation génère du stress oxydatif (Jacob et al., 2013). La Figure 2 illustre le rôle du stress oxydatif dans le vieillissement.

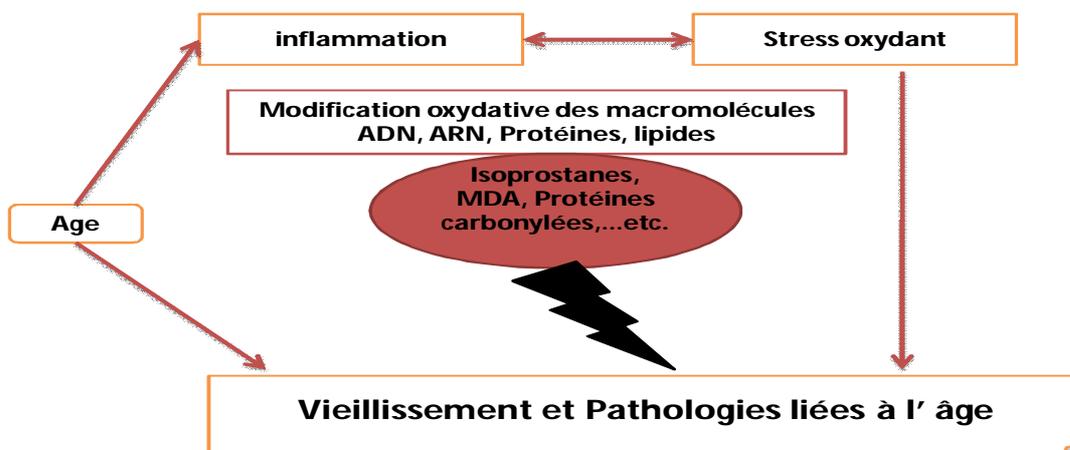


Figure 2. Rôle du stress oxydant dans le vieillissement

3. Système immunitaire et vieillissement

Le sang périphérique contient deux grandes populations de cellules: les globules rouges, et les globules blancs, qui ont comme rôle physiologique principal l'élimination des organismes pathogènes ou des composés potentiellement nocifs. Parmi les globules sanguins blancs, les lymphocytes sont particulièrement importants en raison de leur rôle central dans la réponse immunitaire. On subdivise les lymphocytes en trois genres différents qui ont des fonctions spécifiques: les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK.

Les lymphocytes T se développent dans le thymus tandis que les lymphocytes B se développent dans la moelle osseuse. Les cellules NK sont des lymphocytes cytotoxiques qui se développent aussi dans la moelle.

Les cellules B sont des lymphocytes qui portent des immunoglobulines en tant que récepteurs extérieurs. Les antigènes peuvent stimuler ces cellules pour devenir des cellules plasmiques qui synthétisent et sécrètent de grandes quantités d'un type spécifique d'immunoglobuline (Murphy, 2012).

Les lymphocytes T se développent dans le thymus, elles se répartissent en deux classes principales, les T4 qui portent la protéine de surface appelée CD4 et les T8 qui ont le CD8 à leur surface. Les cellules T CD8 sont destinées à devenir des cellules T cytotoxiques. Les cellules T CD4 naïves, en revanche, peuvent se différencier en plusieurs types de cellules T effectrices (Murphy, 2012).

Les cellules NK constituent le plus grand tiers des lymphocytes qui étaient identifiés en raison de leur capacité spontanée à combattre les cellules tumorales. Elles se développent dans la moelle à partir d'un ancêtre lymphoïde commun. Les cellules NK peuvent produire aussi des cytokines. Elles sont désignées précédemment sous le nom de cellules nulles parce qu'elles n'expriment pas les récepteurs des cellules T ou des B, ne sécrètent pas des anticorps et ne possèdent pas des récepteurs qui reconnaissent les antigènes (Khan, 2008).

Les lymphocytes T sont importants dans la réponse immunitaire contre des antigènes spécifiques. Selon le type de récepteur (TCR), les cellules T sont soit gamma delta T soit alpha bêta cellules T. Les cellules T gamma delta comprennent <5% des lymphocytes T totaux, ces cellules sont trouvées dans l'intestin et les muqueuses. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ ont un rôle majeur dans le contrôle des tumeurs, des infections et des maladies auto-immunes. Ces lymphocytes T sont encore catégorisés sur la base de l'expression des molécules de surface cellulaire CD4 ou CD8. Les lymphocytes T CD4 + ou T helper (Th) ont une faible activité cytotoxique et fournissent une aide pour d'autres cellules immunitaires lors des

réponses du corps aux micro-organismes envahissants. Les lymphocytes T CD8 + d'autre part, sont désignés sous le nom de cellules T cytotoxiques (Tc) et sont connus pour détruire / tuer les cellules qui ont été infectées par les microorganismes étrangers. Les cellules T CD4 + et TCD8 + sont importantes dans l'auto-immunité, l'asthme et ainsi dans l'immunité anti-tumorale (Kesarwani et al., 2013).

La défense de l'organisme contre l'invasion d'un pathogène dépend de la coordination d'un réseau complexe de signaux qui relie les deux bras, inné et adaptatif, du système immunitaire; les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) s'activent vis-à-vis d'une grande variété de microbes de façon à activer les lymphocytes T. Suite à la reconnaissance du pathogène, les CPA l'internalisent et présentent à leur surface des antigènes microbiens pouvant être reconnus par des lymphocytes T naïfs qui vont alors se différencier. Pendant l'activation du TCR dans un milieu de cytokine particulier, et en fonction des signaux reçus des CPA, les lymphocytes T CD4 + naïves et les cellules T CD8 + peuvent se différencier en plusieurs lignées de Th ou Tc, y compris Th1 / Tc1, Th2 / Tc2, Th9 / Tc9, Th17 / Tc17, Th22 / Tc22 et iTreg (lymphocytes T régulateurs induits) (Corvaisier-Chiron et Beauvillain, 2010; Kesarwani et al., 2013). Ces différents sous-types de lymphocytes T, classés en fonction du panel de cytokines qu'ils secrètent et de leur fonction (Álvarez-Rodríguez et al., 2012).

Les cytokines sont des peptides produits par les cellules immunitaires, dont les rôles principaux sont la régulation des mécanismes de l'inflammation, la présentation d'antigènes, la différenciation cellulaire, l'activation et le recrutement, ainsi que les processus de réparation. Ils sont produits principalement par les macrophages et les lymphocytes. Les substances considérées comme cytokines incluent les interleukines (IL) d'IL-1 à IL-25, les interférons (IFN), les facteurs de nécrose tumoraux (TNF), les chimiokines, le facteur de croissance dérivé par plaquette (PDGF), les facteurs de croissance (TGF-) β , et les facteurs de stimulation des colonies (colony-stimulating factors) (Korbut et Guzik, 2004).

Généralement, une cytokine produite par des lymphocytes est appelée une lymphokine (Hay et Westwood, 2002). Ces cytokines ont été décrites la première fois sur la base de leur activité antivirale, quoiqu'elles ne soient pas directement toxiques aux virus mais induisent diverses cellules hôtes pour montrer l'activité antivirale. L'IFN- α est un interféron qui induit l'activité antivirale et augmente la réaction des lymphocytes NK. Il stimule l'expression du système HLA des lymphocytes et empêche la croissance de variétés de cellules lymphoblastoïdes humaines. L'IFN- α peut être sécrété par des lymphocytes activés (cellules T, cellules B et macrophages). Alors que l'interféron- γ (IFN- γ) est un interféron qui stimule l'activation des macrophages, règle l'expression d'antigènes de classe II, active les lymphocytes T

cytotoxiques et induit l'activité antivirale, mais faible comparé aux IFN- α et - β). L'IFN- γ peut être préparé à partir des lymphocytes et des lignées activées de cellules T (Hay et Westwood, 2002). La fonction et la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2 ont été largement étudiées (Figure 3). Les microbes pathogènes intracellulaires conduisent les cellules T à se différencier en des cellules auxiliaires de type 1 (Th1) qui sont caractérisées par la sécrétion de IL-2 et l'IFN- γ (Berer et Krishnamoorthy, 2012). Les Th1 sont générés principalement par l'interleukine (IL)-12 et l'IFN- γ produits par les cellules de l'immunité innée.

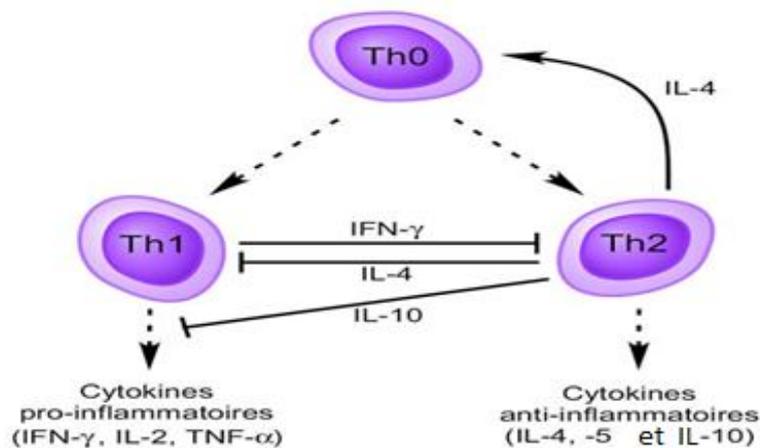


Figure 3. Balance lymphocytaire Th1/Th2 (Hellal, 2007)

Les cytokines induisent la différenciation des lymphocytes Th1 via des signaux transducteurs et activateurs de transcription STAT4 (signal transducer and activator of transcription) et STAT1 et le facteur de transcription T-bet. Par contre, les lymphocytes Th2, requis pour l'immunité humorale, notamment pour l'élimination des helminthes et de différents pathogènes extracellulaires, produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 et se différencient sous l'action de l'IL-4, GATA3 (GATA binding protein 3) et STAT6 (Figure 4) (Corvaisier-Chiron et Beauvillain, 2010).

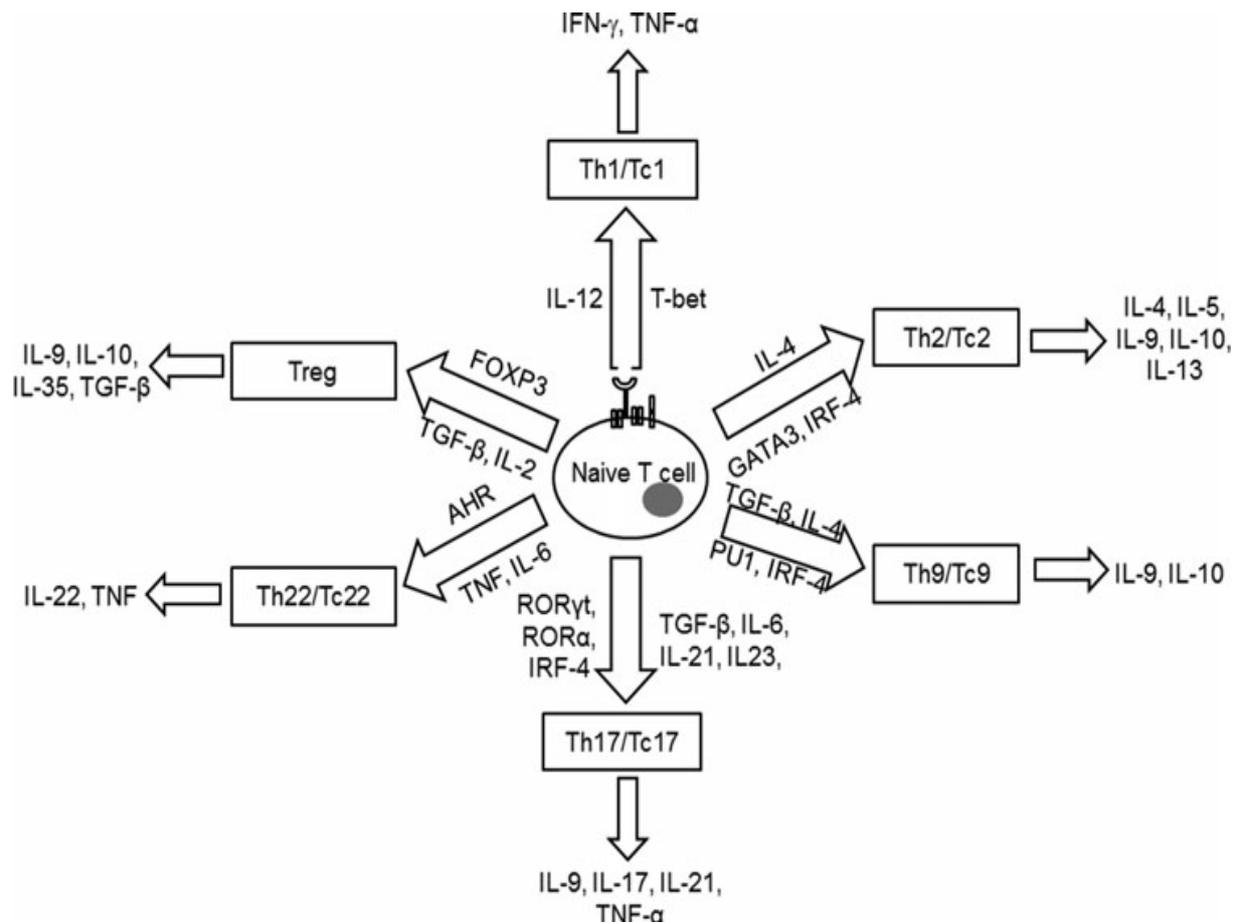


Figure 4. Différenciation des lymphocytes T naïfs en différents sous-populations dans une réponse immunitaire normale (Kesarwani et al., 2013)

Avec le vieillissement, l'individu augmente sa production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-15, l'IL-8 et certains facteurs de la coagulation. Enfin, un lien entre le profil inflammatoire et la genèse des cancers, première cause de mortalité dans les pays industrialisés, a été également fortement évoqué (Bauduer, 2011).

Le vieillissement est surtout accompagné par des changements qualitatifs et quantitatifs au niveau du système immunitaire. In vitro, la réponse proliférative des lymphocytes à la Phytohemagglutinine (PHA) et la Concanavalline A est déprimée avec l'âge (Meydani et al., 1991). Ce processus, également appelé immunosenescence, est suivi de changements profonds des sous-populations des lymphocytes T, des répertoires d'identification d'antigène, et des fonctions effectrices. Par conséquent, les individus âgés montrent une susceptibilité accrue aux néoplasies, aux infections et aux maladies auto-immunes (Álvarez-Rodríguez et al., 2012).

L'immunosenescence est une diminution de la capacité du système immunitaire à répondre aux antigènes étrangers, aussi bien qu'une capacité diminuée de maintenir la tolérance aux

antigènes du soi. Ceci a comme conséquence une susceptibilité accrue aux infections, aux cancers, et une réduction des réponses à la vaccination. Les mécanismes à la base de l'immunosénescence comprennent une série des événements cellulaires et moléculaires comportant le changement de plusieurs voies biochimiques et différentes populations cellulaires (Cannizzo et al., 2011).

Le vieillissement affecte à la fois l'adaptation et le système immunitaire inné. Chez les personnes âgées, un dysfonctionnement progressif des réponses immunitaires a été signalé, spécifiquement dans l'homéostasie des lymphocytes T, avec un changement dans le profil cellules mémoire / cellules naïves et dans le rapport Th1/Th2 (Garg et al., 2014).

Le vieillissement immunitaire se traduit surtout par une diminution inexorable de l'immunité à médiation cellulaire, une commutation progressive Th1-Th2 qui traduirait la diminution progressive du système Th1 et donc de l'immunité à médiation cellulaire, avec une préservation relative du système Th2 stimulateur de l'immunité humorale, une augmentation des cellules mémoires et de moindre capacité proliférative, en réponse à une agression. Ces modifications expliqueraient la plus grande fragilité des sujets âgés aux «germes intracellulaires », notamment lors des infections virales (Lesourd, 2004).

Outre l'involution chronique du thymus, la production diminuée de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'expression de son récepteur, plusieurs mécanismes contribuent à l'immunosénescence. Les infections chroniques par le cytomégalovirus (CMV) peuvent promouvoir des changements immunitaires avec l'âge, associés à la prédisposition génétique conduisant à une tendance accrue vers incontrôlée des réponses inflammatoires, aux changements hormonaux, tels que la diminution de la production d'œstrogène ou d'androgène influencent également la sécrétion de cytokines. Les altérations de la fonction mitochondriale et les changements métaboliques dans le tissu adipeux contribuent aussi à l'immunosénescence et à l'inflammation de la personne âgée (Deleidi et al., 2015). D'autres facteurs, en particulier les facteurs suppresseurs produits par les macrophages contribuent indirectement à la baisse de la fonction des cellules T avec le vieillissement. Parmi eux, la prostaglandine (PG) E2 peut inhiber directement la prolifération des lymphocytes T (Pae et al., 2012).

Quelques études sur les changements d'immunité cellulaire pendant le vieillissement ont signalé que le nombre absolu de lymphocytes T et B a tendance à diminuer avec l'âge, les proportions de cellules NK parmi les lymphocytes périphériques du sang sont restées sans changement ou même ont augmenté, et les proportions de sous-population des cellule T ont également changé avec le vieillissement (Wu et al., 2012).

L'immunosenescence est caractérisée par un taux accru d'apoptose cellulaire, une auto-immunité, une involution thymique, un changement au niveau du répertoire des lymphocytes T, et une accumulation des cellules T mémoires en faveur des cellules effectrices (Ostan et al., 2006).

Les études cliniques indiquent qu'avec l'avancement de l'âge, les réactions immunes contre les antigènes de rappel peuvent être conservées, mais la capacité de montrer des réactions immunitaires contre de nouveaux antigènes diminuent d'une manière significative, ceci peut avoir comme conséquence une susceptibilité plus élevée aux maladies infectieuses et peut limiter l'efficacité des stratégies de vaccination chez les personnes âgées (Bucci et al., 2009).

Pendant le vieillissement, le système immunitaire subit une série de phénomènes relatifs à l'âge, parmi lesquels une modification profonde dans le profil de cytokines. Le dispositif typique de ce phénomène est une augmentation générale des niveaux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 (Bucci et al., 2009; Stowe et Goodwin, 2011).

Le vieillissement cause beaucoup de changements de l'immunité adaptative, qui se manifestent surtout par la régression du thymus, la détérioration dans son architecture interne, qui s'accompagne de l'accumulation des adipocytes, des défauts en cellules épithéliales thymiques et une incapacité d'exporter un nombre suffisant de lymphocytes T naïves vers la périphérie (Woods et al., 2013).

L'involution thymique mène également à un taux diminué des lymphocytes T régulateurs (Treg) après l'âge de 50 ans et pourrait contribuer aux phénomènes relatifs à l'âge tels que l'auto-immunité et l'inflammation. Au cours du vieillissement, il y a une émergence des cellules immunitaires sénescentes, caractérisées par une capacité de prolifération réduite, un raccourcissement des télomères, et une résistance accrue à l'apoptose. Ces cellules sont généralement des T CD28⁻. Ces cellules peuvent également sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Lang, 2014).

Ainsi, certains changements les plus marqués avec l'âge sont la diminution du taux de prolifération lymphocytaire et la diminution de plusieurs cytokines impliquées dans ce processus tel que l'IL-2 (De la Fuente, 2014).

Une diminution de la réponse proliférative des lymphocytes aux antigènes spécifiques ou aux mitogènes non spécifiques est l'un des changements relatifs au vieillissement. La réponse diminuée aux mitogènes est due à un nombre de facteurs variables, y compris le nombre réduit des cellules et la capacité diminuée de leur réponse proliférative (Stowe et Goodwin, 2011).

Avec l'âge, les lymphocytes humaines expriment une réponse proliférative faible vis-à-vis des mitogènes suggérant que le stimulus mitogénique induit un stress qui n'est pas toléré par les lymphocytes des sujets âgés comparés à ceux des sujets jeunes (Beckerman et Ben Yehuda, 2009).

Au cours du vieillissement, la composition membranaire des lymphocytes TCD3+ change. La fluidité des radeaux lipidiques des lymphocytes T CD3 + des personnes âgées en bonne santé a été diminuée, probablement à la suite de la surcharge de cholestérol. Les radeaux lipidiques sont des zones spécialisées de la membrane plasmique caractérisées par une teneur élevée en cholestérol, en glycosphingolipides et en sphingomyéline. Ces domaines lipidiques particuliers sont plus rigides que les autres zones de la membrane. Les radeaux lipidiques recrutent des protéines spécifiques impliquées dans la signalisation cellulaire, le transport, la régulation de la survie cellulaire, et d'autres événements cellulaires majeurs. Ces structures dynamiques contrôlent l'activation des lymphocytes T et les réponses immunitaires (Larbi et al., 2006).

Il est bien connu que la membrane des lymphocytes T des sujets âgés est plus rigide que celle des jeunes sujets. La concentration en cholestérol est 1,6 fois plus élevée dans la fraction membranaire des lymphocytes TCD4 + et T CD8 + des sujets âgés par rapport aux jeunes individus (Fulop et al., 2009). La cause de l'augmentation de la concentration du cholestérol dans les cellules T avec le vieillissement peut être le résultat d'un déséquilibre dans le métabolisme cellulaire du cholestérol (Larbi et al., 2006).

Il apparaît évidemment que la réduction de la prolifération des cellules T chez les personnes âgées peut être attribuée au taux élevé du cholestérol par rapport aux phospholipides dans les membranes des lymphocytes, ce qui augmente la viscosité de la membrane cellulaire et réduit la prolifération des lymphocytes. Toutefois, des données récentes sur les lymphocytes T montrent que la prolifération ne peut être que partiellement restaurée si les lymphocytes T âgés sont incubés avec la cyclodextrine qui extrait le cholestérol de leurs membranes plasmiques. Ce rapport suggère que la diminution de la prolifération lymphocytaire avec l'âge ne peut pas être complètement expliqué par le taux réduit de cholestérol de la membrane (Collison et al., 2005). En outre, les insuffisances dans les récepteurs IL-2 sur des cellules de T pourraient être une autre cause de l'altération de la prolifération des cellules T (Wu et al., 2012).

Au niveau moléculaire, les modifications post-traductionnelles des protéines observées au cours du vieillissement incluant la glutathionylation et la carbonylation affectent directement les fonctions des lymphocytes T et B, bien que l'activité de quelques protéines soit intacte,

l'activité des autres (enolase et phosphogluconolactase 6) peut être inhibée. Le glutathion, principal thiol libre soluble de faible masse moléculaire chez la plupart des organismes, a été récemment impliqué dans une modification post-traductionnelle réversible appelée glutathionylation, pouvant permettre la régulation d'activités enzymatiques, et/ou la protection des thiols libres et réactifs des protéines contre une oxydation irréversible, mais peut également moduler, positivement ou négativement, l'activité des protéines. Ainsi, l'affaiblissement de la fonction enzymatique globale peut se produire dans les lymphocytes des sujets âgés due à l'augmentation des protéines oxydées ou modifiées (Cannizzo et al., 2011).

Il a été aussi montré que les récepteurs membranaires lymphocytaires impliqués dans la reconnaissance immunitaire sont directement affectés par le stress oxydatif. Durant le vieillissement, la carboxylation oxydative des molécules signalisatrices et adaptatrices impliquées dans la transduction du signal TCR influence directement l'intensité et la longueur du signal qui suit l'engagement du TCR. De même, le stress oxydatif induit une dysrégulation de la signalisation chez les lymphocytes B. Finalement, l'inactivation oxydative de la protéine tyrosine phosphatase CD45 contribue au dysfonctionnement des lymphocytes T des personnes âgées (Cannizzo et al., 2011).

Un deuxième lien entre le stress oxydatif et l'immunosénescence est l'induction de l'apoptose cellulaire résultant de l'accumulation des agrégats moléculaires oxydés. L'apoptose est impliquée dans les changements du système immunitaire des âgées, incluant la régression thymique et les changements au niveau des lymphocytes T. À cet égard, le stress oxydant contribue à induire l'apoptose via l'augmentation du nombre de cellules subissant la mort cellulaire en raison de l'accumulation des molécules endommagées par oxydation, comme il a été montré chez les leucocytes humains âgés. En fait, on a observé que les neutrophiles et les lymphocytes non stimulés isolés des patients vieux accumulent des taux plus élevés des ERO, présentent une activité diminuée de SOD, et sont moins résistantes à l'apoptose comparés à ces mêmes cellules obtenues à partir des individus jeunes (Espino et al., 2012).

La Figure 5 résume les modifications oxydatives des cellules immunitaires lors du vieillissement.

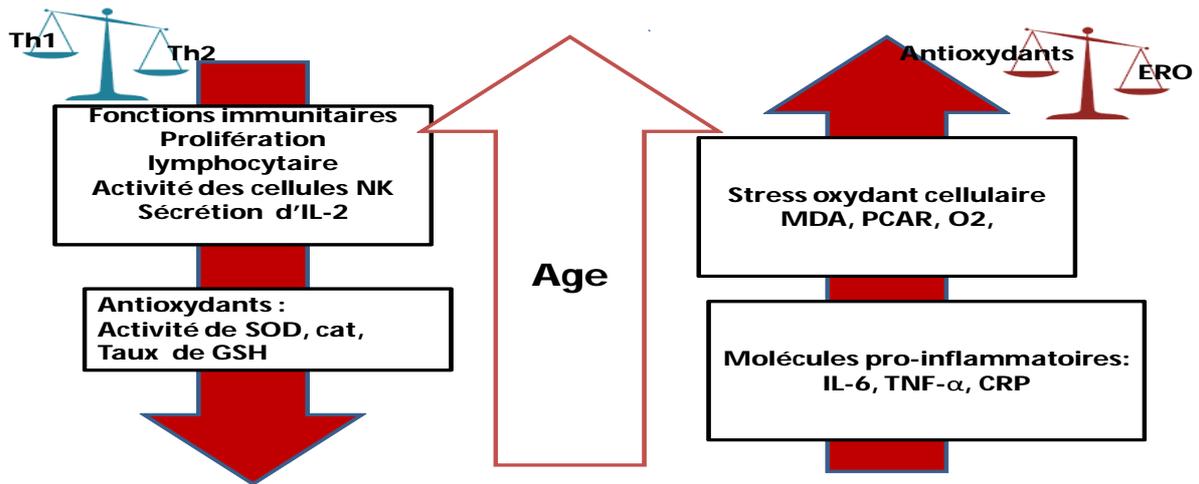


Figure 5. Changements de la fonction oxydante et des paramètres inflammatoires des cellules immunitaires avec l'âge (De la Fuente, 2014)

En plus, des niveaux élevés en ERO contribuent à la suppression des cellules Th1 et la stimulation d'une réponse Th2 (Figure 6) marquée lors de vieillissement. En outre, l'excès en ERO augmente l'expression des gènes pro-apoptotiques FasL et Bim, par contre de faibles concentrations en ERO et RNS permettent l'expression des gènes anti-apoptotiques (Kesarwani et al., 2013).

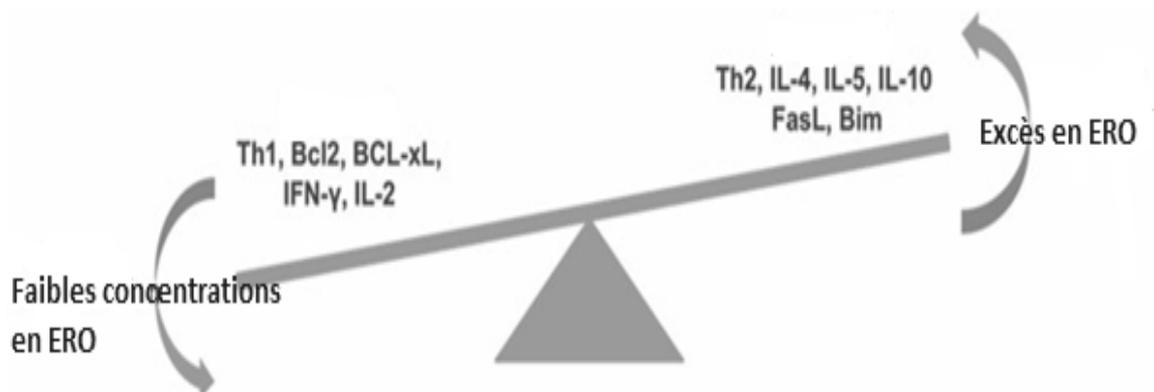


Figure 6. Contrôle de la balance Th1/Th2 par les ERO (Kesarwani et al., 2013)

4. Nutrition, immunité et vieillissement réussi

L'alimentation, tant sur le plan quantitatif que qualitatif, a un impact sur l'espérance de vie et la santé. Les carences nutritionnelles contribuent d'une façon directe ou indirecte dans la survenue de différents types de pathologies et désordres chez les mammifères, comme le montre la Figure 7.

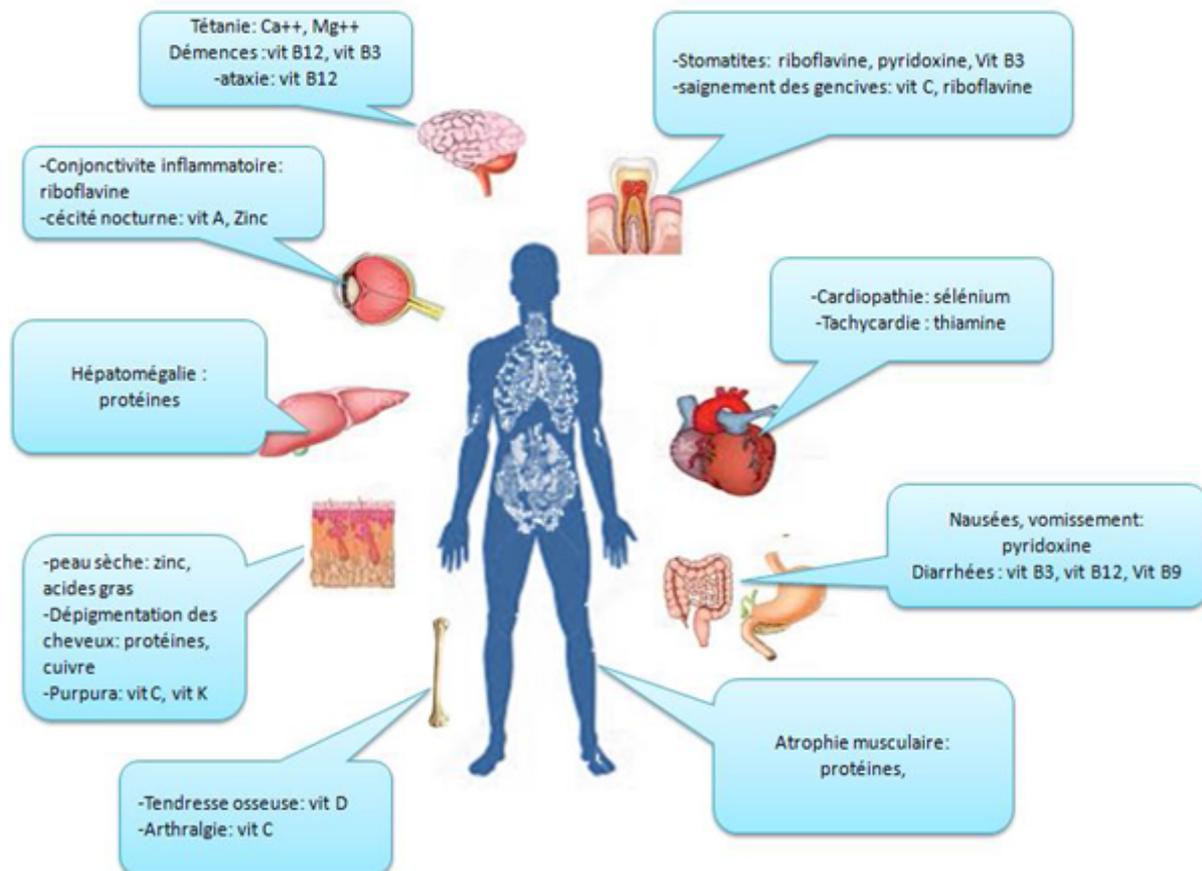


Figure 7. Effets des carences nutritionnelles sur l'organisme humain

(Hirbod-Mobarakeh et al., 2014)

Les sujets âgés sont prédisposés à la malnutrition car ils mangent souvent moins que les plus jeunes, en raison de modifications physiologiques, comme les difficultés de mastication ou de déglutition, la diminution de l'odorat et du goût avec l'âge. Ils sécrètent moins d'acide chlorhydrique nécessaire à la digestion des aliments, et l'absorption intestinale diminue, entraînant une moins bonne biodisponibilité des macro- et surtout des micronutriments. Les personnes âgées ont de plus une consommation importante de médicaments qui modifie également l'absorption intestinale. Enfin, les conditions psychosociales défavorables, le

veuvage, la perte de revenus, l'isolement et la solitude sont d'autres facteurs qui contribuent à la malnutrition chez les vieillards (Ferry, 2013). Les différents facteurs responsables de la malnutrition des personnes âgées sont résumés dans la Figure 8.

Le problème de dénutrition est très fréquent chez les personnes âgées; différents outils nutritionnels ont été développés pour détecter le risque de malnutrition chez cette catégorie de population dans le but d'évaluer le degré d'immunosénescence et afin de choisir de meilleures stratégies nutritionnelles d'intervention. Le screening nutritionnel est une première étape mise en ligne pour l'évaluation du statut nutritionnel chez les âgés. A ce jour, différents questionnaires ont été développés comme le MNA (Mini Nutritional Assessment) qui classe les sujets âgés en trois catégories en fonction de leur statut nutritionnel (Hirbod-Mobarakeh et al., 2014).

La perte de poids corporel peut être un signe de dénutrition chez les âgés. Un index de masse corporelle (IMC) inférieur à 21 est un seuil pertinent pour définir la dénutrition de la personne âgée. Le Simplified Nutritional Assessment Questionnaire (SNAQ) comporte quatre questions prédictives d'une perte de poids significative pendant les 6 mois précédents chez les âgés. Les questions portent sur l'appétit, la satiété, le goût des aliments et le nombre de repas par jour. Un score ≤ 14 indique un haut risque de perte de 5 % de son poids au cours des 6 prochains mois. Le dosage sanguin de l'albumine est parmi les examens de laboratoires usuels pour détecter la malnutrition. L'hypo-albuminémie est clairement associée au risque de morbidité et mortalité chez la personne âgée (Rolland et al., 2015).

La notion de «Vieillesse réussie» est décrite pour la première fois par Rowe et Kahn en 1987 comme un vieillissement sans pathologie ni handicap, permettant un niveau élevé d'activité physique et de fonction cognitive et s'accompagnant d'un engagement, voire d'activités dans la vie sociale.

La nutrition joue un rôle sur pratiquement tous les facteurs de sénescence. La nutrition « optimale » est l'un des facteurs modifiables le plus accessible pour moduler le vieillissement par des stratégies ciblées pour favoriser le vieillissement réussi. L'une des premières stratégies est l'identification des personnes à risque de pathologies nutritionnelles, qu'elles soient en surcharge ou en déficit, voire présentant des carences et la dénutrition (Ferry, 2008).

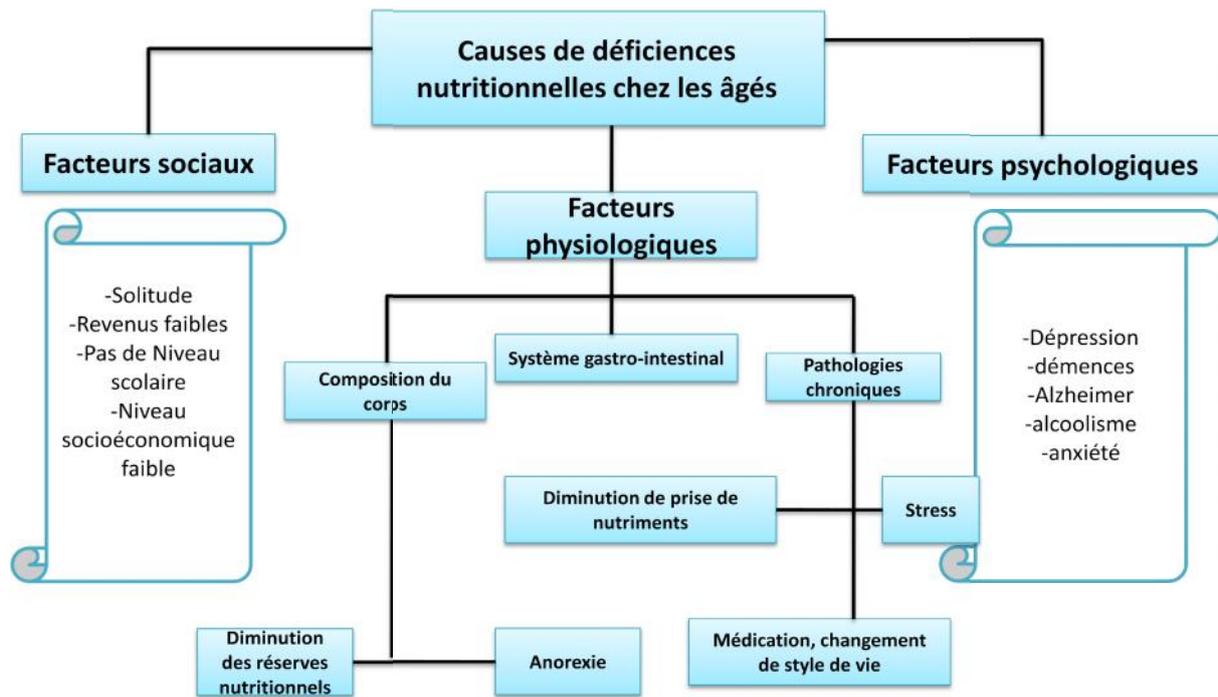


Figure 8. Facteurs qui causent la malnutrition chez les personnes âgées
(Hirbod-Mobarakeh et al., 2014)

Des preuves expérimentales existent pour affirmer que la restriction calorique entraîne une prolongation de la durée de vie chez des modèles animaux. Ce phénomène est probablement transposable à l'homme. La restriction diététique est généralement la stratégie anti-âge la plus utilisée. Elle prolonge la vie chez toutes les races des souris et des rats, dont le protocole de la restriction varie dans le régime adopté et la durée, avec une réduction de 10 à 60 % des calories pendant une semaine ou plusieurs mois. Selon les études, la restriction en calories chez les souris a conduit à une réduction des taux des radicaux libres (Walsh et al., 2014).

Des habitudes alimentaires jugées favorables sont relevées dans certaines populations comme par exemple le fameux « régime crétois ». Il existe une corrélation entre la proportion de cholestérol et de graisses saturées dans l'alimentation et la mortalité cardiovasculaire (Bauduer, 2011). Le régime méditerranéen, ou régime crétois, correspond aux habitudes alimentaires des populations du pourtour de la mer méditerranée. Il se caractérise par une consommation abondante de fruits, légumes, féculents, légumineuses, fromages. Ce régime est assez pauvre en sucres rapides ainsi qu'en viandes rouges (Leger-Guist'hau, 2011). Plusieurs études montrent les effets bénéfiques de ce régime sur la longévité. Ce régime contient un niveau plus bas en lipides saturés avec 25 à 42 % en énergie. Dans ce régime, la

source protéique est surtout les poissons et la viande rouge de la ferme. On signale aussi que les fromages d'origine du lait de chèvre contiennent un taux plus bas en cholestérol par rapport à ceux fabriqués à base du lait de vaches (Accardi et al., 2014).

Ce régime alimentaire est organisé en trois repas, et inclut des quantités réduites d'hydrates de carbone, graisse saturée, viandes rouges et bonbons de raffinage, et une prise élevée des fruits et légumes, grains entiers, aussi bien qu'une grande consommation d'huile d'olive (Dato et al., 2013). Donc, l'adhérence à long terme au régime méditerranéen peut favoriser le statut anti-inflammatoire et peut prévenir les maladies inflammatoires incluant les cancers et les maladies cardiovasculaires et permettant un vieillissement en bonne santé (Accardi et al., 2014).

Le statut nutritionnel peut influencer le vieillissement et l'immunité. Il joue aussi un rôle primordial dans le développement et la progression des maladies chroniques (Tsai et al., 2008) . Quelques auteurs ont rapporté à cela les carences en macro- et micronutriments chez les vieillards, strictement liées aux affaiblissements globaux des fonctions immunitaires avec une défense limitée contre les maladies liées à l'âge. En revanche, les études longitudinales récentes sur la consommation alimentaire chez les sujets vieux ont montré qu'une consommation proportionnée de micro et de macro- nutriments ainsi qu'un contenu satisfaisant de quelques oligoéléments dans les cellules mènent à de bonnes exécutions dans plusieurs fonctions immunitaires. Par conséquent, les facteurs nutritionnels peuvent jouer un rôle pivot dans l'immunosénescence afin d'atteindre un vieillissement et une longévité en pleine santé (Mocchegiani et Malavolta, 2009).

La malnutrition, la consommation de protéines insuffisante, la déficience en vitamines (particulièrement vitamines A, C et E avec des activités antioxydantes) et l'insuffisance en oligoéléments (particulièrement zinc, qui est crucial pour la prolifération des lymphocytes) peuvent avoir comme conséquence une altération des fonctions immunitaires chez les âgés (Wu et al., 2012).

L'importance du zinc dans l'immunité est bien établie en particulier pour son rôle dans l'entretien de la fonction thymique et dans la production et l'exportation des lymphocytes T à la périphérie ; des doses équilibrées en zinc peuvent également être importantes dans le maintien de la fonction des cellules NK (Woods et al., 2013). Le zinc joue un rôle prépondérant dans de différentes fonctions biologiques y compris la réplication d'ADN, la transcription d'ARN, la transduction du signal, la catalyse enzymatique, la régulation redox, la prolifération et la différenciation cellulaire et l'apoptose. La déficience en zinc provoque une réduction du nombre de lymphocytes T.

A l'échelle moléculaire, le zinc active les lymphocytes en stimulant l'autophosphorylation de la protéine tyrosine kinase Lck. Le zinc aussi induit la production de l'IFN- γ tout en augmentant l'expression des gènes codants pour IL-2 et IFN- γ . De ce fait, la carence en zinc conduit à un profil Th2 (Overbeck et al., 2008). L'insuffisance en zinc affecte presque 30% des personnes âgées et la supplémentation en zinc chez les vieux a montré des effets significatifs sur la balance Th1/Th2, IL-10, et autres cytokines pro-inflammatoires (Schmitt et al., 2013).

La majorité de personnes âgées ont également un taux bas en magnésium. Ce minéral est également connu pour avoir un rôle dans l'immunité, particulièrement chez les personnes âgées où l'insuffisance en magnésium peut accélérer l'involution thymique et l'augmentation de l'inflammation (Woods et al., 2013). Le Magnésium est directement impliqué dans un nombre important de réaction biochimiques. Il est le cofacteur de plus de 300 enzymes et en particulier pour ceux impliqués dans l'utilisation et le transfert d'ATP (Gröber et al., 2015).

Les vitamines sont des substances organiques indispensables, sans valeur énergétique propre, que l'Homme ne synthétise pas, ou en quantité insuffisante. Aujourd'hui, seules treize molécules répondent à cette définition. Si elles ne sont pas apportées par l'alimentation, des troubles fonctionnels puis anatomiques apparaissent, qui s'avèrent fatals à plus ou moins longue échéance. Leur solubilité dans les milieux aqueux ou lipidiques permet de les diviser en deux grands groupes, les vitamines liposolubles (A, E, D, K) et les vitamines hydrosolubles (groupe B, C) (Ferry, 2013). Les principales sources de vitamines sont données dans le Tableau 2.

La vitamine A (rétinol) est un micronutriment liposoluble qui est exigé par tous les vertébrés pour la vision et le fonctionnement normal des tissus épithéliaux, le système immunitaire, et la reproduction (Ross, 2013). Selon l'OMS, l'insuffisance en vitamine A reste un problème alimentaire majeur dans le monde entier surtout dans les pays sous développés (Budowski et Sklan, 1989).

La vitamine A a été découverte en 1913 comme facteur essentiel de croissance et de survie pour les jeunes rats (Ross, 2013). La vitamine A est un terme qui désigne tout composé qui possède l'activité biologique du rétinol. Ce dernier peut être disponible pour le corps humain sous forme rétinyl d'ester trouvé dans le lait, les œufs, le foie ; ou en forme de provitamine A d'origines végétales tel que les carottes et le poivron rouge, dont le β -carotène représente le précurseur le plus important pour la synthèse de l'acide rétinoïque (Rhee et al., 2012).

Tableau 2. Principales sources alimentaires de vitamines
(Limbach et Guillard, 2007; Bergstrom et al., 2012; Looker et al., 2011).

| Vitamines | Sources alimentaires principales | Concentrations physiologiques dans le plasma ou sérum sanguin humain |
|-----------|--|--|
| A | Foie, matières grasses animales, légumes et fruits jaunes orange, huile de palme | Rétinol : 2 μ M |
| C | Fruits et légumes | 50 μ M |
| E | Huiles végétales, oléagineux | 30 μ M |
| D | Poissons, Foie, matières grasses animales | 50-125 nM |
| K | Choux, persil, épinard, salades | ND |
| B1 | Viande, poisson, levure, abats | 10 nM |
| B2 | Levure, abats, produits laitiers | 15 nM |
| B3 | Viande, poisson, céréales, champignons | 80 nM |
| B5 | Produits animaux, champignons, céréales, fruits, légumes | ND |
| B6 | Levure, produits animaux, céréales | 50 nM |
| B8 | Abats, oeufs, produits laitiers, viande | ND |
| B9 | Levure, Foie, légumes verts | 5 nM |
| B12 | Produits animaux | 0.25 nM |

ND : non déterminée (pas de données)

La vitamine A a été depuis longtemps connue comme un facteur alimentaire essentiel pour l'immunité normale (Figure 9). Dans les années 20, la vitamine A a été appelée « la vitamine anti-infectante » basée sur des expérimentations sur des animaux déficients de cette molécule (VAD). Les animaux VAD demeurent plus susceptibles aux infections alors ceux qui ont un taux normal de vitamine A ont été protégés (Ross et al., 2011).

Les études réalisées sur des animaux suggèrent que l'insuffisance en vitamine A puisse mener à un nombre plus élevé en macrophages, à un taux accru en IL-12 produit par ces cellules, en favorisant le développement des lymphocytes Th1, et par la suite à la production d'un taux accru d'IFN- γ . L'insuffisance en vitamine A altère également le développement normal des neutrophiles, ce qui peut abaisser la capacité de phagocytose et de tuer les bactéries. Cependant, une association évidente entre la vitamine A et les fonctions de neutrophiles chez l'homme est limitée (Darnton-Hill et Ahmed, 2010). La vitamine A possède des propriétés anti-inflammatoires, elle stimule la différenciation des Th0 en Th2, elle induit donc la

synthèse des cytokines anti-inflammatoires. D'ailleurs, l'acide rétinoïque avec la TGF- β permettent la différenciation des cellules Treg et inhibent l'induction des Th17 et Th1 (Ross, 2012).

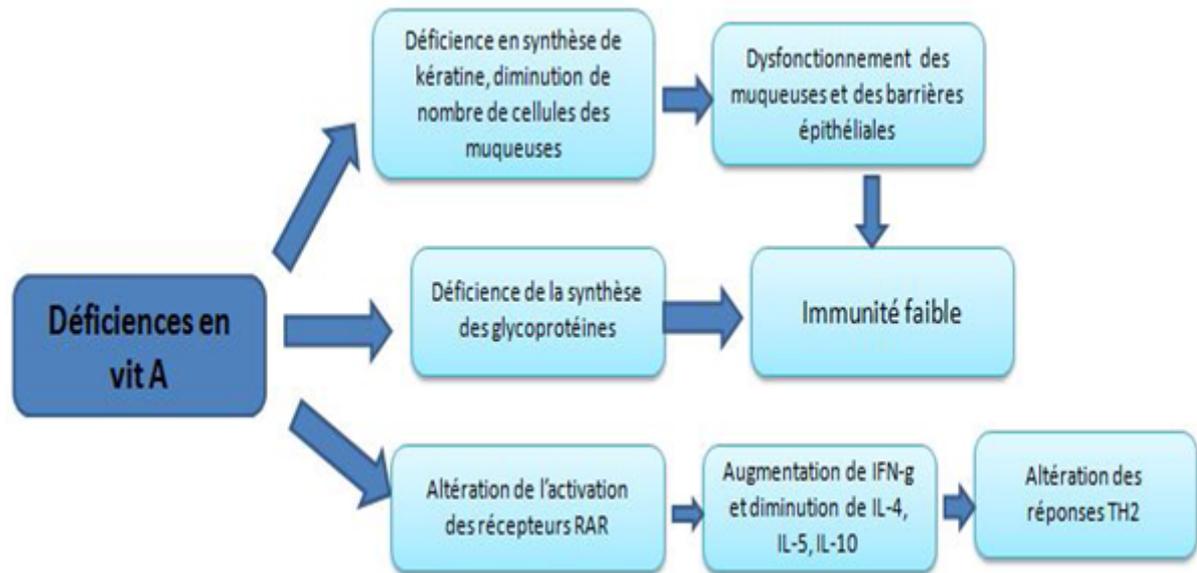


Figure 9. Effets directs ou indirects de la déficience en vitamine A sur l'immunité (Hirbod-Mobarakeh et al., 2014)

La plupart des animaux, sauf l'Homme, les autres primates et le cobaye, synthétisent l'acide L-ascorbique (vitamine C), un micronutriment essentiel, qui a été impliqué dans une variété de processus biologiques, y compris la réponse immunitaire. La vitamine C représente le principal antioxydant en milieu aqueux. Elle se comporte plutôt comme un agent redox : c'est un antioxydant, bloquant la production des radicaux libres, et aussi un oxydant puissant, lorsque du fer se trouve à l'état libre dans le cytoplasme (Limbach et Guillard, 2007).

L'acide L-ascorbique est un cofacteur pour beaucoup d'enzymes telles que des hydroxylases et la mono-oxygénase impliquée dans la synthèse du collagène, la carnitine et les neurotransmetteurs. Cette molécule stimule le système immunitaire en augmentant la prolifération des cellules T. De plus, l'acide ascorbique bloque les voies qui mènent à l'apoptose lymphocytaire (Naidu, 2003). Le statut vitaminique C est habituellement évalué à l'aide du dosage plasmatique de l'acide L-ascorbique. La carence en vitamine C ou scorbut

survient en cas de dénutrition sévère et se caractérise par des manifestations hémorragiques, des troubles de l'ossification, des lésions gingivales, une grande fatigabilité et une tendance aux infections.

La vitamine E est considérée comme la défense antioxydante principale contre la peroxydation de lipides dans les cellules mammifères. La plupart des études de nutrition prouvent que la supplémentation en vitamine E d'origine alimentaire est inversement liée avec la mortalité chez les personnes âgées (Visioli et Hagen, 2007). Des valeurs inférieures à 10-14 $\mu\text{mol/L}$ indiquent un risque élevé de carence en vitamine E (Limbach et Guillard, 2007). Indépendamment de sa propriété antioxydante, on a rapporté que la vitamine E stimule également la réponse immunitaire et module des systèmes de réparation d'ADN, les voies de transduction du signal, et les gènes impliqués dans le stress oxydant, la prolifération, l'inflammation et l'apoptose (Mocchegiani et al., 2014). D'ailleurs, elle module les fonctions immunitaires cellulaires chez les adultes et les sujets âgés (De la Fuente et al., 1998).

Han et al. (2006) ont montré que la vitamine E influence l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire lymphocytaire, de plus elle favorise un profil immunitaire Th1 mais sans influencer le rapport cellules naïves/cellules mémoires. Par contre, la vitamine E augmente spécifiquement la production d'IL-2 chez les cellules naïves et non pas chez les cellules mémoires.

La Vitamine B3 (Niacine) est indispensable pour toutes les cellules vivantes. Le NADH, forme active de la vitamine B3, est un coenzyme principal pour des réactions métaboliques énergétiques. Il joue des rôles significatifs dans la mort des cellules et dans l'homéostasie calcique. Des études multiples ont également suggéré que le NADH puisse produire des effets antioxydants directs (Cao et al., 2016). Le NADH est un cofacteur qui peut donner des électrons à la chaîne respiratoire par la NADH-déshydrogénase, en régénérant le NAD^+ (Kern et al, 2014). Le NADH joue aussi un rôle important dans le système immunitaire en induisant la sécrétion des cytokines des leucocytes périphériques (Ying, 2008). L'administration du NADH peut également améliorer des fonctions cognitives (Demarin et al., 2004).

Les lipides alimentaires sont une source d'énergie cellulaire. Ils sont divisés en acides gras saturés ou insaturés. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont classés en n-3 et n-6 en se basant sur la position de la double liaison finale. Les deux acides gras polyinsaturés : acide linoléique (LA, 18:2n-6), acide linoléique (ALA, 18:3n-3), ne sont pas synthétisés par le corps humain, ils sont appelés essentiels. Ils ont des fonctions métaboliques diverses. Ils régulent de multiples voies métaboliques en modulant certains processus de signalisation

intracellulaire, ainsi que l'expression de gènes cibles via l'activation spécifique de facteurs de transcription (Fritsche, 2015).

L'huile de tournesol et de soja sont les deux principales sources en AGPI n-6, alors que l'huile de poisson, de noix et de lin sont les sources en AGPI n-3.

Les AGPI modulent la synthèse des cytokines, la prolifération lymphocytaire, l'expression des molécules de surface et l'apoptose. Ces lipides ont un effet sur l'équilibre de cytokines (IL-2 et TGF-béata) et la fonction immunitaire. Les AGPI n-6 (acide linoléique) augmentent généralement les niveaux des cytokines pro-inflammatoires et des prostaglandines inflammatoires (PGs), alors que les AGPI n-3 (acide eicosapentaenoïque, EPA et acide docosahexaenoïque, DHA) peuvent diminuer les niveaux de ces cytokines et PGs inflammatoires (Venkatraman et Pendergast, 2000).

Les AGPI n-3 exercent un effet suppressif sur les lymphocytes par la modulation de la fluidité membranaire et la composition des radeaux lipidiques via la réduction du taux de cholestérol et de sphingolipides. Ces lipides inhibent la prolifération lymphocytaire et stimulent la mort cellulaire (Figure 10) (Campoio et al., 2011). On a montré que les AGPI n-3 inhibent l'activation et les fonctions des cellules T en altérant la signalisation moléculaire liée aux radeaux lipidiques (Turk et Chapkin, 2013)

De multiples études à l'échelle internationale ont montré les effets immuno-modulateurs des nutriments in vitro (Dawson et al., 2006; Hernandez et al., 2008; Molina et al., 2014).

En Algérie, on constate un essor des recherches in vitro dans le domaine de la nutrithérapie immunitaire au cours de ces dernières années.

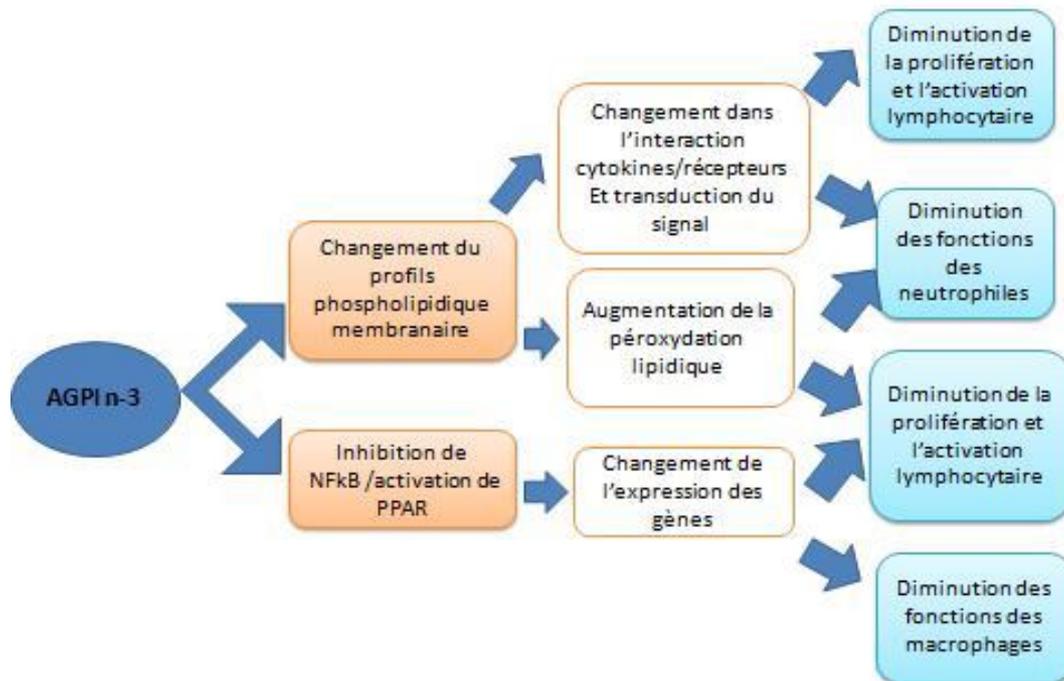


Figure 10. Mécanismes d'action des AGPI n-3 sur le système immunitaire (Hirbod-Mobarakeh et al., 2014)

Les études réalisées au sein du laboratoire PPABIONUT par Djelti et al. (2014), Meraou et al. (2016), Mezouar et al. (2016) ont montré les effets des acides gras et des vitamines sur les lymphocytes et les cellules placentaires cultivées *in vitro*. L'huile de nigelle, la vitamine C, E et NADH ont stimulé la prolifération des lymphocytes T et la sécrétion d'IL-2 chez les femmes diabétiques ou les patients obèses, tandis que l'huile de lin avait un effet immunosuppresseur. De même, les AGPI n-6 purs ont stimulé la prolifération des cellules placentaires alors que les AGPI n-3 ont inhibé la prolifération de ces cellules. A l'université d'Alger, Behairi et al. (2015) ont étudié l'effet *in vitro* de la vitamine A (acide rétinol) sur les lymphocytes isolés des sujets atteints d'Alzheimer. Ils ont montré que la vitamine A possède un effet anti-inflammatoire en réduisant le taux d'IL-17 et du NO tout en augmentant la sécrétion d'IL-10.

Dans cette même optique de recherche, notre travail vise à étudier les effets *in vitro* des vitamines (A, C, E, NADH) et des huiles végétales (olive, tournesol, nigelle, noix, lin) sur les lymphocytes isolés des personnes âgées et des témoins jeunes.

Matériels & méthodes



La partie expérimentale de l'étude est réalisée dans le laboratoire PPABIONUT en collaboration avec deux polycliniques CHETOUANE et BOUHANNEK (Tlemcen). Dans un premier temps, les patients sont sélectionnés selon les critères du protocole SENIEUR (Lesourd, 2004) (Tableau A1 en annexes) en respectant les déclarations Helsinki. L'étude du profil nutritionnel, biochimique et oxydant est effectuée seulement chez les patients éligibles. Par la suite, les lymphocytes sont isolés à partir du sang de ces patients, et cultivés in vitro en présence ou en absence des vitamines ou huiles alimentaire. La Figure 11 résume le protocole expérimental effectué.

1. Population étudiée

L'étude est menée sur des patients de la région de Tlemcen âgés de plus de 65 ans sans aucune pathologie chronique et qui ne reçoivent aucun traitement ou supplément alimentaire. La sélection des patients répond au maximum aux critères du protocole SENIEUR donné en annexe. 50 patients des deux sexes sont recrutés au niveau des deux polycliniques CHETOUANE et BOUHANNEK dont l'âge, le poids, la taille, l'IMC et la tension artérielle sont notés. 80 hommes et femmes jeunes volontaires dont l'âge varie entre 20 et 35 ans sont recrutés comme témoins.

1.1. Considérations éthiques

Tous les patients de cette étude sont informés sur le but du travail selon la déclaration d'Helsinki (Assemblée générale de l'association Médicale Mondiale, 2013). Aucun prélèvement n'est effectué, et aucune enquête n'est menée sans un préalable consentement signé par les participants (Formulaire en annexe). Ceci est réalisé en respectant l'anonymat et la confidentialité des informations. Les caractéristiques de la population étudiée sont montrées dans le Tableau 3.

2. Enquête nutritionnelle

Afin d'étudier le statut nutritionnel des personnes âgées, une enquête nutritionnelle est effectuée. Le questionnaire de base (donné en annexe) comprend des questions sur les critères anthropométriques (poids, taille, indice de masse corporelle), des questions sur le niveau socioéconomique et le niveau d'instruction. La santé buccale et digestive est aussi déterminée car elle influence le statut nutritionnel de la personne âgée.

Les scores MNA (Mini Nutritional Assessment) et SNAQ (Simplified nutritional appetite questionnaire) sont déterminés lors du questionnaire alimentaire.

Tableau 3. Caractéristiques de la population étudiée

| Caractéristiques | Hommes Jeunes Témoins (TH) | Femmes Jeunes Témoins (TF) | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Nombre | 40 | 40 | 25 | 25 |
| Age (ans) | 23,35 ± 3,21 | 23,52 ± 3,47 | 73,12 ± 5,36* | 74,3 ± 4,23* |
| Taille (m) | 1,77±0,08 | 1,62 ± 0,06 | 1,73±0,06 | 1,60 ± 0,07 |
| Poids (Kg) | 72,89 ± 7,34 | 56,42 ± 3,64 | 68,75 ± 6,56 | 58,30± 4,66 |
| IMC (Kg/m²) | 23,09 ± 3,8 | 21,41 ± 2,04 | 22,98 ± 3,75 | 22,76 ± 3,24 |
| TAS | 122,85 ± 6,16 | 120,48 ± 5,33 | 130,57 ± 4,37 | 128,34 ± 3,14 |
| TAD | 80,63 ± 4,22 | 78,50 ± 3,35 | 84,21 ± 3,76 | 82,28 ± 4,53 |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. IMC : indice de masse corporelle (Poids / Taille²); TAD : tension artérielle diastolique; TAS : tension artérielle systolique. La comparaison des moyennes entre les jeunes témoins et les âgés de même sexe est effectuée par le test "t" de Student après analyse de variance: * P < 0,01 différence significative.

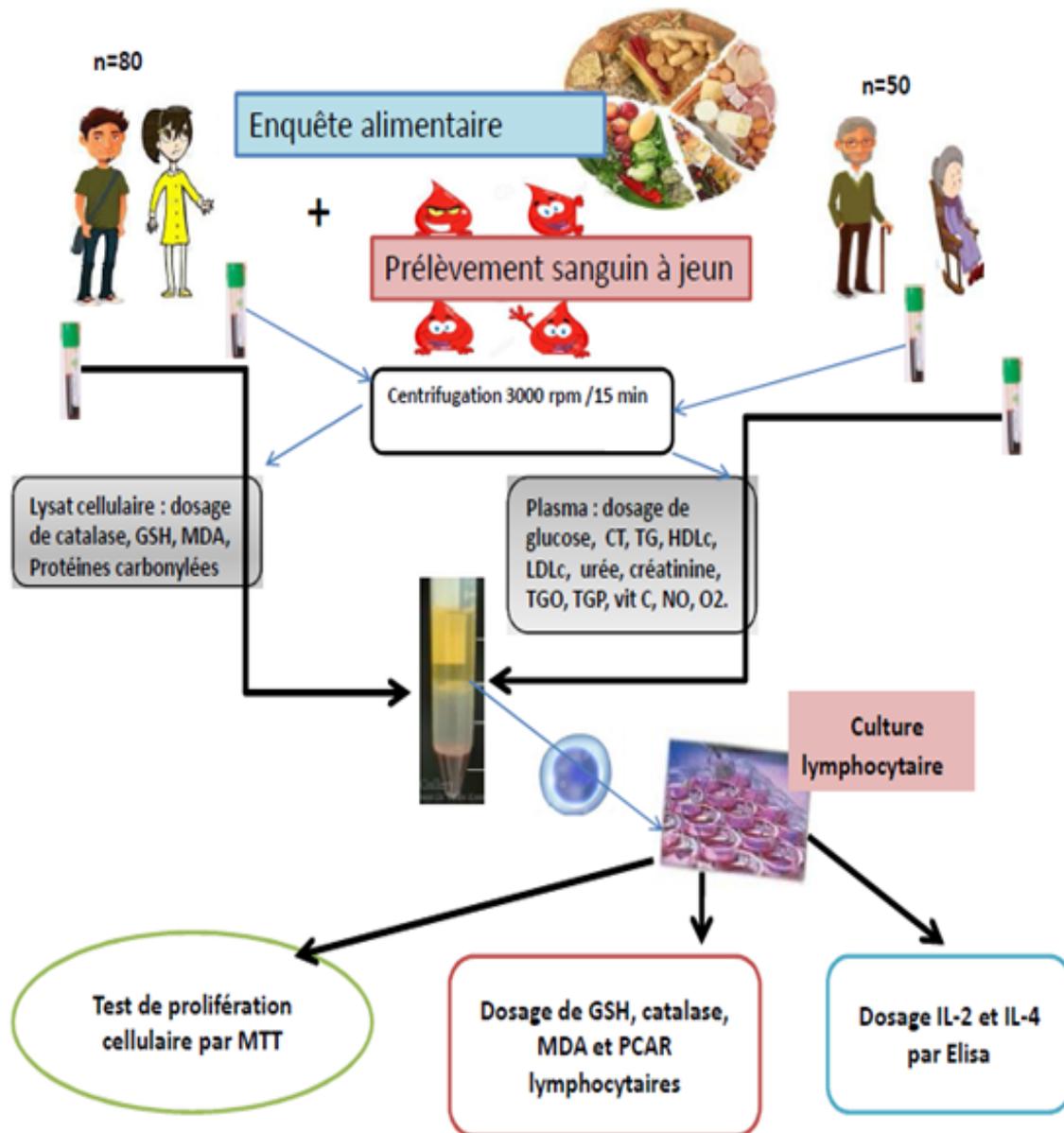


Figure 11. Résumé graphique du protocole expérimental

2.1. MNA (Mini Nutritional Assessment)

Dans plusieurs études, MNA est utilisé comme un outil efficace dans l'évaluation du statut nutritionnel des personnes âgées (Kostka et al., 2014). Il consiste en 18 questions (annexe) notées de 0 à 3 points. Le score Maximal est 30 points. Le score MNA est déterminé selon la méthode décrite par Guigoz (2006). Un score de 24 à 30 points décrit un état nutritionnel normal. Un score de 17 à 23,50 points décrit un risque de malnutrition, alors qu'un score inférieur à 17 points définit un mauvais état nutritionnel.

2.2. SNAQ (Simplified nutritional appetite questionnaire)

Le SNAQ est un outil qui permet d'évaluer le contrôle de l'appétit chez les personnes âgées. Il permet d'identifier le risque d'une perte significative du poids. Il consiste en quatre questions notées de 1 à 5 points. Les questions portent sur l'appétit, la satiété, le goût des aliments et le nombre de repas par jour. Les questions du SNAQ sont orientées vers les notions d'appétit et de plaisir de manger. Un score inférieur à 14 indique une anorexie et un risque de perte de poids. L'avantage de ce test est de repérer les sujets avant qu'ils n'aient perdu du poids. Le SNAQ permet de dépister les personnes âgées ayant des prises alimentaires diminuées mais n'ayant pas encore les critères de dénutrition. L'usage de cet outil facilite donc une intervention nutritionnelle efficace (Wilson et al., 2005).

3. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins à jeun sont effectués chez les personnes sélectionnées volontaires. Le sang est recueilli dans des tubes héparinés, puis centrifugé à 3000 t/min pendant 15 minutes. Le plasma est récupéré puis conservé à -20 °C en vue des différents dosages.

Les érythrocytes restants sont lysés par addition de l'eau distillée glacée et incubation pendant 15 min dans la glace. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 4000 t/min pendant 15 minutes. Le lysat est ensuite récupéré et congelé à -20 °C en vue des dosages des marqueurs redox intracellulaires.

4. Méthodes de dosages utilisées

4.1. Paramètres biochimiques plasmatiques

4.1.1. Dosage de l'albumine

Le taux plasmatique en albumine est déterminé par la méthode colorimétrique, en utilisant le kit SPINREACT qui repose sur la transformation de l'albumine, en présence du vert de

bromocrésol, en un composé coloré bleu-verdâtre dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'albumine.

4.1.2. Dosage du glucose

La concentration du glucose plasmatique est déterminée par une méthode colorimétrique enzymatique en utilisant le Kit BIOSYSTEMES. Ce test repose sur la décomposition du glucose en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène sous l'action de l'enzyme glucose oxydase.

4.1.3. Dosage du cholestérol total

Le cholestérol total est dosé au niveau du plasma par une méthode colorimétrique enzymatique (Kit SPINREACT). Les esters de cholestérol sont hydrolysés par la cholestérol ester hydrolase en cholestérol libre et acides gras. Le cholestérol libre produit est oxydé par une enzyme cholestérol oxydase en Δ^4 cholesterone et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier en présence de peroxydase, oxyde le chromogène en un composé coloré en rouge dont l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol présente dans l'échantillon.

4.1.4. Dosage des triglycérides

Les triglycérides sont dosés au niveau du plasma par une méthode enzymatique (Kit TECO DIAGNOSTICS). Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et en acides gras ; le glycérol obtenu est phosphorylé par une glycérokinase, puis le glycérol-3-phosphate est enzymatiquement oxydé en H_2O_2 . Ce dernier en présence de la peroxydase et d'un chromogène donne un composé coloré.

4.1.5. Détermination des lipoprotéines HDL et LDL

Les concentrations en lipoprotéines de densité élevée (HDL) est déterminée dans le plasma par le kit SPINREACT qui repose sur la précipitation des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) par le phosphotungstate et les ions de magnésium. Après centrifugation (4000 t/min pendant 10 min), le surnageant contient les HDL qui sont dosés par la méthode enzymatique colorimétrique utilisée pour le dosage du cholestérol total.

La concentration en lipoprotéines LDL est calculée selon la formule décrite par Friedewald–Levy–Fredrickson: $LDL (g/L) = \text{concentration du cholestérol total} - \text{concentration du HDL} - (\text{concentration des TG} / 5)$.

4.1.6. Dosage de l'urée

L'urée plasmatique est dosée par le Kit SPINREACT. Ce test repose sur la transformation de l'urée sous l'action de l'uréase en carbonate d'ammonium de couleur verte dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration en urée dans l'échantillon. La densité optique est déterminée par spectrophotométrie, et est proportionnelle à la concentration en urée de l'échantillon.

4.1.7. Dosage de la créatinine

La créatinine plasmatique est dosée par le Kit BIOMAGHREB qui repose sur la formation d'un composé de coloration rouge par la réaction suivante:

Créatinine + acide picrique \longrightarrow créatinine-Acide picrique

La densité optique est obtenue par spectrophotométrie, et est proportionnelle à la concentration en créatinine de l'échantillon.

4.2. Paramètres du stress oxydatif

4.2.1. Dosage de la vitamine C plasmatique

La vitamine C est déterminée dans le plasma frais par la méthode décrite par Jagota et Dani (1982). Après précipitation des protéines par 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 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) sont déterminées à partir de la courbe d'étalonnage réalisée par l'acide ascorbique.

4.2.2. Dosage du monoxyde d'azote (NO) plasmatique

Le NO plasmatique est mesuré par la méthode décrite par Guevara et al. (1998), qui repose sur le dosage des nitrites. Le plasma frais est déprotéinisé par l'ajout du ZnSO_4 . Après centrifugation, le surnageant est incubé avec les billes de cadmium afin de réduire les nitrates présents en nitrites. Après centrifugation, le surnageant obtenu est mélangé avec le réactif de Griess (composé de sulfanilamide, de naphtylamine et d'acide phosphorique). Une coloration rose apparaît dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en NO. Les absorbances sont mesurées par spectrophotométrie à 540 nm. Les concentrations du NO sont obtenues à partir de la courbe d'étalonnage établie en utilisant le nitrite de sodium NaNO_2 .

4.2.3. Dosage de l'anion super oxyde plasmatique

L'anion super oxyde ($O^{2\cdot-}$) est dosé en utilisant la méthode décrite par Auclair et Voisin (1985). Le plasma frais est incubé pendant 2 heures à température ambiante en présence du sel de Tétrazolium (MTT). Après incubation, et ajout du méthanol, du DMSO et du KOH, une coloration rose violacée apparaît. La lecture des absorbances est faite contre le blanc par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 550 nm. Les concentrations en anion $O^{2\cdot-}$ sont calculées en utilisant le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 21,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.4. Détermination de l'activité de la catalase (CAT, EC 1.11.1.6) érythrocytaire

L'activité de la catalase dans le lysat cellulaire sanguin est mesurée par la méthode décrite par Aebi (1974). Ce test repose sur le dosage du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène. Le lysat érythrocytaire dilué est incubé en présence d'un volume équivalent de H_2O_2 et de l'eau physiologique pendant 5 minutes à température ambiante. Par la suite, le sulfate de titanium est ajouté au mélange; la lecture est réalisée par spectrophotométrie à 420 nm.

4.2.5. Dosage de glutathion réduit GSH érythrocytaire

Le dosage du glutathion réduit (GSH) est réalisé par la méthode colorimétrique par le kit Bioxytech GSH-400 (OXIS International, Inc., Portland, OR, USA). En présence du NADPH, le chromogène réagit avec le groupement thiol du GSH pour former un composé coloré dont l'absorbance est à 405 nm.

4.2.6. Dosage du malondialdéhyde (MDA) érythrocytaire

Le dosage du MDA dans le lysat érythrocytaire est effectué selon la méthode décrite par Draper et Hadley (1990). Le lysat est incubé 20 minutes à 100°C en présence de l'acide thiobarbiturique (TBA) et l'acide trichloroacétique (TCA). Après incubation, refroidissement et une centrifugation à 4000t/min pendant 10 min, le TBA réagit avec les aldéhydes pour former un produit 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 ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 532 nm)

4.2.7. Dosage des protéines carbonylées érythrocytaires

Les protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées dans le lysat érythrocytaire par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine (DNPH) selon la méthode de

Levine et al. (1990). L'échantillon est incubé 1h à température ambiante en présence de la DNPH ou avec seulement du HCL pour le blanc. Le DNPH réagit avec les groupements carbonyle pour donner un composé hydrazone. Ensuite, les protéines sont précipitées avec l'acide trichloroacétique (TCA). Après centrifugation, le culot est solubilisé dans une solution de NaOH. Les lectures se font à 350 et 375 nm. La concentration des groupements carbonyles est calculée selon un coefficient d'extinction ($\epsilon = 21,5 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

5. Etude in vitro des effets des nutriments sur les lymphocytes

5.1. Isolement des lymphocytes sanguins

L'isolement des lymphocytes repose sur la séparation des cellules sanguines en fonction d'un gradient de densité utilisant l'Histopaque (SIGMA). Les lymphocytes (densité égale à 1,060) sont moins denses que l'histopaque (densité égale à 1077) et vont se positionner au dessus de l'histopaque après centrifugation. Ainsi, le sang frais prélevé dans tube hépariné est versé doucement dans un tube conique contenant l'histopaque. Après centrifugation à 2000 t/min pendant 20 minutes, la phase entre le plasma et l'histopaque contenant les lymphocytes est récupérée, lavée puis reprise dans le milieu de culture RPMI.

5.2. Test de viabilité et dénombrement des cellules

Le comptage des cellules lymphocytaires se fait à l'aide de la cellule de Malassez, après coloration au bleu de Trypan, 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. Après comptage, le nombre des cellules de la suspension est ajusté à 4 millions de cellules par ml.

5.3. Culture lymphocytaire

Les cultures des lymphocytes s'effectuent dans des microplaques de 96 puits. Les lymphocytes sont stimulés par la concanavaline A (agent mitogène spécifique des lymphocytes T), et sont mis en culture dans le milieu RPMI. Les essais sont réalisés en triples. Afin de déterminer les effets des vitamines sur la prolifération in vitro des lymphocytes, les cellules sont mises en culture en présence de trois vitamines (vitamine A ou acide rétinoïque, vitamine C, E et NADH) à une concentration finale de 100 nM pour la vitamine A, 50 μM pour les vitamines C, E et 500 μM pour NADH. Les concentrations des

vitamines utilisées sont choisies après l'étude bibliographique. Les concentrations utilisées dans notre travail sont choisies selon des études précédentes qui ont montré que ces concentrations n'affectent pas la viabilité cellulaire (Dawson et al., 2006; Hernandez et al., 2008; Liu and Zhang, 2003; Molina et al., 2014)

Afin de déterminer les effets des acides gras présents dans des huiles utilisées dans la région de Tlemcen, les lymphocytes sont cultivés en présence d'huile d'olive, d'huile de tournesol, d'huile de nigelle, d'huile de noix, et d'huile de lin à une concentration finale de 30 μ M TG. Cette concentration est déjà utilisée dans notre laboratoire sans affecter la viabilité des cellules en culture (Djelti et al., 2014). La composition des huiles testées est mentionnée dans le Tableau 4.

Les plaques sont ensuite mises à incuber 48 heures à 37°C, dans un incubateur à 5% de CO₂. A la fin de la période d'incubation, les cellules sont prélevées en vue des différents dosages.

Tableau 4. Composition des huiles étudiées

| Composition en 100 g | Huile d'olive | Huile de tournesol | Huile de nigelle | Huile de noix | Huile de lin |
|-------------------------|---------------|--------------------|---------------------|------------------|--------------|
| AGS (g) | 14 | 15 | 16,8 | 9,87 | 10 |
| AGPI (g) | 26 | 60 | 59,4 | 64,4 | 72 |
| AGMI (g) | 60 | 25 | 23,8 | 17,4 | 18 |
| Vitamine E (mg) | 28,8 | 100 | 36,1 | 35 | 57 |
| AGMI/AGPI | 2,4 | 0,41 | 0,4 | 0,27 | 0,24 |
| Oméga-6/oméga-3 | 24 | 59 | 56 | 4,96 | 0,28 |

La composition en acides gras de différentes huiles est réalisée par CPG au laboratoire UPRES lipides, Faculté des sciences Gabriel, Université de Bourgogne, Dijon, France. Les teneurs en vitamines sont déterminées par HPLC (Dijon, France). AGS: acides gras saturés; AGMI: acides gras mono-insaturés; AGPI: acides gras polyinsaturés.

5.4. Test de prolifération lymphocytaire

La mesure de la prolifération des cellules est réalisée par le test MTT, 3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide. Le test MTT détermine la capacité des cellules viables à convertir un sel soluble de tetrazolium (MTT) en un précipité insoluble le formazan. Cette réaction convertit les sels de tetrazolium jaunes en des cristaux de formazan colorés en bleu dont la concentration est spectrophotométriquement déterminée, après la dissolution des cristaux bleus en milieu acide.

L'indice de prolifération lymphocytaire (IP) est déterminé par la formule suivante:

Densité optique de culture stimulée/densité optique de culture non stimulée $\times 100$ (Medjdoub et al., 2011).

5.5. Dosage des cytokines IL-2 et IL-4

Le taux de sécrétion des cytokines lymphocytaires, Interleukine-2 (IL-2) et interleukine-4 (IL-4) est mesuré dans le surnageant des cultures cellulaires par un kit ELISA (ABFRONTIER, Multiplex HUMAN Cytokine ELISA Kit) selon les instructions donnés. Les échantillons ou les standards sont ajoutés dans les puits pré-revêtus d'anticorps monoclonal anti- IL-2 ou anti-IL-4 et incubés pendant 2-5 h à température ambiante sous agitation douce. Ceci permet aux cytokines présentes dans les échantillons de se lier aux puits via l'anticorps immobilisé. Ensuite, les puits sont lavés et l'anticorps anti- IL-2 ou anti- IL-4 polyclonal conjugué à la biotine est ajouté dans chaque puits. L'incubation dure 1 h à température ambiante sous agitation. Après lavage, la solution de HRP-Streptavidine est ajoutée dans chaque puits, puis incubation de 45 minutes à la température ambiante sous agitation. La streptavidine-HRP ajoutée se lie à l'anti- IL2 ou à l'anti- IL-4 conjugué à la biotine. Par la suite, la streptavidine-HRP non lié est enlevée durant le lavage, et la solution de substrat réagissant avec le HRP (réactif colorimétrique TMB) est ajoutée aux puits. Après incubation à l'obscurité, un produit coloré est formé proportionnellement à la quantité des IL-2 ou IL-4 présents dans l'échantillon. La réaction est terminée par l'addition d'acide et l'absorbance est mesurée à 450 nm. Une courbe étalon est préparée à partir du standard IL-2 ou IL-4 fourni par le Kit de dosage. La balance Th1/Th2 est déterminée par le rapport IL-2/IL-4 (Barrat et al., 1997).

5.6. Equilibre oxydant/antioxydant intra-lymphocytaire

Après les différentes incubations et la récolte des cellules, les lymphocytes sont lysés par NaOH 5M. Après centrifugation, le lysat lymphocytaire est récupéré pour le dosage des marqueurs intracellulaires du stress oxydatif.

Le taux de peroxydation lipidique est déterminé en quantifiant la concentration du malondialdéhyde (MDA) dans les lysats lymphocytaires par le réactif TBA, comme cité précédemment.

L'oxydation des protéines est mise en évidence par la mesure des protéines carbonylées dans le lysat lymphocytaire par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine, comme cité ci-dessus.

Le taux lymphocytaire en glutathion réduit est mesuré par le kit spécifique cité ci-dessus (Bioxytech GSH-400 kit, OXIS International, Inc., Portland, OR, USA).

L'activité de l'enzyme catalase (CAT, EC 1.11.1.6) dans le lysat lymphocytaire est mesurée par la méthode d'Aebi décrite ci-dessus.

6. 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 jeunes témoins et les âgés de même sexe est effectuée par le test ANOVA à un facteur et par le test "t" de Student : * $P < 0,05$ différence significative.

Dans l'étude in vitro, les comparaisons des moyennes entre les hommes et femmes jeunes et âgés, et les comparaisons entre les différentes incubations in vitro sont effectuées par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) et entre les quatre groupes pour la même incubation par les signes différents (α , β , γ , Δ), avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

Résultats & interprétations



1. Marqueurs de l'état nutritionnel et paramètres biochimiques

1.1. Marqueurs de l'état nutritionnel chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

(Figures 12 et 13, Tableau 5)

En utilisant l'indice de masse corporelle (IMC), les personnes âgées étudiées montrent un risque de dénutrition. Nos résultats montrent que la dénutrition ($IMC < 21 \text{ kg} / \text{m}^2$) est présente chez 24% des hommes et femmes âgés (Figure 12). La dénutrition est considérée comme sévère lorsque $IMC < 18 \text{ kg} / \text{m}^2$ chez les personnes âgées. Notre étude montre que 12% des hommes âgés et 16% des femmes âgées présentent une dénutrition sévère. Cependant, chez les hommes et femmes jeunes, l'IMC est supérieur à 18 dans tous les cas, indiquant l'absence de dénutrition. L'utilisation du score MNA indique un risque nutritionnel aussi bien chez les sujets âgés que chez les jeunes (Figure 13). Selon Guigoz (2006), le test MNA est catégorisée comme suit: dénutrition sévère ($MNA < 17$); à risque de dénutrition ($17 < MNA < 24$); et état nutritionnel normal ($MNA \geq 24$). Nos résultats montrent que 12% des hommes âgés et 8% des femmes âgées sont sous-alimentées avec dénutrition sévère, 44% des hommes âgés et 52% des femmes âgées ont un risque de dénutrition, 44% des hommes âgés et 40% des femmes âgées ont un état nutritionnel normal. Cependant, 50% des hommes jeunes et 47,50% des femmes jeunes sont à risque de dénutrition selon le test MNA, et aucun ne présente une dénutrition sévère. Les résultats du score SNAQ montrent que ces personnes âgées présentent une anorexie et un risque de perte de poids puisque le score est inférieur à 14. Par contre, les teneurs plasmatiques en albumine ne diffèrent pas significativement entre les quatre groupes (Tableau 5).

1.2. Paramètres biochimiques chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Tableau 6)

Chez les sujets âgés, il n'existe pas de différence significative des taux plasmatiques en glucose, et en HDL-C par rapport aux valeurs des témoins jeunes. Par contre, les teneurs plasmatiques en cholestérol, triglycérides et LDL-C sont augmentées significativement chez les femmes et hommes âgés comparées aux valeurs obtenues chez les témoins jeunes. Les teneurs plasmatiques en urée et en créatinine sont significativement faibles chez les âgés par rapport aux valeurs chez les jeunes. Chez les sujets âgés, les activités plasmatiques des transaminases TGO montrent une augmentation significative par rapport aux valeurs chez les témoins jeunes. Les activités TGP sont cependant augmentées significativement que chez les femmes âgées comparées aux femmes jeunes témoins.

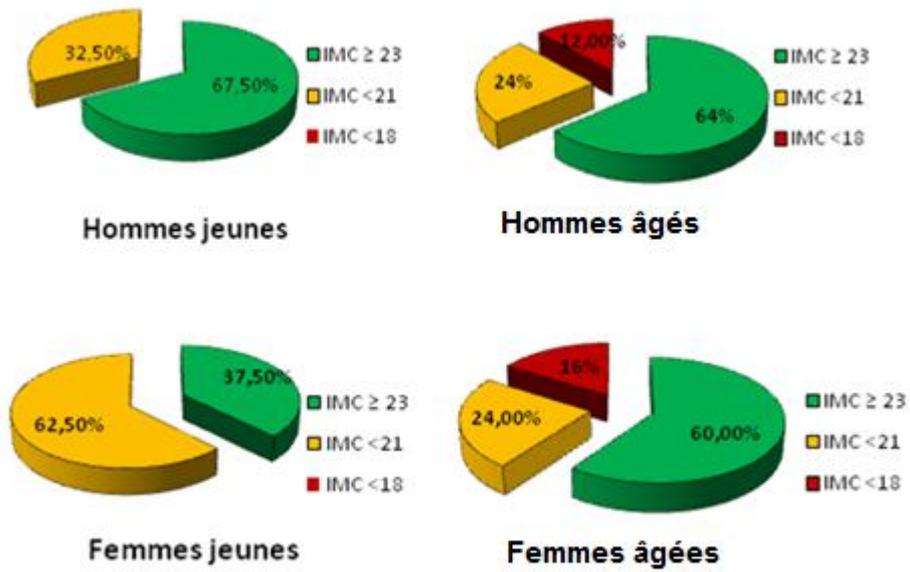


Figure 12. Prévalence de la dénutrition chez les personnes jeunes et âgées en utilisant l'IMC

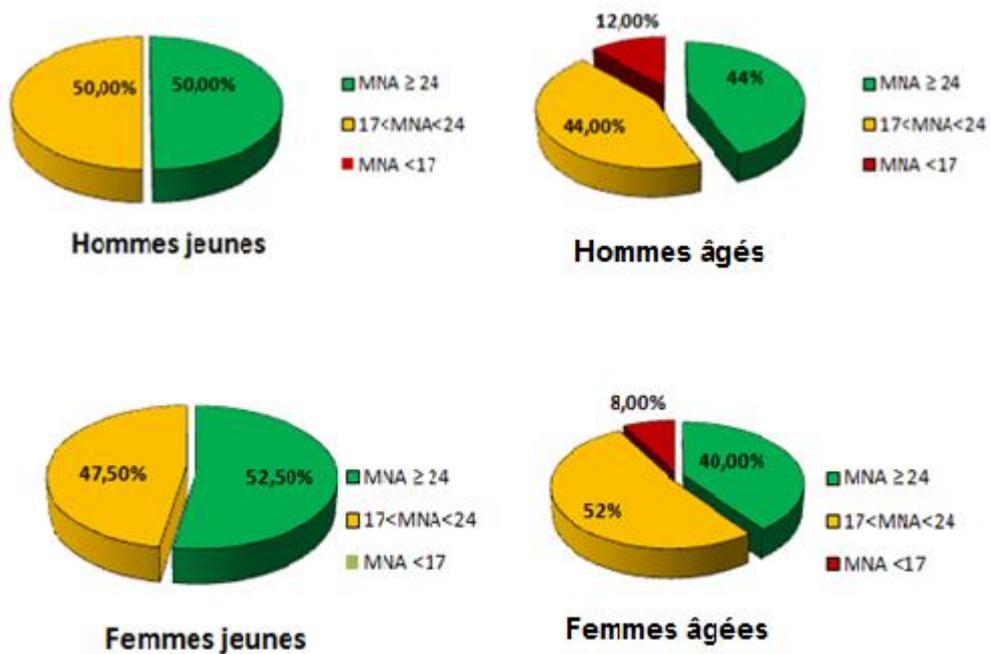


Figure 13. Prévalence de la dénutrition chez les personnes jeunes et âgées en utilisant le score MNA

Tableau 5. Marqueurs de l'état nutritionnel chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Paramètres | Hommes Jeunes Témoins | Femmes Jeunes Témoins | Hommes Agés | Femmes Agées | P ANOVA |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|
| Score MNA | 27,57 ± 1,06 ^a | 26,50 ± 1,30 ^a | 22,65 ± 1,23 ^b | 22,05 ± 1,11 ^b | 0,010 |
| Score SNAQ | 16,35 ± 1,11 ^a | 16,84 ± 1,55 ^a | 11,06 ± 2,23 ^b | 11,05 ± 1,98 ^b | 0,05 |
| Albumine (g/dL) | 4,56 ± 0,48 | 3,98 ± 0,57 | 4,25 ± 0,53 | 4,16 ± 0,47 | 0,228 |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. Score MNA: score de l'évaluation nutritionnelle rapide (Mini Nutritional Assessment); Score SNAQ: score du questionnaire simplifié de l'état nutritionnel (Simplified Nutritional Assessment Questionnaire). La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les groupes sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

Tableau 6. Paramètres biochimiques chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Paramètres | Hommes Jeunes Témoins (TH) | Femmes Jeunes Témoins (TF) | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) | P ANOVA |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|------------|
| Glucose (g/L) | 0,92±0,07 | 0,86±0,08 | 0,96±0,06 | 1,08 ±0,15 | 0,110 |
| Urée (g/L) | 0,40 ±0,02 ^a | 0,35 ± 0,03 ^a | 0,24 ±0,04 ^b | 0,27 ± 0,05 ^b | 0,008 |
| Créatinine (mg/L) | 7,85±0,65 ^a | 8,11±0,74 ^a | 6,75 ± 0,62 ^b | 6,08± 0,85 ^b | 0,007 |
| Cholestérol (g/L) | 1,22±0,22 ^b | 1,26±0,13 ^b | 1,80 ±0,16 ^a | 1,79 ±0,29 ^a | 0,006 |
| Triglycérides (g/L) | 1,08 ±0,06 ^b | 0,85 ± 0,11 ^b | 1,15 ± 0,04 ^a | 1,28 ± 0,12 ^a | 0,010 |
| HDL-C (g/L) | 0,30 ± 0,04 | 0,37± 0,05 | 0,33 ± 0,07 | 0,34± 0,06 | 0,147 |
| LDL-C (g/L) | 0,70 ± 0,12 ^b | 0,72± 0,06 ^b | 1,27 ± 0,11 ^a | 1,23 ± 0,05 ^a | 0,005 |
| TGO (U/L) | 14,31±1,37 ^b | 10,11±1,24 ^b | 20,13±2,74 ^a | 18,75±1,88 ^a | 0,004 |
| TGP (U/L) | 12,37 ±1,22 ^b | 15,05 ± 2,33 ^b | 12,87 ±1,28 ^b | 20,13 ± 1,05 ^a | 0,009 |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. HDL-C : cholestérol des lipoprotéines de haute densité ; LDL-C : cholestérol des lipoprotéines de faible densité ; TGO: glutamate oxaloacétate transaminase ; TGP : glutamate pyruvate transaminase. La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les groupes sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

2. Marqueurs du stress oxydant

2.1. Marqueurs plasmatiques et érythrocytaires du statut antioxydant chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Tableau 7)

Le taux plasmatique en vitamine C est diminué significativement chez les femmes âgées comparées aux femmes jeunes ; cependant aucune différence significative n'est notée entre les hommes âgés et les hommes jeunes.

L'activité de l'enzyme catalase érythrocytaire est diminuée significativement chez les sujets âgés par rapport aux témoins jeunes. De même, les taux érythrocytaires en GSH sont diminués significativement chez les sujets âgés par rapport aux valeurs témoins, et aussi chez le sexe féminin par rapport au masculin.

2.2. Marqueurs plasmatiques et érythrocytaires du statut oxydant chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Tableau 7)

Quelque soit le sexe, les teneurs plasmatiques en anion superoxyde augmentent significativement chez les personnes âgées comparées aux valeurs témoins. En ce qui concerne le monoxyde d'azote, on observe qu'avec l'âge il ya une diminution significative des taux du NO, et on note que les femmes ont un taux plasmatique faible en NO par rapport aux hommes.

En ce qui concerne l'oxydation lipidique et protéique, les taux du MDA (marqueur de la peroxydation lipidique) et des protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation des protéines) dans le lysat érythrocytaire sont élevés d'une manière significative chez les âgés par rapport aux témoins jeunes quelque soit le sexe.

Globalement, les femmes âgées semblent être plus exposées au stress oxydatif comparées aux hommes âgés.

3. Effets des nutriments sur les lymphocytes en culture

3.1. Prolifération des lymphocytes chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Figure 14 et Tableau A2 en annexes)

Chez les hommes et les femmes âgés, le taux de prolifération lymphocytaire in vitro en présence de l'agent mitogène Con A est significativement diminué par rapport aux témoins jeunes. Chez les hommes et les femmes jeunes, le traitement par la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E ou le NADH a induit une augmentation significative de la prolifération des

lymphocytes. Chez les hommes et les femmes âgés, la vitamine C, E ou le NADH ont aussi stimulé la prolifération lymphocytaire in vitro alors que la vitamine A n'a pas d'effet.

Tableau 7. Marqueurs plasmatiques et érythrocytaires du statut oxydant/antioxydant chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Paramètres | Hommes Jeunes | Femmes Jeunes | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) | P ANOVA |
|---|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------|------------|
| Vitamine C ($\mu\text{g/mL}$) | $28,18 \pm 1,72^a$ | $30,21 \pm 2,38^a$ | $29,32 \pm 2,11^a$ | $17,08 \pm 1,86^b$ | 0,010 |
| $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($\mu\text{mol/L}$) | $14,55 \pm 2,61^c$ | $12,31 \pm 2,57^c$ | $21,62 \pm 2,64^b$ | $37,02 \pm 2,93^a$ | 0,003 |
| NO ($\mu\text{mol/L}$) | $27,34 \pm 1,05^a$ | $23,22 \pm 1,26^b$ | $19,07 \pm 1,49^c$ | $11,70 \pm 1,07^d$ | 0,001 |
| Catalase (U/min/mL) | $50,23 \pm 4,48^a$ | $53,22 \pm 4,35^a$ | $30,71 \pm 3,08^b$ | $35,38 \pm 2,14^b$ | 0,008 |
| GSH (mmol/L) | $5,66 \pm 0,54^a$ | $4,28 \pm 0,60^b$ | $3,09 \pm 0,54^c$ | $2,47 \pm 0,46^d$ | 0,002 |
| MDA ($\mu\text{mol/L}$) | $1,56 \pm 0,24^b$ | $1,87 \pm 0,33^b$ | $4,71 \pm 0,62^a$ | $4,75 \pm 0,59^a$ | 0,007 |
| Protéines carbonylées ($\mu\text{mol/L}$) | $1,28 \pm 0,30^b$ | $1,15 \pm 0,29^b$ | $3,07 \pm 0,37^a$ | $2,97 \pm 0,42^a$ | 0,008 |

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart type. GSH: glutathion réduit; MDA: malondialdéhyde; NO: monoxyde d'azote; $\text{O}_2^{\cdot-}$: anion suproxyde. La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les groupes sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

L'ajout de l'huile de nigelle dans le milieu de culture potentialise l'effet de la Con A et stimule la prolifération lymphocytaire chez les témoins jeunes et chez les sujets âgés. Par contre, l'huile de lin provoque une réduction de la prolifération lymphocytaire alors que l'huile d'olive, de tournesol et de noix n'ont aucun effet quelque soit le groupe considéré. Les variations entraînées par les nutriments sont similaires chez le sexe masculin et féminin.

3.2. Sécrétion des cytokines

3.2.1. Effets des différents nutriments sur la sécrétion de l'interleukine 2 (IL-2, Pg/mL) in vitro chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Tableau 8)

En présence de la Con A, la sécrétion d'IL2 par les lymphocytes âgés est significativement réduite comparée à celle des lymphocytes des témoins jeunes. La sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes des témoins jeunes et des sujets âgés est modulée significativement par la présence des vitamines et des huiles végétales dans le milieu d'incubation. Le traitement des lymphocytes par la vitamine A et le NADH n'a aucun effet tandis que la vitamine C et E a augmenté significativement la libération d'IL-2 par les lymphocytes des hommes et femmes jeunes et âgés. De plus, en présence de vitamine C et E, les taux d'IL-2 dans les groupes âgés sont devenus semblables aux niveaux des jeunes. L'incubation des lymphocytes en présence de l'huile de nigelle a augmenté significativement le taux de sécrétion de l'IL-2, par contre l'huile de lin a causé une diminution accrue de l'IL-2 chez les lymphocytes des jeunes témoins et des sujets âgés. Cependant, les huiles d'olive, de tournesol et de noix n'ont aucun effet. Il est à noter qu'en présence de l'huile de nigelle et de lin, les taux d'IL-2 chez les âgés deviennent similaires à ceux des jeunes.

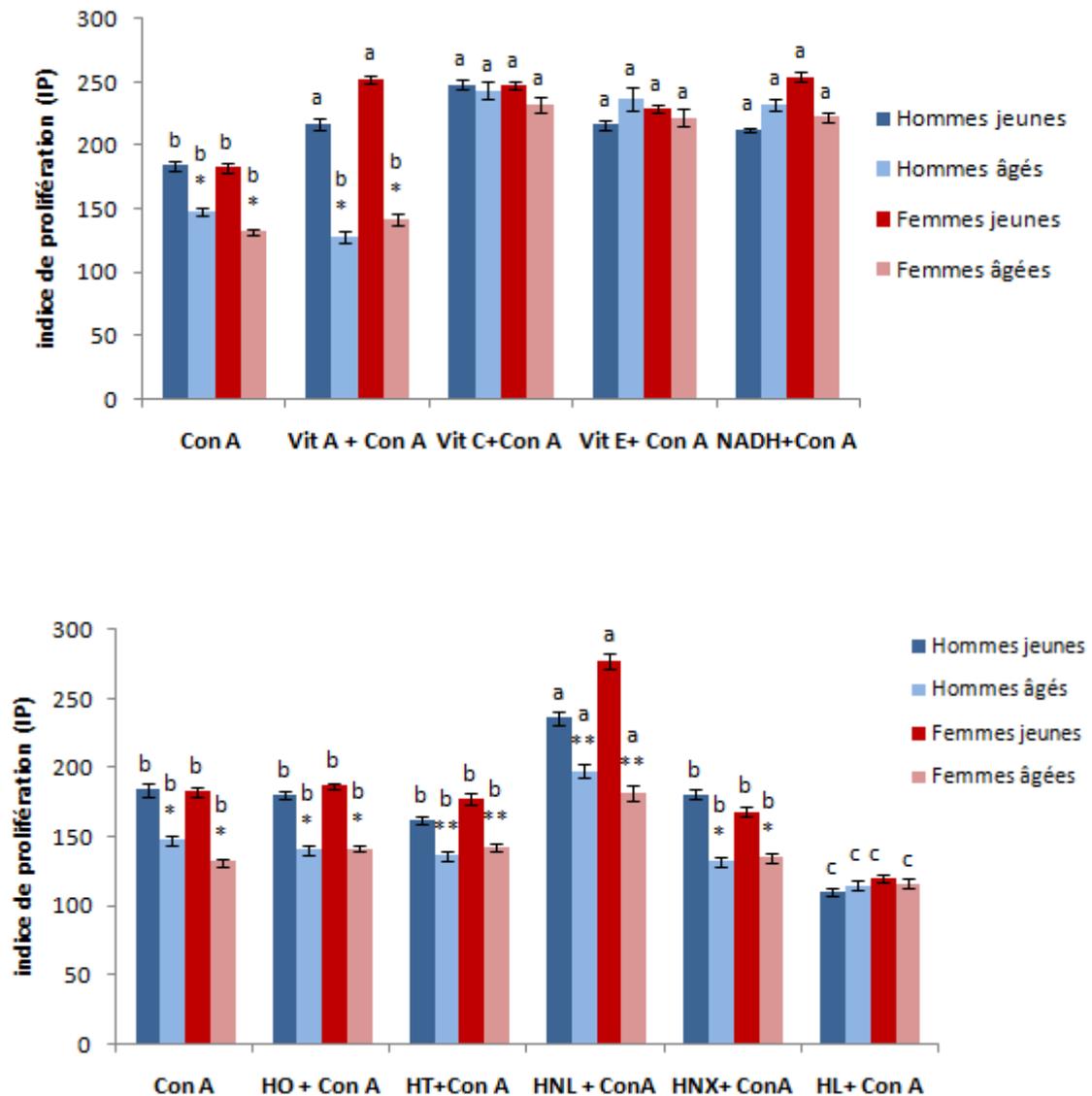


Figure 14. Effets in vitro des nutriments sur la prolifération lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart type. Con A : concanavaline A, Vit : vitamine, NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3, HO : huile ‘olive, HT : huile de tournesol, HNL : huile de nigelle, HNX : huile de noix, HL : huile de lin.

La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05. Les différences entre les groupes jeunes et âgés, hommes ou femmes, pour la même incubation, sont marquées par * P < 0.05 et ** P < 0.01.

Tableau 8. Effets des différents nutriments sur la sécrétion de l'interleukine 2 (IL-2, Pg/mL) des lymphocytes in vitro chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Incubations | Hommes Jeunes Témoins (TH) | Femmes Jeunes Témoins (TF) | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) | P ANOVA |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------|
| Con A | 2766±125 ^{αc} | 2866±154,68 ^{αd} | 2091,60±185 ^{βc} | 2069,40±121 ^{βc} | 0,010 |
| Vitamine A | 2833±216,70 ^{αc} | 2897±237,58 ^{αd} | 1977,70±121 ^{βc} | 1947±119 ^{βc} | 0,009 |
| Vitamine C | 3883±181 ^a | 4036±158 ^a | 4058,33±238 ^a | 4116±238 ^a | 0,234 |
| Vitamine E | 3608±141 ^a | 3708±125 ^b | 3833±265 ^a | 3897±212,74 ^a | 0,186 |
| NADH | 2788±112,74 ^{αc} | 2808,26±116 ^{αd} | 2061±120,94 ^{βc} | 2028,26 ±118 ^{βc} | 0,010 |
| Huile d'olive | 2691,66±138 ^{αc} | 2705,46±137 ^{αd} | 1955,46±121 ^{βc} | 1888,87±224 ^{βc} | 0,008 |
| Huile tournesol | 2649,90±118 ^{αc} | 2686±139,58 ^{αd} | 1889±167 ^{βc} | 1922±144,84 ^{βc} | 0,010 |
| Huile Nigelle | 3297±129 ^b | 3355,46±112 ^c | 3358±176 ^b | 3291±108,40 ^b | 0,133 |
| Huile Noix | 2805±112,72 ^{αc} | 2822±140,85 ^{αd} | 2058±185 ^{βc} | 2008,26±118 ^{βc} | 0,009 |
| Huile lin | 1597±112,70 ^d | 1644±108 ^e | 1600±125 ^d | 1586±110,73 ^d | 0,242 |
| P ANOVA | 0,004 | 0,005 | 0,007 | 0,007 | |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3. La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) et entre les quatre groupes pour la même incubation par les signes différents (α, β, γ, Δ), avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

3.2.2. Effets des différents nutriments sur la sécrétion de l'interleukine 4 (IL-4, Pg/mL) des lymphocytes in vitro chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Tableau 9)

Les taux d'interleukine-4 (IL-4) sont significativement plus élevés chez les personnes âgées que chez les jeunes témoins. Chez les hommes et les femmes jeunes, l'ajout des vitamines A, C, E ou NADH induit une augmentation significative de la libération d'IL-4 par les lymphocytes. Chez les personnes âgées, le traitement par la vitamine C ou le NADH provoque une augmentation significative de la sécrétion d'IL-4 tandis que la vitamine A ou E n'a eu aucun effet. En outre, les taux d'IL-4 deviennent similaires chez les sujets âgés et jeunes après traitement avec la vitamine C.

Le traitement in vitro des lymphocytes par l'huile d'olive, de nigelle et l'huile de lin augmente significativement le taux de sécrétion de l'IL-4 chez les jeunes témoins et les personnes âgées, alors que les huiles de tournesol et de noix n'ont pas affecté la sécrétion d'IL-4 chez tous les groupes étudiés.

3.2.3. Effes des nutriments sur le rapport IL-2/IL-4 des lymphocytes in vitro chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Figure 15, Tableau A3 annexes)

Le rapport IL-2 / IL-4 représente la balance Th1 / Th2. Il est significativement diminué chez les personnes âgées par rapport aux sujets jeunes. Le traitement par la vitamine A, C et NADH induit une diminution significative du rapport IL-2 / IL-4 chez les lymphocytes des jeunes hommes et femmes. La vitamine E augmente ce rapport chez les hommes et femmes jeunes. Chez les hommes et les femmes âgés, l'IL-2 / IL-4 n'est pas affecté par la vitamine A, diminue par la vitamine C ou le NADH et augmente par la vitamine E. De plus, en présence des vitamines C, E ou NADH, il n'y a pas de différences significatives dans le rapport IL-2 / IL-4 entre les groupes âgés et jeunes. L'huile d'olive réduit le rapport IL-2/IL-4 chez tous les groupes étudiés. L'huile de tournesol n'affecte pas ce rapport chez tous groupes étudiés, tandis que le traitement des lymphocytes par l'huile de nigelle diminue significativement le rapport IL-2/IL-4 chez les témoins jeunes mais sans affecter ce rapport chez le groupe des âgés. L'huile de noix diminue le rapport IL-2/IL-4 chez les jeunes hommes, mais sans l'affecter chez le reste des sujets étudiés. Par contre, l'huile de lin diminue significativement le rapport IL-2/IL-4 chez tous les groupes étudiés.

Tableau 9. Effets des différents nutriments sur la sécrétion de l'interleukine 4 (IL-4, Pg/mL) des lymphocytes in vitro chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Incubations | Hommes Jeunes Témoin (TH) | Femmes Jeunes Témoin (TF) | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) | P ANOVA |
|------------------------|---|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| Con A | 45.01 ± 3.02 ^{γd} | 52 ± 3.53 ^{βd} | 63.89 ± 3.19 ^{αe} | 65.04 ± 3.37 ^{αe} | 0.020 |
| Vitamine A | 122.05 ± 3.46 ^α _b | 124.68 ± 2.24 ^{αb} | 58.89 ± 3.07 ^{βc} | 61.6 ± 2.22 ^{βc} | 0.007 |
| Vitamine C | 152 ± 8.66 ^a | 155 ± 11.42 ^a | 161 ± 9.59 ^a | 164.47±10.69 ^a | 0.106 |
| Vitamine E | 52.71 ± 2.33 ^β _c | 53.76 ± 2.77 ^{βc} | 62.71± 2.19 ^{αc} | 63.76 ± 2.42 ^{αc} | 0.03 |
| NADH | 115.74± 8.46 ^{ab} | 118.15 ± 10.04 ^{ab} | 88.68 ± 2.22 ^{βb} | 90.34 ± 3.67 ^{βb} | 0.005 |
| Huile d'olive | 94.73 ± 2.39 ^{ac} | 96.70 ± 2.82 ^{ac} | 77.54 ± 3.27 ^{βd} | 79.22 ± 4.82 ^{βd} | 0.009 |
| Huile tournesol | 45.34 ± 4.46 ^{βd} | 51.23 ± 3.82 ^{βd} | 65.07 ± 2.26 ^{αe} | 60.83 ± 4.74 ^{αe} | 0.020 |
| Huile Nigelle | 119.95±12.14 ^b | 122 ± 13.04 ^b | 114.47 ± 10.13 ^b | 115.34 ± 8.55 ^b | 0.223 |
| Huile Noix | 50.25 ± 5.47 ^{βd} | 52.14 ± 3.87 ^{βd} | 62.84 ± 3.32 ^α | 64.69 ± 2.65 ^{αe} | 0.030 |
| Huile lin | 98.32 ± 5.33 ^c | 97.97 ± 5.04 ^c | 103.41 ± 11.39 ^b | 107.80 ± 14.43 ^b | 0.145 |
| P ANOVA | 0.005 | 0.004 | 0.003 | 0.004 | |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3. La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) et entre les quatre groupes pour la même incubation par les signes différents (α, β, γ, Δ), avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

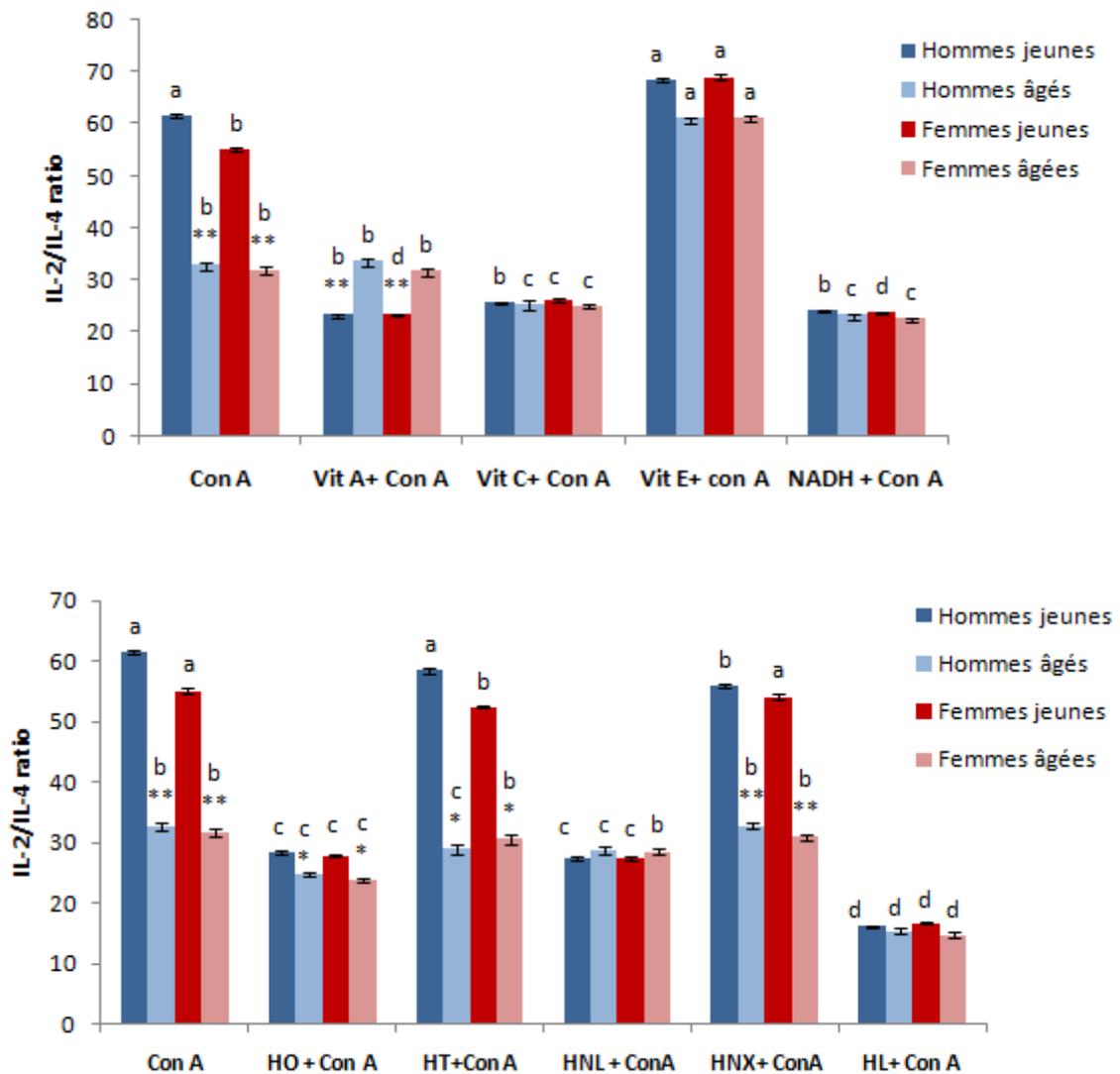


Figure 15. Effes des nutriments sur le rapport IL-2/IL-4 des lymphocytes chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart type. Con A : concaavaline A, Vit : vitamine, NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3, HO : huile ‘olive, HT : huile de tournesol, HNL : huile de nigelle, HNX : huile de noix, HL : huile de lin.

La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05. Les différences entre les groupes jeunes et âgés, hommes ou femmes, pour la même incubation, sont marquées par * P < 0.05 et ** P < 0.01.

3.3. Statut oxydant/antioxydant lymphocytaire

3.3.1. Effets des différents nutriments sur le taux de glutathion lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Figure 16, Tableau A4 en annexes)

Nos résultats ont montré que les quantités de GSH des lymphocytes sont réduites chez les hommes et les femmes âgés comparativement aux sujets jeunes. Les vitamines C, E ou NADH augmentent significativement les taux de GSH chez les sujets âgés et sans effet chez les jeunes témoins. La vitamine A n'a pas affecté les niveaux de GSH chez les jeunes et les âgés. En présence de vitamine C, E ou NADH, les teneurs en GSH des lymphocytes chez les personnes âgées sont rétablies et se rapprochent des valeurs des sujets jeunes.

A l'exception de l'huile de tournesol, toutes les huiles testées (olive, nigelle, noix, lin) augmentent le taux lymphocytaire de GSH chez les personnes âgées et les valeurs deviennent identiques à celles des témoins jeunes.

3.3.2. Effets des différents nutriments sur l'activité de l'enzyme Catalase (U/mg protéine) des lymphocytes chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Figure 17, Tableau A5 en annexes)

Les lymphocytes des hommes et de femmes âgés présentent des activités de la catalase plus faibles que les lymphocytes des sujets jeunes. Les traitements des lymphocytes avec la vitamine C ou E augmentent de manière significative l'activité de la catalase intracellulaire tandis que la vitamine A n'a aucun effet chez les sujets jeunes et âgés. L'addition de NADH aux cultures n'a pas affecté l'activité catalase chez des sujets jeunes tout en l'augmentant significativement chez les personnes âgées. En présence de la vitamine C, E ou NADH, l'activité de catalase dans les lymphocytes des sujets âgés est normalisée aux valeurs témoins.

Les huiles d'olive, de tournesol et de noix n'affectent pas l'activité enzymatique de la catalase chez les jeunes ni chez les sujets âgés ; tandis que l'huile de nigelle et de lin augmentent significativement l'activité de la catalase chez tous les groupes étudiés.

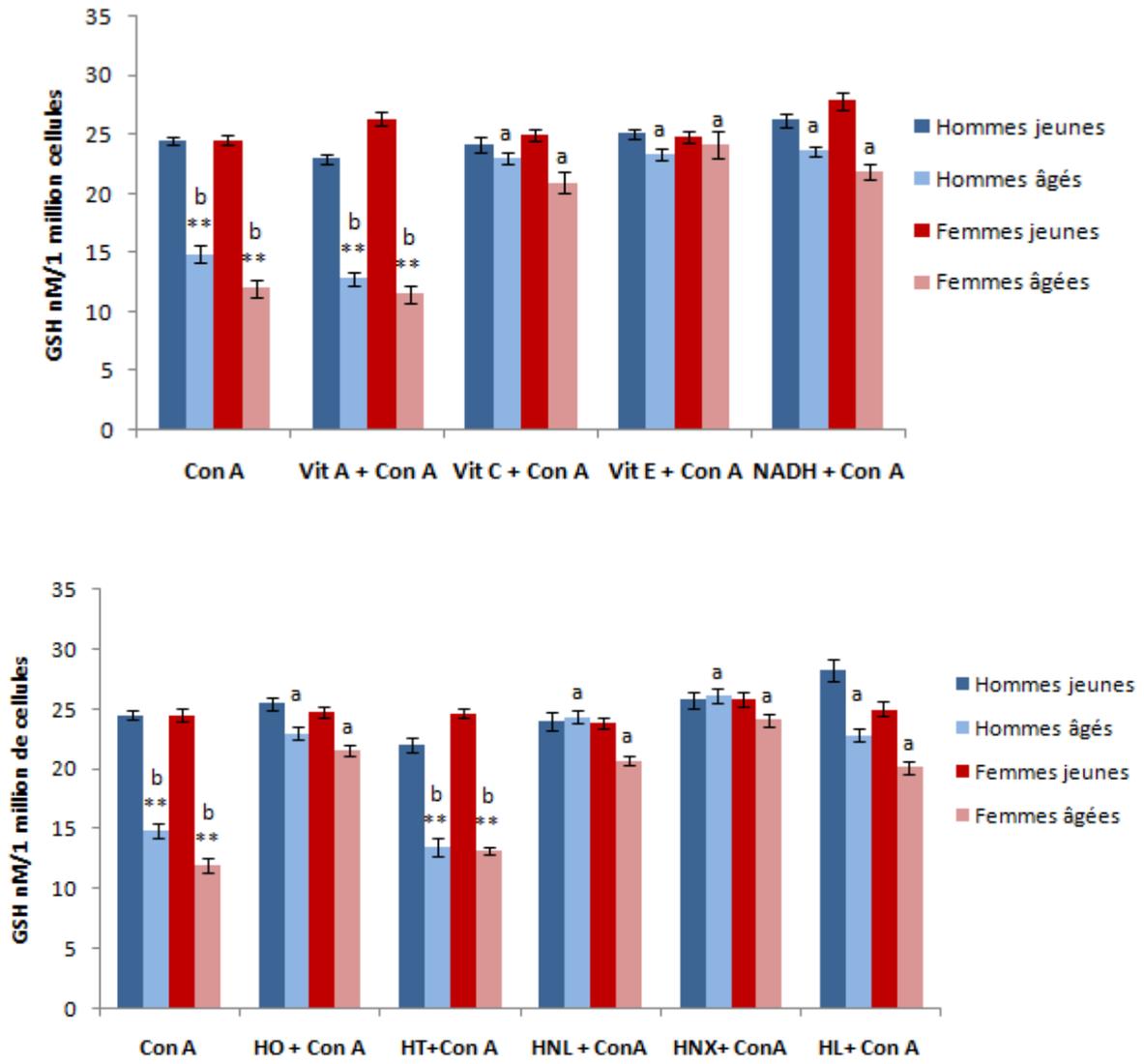


Figure 16. Effets des différents nutriments sur le taux de glutathion lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart type. Con A : concanavaleine A, Vit : vitamine, NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3, HO : huile ‘olive, HT : huile de tournesol, HNL : huile de nigelle, HNX : huile de noix, HL : huile de lin.

La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05. Les différences entre les groupes jeunes et âgés, hommes ou femmes, pour la même incubation, sont marquées par * P < 0,05 et ** P < 0,01.

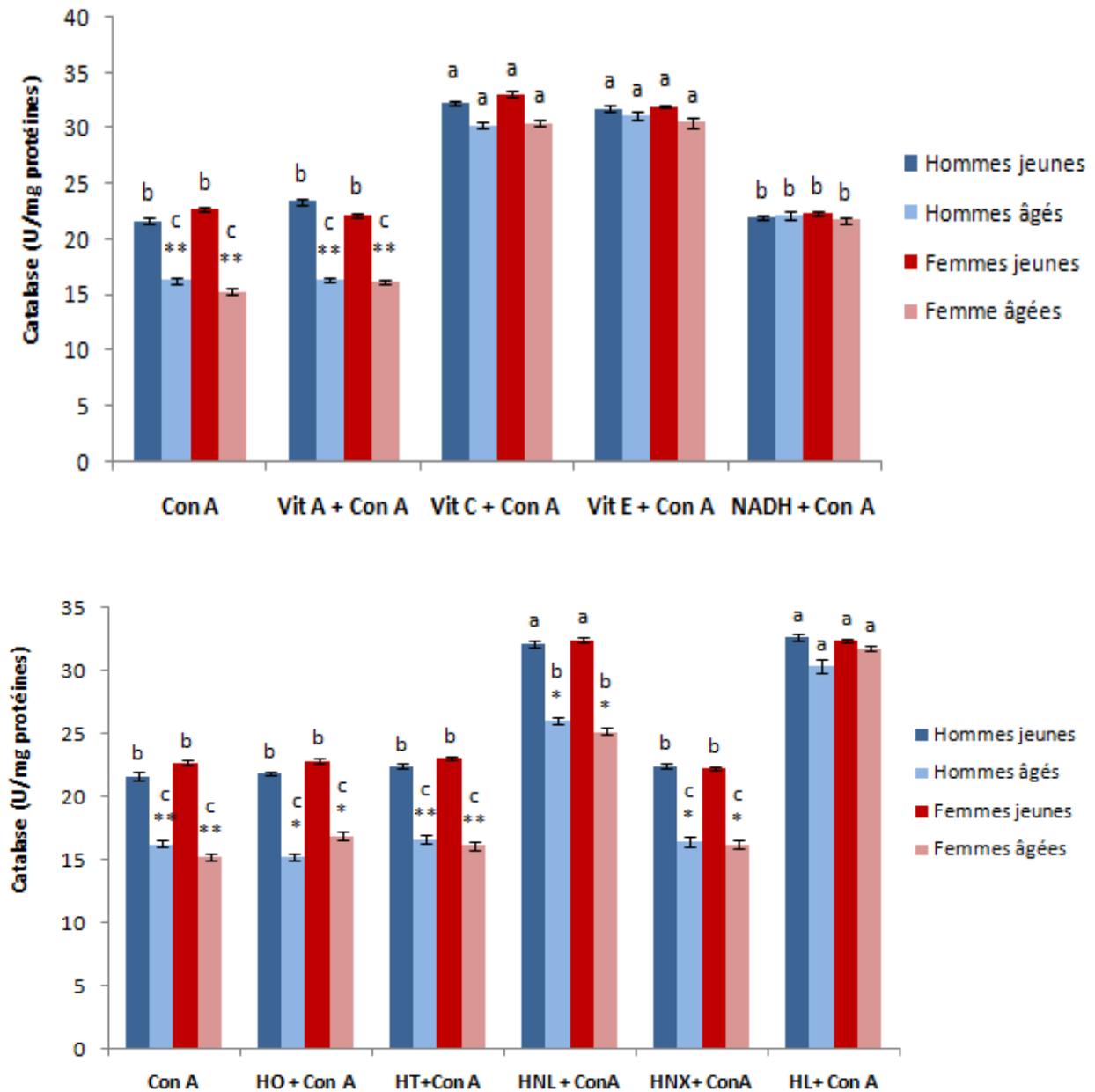


Figure 17. Effets des différents nutriments sur l'activité de la catalase lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart type. Con A : concavaline A, Vit : vitamine, NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3, HO : huile 'olive, HT : huile de tournesol, HNL : huile de nigelle, HNX : huile de noix, HL : huile de lin.

La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05. Les différences entre les groupes jeunes et âgés, hommes ou femmes, pour la même incubation, sont marquées par * P < 0.05 et ** P < 0.01.

3.3.3. Effets des différents nutriments sur le taux de MDA lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Figure 18, Tableau A6 en annexes)

Les teneurs lymphocytaires en MDA sont augmentées significativement chez les hommes et les femmes âgés comparativement aux sujets jeunes. Les vitamines C et E réduisent les taux de MDA chez les lymphocytes des sujets âgés et des jeunes témoins. La vitamine A n'affecte pas les niveaux de MDA chez les jeunes et les âgés quel que soit le sexe. Le NADH cause une réduction des niveaux de MDA que chez les lymphocytes de la population âgée sans affecter ce marqueur chez les témoins jeunes.

En présence de l'huile de nigelle et de lin, les teneurs en MDA lymphocytaire chez les personnes âgées et les jeunes sont réduites. Par contre, les huiles de tournesol et de noix n'affectent pas ce paramètre dans tous les groupes, alors que l'huile d'olive réduit ce taux de MDA chez les âgés mais pas chez les témoins jeunes.

3.3.4. Effets des différents nutriments sur le taux des protéines carbonylées lymphocytaires chez les hommes et les femmes jeunes et âgés (Figure 19, Tableau A7 en annexes)

Chez les hommes et femmes âgés, le taux lymphocytaire en protéines carbonylés est élevé par rapport à leurs témoins jeunes respectifs. Les vitamines C et E réduisent les taux de protéines carbonylées chez les lymphocytes des sujets âgés et des jeunes témoins ; tandis que la vitamine A n'a pas d'effet chez tous les groupes. Le NADH cause une réduction des teneurs lymphocytaires en protéines carbonylée que chez la population âgée.

L'huile de nigelle et de lin diminuent de manière significative les taux lymphocytaires en protéines carbonylées chez les deux populations âgées et jeunes, par contre les huiles d'olive, de tournesol et de noix n'ont pas affecté les taux de protéines carbonylées chez tous les groupes étudiés.

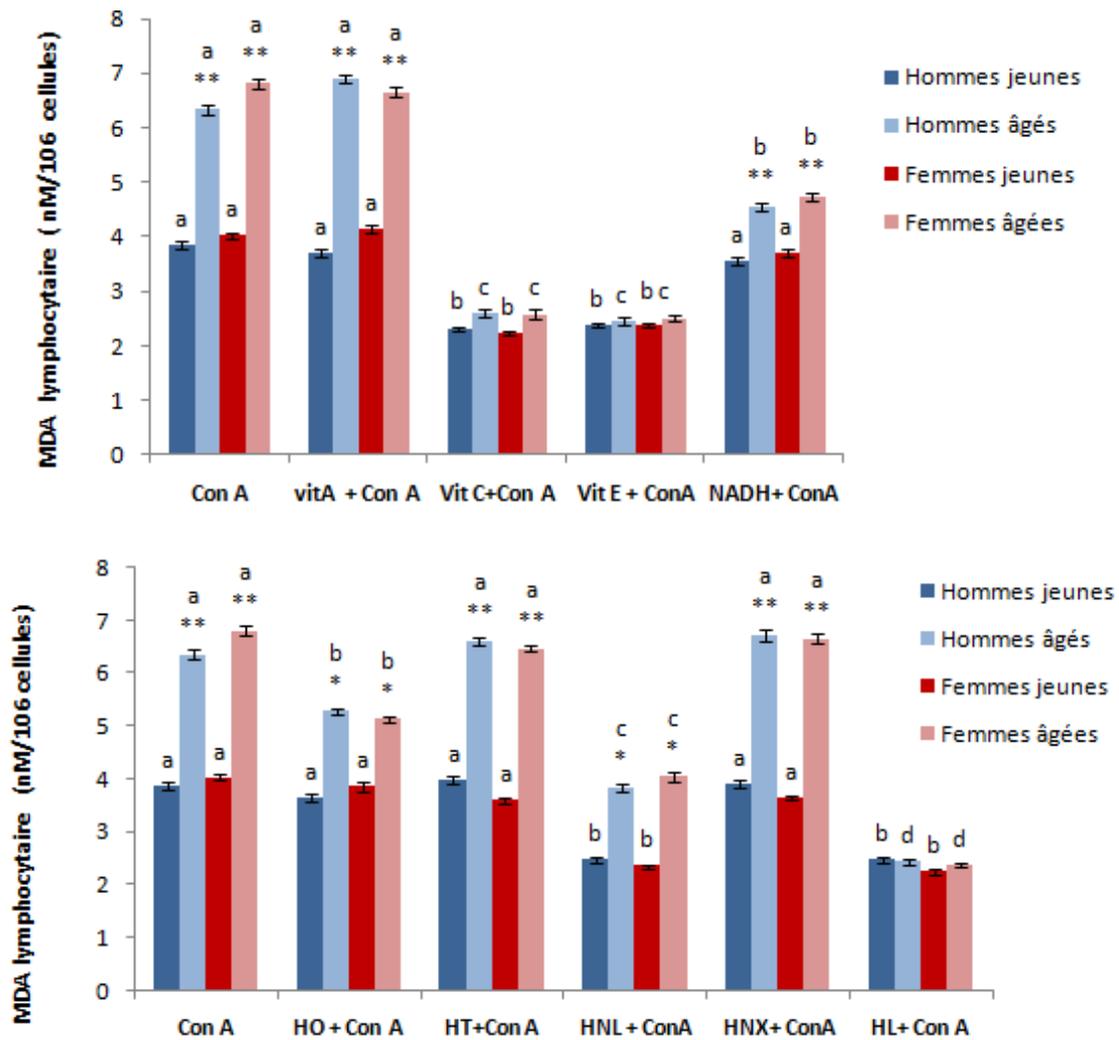


Figure 18. Effets des différents nutriments sur le taux de MDA lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart type. Con A : concanavaline A, Vit : vitamine, NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3, HO : huile ‘olive, HT : huile de tournesol, HNL : huile de nigelle, HNX : huile de noix, HL : huile de lin.

La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05. Les différences entre les groupes jeunes et âgés, hommes ou femmes, pour la même incubation, sont marquées par * P < 0,05 et ** P < 0,01.

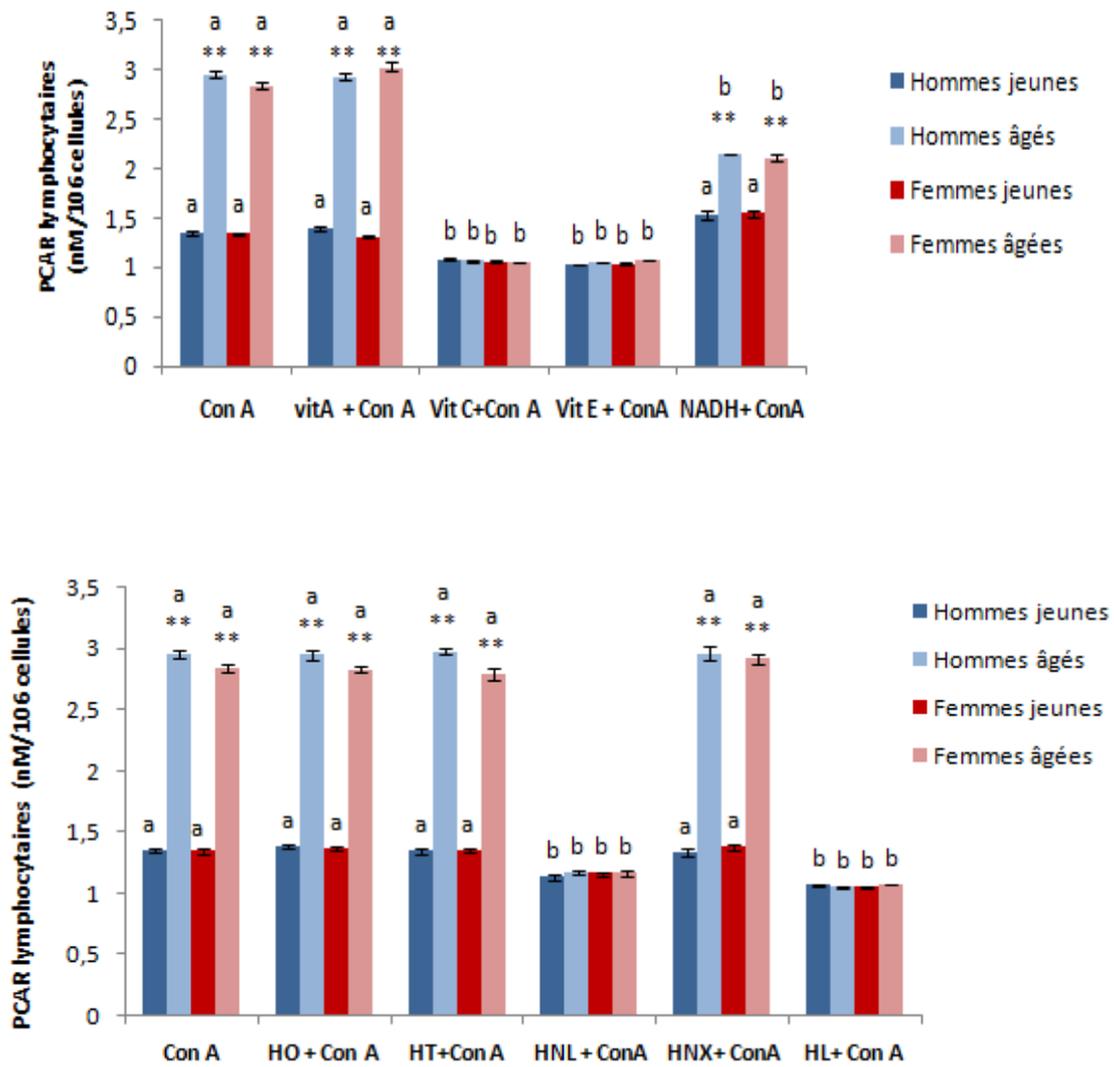


Figure 19. Effets des différents nutriments sur le taux des protéines carbonylées lymphocytaires chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

Chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart type. Con A : concavaline A, Vit : vitamine, NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3, HO : huile ‘olive, HT : huile de tournesol, HNL : huile de nigelle, HNX : huile de noix, HL : huile de lin, PCAR : protéines carbonylées.

La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05. Les différences entre les groupes jeunes et âgés, hommes ou femmes, pour la même incubation, sont marquées par * P < 0,05 et ** P < 0,01.

Discussion



Le vieillissement est un phénomène multifactoriel, associé à des dysfonctionnements métaboliques et immunitaires. Le déclin lié à l'âge dans la fonction immunitaire entraîne une augmentation de l'incidence et la gravité des infections, des cancers et de la mortalité (Cannizzo et al., 2011). Le vieillissement affecte à la fois la réponse immunitaire innée et adaptative. Chez les personnes âgées, un dysfonctionnement progressif des réponses immunitaires a été signalé, particulièrement dans l'homéostasie des lymphocytes T, avec un changement dans les rapports Th1/Th2 et cellules naïves/mémoires (Garg et al., 2014).

Il est bien connu que l'espérance et la longévité de la vie dépendent de plusieurs événements multifactoriels déterminés par des facteurs génétiques et environnementaux. Les éléments nutritifs jouent aussi un rôle essentiel dans ces événements. L'état nutritionnel peut influencer le vieillissement et il joue également un rôle important dans le développement et la progression de nombreuses maladies chroniques. L'évaluation nutritionnelle chez les personnes âgées devient cruciale. Plusieurs stratégies et différents outils nutritionnels ont été validés dans une série d'études pour évaluer quels patients gériatriques sont à risque de malnutrition.

La première partie de ce travail de doctorat consiste à évaluer l'état nutritionnel des personnes âgées de la région de Tlemcen à l'aide des données anthropométriques, score MNA, score SNAQ et par dosage d'albumine plasmatique.

L'indice de masse corporelle, l'IMC fait partie des paramètres anthropométriques, utilisé pour évaluer l'état nutritionnel (Gavriilidou et al., 2015). La composition corporelle change pendant la malnutrition, avec la perte de graisse et de tissu musculaire, mais la composition corporelle change également avec l'âge (Hickson, 2006). L'adiposité abdominale est un facteur de risque pour le vieillissement et les maladies liées à l'âge. L'indice de masse corporelle (IMC) est une mesure utile de l'adiposité globale puisque chaque augmentation de 5 kg / m² de l'IMC est associée à une mortalité globale de 30% plus élevée (Wagner et al, 2016). Les hommes et les femmes âgées étudiés avaient en moyenne un IMC normal sans excès de poids ou obésité. Cependant, en utilisant ce paramètre, selon différentes catégories, 24 % des personnes âgées développent un risque de malnutrition et plus de 12 % présentent une dénutrition sévère. Le score (MNA, Mini Nutritional Assessment) est un autre outil de dépistage mis au point pour détecter la malnutrition ou le risque de malnutrition. Il est considéré comme un bon critère pour déterminer l'état nutritionnel des personnes âgées. En utilisant le test MNA, plus de 44% des personnes âgées de la région de Tlemcen ont un risque de malnutrition. Le test MNA apparaît comme un outil très puissant pour détecter le problème de dénutrition chez les âgés, en plus il est très facile à mettre en œuvre.

Le SNAQ est un autre test de détection de la malnutrition. Il détecte le risque de perte de poids dans les 6 mois qui suivent. En utilisant ce test, les personnes âgées dans cette étude présentent un risque de perte de poids, ceci concorde avec les deux tests IMC et MNA utilisés lors de cette étude.

De faibles concentrations en albumine sont considérées comme marqueur de la malnutrition protéique (Visser et al., 2005). L'albumine est une protéine hépatique sérique avec une demi-vie de 14-20 journées. Elle fonctionne comme une molécule porteuse pour divers minéraux, des hormones, des acides gras et aide aussi à maintenir la pression dans les capillaires. De plus, l'albumine est une protéine de la phase aiguë négative, et son taux est affecté par un nombre de maladies inflammatoires et de médicaments, en particulier qui affectent la fonction hépatique. Par exemple, une insuffisance hépatique, des brûlures, la septicémie, le traumatisme, les états post-chirurgicaux et le cancer sont tous associés à une diminution des taux d'albumine (Bharadwaj et al., 2016). Des concentrations faibles d'albumine sont fréquemment observées chez les personnes âgées et sont associées à la mortalité (Visser et al., 2005). Cependant, notre présente étude ne montre pas une malnutrition protéique chez les personnes âgées étudiées puisque les taux plasmatiques en albumine sont similaires à celles des témoins jeunes.

Les causes de la malnutrition chez la population âgée sont extrêmement variées et peuvent être répartis en trois grands types: physiologiques, sociaux et psychologiques (Hickson, 2006). La malnutrition a des conséquences cliniques importantes car elle entraîne une perte de poids, altère le fonctionnement et la qualité de la vie, et entraîne une augmentation de risque de mortalité.

Notre étude montre aussi des troubles métaboliques, biochimiques et immunitaires chez les sujets âgés. Ces sujets âgés présentent une dyslipidémie avec un taux élevé de triglycérides plasmatiques, cholestérol et du LDL-C par rapport aux jeunes témoins, mais ils ont des concentrations normales de glucose plasmatique. Une hyperglycémie a été précédemment rapportée chez les personnes âgées et elle a été associée à des troubles du métabolisme des hydrates de carbone (Szoke et al., 2008). L'hyperglycémie est surtout notée chez les personnes présentant un excès pondéral. Comme les personnes âgées étudiées dans cette étude ont un IMC moyen normal, ceci peut expliquer qu'ils ont aussi une glycémie normale.

En accord avec nos résultats, il a été démontré que les personnes âgées avaient aussi des taux de lipides et de lipoprotéines sériques anormaux (Kelley et al., 2005). Ces altérations peuvent contribuer au développement de l'athérosclérose chez les personnes âgées. Les raisons de l'accumulation de lipides au cours du vieillissement sont multiples, y compris les troubles

hormonaux, le mode de vie sédentaire, des changements métaboliques tels que les activités faibles de certaines enzymes, la diminution de la dégradation du cholestérol en acides biliaires ainsi l'augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol chez les âgés (Quiles et al, 2004; Kelley et al., 2005; Uranga et Keller, 2010; Mc Auley et Mooney, 2015).

Il a été montré qu'il y a des troubles du métabolisme du cholestérol durant le vieillissement normal. Chez l'humain, les niveaux plasmatiques en LDL augmentent d'environ de 40 % de 20 ans jusqu'à 60 ans (Uranga et Keller, 2010). La dyslipidémie chez les âgés semble être liée à la déficience en hormone de croissance (GH) et la réduction de l'expression des récepteurs hépatiques à LDL chez cette population (Parini et al., 1999).

Il y a une interconnexion entre la dyslipidémie, le stress oxydatif, et l'immunosénescence. En effet, des taux élevés en lipides et en lipoprotéines peuvent être partiellement responsables de la diminution des réponses immunitaires chez les personnes âgées (Ohtsuka et al., 1990). En outre, les LDL oxydées (LDLox) sensibilisent les cellules T CD4 + qui, une fois stimulées perdent leur capacité à proliférer. L'exposition des cellules activées T CD4 + aux LDLox conduit à l'apoptose, en association avec l'inhibition de l'expression de l'IL-2 (Meier et al., 2007).

La créatinine et l'urée sont les meilleurs marqueurs de la fonction rénale. L'urée est entièrement filtrée par les glomérules. Son taux sanguin reflète globalement le fonctionnement rénal. Dans notre travail, les teneurs en urée et créatinine sont diminuées chez les sujets âgés comparés aux témoins jeunes. Les teneurs faibles en urée peuvent être liées à une diminution de sa synthèse hépatique et suite à un régime pauvre en protéines. Les teneurs faibles en créatinine peuvent être liées à une masse musculaire faible chez les sujets âgés (sarcopénie). D'autres études ont montré une augmentation de l'urée sanguine suite à une fonction rénale altérée avec l'âge (Wang et al., 2014).

Le métabolisme hépatique est étudié par le dosage des transaminases, des enzymes localisées à l'intérieur des cellules. Il en existe deux types, l'aspartate aminotransférase (ASAT ou TGO) et l'alamine aminotransférase (ALAT ou TGP). La fonction des transaminases est de permettre le transfert d'amines lors des processus métaboliques et chimiques à l'intérieur des cellules. Les ALAT (TGP) prédominent dans le foie, alors que les ASAT (TGO) prédominent dans les muscles, notamment dans le muscle cardiaque. Le taux des transaminases dans le sang augmente lorsqu'il existe une lésion cellulaire, principalement au niveau du foie et des reins (Viry, 1990). Dans notre étude, les activités des transaminases plasmatiques TGO et TGP sont augmentées chez les hommes et femmes âgés comparés aux témoins jeunes. L'élévation des transaminases dans notre étude peut être en faveur d'une atteinte hépatique et cellulaire chez

les personnes âgées. Ceci est en accord avec d'autres travaux indiquant l'élévation des transaminases suite à l'âge (Zhao et al., 2000; Berdah et al., 2010).

Le vieillissement est également associé à une augmentation du stress oxydant (Kregel et Zhang, 2007). Le stress oxydatif peut être défini comme un déséquilibre entre la production des espèces réactives d'oxygène (ERO) et le pouvoir de neutralisation efficace de ces espèces par des mécanismes cellulaires antioxydants, qui comprennent à la fois des molécules enzymatiques (par exemple superoxyde dismutases (SOD), catalase, glutathion peroxydase, glutathion reductases, et peroxyrédoxines) et des réducteurs de bas poids moléculaire (par exemple, la vitamine E, le glutathion et la vitamine C). Les mitochondries utilisent environ 90% de l'oxygène total, représentant ainsi le site principal de la consommation d'oxygène ainsi qu'une source primaire et continue de production des ERO cellulaires. Le reste des ERO intracellulaires proviennent de l'activité des enzymes oxydantes, y compris le cytochrome P450, la xanthine oxydase cytoplasmique et l'enzyme membranaire Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) oxydase. Les radicaux libres les plus importants sont les dérivés d'oxygène en particulier l'anion superoxyde ($O_2^- \bullet$), le radical hydroxyle ($OH\cdot$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi que des espèces azotées réactives telles que l'oxyde nitrique (NO) et le peroxy-nitrite (Taha et Blaise, 2014).

Nos résultats montrent une augmentation des teneurs plasmatiques en anion superoxyde ($O_2^- \bullet$) et une diminution des teneurs plasmatiques en vitamine C et en monoxyde d'azote (NO) chez les sujets âgés, quelque soit le sexe, par rapport aux témoins jeunes.

L' $O_2^- \bullet$ est un radical libre. L'augmentation de sa production reflète un stress oxydant évident. Nos résultats concordent avec ceux de plusieurs auteurs qui indiquent une augmentation de cet anion superoxyde avec l'âge (Dellatre, 2005; Pucca et al., 2013). Ceci peut être en relation avec une activité anormale de la mitochondrie lors du vieillissement.

Les teneurs plasmatiques en vitamine C sont réduites chez les personnes âgées. Ceci reflète une diminution du pouvoir antioxydant chez les âgés. Le taux sanguin diminué de la vitamine C peut être dû à une faible consommation alimentaire de fruits et légumes ou alors à une forte consommation de cette molécule lors de la neutralisation des radicaux libres. Dans les deux cas, la personne âgée présente une défense diminuée ce qui peut aggraver son état de stress oxydatif.

Les sujets âgés étudiés présentent des concentrations plasmatiques significativement plus faibles en NO comparés aux sujets jeunes. Le NO est un puissant vasodilatateur synthétisé par les cellules de l'organisme. Sa sécrétion exerce un effet vasodilatateur puissant qui régule le flux sanguin. L'enzyme responsable de sa synthèse est la NO synthase qui utilise comme

cofacteur le NADPH (Boyer et al., 2011). Cette enzyme semble être altérée chez les sujets âgés (Gil del Valle, 2011). Le dysfonctionnement endothélial observé lors du vieillissement peut survenir lorsque des ERO réduisent la disponibilité du NO. En outre, le dysfonctionnement de l'endothélium artériel est un élément clé dans de nombreux troubles cardiovasculaires (Kregel et Zhang, 2007). La réduction du taux du NO peut être liée à des risques cardiovasculaires et d'hypertension chez les personnes âgées.

La théorie des radicaux libres du vieillissement propose que plusieurs changements liés à l'âge dans les fonctions cellulaires immunitaires, qui dépendent de l'état redox de ces cellules, puissent être de bons marqueurs de la santé, l'âge biologique et la longévité (Taha et Blaise, 2014). Nos résultats montrent aussi une réduction du taux de glutathion réduit (GSH) érythrocytaire et une augmentation du MDA et des protéines carbonylées chez les personnes âgées comparées à des sujets jeunes, en conformité avec des études précédentes (Kregel et Zhang, 2007; Cannizzo et al., 2012). En outre, la diminution de l'activité de catalase érythrocytaire observée chez les sujets âgés reflète une réduction de la défense antioxydante de l'organisme induisant un stress oxydant.

Il est bien établi que la concentration des biomolécules oxydées augmente avec l'âge y compris le MDA, et les protéines carbonylées. Le MDA est un céto-aldéhyde produit par la peroxydation des lipides insaturés. L'excès en MDA se combine avec les acides aminés libres en produisant la peroxydation protéique. Lors du vieillissement, on remarque une augmentation de ces deux paramètres pro-oxydants; par contre les marqueurs sanguins du pouvoir antioxydant sanguins tels que le GSH et la catalase sont diminués chez les personnes âgées (Dalle-Donne et al., 2006).

Le GSH est un antioxydant qui sert à éliminer le H₂O₂, les lipides peroxydés, les xénobiotiques. Il fonctionne comme cofacteur pour les enzymes glutathion peroxydase et glutathion-S-transférase. La catalase est une autre molécule antioxydante de nature enzymatique localisée dans le peroxysome dont la fonction est la détoxification du H₂O₂ en eau (Pole et al., 2016).

L'augmentation du stress oxydatif cellulaire joue un rôle important dans l'immunosénescence (Sandhu et Gurcharan, 2002). Lorsque la peroxydation lipidique est augmentée, des changements dans la perméabilité de la membrane cellulaire peuvent se manifester. Ainsi, il apparaît clairement que la supplémentation nutritionnelle notamment en antioxydants comme les vitamines et le NADH peut être une stratégie prometteuse pour renforcer l'immunité chez les personnes âgées. De plus, certains acides gras peuvent aussi améliorer l'immunité au cours du vieillissement.

Afin de valider l'hypothèse qu'une supplémentation en certains nutriments peut être bénéfique sur l'immunité lors du vieillissement, nous avons déterminé les effets de certaines vitamines et certaines huiles dont la composition en acides gras est différente sur la fonction lymphocytaire in vitro. Ce test in vitro est largement utilisé et représente un outil fiable pour apprécier indirectement la fonction immune (Medjdoub et al., 2011; Djelti et al., 2014; Meraou et al., 2016 ; Meraou et al., 2017).

Notre étude in vitro montre aussi que la prolifération des lymphocytes, la sécrétion des cytokines, et la balance oxydante/antioxydante lymphocytaire sont altérées chez les hommes et les femmes âgés.

La prolifération des lymphocytes T peut être stimulée in vitro en utilisant différents mitogènes comme la phytohemagglutinine (PHA), la concanavaline A (Con A), le pokeweed mitogène (PWM) (Palacios et al., 2007). Dans notre étude, la prolifération lymphocytaire stimulée par la Con A est réduite chez les sujets âgés comparés à des témoins jeunes. Puisque l'IL-2 est un facteur de croissance efficace des lymphocytes T, la sécrétion diminuée d'IL-2 pourrait être la raison de la prolifération réduite des lymphocytes chez les personnes âgées.

Cependant, la sécrétion d'IL-4 par les lymphocytes stimulés est augmentée chez les sujets âgés. L'IL-2 est une cytokine Th1 essentielle dans l'immunité cellulaire, caractérisée par son rôle dans la médiation de l'expansion clonale des lymphocytes T activés (Adolfsson et al., 2001). L'IL-4 est une cytokine anti-inflammatoire Th2 associées à l'immunité humorale. Elle exécute les fonctions pléiotropiques y compris l'induction de la différenciation des Th2, la prolifération des cellules B, et la suppression de la réponse Th1 (Sharma et al., 2008).

La réponse de type Th2 est dominante chez les personnes âgées en accord avec des données précédentes suggérant que la diminution de l'immunité associée à l'âge peut être liée à un déséquilibre de la sécrétion des cytokines immunitaires (Yen et al., 2000). Les études précédentes ont prouvé que le vieillissement est caractérisé par une dominance de cytokines type Th2 (Lee et al., 2012). Des changements phénotypiques de lymphocyte T ont été suggérés pour être à la base d'une grande partie des changements relatifs à l'âge du profil cytokinique.

Dans notre étude, les lymphocytes des sujets âgés sont exposés à un stress oxydant intracellulaire évident comme le montre la réduction de l'activité de la catalase lymphocytaire et les niveaux de GSH. Par contre, les teneurs en MDA et en protéines carbonylées sont élevés dans les lymphocytes des vieux comparés aux jeunes. Le stress oxydant a été précédemment rapporté dans les lymphocytes âgés, résultant probablement d'une production non contrôlée des radicaux libres avec l'âge et des défenses antioxydantes diminuées (Gautam

et al., 2010). Nos résultats sont en accord avec cette observation. De plus, la réduction de la prolifération *in vitro* de lymphocytes chez les personnes âgées peut être liée à l'augmentation du stress oxydatif intracellulaire.

Des études ont montré que l'épuisement du GSH intra-lymphocytaire chez les personnes âgées est lié à un taux réduit de prolifération des lymphocytes, à une surproduction d'IL-4 et à un déclin dans les fonctions des lymphocytes (Peterson et al., 1998). Les lymphocytes T humains appauvris en GSH sont incapables de proliférer en réponse aux mitogènes de type lectines suggérant une corrélation directe entre la prolifération des cellules et la disponibilité de GSH (Hadzic et al., 2005). De plus, des niveaux élevés en MDA et en protéines carbonylées chez les personnes âgées sont associés au phénotype Th2 observé durant le vieillissement (Ponnappan et Ponnappan, 2011; Bennett et Griffiths, 2013).

Le stress oxydatif peut induire la production et la libération de l'IL-4 capable de soutenir la différenciation de type Th2. Des études antérieures ont montré que le H₂O₂ induit la production d'IL-4 et d'IL-6 dans les mastocytes (Frossi et al., 2003). D'autre part, une exposition prolongée à des concentrations élevées en ERO peut inhiber la prolifération des lymphocytes T et conduire à l'apoptose (Bennett et Griffiths, 2013). L'exposition des lymphocytes T à un stress oxydant cause la diminution de la production d'IL-2 et de la réponse du calcium intracellulaire, et une activité altérée des facteurs de transcription requis pour la transcription d'IL-2. Ces altérations sont semblables aux changements rapportés chez les lymphocytes T âgés (Adolfsson et al., 2001).

En plus des facteurs génétiques et environnementaux, le problème de malnutrition enregistré chez les personnes âgées étudiées semble être la cause principale des altérations métaboliques, immunitaires et oxydatives chez la population âgée. L'intervention nutritionnelle peut donc avoir des effets bénéfiques sur l'état de santé des personnes âgées. Les interventions thérapeutiques visant à améliorer le pouvoir antioxydant endogène sont un mécanisme de remplacement précieux pour inverser le cercle vicieux du stress oxydatif et de l'inflammation.

Différentes études moléculaires impliquent le (Nrf2) (nuclear factor erythroid 2 related factor) dans les anomalies liées au vieillissement tel que le stress oxydant. Le (Nrf2) est un facteur de transcription essentiel dans la défense contre le stress oxydatif via l'induction d'environ 200 gènes de type ARE (antioxydant response element). La voie de signalisation Nrf2-ARE régule l'expression des gènes impliqués dans la détoxification et l'augmentation de la capacité antioxydante cellulaire. La voie Nrf2 / ARE peut être activée pharmacologiquement par des molécules d'origine naturelle (nutraceutiques) et par des produits médicamenteux synthétisés chimiquement. Pour montrer le rôle régulateur de Nrf2

dans l'immunosenescence, des études ont démontré que les inducteurs de Nrf2, tels que le sulforaphane restaure l'immunité de type 1. Les auteurs de cette étude ont démontré que les cellules dendritiques des souris âgées ont des niveaux bas de GSH et que le traitement de ces cellules par le sulforaphane a entraîné une augmentation des taux de GSH et par la suite la reconstitution de la réponse des Th1 (Ponnappan et Ponnappan, 2011).

Étant donné que l'inflammation chronique et le stress oxydatif sont des causes principales du vieillissement et des maladies liées à l'âge, des antioxydants naturels efficaces et des agents anti-inflammatoires pourraient fournir des options thérapeutiques nouvelles et sûres pour diminuer ces troubles dévastateurs. La capacité des nutriments à moduler la réponse immunitaire a été démontrée précédemment mais elle est encore discutée dans le vieillissement. Les personnes âgées sont particulièrement à risque de carence marginale de nutriments. Nous avons donc évalué dans cette étude les effets correctifs *in vitro* de certains nutriments sur la fonction des lymphocytes au cours du vieillissement.

Nous avons étudié dans la deuxième partie de ce travail de doctorat, les effets *in vitro* des vitamines et des acides gras contenus dans les huiles végétales sur les fonctions lymphocytaires et nous avons essayé de déterminer si ces nutriments peuvent contribuer à l'amélioration de l'immunité durant le vieillissement.

Nos résultats ont prouvé que la supplémentation *in vitro* en nutriments a des effets modulateurs importants sur la fonction des cellules T chez les personnes âgées. Les effets immuno-modulateurs des nutriments sont évidents sur la prolifération lymphocytaire et la sécrétion des cytokines avec une réduction significative du stress oxydant intracellulaire.

La vitamine A *in vitro* induit une augmentation significative de la prolifération des lymphocytes et une élévation de la sécrétion d'IL-4 sans affecter les niveaux d'IL-2 chez les hommes et femmes jeunes témoins. Le rapport IL-2/IL-4 est réduit par cette vitamine. Ces résultats sont alignés à une réponse de type Th2, reflétant probablement l'effet anti-inflammatoire de la vitamine A chez les jeunes. Cependant, dans les lymphocytes âgés, la vitamine A n'a eu aucun effet significatif sur la prolifération lymphocytaire *in vitro* et sur la sécrétion des cytokines. Cette non réponse des lymphocytes âgés à la vitamine A reflète les modifications liées à l'âge dans le métabolisme et les voies de signalisation de vitamine A suite à une diminution significative des récepteurs d'acide rétinoïque dans les cellules des personnes âgées (Feart et al., 2005). De plus, dans notre étude, nous avons observé que le statut redox intracellulaire n'est pas affecté par la présence de la vitamine A dans les deux groupes, jeune et âgé. Nous n'avons pas observé les effets pro-oxydants précédemment

rapportés de la vitamine A (Murata et Kawanishi, 2000; De Oliveira, 2015). Ceci peut être lié aux différentes doses utilisées, variant d'une étude à l'autre.

Nos résultats prouvent que la supplémentation en vitamine C augmente la prolifération in vitro des lymphocytes avec augmentation parallèle de la sécrétion d'IL-2 et IL-4 dans les groupes âgés et jeunes. Le rapport IL-2/IL-4 est réduit par la vitamine C chez les sujets âgés et jeunes, en faveur d'un décalage de l'équilibre Th1/Th2 vers le phénotype Th2, phénotype très favorable puisque anti-inflammatoire. Des résultats contradictoires ont été édités au sujet des effets immuns de la vitamine C, variant selon la dose utilisée. Plusieurs travaux précédents ont suggéré que la supplémentation avec la vitamine C améliore l'immunité des personnes âgées (Casciari et al., 2003). Les concentrations élevées en vitamine C ont abaissé la viabilité des cellules, la prolifération in vitro et la sécrétion diminuée de cytokines des cellules T activées (Maeng et al., 2009). La supplémentation modérée en vitamine C a augmenté la réponse proliférative des lymphocytes in vitro chez les sujets âgés (Anderson et al., 1980; Kennes et al., 1983). En effet, la supplémentation en vitamine C augmente la production de cytokines par les cellules mononucléaires de sang périphérique (Jeng et al., 1996).

La vitamine C ou son composé oxydé le dehydroascorbate (DHA) semble avoir stimulé la prolifération lymphocytaire en induisant la formation de NADPH et par la suite la régénération de GSH lymphocytaire par la voie des pentoses phosphates (Puskas et al., 2000). Dans notre étude, la vitamine E induit aussi une augmentation significative de la prolifération des lymphocytes avec une augmentation concomitante de la sécrétion d'IL-2 chez les vieux et les jeunes sujets témoins. Les niveaux d'IL-4 sont augmentés chez les jeunes sujets tandis que non affectés chez les personnes âgées après addition de la vitamine E. Néanmoins, le rapport IL-2/IL-4 est sensiblement augmenté en présence de la vitamine E dans les lymphocytes âgés et jeunes. La vitamine E semble avoir produit un phénotype Th1. Nos résultats sont en accord avec des épreuves cliniques prouvant que la supplémentation de la vitamine E a augmenté la production d'IL-2 chez les individus vieux en bonne santé (Meydani et al., 1998). D'autres études montrent une production d'IL-2 accrue chez les souris âgées supplémentées en vitamine E (Adolfsson et al., 2001). Parmi les antioxydants, la vitamine E est le plus intensivement étudiée en ce qui concerne des effets immunostimulants. Il a été démontré que la vitamine E module la production des cytokines par son effet sur les facteurs de transcription qui sont réglés par le statut redox, et en influençant la synthèse des PGE2, qui joue un rôle principal dans la réponse Th1 et dans la régulation des cytokines proinflammatoires (Han et Meydani, 2000). L'effet de la vitamine E (tocophérol) sur l'immunité des vieux était

intensivement étudié. Les sujets âgés en bonne santé ont été supplémentés avec 400-800 unités internationales de la vitamine E, leur hypersensibilité a été diminuée et la production d'IL-2 in vitro par les lymphocytes a été augmentée. La vitamine E semble causer ces effets via l'inhibition de PGE2 ou d'autres facteurs suppressifs (Stowe et Goodwin, 2011).

Des études précédentes ont montré que 46 μ M de la vitamine E stimule la prolifération des lymphocytes TCD4+ et augmente la production de l'IL-2 par 1,7 fois chez les souris âgées (Molano et Meydani, 2012). Le mode d'action moléculaire de la vitamine E reste mal connu. Différents mécanismes ont été proposés. Le fonctionnement le plus connu est que la vitamine E protège les lipides membranaires contre les ERO impliquées dans le phénomène d'immunosenescence. Cependant, ce dernier n'est pas le seul mécanisme d'action de cette vitamine sur l'immunité, étant donnée que la vitamine E influence les voies de signalisation cellulaire, en inhibant certaines protéines tels que PKC, phospholipase A1 et en stimulant la diacylglycérol kinase et la protéine tyrosine phosphatase. La vitamine E s'insère aussi au niveau de la bicouche lipidique en stabilisant les structures membranaires cellulaires (Molano et Meydani, 2012).

Le NADH est connu pour compléter le niveau des stocks cellulaires épuisés d'ATP (Forsyth et al, 1999). Notre étude montre un effet stimulant de cette molécule sur la prolifération des lymphocytes avec une augmentation significative des niveaux d'IL-4 sans affecter les taux d'IL-2 chez les sujets jeunes et âgés. Le NADH semble avoir produit un phénotype Th2. Ces effets stimulants du NADH sur la croissance des cellules peuvent être liés à la régénération cellulaire de l'ATP. Cette dernière a un rôle principal dans la prolifération des cellules et les T-cellules exigent les niveaux élevés de NADH (Delmastro-Greenwood et Piganelli, 2013). Il a été également montré que le NADH peut empêcher l'apoptose et peut maintenir la viabilité des cellules en induisant la production autocrine d'IL-4 dans les cultures des cellules (Palaga et al., 2004). En effet, il a été démontré que le NADH in vitro diminue l'apoptose chez les cellules irradiées (Liu et Zhang, 2003).

Les vitamines C, E et NADH 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 l'oxydant / antioxydant chez les sujets âgés et jeunes, tandis que le NADH a des effets bénéfiques seulement chez les sujets âgés. La vitamine C et E induisent une augmentation significative d'activité de la catalase avec une diminution concomitante des teneurs en MDA et en protéines carbonylées chez les jeunes témoins et les sujets vieux. De plus, la vitamine C et la vitamine E augmentent les teneurs cellulaires en GSH chez les hommes et les femmes âgés. Ces résultats suggèrent que le statut oxydant/ antioxydant des lymphocytes T des personnes

âgées est plus sensible à la présence des vitamines que ceux des jeunes témoins. Il est important de noter qu'en présence de ces deux vitamines, le statut redox lymphocytaire des sujets âgés est normalisé et se rapproche de celui des jeunes témoins. Nos résultats sont en accord avec les rapports précédents qui ont montré le pouvoir antioxydant de la vitamine C et E (Guaiquil et al., 2001; Traber et Atkinson, 2007). 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 (Lee et Wan, 2000; Guaiquil et al., 2001).

Dans notre étude, le NADH *in vitro* n'a aucun effet sur le statut redox des lymphocytes de jeunes sujets, alors qu'il le module dans les lymphocytes des personnes âgées. En présence de cette molécule, des niveaux de GSH et l'activité de la catalase lymphocytaires sont augmentés tandis que les teneurs en MDA et en protéines carbonylées sont réduites par le NADH chez les vieux, reflétant une diminution du stress oxydant intracellulaire. Le NADH a été indiqué comme antioxydant (Olek et al., 2004). La réponse des lymphocytes est donc différente selon l'âge des sujets étudiés. Les lymphocytes des sujets âgés répondent plus et sont plus sensibles aux différentes vitamines utilisées.

Les études précédentes renforcent l'idée que le régime alimentaire, en particulier la qualité des graisses alimentaires, peut moduler les réponses immunitaires et le stress oxydatif (Wang et al., 2000). En effets, les acides gras ont un effet profond sur la lymphoprolifération et la production des cytokines chez les personnes âgées (Venkatraman et Pendergast, 2000).

En général, les acides gras insaturés sont connus pour inhiber la prolifération stimulée par le mitogène des lymphocytes, par rapport aux acides gras saturés mais leurs actions peuvent être différentes selon les concentrations utilisées (De Jong et al., 2014).

L'acide linoléique (LA, C18:2 n-6) favorise une augmentation de la prolifération des lymphocytes à faible concentration (25 μ M) et augmente l'effet de stimulation de l'IL-2 sur la prolifération des lymphocytes, tandis que des concentrations plus élevées de cet acide gras diminue la prolifération cellulaire (Gorjao et al., 2007). Les acides gras polyinsaturés oméga-3 ont plutôt des effets immunosuppresseurs (Venkatraman et Pendergast, 2000).

L'huile d'olive contient de l'acide oléique (AGMI n-9) qui a un effet immunosuppresseur sur les lymphocytes T des personnes âgées et jeunes. La plupart des études ont montré qu'un régime alimentaire contenant de l'huile d'olive administré à des animaux favorise une réduction significative de la prolifération des lymphocytes en réponse au mitogène la concanavaline A (Con A) (Yaqoob, 1994). Néanmoins, nos résultats montrent que l'addition d'huile d'olive dans le milieu de culture n'a aucun effet sur la prolifération lymphocytaire et la synthèse d'IL-2. Cependant, elle augmente significativement la sécrétion d'IL-4 dans tous les

groupes, toute en diminuant le rapport IL-2/IL-4, cette huile semble avoir un pouvoir anti-inflammatoire.

L'addition d'huile de nigelle induit une augmentation significative de la prolifération lymphocytaire et de la production d'IL-2 et d'IL-4 par les lymphocytes stimulés chez les âgés et les jeunes témoins. L'huile de nigelle a un effet anti-inflammatoire chez les témoins jeunes mais sans affecter le rapport IL-2/IL-4 chez le groupe des âgés.

L'huile de nigelle est riche en AGPI n-6 (LA, C18:3 n-6) avec un ratio Oméga-6/oméga-3 égal à 56/1. Nos résultats sont en accord avec des études antérieures montrant que la supplémentation alimentaire avec l'huile de nigelle améliore la réponse immunitaire des sujets âgés en bonne santé (Salem, 2005). L'effet immunostimulant de l'huile de nigelle sur les lymphocytes pourrait être dû à l'augmentation du rapport Oméga-6/oméga-3. D'ailleurs, Pizato et al. (2006) ont constaté que l'augmentation du rapport oméga-6/oméga-3 du régime alimentaire a augmenté la prolifération des lymphocytes T. Cependant, l'huile de tournesol a aussi un rapport élevé en Oméga-6/oméga-3 (59/1), mais elle n'a pas affecté la prolifération lymphocytaire ni la production des cytokines chez tous les groupes. Selon notre avis, la composition en acides gras ne peut pas seule expliquer l'effet immunostimulant ou immunosuppresseur de l'huile testée car les huiles contiennent aussi certains composés minoritaires bioactifs tels que les phytostérols. L'huile de nigelle contient majoritairement le bêta-sitostérol (54% des stérols totaux) et le stigmastérol (20.92%). Par contre, il a été démontré que l'huile de tournesol raffiné a un niveau plus bas de phytostérols (Cheikh-Rouhou et al., 2007; Verleyen et al., 2002).

Les phytostérols ont des structures proches à celle de cholestérol, ils sont présents surtout dans les huiles végétales non raffinées. Des études ont montré que le sitostérol stimule in vitro et in vivo la réponse immunitaire et la prolifération lymphocytaire (Awad et Fink, 2000).

Les noix (*Juglans regia* L.) sont une excellente source d'acide α -linoléique (oméga-3), et ont une teneur élevée en antioxydants tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques (acide ellagique), la mélatonine, le gamma-tocophérol et le sélénium. Elles constituent une excellente source d'antioxydants naturels efficaces et d'agents de chimio-prévention (Carvalho et al., 2010). Dans notre étude, l'huile de noix n'a pas affecté la prolifération ni la sécrétion des cytokines chez tous les groupes étudiés.

Les graines de lin (*Linum usitatissimum*) sont également une excellente source de l'acide α -linoléique avec des niveaux typiques de 55% dans l'huile (Oomah, 2001). Les auteurs d'un certain nombre d'études ont suggéré que le principal avantage de la consommation d'huile de lin est due à son composé l'acide α -linoléique qui module également la réponse

immunitaire; mais il abaisse le taux des lymphocytes chez les chiens âgés (Hall et al., 1999). La capacité des lymphocytes T à proliférer et à produire de l'IL-2 après stimulation par la Con A est nettement réduite après l'exposition à l'huile de lin pour tous les groupes. La synthèse d'IL-4 est augmentée en réponse à l'huile de lin. L'effet immunosuppresseur de l'huile de graines de lin est dû à sa richesse en acide α -linoléique (McGuire et al., 1997). Dans certaines études sur le rat, un régime riche en huile de lin pendant 6 semaines induit une inhibition de la prolifération induite par la Con A des lymphocytes spléniques (Jeffery et al., 1996). Certains auteurs suggèrent que l'activation de la phospholipase D peut être responsable de l'effet antiprolifératif des oméga-3 dans les cellules lymphocytaires et que la surexpression de la phospholipase D dans les cellules T inhibe l'expression de l'ARNm des IL-2 (Shaikh et Edidin, 2006)

D'autres études ont montré que les oméga-3 ont un effet immunosuppresseur via l'inhibition de l'activité MAP kinase lymphocytaire (Denys et al., 2002).

Il est généralement connu que l'huile d'olive contient des acides gras, mais aussi est particulièrement riche en composés phénoliques. Ils présentent une activité anti-oxydante (De Pablo et al., 2004). Dans notre étude, l'huile d'olive a présenté un léger effet antioxydant en diminuant la peroxydation lipidique chez les âgés, et en augmentant le taux de GSH. Cependant, elle n'affecte pas la catalase ni les taux des protéines carbonylées.

L'huile de tournesol et celle de noix n'ont pas affecté le statut oxydant/antioxydant des lymphocytes. Les études antérieures ont montré le pouvoir antioxydant faible de l'huile de tournesol (Meraou et al., 2016). In vitro, l'huile de noix peut augmenter la capacité antioxydante des cellules monocytaires et peut élever l'activité de l'enzyme SOD. Cependant, cette huile ne parvient pas à protéger l'ADN et les protéines contre les dommages oxydatifs causés par les ERO (Laubertova et al., 2014).

Par contre, l'huile de nigelle et de lin ont amélioré le statut redox lymphocytaire chez tous les groupes et ceci est en accord avec des études précédentes. Djelti et al. (2014) ont montré que le taux de MDA et de protéines carbonylées diminuent tandis que les activités de la SOD et de la catalase et le taux de GSH augmentent dans les lymphocytes cultivés en présence de l'huile de lin et l'huile de nigelle chez les diabétiques.

Conclusion



Au cours de ces dernières années, l'amélioration de la qualité de vie à l'échelle planétaire a permis la prolongation de l'espérance de la vie de l'espèce humaine surtout dans les pays développés. Cependant, le taux de personnes âgées élevé a des répercussions socioéconomiques non négligeables. Les sujets âgés sont le plus souvent susceptibles à des maladies graves telles que Alzheimer, HTA, diabète, cancers, infections,...etc. En plus, les sujets qui dépassent 65 ans répondent moins aux vaccins tels le vaccin de la grippe. Ainsi, le vieillissement rend l'être humain vulnérable à toutes pathologies graves. Le vieillissement est donc devenu un problème de santé publique. Malheureusement, ce phénomène biologique est non évitable. Cependant, on peut agir pour permettre un vieillissement en pleine santé, ou un vieillissement réussi, et c'est l'une des préoccupations majeures de l'OMS.

La quasi-totalité des pathologies liées au vieillissement sont associées à un déclin immunitaire, à un stress oxydant et à la malnutrition. Nos résultats de cette thèse de doctorat ont bien montré que le pouvoir de prolifération lymphocytaire et la synthèse de l'IL-2 sont significativement faibles chez les personnes âgées comparées aux témoins jeunes. Il est bien établi que la malnutrition est l'origine du dysfonctionnement immunitaire marqué chez les sujets âgés. Effectivement, nos résultats montrent que le risque de malnutrition est élevé chez les personnes âgées de la région de Tlemcen, avec une déficience en vitamine C enregistrée uniquement chez les femmes âgées. A côté des déséquilibres métaboliques marqués chez la population âgée tels que la dyslipidémie (augmentation du cholestérol, des TG et des LDL), et la diminution du taux du NO, le stress oxydant cellulaire apparaît comme un facteur clé qui cause le déclin immunitaire lié à l'âge. En outre, l'élévation du taux des marqueurs du stress oxydant plasmatiques et lymphocytaires (anion superoxyde, MDA, PCAR) et une baisse du pouvoir antioxydant (GSH, catalase) chez les âgés sont évidents, et en faveur d'une augmentation du stress oxydatif.

Les nutriments antioxydants ou non antioxydants occupent une place d'actualité dans le domaine du vieillissement. Un des aspects les plus étudiés est lié à leur effet immuno-modulant. Les différentes preuves scientifiques ont poussé de nombreuses organisations et gouvernements à reconnaître aujourd'hui les interventions nutritionnelles comme une nouvelle approche préventive et/ou thérapeutique à un large spectre de maladies modernes liées à l'âge.

Dans le but de mettre en évidence des nutriments capables de stimuler la prolifération lymphocytaire, tout en permettant un statut redox cellulaire normal, nous avons choisi de comparer l'effet des nutriments antioxydants (vitamine A, C, E et NADH) ou non antioxydants (acides gras dans des huiles végétales) sur les lymphocytes isolés des personnes âgées ou jeunes.

Nos résultats ont montré l'effet correctif *in vitro* de certains nutriments sur la fonction lymphocytaire. Parmi les nutriments testés, sur le plan stimulation de la réponse Th1 et balance IL-2/IL-4, la vitamine E a donné les meilleurs effets correctifs. La stimulation des lymphocytes isolés des sujets âgés par cette molécule a permis de rendre la fonction lymphocytaire similaire à celle des jeunes témoins. De ce fait, ce nutriment pourrait être un meilleur adjuvant alimentaire lors de la vaccination chez les personnes âgées plus de 65 ans. Néanmoins, des doses faibles sont à recommander puisque cette vitamine E semble engendrer un profil pro-inflammatoire chez les personnes âgées.

Le NADH, la vitamine C et l'huile de nigelle ont aussi stimulé la fonction lymphocytaire chez les sujets âgés, tout en rendant la prolifération cellulaire similaire à celle des jeunes. Cependant, ces nutriments au contraire de la vitamine E semblent augmenter aussi la sécrétion d'IL-4 en favorisant une réponse Th2. Ces substrats pourraient être utiles dans le renforcement de l'immunité contre les maladies inflammatoires et les infections à pathogènes extracellulaires.

Chez les âgés, l'huile d'olive, la vitamine A, l'huile de tournesol et celle de noix n'ont pas affecté la prolifération lymphocytaire. Par contre, l'huile de lin avait un effet immunosuppresseur et anti-inflammatoire. A notre avis, une consommation excessive de cette huile pourra affaiblir l'immunité de l'organisme lors des infections intracellulaires, virales et cancers. Sa consommation doit être contrôlée chez les personnes âgées.

Une bonne culture nutritionnelle peut donc avoir des effets bénéfiques sur l'état de santé des personnes âgées. Une nutrition équilibrée est considérablement importante pour la prévention et la gestion des maladies chroniques liées à l'âge et pour le maintien de la santé générale de l'individu que ce soit jeune ou âgé.

En fin, à la lumière des résultats obtenus, nous recommandons aux personnes âgées la consommation non excessive des aliments riches en vitamine E, une consommation importante de vitamine C et d'huile de nigelle pour renforcer leur immunité et lutter contre les

infections. Une nutrition équilibrée est un facteur clé pour atteindre un vieillissement en pleine santé « Bien se nourrir pour bien vieillir ».

A côté des ces recommandations nutritionnelles, l'activité physique reste aussi un outil très important pour maintenir une bonne santé au cours du vieillissement.

Références bibliographiques

| |
|--|
| |
|--|

A

- Accardi G, Balistreri CR , Caruso C , Candore G (2014). Diet and Immunosenescence. In A. Massoud, N. Rezaei (eds.), *Immunology of Aging*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Adolfsson O, Huber BT, Meydani SN (2001). Vitamin E enhanced IL-2 production in old mice: naive but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2- producing capacity. *J Immunol*. 167: 3809–3817.
- Aebi H (1974). Catalase in vitro. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie GmbH. Weinheim. 26:673-684.
- Ait Sadi S (2014). Vieillesse en Algérie. *Echo - News*. P1.
- Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Munoz-Cacho P, Martinez-Taboada VM (2012). Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol*. 273: 124–132.
- Amarya S , Singh K, Sabharwal M (2015). Changes during aging and their association with malnutrition. *Journal of Clinical Gerontology & Geriatrics*. 6 :78-84
- Anderson R, Oosthuizen R, Maritz R, Heron A, Van Rensburg AJ (1980). The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and humoral immune function in volunteers. *Am J Clin Nutr*. 33: 71-76.
- Assemblée générale de l'association Médicale Mondiale (2013). *Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*
- Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue-tetrazolium reduction. Greenwald RA, eds. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton: CRC Press, Inc. 123-132.
- Awad AB, Fink CS (2000). Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action . *J Nutr*. 130: 2127–2130.

B

- Baba Ahmed Y, Merzouk H, Harek Y, Medjdoub A, Cherrak S, Larabi L, Narce M (2014). In vitro effects of nickel (II) and copper (II) complexes with 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole on T lymphocyte proliferation and intracellular redox status. *Med Chem Res.* 24: 764-772.
- Baba Hamed Y, Medjdoub A, Mostefa Kara B, Merzouk H, Villemin D, Narce M (2012). 5,6-Dihydro-2H-pyranones and 5,6-dihydro-2H-pyridones and their derivatives modulate in vitro human T lymphocyte function. *Mol Cell Biochem.* 360: 23–33.
- Barrat F, Lesourd B, Boulouis HJ (1997). Sex and parity modulate cytokine production during murine ageing. *Clin Exp immunol.* 109:562-568.
- Bauduer F (2011). Vieillesse et longévité : données récentes. *Bull Mém Soc Anthropol. Paris.* 23: 189-199.
- Beckerman P, Ben Yehuda A (2009). Mitochondria and immunosenescence. *Handbook on Immunosenescence*, DOI 10.1007/ 978-1-4020-9062-2_37. Springer Science.
- Behl C, Ziegler C (2014). Theories and mechanisms of aging, Chapter 3 Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease, *Springer Briefs in Molecular Medicine*.
- Bennett SJ, Griffiths HR (2013). Regulation of T-Cell functions by oxidative stress. In: *Studies on Arthritis and Joint Disorders, Oxidative Stress*. M.J. Alcaraz et al. (eds) Springer Science Eds.36p.
- Behairi N, Belkhef M, Mesbah-Amroun H, Rafa H, Belarbi S, Tazir M, Touil-Boukoffa C (2015). All- trans -retinoic acid modulates nitric oxide and interleukin-17A production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation.* 1021–7401.

-Bharadwaj S, Ginoya S, Tandon P, Gohel TD, Guirguis J, Vallabh H, Jevann A, Hanouneh I (2016). Malnutrition: laboratory markers vs nutritional assessment. *Gastroenterology Report*. 4 : 272–280.

-Berdah J (2010). La femme et le syndrome métabolique. *Réalités en Nutrition et en Diabétologie*. 27:23-27.

-Berer K, Krishnamoorthy G (2012). Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta Neuropathol*. 123: 639–651.

-Bergstrom T, Ersson C, Bergman J, Moller L (2012). Vitamins at physiological levels cause oxidation to the DNA nucleoside deoxyguanosine and to DNA—alone or in synergism with metals. *Mutagenesis* . 1–7.

-Bonnefoy M (2010). Composition corporelle et activité physique chez le sujet âgé, *Cah Gérontol*. 2: 45-49.

-Boyer L, Plantier L, Dagouassat M, Lanone S, Goven D, Caramelle P, Berrehar F, Kerbrat1 S, Dinh-Xuan7AT, Crestani B, Le Gouvello S, Boczkowski J (2011). Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema. *Laboratory Investigation*. 91: 353–362.

-Bucci L, Ostan R, Capri M, Salvioli S, Cevenini E, Celani L, Monti D, Franceschi C (2009). *Inflamm-Aging*. Handbook on Immunosenescence. Springer Science.

-Budowski P, Sklan D (1989). Vitamins E and A. chapter 9 in: *The Role of Fats in Human Nutrition* . ISBN 0-12-718051-6

C

-Campoio TR, Oliveira FA, Otton R (2011). Oxidative stress in human lymphocytes treated with fatty acid mixture: Role of carotenoid astaxanthin. *Toxicology in Vitro*. 25: 1448–1456.

-Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L (2011). Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics*. 74: 2313–2323.

-Cannizzo ES, Clement CC, Morozova K, Valdor R, Kaushik S, Almeida LN, Follo C, Sahu R, Cuervo AM, Macian F, Santambrogio L (2012). Age-related oxidative stress compromises endosomal proteostasis. *Cell Reports*. 26: 136–149.

- Cao W, Hong Y, Chen H, Wu F, Wei X, Ying W (2016). SIRT2 mediates NADH induced increases in Nrf2, GCL, and glutathione by modulating Akt phosphorylation in PC12 cells. *FEBS Letters*.

-Carvalho M, Vanda PJF, Mendes S, Silva R, Pereira JA , Jerónimo C, Silva BM (2010). Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 441–447.

-Casciari JJ, Riordan HD, Mikirova N, Austin J (2003). Effect of Vitamin C supplementation on Ex Vivo immune cell functioning. *J Ortho Med*. 18: 83-92.

-Cheikh-Rouhou S , Besbes S , Lognay G, Blecker C, Deroanne C , Attia H (2008). Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21: 162–168.

-Choinière R (2010). Vieillesse de la population, état fonctionnel des personnes âgées et besoins futurs en soins de longue durée au Québec. Institut national de santé publique du Québec. Bibliothèque et archives Canada. ISBN : 978-2-550-58882-5.

-Collison LW, Kannan L, Onorato TM, Knudsen J, Haldar D, Jolly CA (2005). Aging reduces glycerol-3-phosphate acyltransferase activity in activated rat splenic T-lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1687:164– 172.

Corvaisier-Chiron M, Beauvillain C (2010). Les lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes Th17 : fonctions physiologiques et pathologiques. *Revue Francophone des laboratoires*. 424 : 31-46.

D

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 52:601–623.

-Darnton-Hill I and Ahmed F (2010). Micronutrients: Immunological and infection effects on nutritional status and impact on health in developing countries. Chapter 3. A. Bendich, R.J. Deckelbaum (eds.), *Preventive Nutrition, Nutrition and Health*.

-Dato S, Crocco P, D'Aquila P, de Rango F, Bellizzi D, Giuseppina R, Giuseppe P (2013). Exploring the role of genetic variability and lifestyle in oxidative stress response for healthy aging and longevity. *Int J Mol Sci*. 14: 16443-16472.

-Dawson HD, Collins G, Pyle R, Key M, Weeraratna A, Deep-Dixit V (2006). Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes. *BMC Immunology*. 7: 27.

- De Jaeger C (2011). Les théories du vieillissement. *Médecine & Longévité*. 3: 153-154.

-De Jong AJ, Kloppenburg M, Toes REM and Ioan-Facsinay A (2014). Fatty acids, lipid mediators, and T-cell function. *Frontiers in immunology*. 5:483-488.

-De la Fuente M (2014) . The immune system, a marker and modulator of the rate of aging. In: *Immunology of aging*. A. Massoud and N. Rezaei (eds). Springer-Verlag., Berlin Heidelberg. p. 5-6.

-De la Fuente M, Ferrandez MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A, Miquel J (1998). Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Can J Physiol Pharmacol*. 76: 373–380.

-Deleidi M, Jaggle M, Rubino G (2015). Immuneaging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Front. Neurosci*. 9:172.

-Delgado JE, Castañeda NY, Castro M, Amaro RG, Curiel IG, Rosales AM, Calderon BR, Santiago BR (2013). Production of antimicrobial peptides is preserved in aging. *Clinical Immunology*. 148: 198–205.

-Delmastro-Greenwood MM, Piganelli JD (2013). Changing the energy of an immune response. *Am J Clin Exp Immunol*. 2: 30-54.

-Demarin V, Podobnik SS, Storga-Tomic D, Kay G (2004). Treatment of Alzheimer's disease with stabilized oral nicotinamide adenine dinucleotide: a randomized, double-blind study. *Drugs Exp Clin Res*. 30: 27–33.

-Denys A, Hichami A, Khan NA (2002). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase enzyme activity in human T-cells. *Mol Cell Biochem*. 232 : 143–148.

-De Oliveira, MR (2015). Vitamin A and retinoids as mitochondrial toxicants. *Oxid Med Cell Longev*. 13p.

-De Pablo MA, Puertollano MA, De Cienfuegos GÁ (2004). Olive oil and immune system functions: potential involvement in immunonutrition. *Grasas y Aceites*. 55 : 42-51.

-Djelti F, Merzouk H, Merzouk SA, Narce M (2014). In vitro effects of oil's fatty acids on T cell function in gestational diabetic pregnant women and their newborns. *Journal of Diabetes*.

-Draper H, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186:421-431.

E

-Espino J, Pariente JA, Rodriguez AB (2012). Oxidative stress and immunosenescence: Therapeutic effects of melatonin. *Oxid. Med. Cell. Longev*.

F

-Ferry M (2013). Les micronutriments chez le sujet vieillissant. *Cah Gerontol*. 5 : 308-317.

-Ferry M (2008). Bases nutritionnelles pour un vieillissement réussi. *Cah Nutr Diét*. 43: 2.

-Feart C, Pallet V, Boucheron C, Higuere D, Alfos S, Letenneur L (2005). Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Euro J Endocrinology*.152 :449–458.

-Forsyth LM, Preuss HG, MacDowell AL, Chiazze L, Birkmayer GD, Bellanti JA (1999). Therapeutic effects of oral NADH on the symptoms of patients with chronic fatigue syndrome. *Ann Aller Asthma Immunol*. 82 : 2.

-Fritsche KL (2015). The science of Fatty acids and inflammation. *Adv Nutr*. 6: 293-301.

-Frossi B, De Carli M, Curt DK, Rivera J, Pucillo C (2003). Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1- dependent pathway. *Eur J Immunol*. 33: 2168–2177.

-Fulop T, Le Page A, Fortin C, Witkowski JM, Dupuis G, Larbi A (2014). Cellular signaling in the aging immune system. *Current Opinion Immunology*. 29: 105–111.

-Fulop et al. (2009). *Handbook on Immunosenescence*, DOI 10.1007/978-1-4020-9062-2_66. Springer Science.

G

-Garg SK, Colin D, Shi H, Yung R (2014). Changes in adipose tissue macrophages and T cells during aging. *Critical Rev Immunol*. 34:1–14.

-Gautam N, Das S, Mahapatra SK, Chakraborty SP, Kundu PK, Roy S (2010). Age associated oxidative damage in lymphocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 3: 275-282.

-Gavriilidou NN, Pihlsgård M and Elmståhl S (2015). High degree of BMI misclassification of malnutrition among Swedish elderly population: Age-adjusted height estimation using knee height and demispan. *European Journal of Clinical Nutrition* . 69: 565–571.

-Gil del Valle L (2011). Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine & Aging Pathology* 1: 1–7.

- Gonzalez B, Brunetti N, Lanfranchi G, Lorisson E, Verny C (2010). Activité physique et diabète chez les sujets âgés. *Cah Gérontol.* 2: 36-44.
- Gorjao R, Hirabara SM, De Lima TM, Cury-Boaventura MF, Curi R (2007). Regulation of interleukin-2 signaling by fatty acids in human lymphocytes. *J Lipid Res.* 48: 2009–2019.
- Gröber U, Schmidt J, Kisters K (2015). Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients* .7: 8199-8226.
- Guaiquil VH, Vera JC, Golde DW (2001). Mechanism of vitamin C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione-depleted HL-60 cells. *J Biol Chem.* 276:40955–40961.
- Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gołabek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta.* 274:177-188.
- Guigoz Y (2006).The Mini-Nutritional Assessment (MNA®) review of the literature – what does it tell us? *J Nutr Health Aging.* 10:465-487.

H

- Hadzic T, Li L, Cheng N, Walsh SA, Spitz DR, Knudson CM (2005). The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion. *J Immunol.* 175: 7965-7972.
- Hajjar RR, Atli T, Al-Mandhari Z, Oudrhiri M, Balducci L, Silbermann M (2013). Prevalence of aging population in the Middle East and its implications on cancer incidence and care. *Annals of Oncology* 23: 11–24.
- Hall JA, Wander RC, Gradin JL 1999). Effect of dietary n-6-to-n-3 fatty acid ratio on complete blood and total white blood cell counts, and T-cell subpopulations in aged dogs. *Am J Vet Res.* 60:319–327.

- Han SN, Adolfsson O, Lee CK, Prolla TA, Ordovas J, Meydani SN (2006). Age and vitamin E-induced changes in gene expression profiles of T Cells. *J Immunol.* 177: 6052-6061.
- Han SN, Meydani SN (2000). Antioxidants, cytokines, and influenza infection in aged mice and elderly humans. *J Infect Dis.* 182: 74-80.
- Hay Frank C, Westwood Olwyn MR (2002). *Practical Immunology.* fourth edition Blackwell Science. ISBN 0-86542-961-8.
- Heck TG, Ludwig MS, Dos Santos AB, Goettens-Fiorin PB (2015). Lifestyle and aging effects in the development of insulin resistance- activating the muscle as strategy against insulin resistance by modulating cytokines and HSP70. Chapter 4. In *Muscle Cell and Tissue.*
- Hellal M (2007). Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine : Synthèses et activités anti-cytokine. Thèse de doctorat en chimie organique. Université Louis Pasteur (Strasbourg I).
- Hermsdorff HHM, Puchau B, Zulet MA, and Martinez JA (2010). Association of body fat distribution with proinflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells from young adult subjects. *OMICS A Journal of Integrative Biology.*14: 3.
- Hernandez J, Garibay-Escobar A, Mendoza-Mendoza A, Pinelli-Saavedra A, Valenzuela O (2008). Effect of exogenous vitamin E on proliferation and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells from patients with tuberculosis. *Br J Nutr.* 99: 224–229.
- Hickson M (2006). Malnutrition and ageing. *Postgrad Med J.* 82:2–8.
- Hirbod-Mobarakeh A, Mahmoudi M, Rezaei N (2014). Nutrition, immunity, and aging. Chapter 20. In: A. Massoud, N. Rezaei (eds.), *Immunology of Aging.*
- Hirokawa K (1999). Age-related changes of signal transduction in T cells. *Exp Gerontol.* 34: 7-18.

-Höhn A, König J, Grune T (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of proteomics* 92: 132–159.

J

-Jacob KD, Noren HN, Trzeciak AR, Evans MK (2013). Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 134: 139–157.

-Jagota SK, Dani HM (1982). A new colorimetric technique for estimation of vitamine C using folin phenol reagent. *Analytical Biochemistry*. 127:178-182.

- Jeffery NMP, Sanderson EA, Newsholme, Calder PC (1996). Effects of varying the omega-6: omega-3 ratio of the diet upon immune function in the rat. *Biochem Soc Trans*. 24:77.

-Jeng KC, Yang C, Siu WY, Tsai YS, Liao WJ, Kuo JS (1996). Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. *Am J Clin Nutr*. 64: 960-965.

K

-Kelley GA, Kelley KS, Tran ZV (2005). Exercise, lipids, and lipoproteins in older adults: a meta-analysis. *Prev Cardiol*. 8: 206-214.

-Kennes B, Dumont I, Brohee D, Hubert C, Neve P (1983). Effect of vitamin C supplements on cell-mediated immunity in old people. *Gerontology*. 29:305-310.

-Kern SE, Price-Whelan A, Newman DK (2014). Extraction and measurement of NAD(P)⁺ and NAD(P)H. In: *Pseudomonas methods and protocols, methods in molecular biology*. Ramos (Eds.) . Springer Science P 311.

-Kesarwani P, Anuradha K, Al-Khami M AA, Mehrotra S (2013). Redox regulation of T-cell function: From molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 18 : 12.

-Khan MM. Immunopharmacology (2008). Springer Science, ISBN: 978-0-387-77975-1.

-Kregel KC, Zhang HJ (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292: 18-36.

- Korbit R K, Guzik TJ (2004). Inflammatory mediators and intracellular signaling. Chapitre 6, Springer.

-Kostka J, Borowiak E, Kostka T (2014). Validation of the modified Mini Nutritional Assessment short forms in different populations of older people in Poland . *The Journal of Nutrition, Health & Aging* .18: 4.

L

- Lang PO (2014). T Cell-mediated immunity in the immunosenescence process. Chapter 10. *Immunology of Aging*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

-Larbi A, Dupuis G , Khalil A, Douziech N, Fortin C, Fülöp T (2006). Differential role of lipid rafts in the functions of CD4+ and CD8+ human T lymphocytes with aging. *Cellular Signalling* 18: 1017–1030.

-Laubertova L, Konarikova K , Gbelcova H, Durackova Z, Zitnanova I (2014). Effect of walnut oil on hyperglycemia-induced oxidative stress and pro-inflammatory cytokines production. *Eur J Nutr.*

-Lee CYJ, Wan JMF (2000). Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. *J Nutrition* . 2932: 7-2.

-Lee N, Shin MS, Kang I (2012). T-Cell biology in aging, with a focus on lung disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 67:254–263.

-Leger-Guist'hau J (2011). Intérêt du régime méditerranéen : extrapolation à la nutrition entérale au long cours. *Nutrition clinique et métabolisme* 25 : S7-S9

-Lesourd B (2004). Modification de la réponse immune chez le sujet âgé. *Revue du Rhumatisme*. 71 : 446–454.

-Levine RL, Garland D, Olivier CN, Amici A, Lenz AG, Stadtman ER (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 186:464-478.

-Limbach S J, Guillaud C (2007). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*, chapitre 10.

-Liu FQ, Zhang JR (2003). X-ray induced L02 cells damage rescued by new anti-oxidant NADH. *World J Gastroenterol*. 9: 1781-1785.

-Looker AC, Johnson CL, Lacher DA, Pfeiffer CM, Schleicher RL, and Sempos CT (2011). *Vitamin D Status: United States, 2001–2006*. Centers for Disease Control and Prevention National Center for Health Statistics.

-Ly A, Shevelev A, Andres C, Pan XY, Trojan J (2013). Mécanismes et pathologies du vieillissement. *J Afr Cancer*. 5:103-113

M

-Maeng HG, Lim H, Jeong YJ, Woo A, Kang JS, Lee WJ (2009). Vitamin C enters mouse T cells as dehydroascorbic acid in vitro and does not recapitulate in vivo vitamin C effects. *Immunobiology*. 214: 311-320.

-Mather M, Jacobsen LA, Pollard KM (2015). Aging in the United States. Population reference bureau. *Population bulletin*.70:2.

-Meier P, Spertini F, Blanc E, Burnier M (2007). Oxidized low-density lipoproteins activate CD4+ T cell apoptosis in patients with end-stage renal disease through Fas engagement. *J Am Soc Nephrol*. 18: 331–342.

-Mc Auley MT, Mooney KM (2015). Computationally Modeling Lipid Metabolism and Aging: A Mini-review. *Comp Struct Biotechnol J*. 13:38–46.

- Mc Guire SO, Alexander DW., Fritsche KL (1997). Fish oil source differentially affects rat immune cell alpha-tocopherol concentration. *J Nutr.* 127: 1388–1394.
- 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. *Pestic Biochem Physiol.* 101: 27–33.
- Meraou A, Merzouk H, Saidi A, Medjdoub A, Merzouk SA, Bénali M, Belbraouet S (2017). In vitro effects of oil's fatty acids on T-cell function of obese men. *Food and Nutrition Sciences.* 8: 277-293.
- 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.
- Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Pedrosa M, Diamond R (1998). Assessment of the safety of supplementation with different amounts of vitamin E in healthy older adults. *Am J Clin Nutr.* 68: 311–318.
- Meydani S N, Ribaya-Mercado J D, Russell RM, Sahyoun NFD, et Gershoff S N (1991). Vitamin B-6 deficiency impairs interleukin 2 production and lymphocyte proliferation in elderly adults. *Am J Clin Nutr.* 53: 1275-80.
- Mezouar D, Merzouk H, Saidi-Merzouk 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.*
- Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Malavolta M, Basso A, Piacenza F (2014). Vitamin E–gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: Implications for treatment. A systematic review. *Ageing Res Rev.* 14: 81–101.
- Mocchegiani E, Malavolta M (2009). Role of Zinc and Selenium in Oxidative Stress and Immunosenescence: Implications for Healthy Ageing and Longevity, in: *Handbook on Immunosenescence.* T. Fulop et al. (Eds.). Springer Science. P 1368.

-Mohajeri MH, Troesch B, Weber P (2015). Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: Implications for brain aging and Alzheimer-type dementia. *Nutrition*. 31: 261–275.

-Molano A, Meydani SN (2012). Vitamin E, signalosomes and gene expression in T cells. *Molecular Aspects of Medicine*. 33: 55–62.

-Molina N, Morandi AC, Bolin AP, Otton R (2014). Comparative effect of fucoxanthin and vitamin C on oxidative and functional parameters of human lymphocytes. *Int Immunopharmacol*. 22: 41–50.

-Montaz S, Abdollahi M (2012). A comprehensive review of biochemical and molecular evidences from animal and human studies on the role of oxidative stress in aging: An epiphenomenon or the cause. *Asian J Anim Vet Adv*. 7: 1–19.

-Murata M, Kawanishi S (2000). Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J Biol Chem*. 275: 2003–2008.

-Murphy K (2012). *Janeway's immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, United States of America. ISBN 978-0-8153-4243-4.

N

Naidu KA (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery ? An overview. *Nutrition Journal*. 2:7.

Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nature reviews, immunology*, Volume 4.

O

-Ohtsuka Y, Kobayashi K, Hirano T, Furukawa SI, Nagano S, Takahashi T (1990). Involvement of lipoproteins in suppression of interleukin 2 dependant cell proliferation by sera from aged humans. *Gerontology*. 36: 268–275.

-Olek RA, Ziolkowski W, Kaczor JJ, Greci L, Popinigis J, Antosiewicz J (2004). Antioxidant activity of NADH and its analogue - An in vitro study. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37: 416-421.

-Oomah BD (2001). Flaxseed as a functional food source. *J Sci Food Agric.* 81: 889-894.

-Ostan R, Alberti S, Bucci L, Salvioli S, Pasi S, Cevenini E, Capri M, Di Iorio A, Ginaldi L, De Martinis M, Franceschi C, Monti D (2006). Effect of zinc ions on apoptosis in PBMCs from healthy aged subjects. *Biogerontology.* 7: 437-447.

-Ouwehand AC, Vaughan EE (2006). *Gastrointestinal microbiology.* Taylor & Francis Group, New York.

-Overbeck S, Rink L and Haase H (2008). Modulating the immune response by oral zinc supplementation: a single approach for multiple diseases. *Arch Immunol Ther Exp.* 56: 15-30.

P

- Pae M, Meydani SN, Wu D (2012). The Role of nutrition in enhancing immunity in aging. *Aging and Disease.* 3: 1.

-Palacios MG, Cunnick J, Winkler D, Vleck CM (2007). Immunosenescence in some but not all immune components in a free-living vertebrate, the tree swallow. *Proc R Soc B.* 274:951-957.

-Palaga T, Kataoka T, Nagai K (2004). Extracellular ATP inhibits apoptosis and maintains cell viability by inducing autocrine production of interleukin-4 in a myeloid progenitor cell line. *Intl Immunopharmacology.* 4: 953-961.

-Pandey KB, Rizvi SI (2014). Resveratrol in vitro ameliorates tert-butyl hydroperoxide induced alterations in erythrocyte membranes from young and older humans. *Appl Physiol Nutr Metab.* 39: 1-5.

-Parini P, Angelin B, Rudling M (1999). Cholesterol and lipoprotein metabolism in aging reversal of hypercholesterolemia by growth hormone treatment in old rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:832-839.

-Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C (1998). Glutathione levels in antigen presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Nat Acad Sci USA.* 95: 3071-3076.

-Pizato N, Bonatto S, Piconcelli M, de Souza LM, Sasaki GL et al. (2006). Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. *Nutrition.* 22: 425–432.

-Pole A, Dimri M, and Dimri GP (2016). Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Molecular Science.* 3: 300-324.

-Ponnappan S, Ponnappan U (2011). Aging and immune function: Molecular mechanisms to interventions. *Antiox Redox. Signal.* 14: 8.

-Pucca AA, Carrizzoc A, Villa F, Ferrario A, Casaburo M, Maciag A, Vecchione C (2013). Vascular ageing: The role of oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 45:556–559.

-Puskas F, Gergely P, Banki KJR, Perl A (2000). Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *FASEB J.* 14: 1352–1361.

Q

-Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa C, Battino M, Huertas JR, Martin Y (2004). Dietary fat type (virgin olive vs. sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Exp Gerontol.* 39:1189–1198.

R

-Rhee EJ, Nallamshetty S, Plutzky J (2012). Retinoid metabolism and its effects on the vasculature. *Biochimica Biophysica Acta*. 1821: 230–240.

-Rolland Y, De Maziers CL, Guyonnet S (2015). Malnutrition screening tools in the nursing home setting. *La Revue de Gériatrie*. 40: 3.

-Ross AC (2013). Physiology, dietary sources , and requirements. *Encyclopedia of Human Nutrition, Volume 4*.

-Ross A C (2012). Vitamin A and retinoic acid in T cell–related immunity .*Am J Clin Nutr* .96: 1166S–72S.

-Ross AC, Chen Q, Ma Y (2011). Vitamin A and retinoic acid in the regulation of B-cell development and antibody production. In: *Vitamins and Hormones*. Elsevier Inc, Pennsylvania. P. 104-107.

S

-Saeidnia S, Abdollahi M (2013). Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases .*Toxicology and Applied Pharmacology*. 273: 442–455.

-Salem ML (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol*. 5: 1749–70.

-Sandhu SK, Gurcharan K (2002). Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and Lymphocytes. *Biogerontology*. 3:161–173.

-Santoro A, Pini E, Scurti M, Palmas G, Berendsen A (2013). Combating inflammaging through a Mediterranean whole diet 3 approach: The NU-AGE project’s conceptual framework and design. *Mechanisms of Ageing and Development*.

- Shaikh SR, Edidin M (2006). Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation. *Am J Clin Nutr*. 84:1277–89.

-Sharma RK, Reynolds N, Rakhit M, Agarwal A (2013). Methods for detection of ROS in the female reproductive system. Chapter 2 Studies on Women's Health, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Springer Science.

-Sharma P, Chakraborty R, Wang L, Min B, Tremblay ML, Kawahara T (2008). Redox regulation of interleukin-4 signaling. *Immunity*. 29: 551–564.

-Schmitt V, Rink L, Uciechowski P (2013). The Th17/Treg balance is disturbed during aging. *Experimental Gerontology*. 48:1379–1386.

-Stowe RP, Goodwin JS (2011). Effects of aging on immune function. Chapter 4. Principles and Practice of Geriatric Surgery.

-Szoke E, Shrayyef MZ, Messing S, Woerle HJ, Van Haeften TW, Meyer C (2008). Effect of aging on glucose homeostasis. *Diabetes Care*.

T

Taha R, Blaise G (2014). Nrf2 activation as a future target of therapy for chronic diseases. *Functional Foods in Health and Disease*. 4: 510-523.

-Traber MG, Atkinson J (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*. 43: 4–15.

-Tsai AC, Ho CS, Chang MC (2008). Assessing the prevalence of malnutrition with the mini nutritional assessment (MNA) in a nationality representative sample of elderly Taiwanese. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*. 12: 4.

-Turk HF, Chapkin RS (2013). Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 88: 43–47.

U

Uranga RM, Keller JN (2010). Diet and age interactions with regards to cholesterol regulation and brain pathogenesis. *Current Gerontol Geriatr Res*.

V

-Venkatraman JT, Pendergast D (2000). Role of dietary fats and exercise in immune functions and aging. Chapter 5 Humana Press Inc., Totowa.

-Verleyen T, Forcades M, Verhe R, Dewettinck K, Huyghebaert A, De Greyt W (2002). Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. *JAOCS* 79: 117–122.

-Visioli F, Hagen TM (2007). Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: Focus on micronutrients. *Pharmacological Res.* 55: 199–206.

-Viry MV (1990). Alanine aminotransférase. In : Siest G, Henny J, Schiele S. *Références en biologie clinique*. Paris, Elsevier Eds. 77-92.

-Visser M, Kritchevsky SB, Newman AB, Goodpaster BH, Tylavsky FA, Nevitt MC, Harris TB (2005). Lower serum albumin concentration and change in muscle mass: the health, aging and body composition study. *Am J Clin Nutr.* 82:531–7.

-Vogel T, Kaltenbach G, Geny B (2013). L'hypertension artérielle chez le sujet âgé : prise en charge thérapeutique en intégrant les dernières recommandations européennes et nord-américaines. *Cah Gériatol.* 5:234-244.

W

-Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B (2016). Biomarkers of aging: from function to molecular biology. *Nutrients.* 8: 338.

-Walsh ME, Shi Y, Van Remmen H (2014). The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. *Free Radical Biology and Medicine.* 66: 88–99.

- Wang X, Bonventre VJ, Parrish AR (2014). The Aging Kidney: Increased susceptibility to nephrotoxicity. *Int J Mol Sci.* 15:15358-15376.

-Wilson M, Thomas D, Rubenstein L, Chibnall J, Anderson S, Baxi A (2005). Appetite assessment: simple appetite questionnaire predicts weight loss in community-dwelling adults and nursing home residents. *Am J Clin Nutr.* 82:1074-81.

-Woods JL, Iuliano-Burns S, Walker KZ (2013). Immunological and nutritional factors in elderly people in low-level care and their association with mortality. *Immunity & Ageing.* 10: 32.

-Wu J, Li W, Liu Z, Zhang YY, Peng Y, Feng DG, Li LH, Wang LN, Liu L, Li L, Liu J (2012). Ageing-associated changes in cellular immunity based on the senior protocol. *Scand J Immunol.* 1365-3083.

Y

-Yaqoob, P, Newsholme EA, Calder PC (1994). The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology.* 82: 603-610.

-Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, Butler AA, Dixit VD. Obesity accelerates thymic aging (2009). *Blood.* 114: 18.

-Yen CJ, Lin SL, Huang KT, Lin RH (2000). Age-associated changes in interferon gamma and interleukin-4 secretion by purified human CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Biomed Sci.* 7: 317-321.

- Ying W (2008). NAD⁺/ NADH and NADP/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences. *Antiox Redox Signaling.* 10: 2.

Z

-Zhang Q, Li N, Zhou G, Lu X, Xu Z, Li Z (2003). In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacological Research.* 48:151–155.

-Zhao G, Wang L, Yan R (2000). Menopausal symptoms: experience of Chinese women. *Climacteric United States.* 3:135-44.

Annexes



**Tableau A1. Critères de bonne santé pour les études sur le vieillissement
immunitaire (protocole SENIEUR)**

(Lesourd, 2004)

| Critères du protocole SENIEUR | Critères additionnels |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> -Sujet en bonne santé -Sans maladie aiguë ou chronique en cours -Paramètres biologiques standard normaux -Sans médicaments agissant sur le système immunitaire | <ul style="list-style-type: none"> -Aucune maladie dans les 5 dernières années -Aucune difficulté motrice -Activité physique normale -Aucun médicament pour pathologie cardiaque, neurologique ou psychique [y compris la dépression] -Fonctions cognitives normales -Albumine sérique > 39 g/L -Pas de déficit biologique pour Zn, Se, vitamines B6, B9,B12 |

CONSENTEMENT

Je soussigné,

Madame/Mademoiselle/Monsieur.....

Après avoir pris connaissance des objectifs et des méthodologies relatifs au projet intitulé : «Troubles métaboliques et effets des vitamines et des huiles sur la prolifération lymphocytaire, la sécrétion des cytokines et le statut redox chez les personnes âgées dans la région de Tlemcen». sous la responsabilité de Melle BOUAMAMA Samia doctorante à l'université de Tlemcen , en collaboration avec les polycliniques de Chetouane et Bouhanek, foyer des personnes âgées (Tlemcen) et le laboratoire de Recherche «Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition sous la direction du Pr. MERZOUK Hafida (Université de Tlemcen, Algérie), j'accepte de participer à ce projet, en répondant aux différents questionnaires et en fournissant un prélèvement sanguin.

Signature

0=oui 2= non

E. problèmes neuropsychologiques

0= démence ou dépression sévère

1= démence ou dépression modérée

2=pas de problèmes psychologiques

F. indice de masse corporelle (IMC) = poids /taille ² en kg /m²

0= IMC < 19

1=19 ≤ IMC<21

2=21 ≤ IMC< 23

3= IMC ≥ 23

Evaluation globale

G. le patient vit-il de façon indépendante à domicile ?

0=non 1=oui

H. prend plus de trois médicaments par jour?

0=oui 1=non

I. Plaies cutanées ?

0=oui 1= non

j. combien de véritables repas le patients prend t-il par jours ?

0= 1 repas

1= 2 repas

2= 3 repas

K. le patient consomme t-il

- Une fois par jour au moins du produits laitiers ? oui non
- chaque jour de viande , de poisson ou de la volaille ? oui non
- une ou deux fois par semaine des œufs ou des légumineuses ? oui non

0.0 = si 0 ou 1 oui

0.5 = si 2 oui

1= si 3 oui

L. consomme-t-il deux fois par jour au moins des fruits ou des légumes ?

0= non 1=oui

M. combien de verres de boissons consomme-t-il par jour ? (eau, jus, café, lait , . .)

0= moins de 3 verres

0.5=de 3 à 5 verres

1.0= plus de 6 verres

N. manière de se nourrir ?

0= nécessité d'assistance

1= se nourrit seul avec difficultés

2= se nourrit seul sans difficultés

O. le patient se considère –t-il bien nourri ?

0= malnutrition sévère

1=ne sait pas ou malnutrition modérée

2= pas de problèmes de nutrition

P. le patient se sent-il en meilleur ou en bonne santé que la plupart des personnes de son âge ?

0.0= moins bonne

0.5=ne sait pas

1.0= aussi bonne

2.0= meilleure

Q. circonférence brachiale (CB en cm)

0.0=CB inf à 21

0.5= $21 \leq CB \leq 22$

1.0= $CB > 22$

R. circonférence au mollet (CM en cm)

0= $CM < 31$

1= $cM \geq 31$

Appréciation de l'état nutritionnel

Simplified Nutritional Appetite Questionnaire : SNAQ**(Wilson et al., 2005)**

| Nom | prénom | Age |
|--|---------------|---------------|
| Date | poids | Taille |
| 1-Mon appétit est a- Plus faible b- Faible c- Moyen d- Bon e- Très bon | | |
| 2- quand je mange a- Je me sens rassasié juste après quelques bouchées b- Je me sens rassasié après un tiers du repas c- Je me sens rassasié après avoir mangé plus de demi de repas d- Je me sens rassasié après avoir mangé tout le repas e- Je me sens difficilement rassasié | | |
| 3- le gout des aliments a- Très désagréable b- Désagréable c- Moyen d- Bon e- Très bon | | |
| 4- je mange normalement a- Moins d'un seul repas par jour b- Un seul repas par jour c- Deux repas par jour d- Trois repas par jour e- Plus de trois repas par jour | | |

Tableau A2. Prolifération des lymphocytes chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Incubations | Hommes Jeunes Témoins (TH) | Femmes Jeunes Témoins (TF) | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) | P ANOVA |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------|
| Con A | 183,85 ± 27 ^{ba} | 182,86 ± 23,97 ^{ba} | 147,672 ± 17,90 ^{cb} | 131,84 ± 14,16 ^{cb} | 0,008 |
| Vitamine A | 217,07 ± 25,50 ^{aa} | 252,36 ± 19,51 ^{aa} | 128 ± 23 ^{cb} | 141,6 ± 10 ^{cβ} | 0,007 |
| Vitamine C | 248,4 ± 21,60 ^a | 247,02 ± 19,49 ^a | 243,2 ± 34,70 ^a | 232,16 ± 29,83 ^a | 0,126 |
| Vitamine E | 216,40 ± 23 ^a | 228,96 ± 10,71 ^a | 236,70 ± 43,91 ^a | 222,10 ± 33,93 ^a | 0,234 |
| NADH | 212,20 ± 11 ^a | 254,52 ± 24,77 ^a | 232,31 ± 24,86 ^a | 222,61 ± 18,87 ^a | 0,117 |
| Huile d'olive | 180,20 ± 16,30 ^{ba} | 186,83 ± 12,97 ^{ba} | 140,20 ± 19,20 ^{cβ} | 141,13 ± 10,65 ^{cb} | 0,010 |
| Huile tournesol | 162 ± 20,60 ^{ba} | 177,62 ± 29,75 ^{ba} | 136,15 ± 16,90 ^{cβ} | 142,5 ± 13,89 ^{cb} | 0,009 |
| Huile Nigelle | 236,11 ± 28,70 ^{aa} | 277,74 ± 36 ^{aa} | 197,70 ± 25,60 ^{bβ} | 181,80 ± 26 ^{bβ} | 0,008 |
| Huile Noix | 180,70 ± 21 ^{ba} | 168,13 ± 24,87 ^{ba} | 132,40 ± 16,70 ^{cβ} | 134,88 ± 17,70 ^{cb} | 0,010 |
| Huile lin | 110,30 ± 18 ^c | 120,02 ± 14,83 ^c | 114,40 ± 17,32 ^d | 115,89 ± 18,15 ^d | 0,281 |
| P ANOVA | 0,005 | 0,006 | 0,003 | 0,005 | |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3. La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) et entre les quatre groupes pour la même incubation par les signes différents (α , β , γ , Δ), avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

Tableau A3. Effets des nutriments sur le rapport IL-2/IL-4 des lymphocytes in vitro chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Incubations | Hommes Jeunes Témoins (TH) | Femmes Jeunes Témoins (TF) | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) | P ANOVA |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|
| Con A | 61,45 ± 2,39 ^{ab} | 55,11 ± 2,81 ^{ba} | 32,73 ± 2,88 ^{γb} | 31,81 ± 3,59 ^{γb} | 0,006 |
| Vitamine A | 23,21 ± 2,63 ^{βb} | 23,23 ± 1,06 ^{βd} | 33,58 ± 3,41 ^{αb} | 31,6 ± 3,95 ^{αb} | 0,008 |
| Vitamine C | 25,54 ± 2,09 ^f | 26,03 ± 1,83 ^d | 25,20 ± 3,81 ^c | 25,02 ± 2,26 ^c | 0,127 |
| Vitamine E | 68,45 ± 4,27 ^a | 68,97 ± 3,25 ^a | 61,12 ± 5,21 ^a | 61,11 ± 5,87 ^a | 0,135 |
| NADH | 24,08 ± 2,32 ^b | 23,76 ± 1,55 ^d | 23,24 ± 1,55 ^c | 22,45 ± 1,86 ^c | 0,118 |
| Huile d'olive | 28,41 ± 1,74 ^{ae} | 27,94 ± 1,58 ^{ad} | 24,81 ± 1,70 ^{bc} | 23,74 ± 1,47 ^{bc} | 0,030 |
| Huile tournesol | 58,44 ± 2,40 ^{ab} | 52,43 ± 1,54 ^{ba} | 29,03 ± 3,89 ^{γb} | 30,59 ± 3,55 ^{γb} | 0,010 |
| Huile Nigelle | 27,48 ± 2,62 ^e | 27,50 ± 2,58 ^d | 28,73 ± 3,98 ^b | 28,53 ± 2,67 ^b | 0,234 |
| Huile Noix | 55,82 ± 2,06 ^{ac} | 54,12 ± 3,39 ^{aa} | 32,74 ± 2,72 ^{βb} | 31,04 ± 2,52 ^{βb} | 0,008 |
| Huile lin | 16,24 ± 1,14 ^g | 16,78 ± 1,42 ^f | 15,47 ± 1,97 ^e | 14,71 ± 2,67 ^e | 0,237 |
| P ANOVA | 0,001 | 0,003 | 0,007 | 0,006 | |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3. La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) et entre les quatre groupes pour la même incubation par les signes différents (α, β, γ, Δ), avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

Tableau A4. Effets des différents nutriments sur le taux de glutathion lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Incubations | Hommes Jeunes Témoins (TH) | Femmes Jeunes Témoins (TF) | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) | P ANOVA |
|----------------------------|---------------------------------------|---|-----------------------------|------------------------------|--------------------|
| Con A | 24,51 ± 2,11 ^α | 24,54 ± 2,51 ^α | 14,84 ± 3,84 ^{βb} | 11,97 ± 3,80 ^{βb} | 0,008 |
| Vitamine A | 22,94 ± 2,26 ^α | 26,34 ± 3,47 ^α | 12,83 ± 2,96 ^{βb} | 11,50 ± 3,74 ^{βb} | 0,007 |
| Vitamine C | 24,11 ± 3,99 | 24,99 ± 3,52 | 23,01 ± 2,88 ^a | 20,95 ± 4,46 ^a | 0,345 |
| Vitamine E | 25,06 ± 2,33 | 24,79 ± 2,87 | 23,32 ± 2,32 ^a | 24,12 ± 5,84 ^a | 0,216 |
| NADH | 26,22 ± 3,64 | 27,90 ± 4,60 | 23,58 ± 2,07 ^a | 21,86 ± 2,96 ^a | 0,191 |
| Huile d'olive | 25,49 ± 2,85 | 24,79 ± 2,29 | 23,03 ± 3,22 ^a | 21,57 ± 3,01 ^a | 0,205 |
| Huile tournesol | 22,02 ± 3,04 ^α | 24,7 ± 2,03 ^α | 13,5 ± 4,63 ^{βb} | 13,21 ± 2,11 ^{βb} | 0,006 |
| Huile Nigelle | 24,05 ± 3,97 | 23,88 ± 2,35 | 24,36 ± 3,19 ^a | 20,73 ± 2,55 ^a | 0,148 |
| Huile Noix | 25,8 ± 3,63 | 25,83 ± 3,29 | 26,10 ± 4,01 ^a | 24,13 ± 3,26 ^a | 0,202 |
| Huile lin | 28,26 ± 4,84 | 25 ± 3,09 | 22,86 ± 3,78 ^a | 20,17 ± 3,56 ^a | 0,247 |
| P ANOVA | 0,236 | 0,189 | 0,207 | 0,185 | |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3. La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) et entre les quatre groupes pour la même incubation par les signes différents (α , β , γ , Δ), avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

Tableau A5. Effets des différents nutriments sur l'activité de l'enzyme Catalase (U/mg protéine) des lymphocytes chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Incubations | Hommes Jeunes Témoins (TH) | Femmes Jeunes Témoins (TF) | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) | P ANOVA |
|----------------------------|---------------------------------------|---|-----------------------------|------------------------------|--------------------|
| Con A | 21,67 ± 2 ^{αb} | 22,70 ± 1,39 ^{αb} | 16,27 ± 1,38 ^{βc} | 15,27 ± 1,44 ^{βc} | 0,008 |
| Vitamine A | 23,41 ± 1,75 ^{αb} | 22,23 ± 1,35 ^{αb} | 16,37 ± 1,33 ^{βc} | 16,19 ± 1,18 ^{βc} | 0,010 |
| Vitamine C | 32,26 ± 1,43 ^a | 33,07 ± 1,79 ^a | 30,32 ± 1,39 ^a | 30,47 ± 1,35 ^a | 0,243 |
| Vitamine E | 31,82 ± 1,83 ^a | 32,01 ± 1,14 ^a | 31,15 ± 1,67 ^a | 30,57 ± 2,34 ^a | 0,187 |
| NADH | 21,92 ± 1,26 ^b | 22,38 ± 1,32 ^b | 22,19 ± 1,68 ^b | 21,70 ± 1,59 ^b | 0,266 |
| Huile d'olive | 21,84 ± 0,87 ^{αb} | 22,89 ± 1,50 ^{αb} | 15,25 ± 1,41 ^{βc} | 16,93 ± 1,50 ^{βc} | 0,010 |
| Huile tournesol | 22,45 ± 1,34 ^{αb} | 23,12 ± 1,02 ^{αb} | 16,68 ± 1,68 ^{βc} | 16,15 ± 1,54 ^{βc} | 0,009 |
| Huile Nigelle | 32,19 ± 1,74 ^{αa} | 32,47 ± 1,07 ^{αa} | 26,06 ± 1,56 ^{βb} | 25,20 ± 1,42 ^{βb} | 0,010 |
| Huile Noix | 22,48 ± 1,23 ^{αb} | 22,31 ± 1,11 ^{αb} | 16,47 ± 1,86 ^{βc} | 16,28 ± 1,45 ^{βc} | 0,020 |
| Huile lin | 32,67 ± 1,47 ^a | 32,43 ± 1,26 ^a | 30,40 ± 2,55 ^a | 31,81 ± 1,33 ^a | 0,235 |
| P ANOVA | 0,010 | 0,008 | 0,005 | 0,006 | |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3. La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) et entre les quatre groupes pour la même incubation par les signes différents (α, β, γ, Δ), avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

Tableau A6. Effets des différents nutriments sur le taux de MDA lymphocytaire chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Incubations | Hommes Jeunes Témoins (TH) | Femmes Jeunes Témoins (TF) | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) | P ANOVA |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| Con A | 3,86 ± 0,50 ^{βa} | 4,03 ± 0,33 ^{βa} | 6,35 ± 0,46 ^{αa} | 6,81 ± 0,51 ^{αa} | 0,007 |
| Vitamine A | 3,71 ± 0,46 ^{βa} | 4,15 ± 0,54 ^{βa} | 6,91 ± 0,41 ^{αa} | 6,66 ± 0,43 ^{αa} | 0,008 |
| Vitamine C | 2,32 ± 0,23 ^b | 2,24 ± 0,25 ^b | 2,61 ± 0,41 ^d | 2,58 ± 0,39 ^d | 0,207 |
| Vitamine E | 2,38 ± 0,31 ^b | 2,38 ± 0,30 ^b | 2,45 ± 0,36 ^d | 2,51 ± 0,34 ^d | 0,128 |
| NADH | 3,55 ± 0,52 ^{βa} | 3,69 ± 0,48 ^{βa} | 4,55 ± 0,42 ^{αb} | 4,74 ± 0,43 ^{αb} | 0,008 |
| Huile d'olive | 3,64 ± 0,42 ^{βa} | 3,85 ± 0,53 ^{βa} | 5,28 ± 0,25 ^{αb} | 5,13 ± 0,23 ^{αb} | 0,010 |
| Huile tournesol | 3,98 ± 0,40 ^{βa} | 3,60 ± 0,36 ^{βa} | 6,62 ± 0,38 ^{αa} | 6,47 ± 0,33 ^{αa} | 0,006 |
| Huile Nigelle | 2,47 ± 0,29 ^{βb} | 2,35 ± 0,22 ^{βb} | 3,84 ± 0,42 ^{αc} | 4,04 ± 0,49 ^{αc} | 0,020 |
| Huile Noix | 3,91 ± 0,52 ^{βa} | 3,65 ± 0,34 ^{βa} | 6,73 ± 0,56 ^{αa} | 6,65 ± 0,47 ^{αa} | 0,007 |
| Huile lin | 2,48 ± 0,35 ^b | 2,26 ± 0,37 ^b | 2,43 ± 0,32 ^d | 2,37 ± 0,22 ^d | 0,125 |
| P ANOVA | 0,008 | 0,007 | 0,004 | 0,003 | |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3. La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) et entre les quatre groupes pour la même incubation par les signes différents (α, β, γ, Δ), avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

Tableau A7. Effets des différents nutriments sur le taux des protéines carbonylées lymphocytaires chez les hommes et les femmes jeunes et âgés

| Incubations | Hommes Jeunes Témoins (TH) | Femmes Jeunes Témoins (TF) | Hommes Agés (AH) | Femmes Agées (AF) | P ANOVA |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| Con A | 1,35 ± 0,14 ^{βa} | 1,34 ± 0,13 ^{βa} | 2,96 ± 0,16 ^{αa} | 2,84 ± 0,13 ^{αa} | 0,007 |
| Vitamine A | 1,40 ± 0,18 ^{βa} | 1,31 ± 0,11 ^{βa} | 2,93 ± 0,15 ^{αa} | 3,03 ± 0,25 ^{αa} | 0,008 |
| Vitamine C | 1,08 ± 0,05 ^b | 1,06 ± 0,05 ^b | 1,07 ± 0,04 ^b | 1,05 ± 0,04 ^b | 0,217 |
| Vitamine E | 1,03 ± 0,06 ^b | 1,04 ± 0,04 ^b | 1,06 ± 0,05 ^b | 1,07 ± 0,05 ^b | 0,184 |
| NADH | 1,53 ± 0,27 ^{βa} | 1,55 ± 0,23 ^{βa} | 2,15 ± 0,15 ^{αb} | 2,11 ± 0,16 ^{αb} | 0,007 |
| Huile d'olive | 1,38 ± 0,12 ^{βa} | 1,37 ± 0,17 ^{βa} | 2,95 ± 0,18 ^{αa} | 2,83 ± 0,13 ^{αa} | 0,008 |
| Huile tournesol | 1,34 ± 0,16 ^{βa} | 1,35 ± 0,12 ^{βa} | 2,98 ± 0,15 ^{αa} | 2,79 ± 0,27 ^{αa} | 0,008 |
| Huile Nigelle | 1,13 ± 0,13 ^b | 1,16 ± 0,11 ^b | 1,17 ± 0,12 ^b | 1,16 ± 0,13 ^b | 0,211 |
| Huile Noix | 1,33 ± 0,19 ^{βa} | 1,38 ± 0,14 ^{βa} | 2,96 ± 0,27 ^{αa} | 2,92 ± 0,22 ^{αa} | 0,009 |
| Huile lin | 1,06 ± 0,04 ^b | 1,05 ± 0,05 ^b | 1,05 ± 0,06 ^b | 1,07 ± 0,05 ^b | 0,145 |
| P ANOVA | 0,006 | 0,008 | 0,005 | 0,004 | |

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. NADH: nicotinamide adénine dinucléotide ou vitamine B3. La comparaison des moyennes entre jeunes et âgés est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives entre les incubations du même groupe sont marquées par les lettres différentes (a, b, c...) et entre les quatre groupes pour la même incubation par les signes différents (α, β, γ, Δ), avec un P (ANOVA) inférieur à 0,05.

Effects of exogenous vitamins A, C, and E and NADH supplementation on proliferation, cytokines release, and cell redox status of lymphocytes from healthy aged subjects

Samia Bouamama, Hafida Merzouk, Amel Medjdoub, Amel Merzouk-Saidi, and Sid Ahmed Merzouk

Abstract: Aging is an inevitable biological event that is associated with immune alterations. These alterations are related to increased cellular oxidative stress and micronutrient deficiency. Antioxidant supplementation could improve these age-related abnormalities. The aim of this study was to determine *in vitro* effects of vitamin A, vitamin C, vitamin E, and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) on T cell proliferation, cytokine release, and cell redox status in the elderly compared with young adults. Peripheral blood lymphocytes were isolated using a density gradient of Histopaque. They were cultured *in vitro* and stimulated with concanavalin A in the presence or absence of vitamins. Cell proliferation was determined by conducting MTT assays, and based on interleukin-2 and interleukin-4 secretions. Cell oxidant/antioxidant balance was assessed by assaying reduced glutathione (GSH), malondialdehyde, carbonyl protein levels, and catalase activity. The present study demonstrated that T-lymphocyte proliferation was decreased with aging and was associated with cytokine secretion alterations, GSH depletion, and intracellular oxidative stress. In the elderly, vitamin C, vitamin E, and NADH significantly improved lymphocyte proliferation and mitigated cellular oxidative stress, whereas vitamin A did not affect cell proliferation or cell redox status. In conclusion, vitamin C, vitamin E, and NADH supplementation improved T-lymphocytes response in the elderly, and could contribute to the prevention of age-related immune alterations. Consumption of food items containing these vitamins is recommended, and further investigation is necessary to evaluate the effect of vitamin supplementation *in vivo*.

Key words: aging, lymphocytes, vitamins, cytokines, oxidant/antioxidant status.

Résumé : Le vieillissement, événement biologique inévitable, est associé à des altérations du système immunitaire; ces dernières sont liées à l'augmentation du stress oxydatif cellulaire et à des carences en micronutriments. La supplémentation en antioxydants pourrait améliorer ces anomalies associées à l'âge. Le but de cette étude est de déterminer les effets *in vitro* des vitamines A, C et E et du nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné (NADH) sur la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion des cytokines et le statut redox chez des personnes âgées comparativement à de jeunes adultes. Les lymphocytes du sang périphérique sont isolés dans un gradient de densité au moyen du système Histopaque. Ces lymphocytes sont cultivés *in vitro* et stimulés par la concanavaline A en présence ou en l'absence des vitamines. La prolifération cellulaire est analysée par le test MTT, et la sécrétion de l'interleukine-2 et -4 par des kits Elisa. On évalue aussi le bilan oxydant/antioxydant par le dosage du glutathion réduit (« GSH »), du malonaldéhyde, des protéines carbonylées et de l'activité de la catalase. Les résultats révèlent que la prolifération des lymphocytes T diminue avec l'âge en plus d'être associée à l'altération de la sécrétion des cytokines, à la diminution du GSH et au stress oxydatif intracellulaire. Chez les personnes âgées, les vitamines C et E ainsi que le NADH améliorent significativement la prolifération des lymphocytes et atténuent le stress oxydatif dans la cellule; par contre, la vitamine A n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire et le statut redox. En conclusion, la supplémentation en vitamines C, E et en NADH améliore la réponse des lymphocytes T chez les personnes âgées et pourrait contribuer à la prévention des anomalies du système immunitaire associées à l'âge. La consommation d'aliments renfermant ces vitamines est recommandée. Il faut réaliser d'autres études afin d'évaluer les effets *in vivo* de la supplémentation en vitamines.

Mots-clés : vieillissement, lymphocytes, vitamines, cytokines, statut oxydant/antioxydant.

Introduction

Aging is an inevitable biological event that affects all living organisms. Aging is associated with biochemical and physiological changes, including increased susceptibility to diseases and loss of mobility and agility (Mocchegiani et al. 2012). It has been reported that several hematologic parameters are altered during aging (Pandey and Rizvi 2014). With age, there is a decline in proliferation and production of naive lymphocytes, and a reduction in several cytokines, such as interleukin 2 (IL-2), is implicated in this process

(De la Fuente 2014). This process, also called as immunosenescence, is characterized by an increase of cellular apoptosis rate, thymic involution, a change of the T cell repertoire, and an accumulation of memory T cells (Álvarez-Rodríguez et al. 2012; Ostan et al. 2006). Immunosenescence is responsible for the increased susceptibility of the elderly to cancers, chronic inflammatory disorders, autoimmunity, and infectious diseases (Cannizzo et al. 2011).

Many theories are proposed to explain aging. Among those “the free radical theory of aging” proposed by Harman in 1956, also

Received 5 April 2016. Accepted 10 January 2017.

S. Bouamama, H. Merzouk, A. Medjdoub, and A. Merzouk-Saidi. Laboratory of Physiology, Physiopathology, and Biochemistry of Nutrition, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Earth and Universe, Abou-Bekr Belkaïd University, Tlemcen 13000, Algeria. **S.A. Merzouk.** Department of Technical Sciences, Faculty of Engineering, Abou-Bekr Belkaïd University, Tlemcen 13000, Algeria.

Corresponding author: Hafida Merzouk (email: hafidamerzouk_2@hotmail.com).

Copyright remains with the author(s) or their institution(s). Permission for reuse (free in most cases) can be obtained from [RightsLink](https://www.rightslink.com).

known as oxidative stress theory, has received extensive support. It proposes that organism deterioration is the cumulative result of oxidative damage to the cells and tissues (Espino et al. 2012; Zhang et al. 2003). Moreover, aging is mainly characterized by an imbalance between production and elimination of reactive oxygen species (ROS) and by increased oxidation of biomolecules (Cannizzo et al. 2012). Alterations in intracellular signaling pathways, increased free radical levels, decreased antioxidant capacity, and oxidation of biomolecules have been reported in aged lymphocytes (Hirokawa 1999; Gautam et al. 2010; Fulop et al. 2014). It has also been observed that oxidized protein and lipids, including 4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde (MDA), promote lymphocyte differentiation towards a Th2 phenotype (Bennett and Griffiths 2013), a feature that is observed in aging (Ponnappan and Ponnappan 2011). These effects are related to the elderly nutrient deficiency (Mocchegiani and Malavolta 2009; Visioli and Hagen 2007). Moreover, nutrition has a relevant role in immune system function, especially for elderly individuals (De la Fuente 2014). In older individuals, malnutrition is most often the consequence of decreased or inappropriate food intake. Common causes are poor socioeconomic status, digestive problems, mastication difficulty, loss of teeth, and consumption of drugs that counteract intestine nutrient absorption (Ferry 2013). The National Health and Nutrition Examination Survey data from 2003 to 2008 shows that vitamins A, C, D, E, and K and folate intakes are low in a significant proportion of the older population in the United States (Mohajeri et al. 2015). Malnutrition, insufficient protein intake, vitamin deficiency, and deficiency of trace elements can result in impaired immune function during aging (Wu et al. 2012). For these reasons, antioxidant supplementation appears to be a key component to promote healthy aging (Momtaz and Abdollahi 2012).

Vitamin A is a fat-soluble micronutrient implicated for normal immune signaling through retinoic acid, an active metabolite of vitamin A. Vitamin A-deficient animals show abnormalities of lymphocyte numbers in plasma and the spleen (Ross et al. 2011).

Vitamin C is an essential micronutrient that has been implicated in a variety of biological processes, including immune response and antioxidant activity (Guerra et al. 2012). Vitamin E is the principal anti-oxidant defense against lipid peroxidation in mammalian cell membranes. Moreover, it modulates and improves immune cell function in adults and older subjects (De la Fuente et al. 1998). Most nutritional studies show that dietary vitamin E is inversely related to coronary heart disease mortality rate in the elderly (Visioli and Hagen 2007). Vitamins C and E are also cofactors for various enzymatic reactions, and modulate signal transduction and gene expression in immune cells (Carcamo et al. 2004; Manning et al. 2013; Mocchegiani et al. 2014; Zingg 2015).

Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) is a key coenzyme for numerous redox reactions essential for energy homeostasis (Kern et al. 2014). Previous studies have suggested that NADH can directly have antioxidant effects (Cao et al. 2016). NADH plays an active role in the immune system response by inducing cytokine release from peripheral leukocytes (Ying 2008). Its administration can also improve cognitive functions (Demarin et al. 2004).

Several strategies have been proposed to maintain immune function with aging, including administration of antioxidants. In vitro, lymphocyte proliferation and cytokine production are useful metrics to evaluate lymphocyte function. Insufficient information is currently available about antioxidant supplementation effects on in vitro lymphocyte function, including proliferation, cytokine production, and intracellular redox status. However, a shift of lymphocyte oxidant/antioxidant balance in favor of accelerated oxidative damage has been previously reported during aging (Gautam et al. 2010). Therefore, our present study was performed to evaluate the in vitro influence of antioxidant vitamins A, C, and E and NADH on T-lymphocytes proliferation, cytokine release, and T-cell redox status in the elderly.

Table 1. Characteristics of the study population.

| Characteristics | Young men control | Young women control | Older men | Older women |
|--------------------------|-------------------|---------------------|-------------|-------------|
| N | 40 | 40 | 25 | 25 |
| Age (y) | 23.35±3.21 | 23.52±3.47 | 73.12±5.36* | 74.3±4.23* |
| Height (m) | 1.77±0.08 | 1.62±0.06 | 1.73±0.06 | 1.60±0.07 |
| Weight (kg) | 72.89±7.34 | 56.42±3.64 | 68.75±6.56 | 58.30±4.66 |
| BMI (kg/m ²) | 23.09±3.8 | 21.41±2.04 | 22.98±3.75 | 22.76±3.24 |
| SBP | 122.85±6.16 | 120.48±5.33 | 130.57±4.37 | 128.34±3.14 |
| DBP | 80.63±4.22 | 78.50±3.35 | 84.21±3.76 | 82.28±4.53 |

Note: Values are means ± SD. Statistical comparisons between older and young control subjects of the same sex were performed by Student's *t* test after variance analysis. Differences were considered significant at **P* < 0.01. BMI, body mass index (weight/height²); DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure.

Materials and methods

Subjects

The study included 50 volunteer older adults who were at least 65 years of age and who were living independently at home in Tlemcen City, and 80 young subjects between 20 to 35 years of age. All subjects were in good health. All of the men were nonsmokers. None of the subjects had diabetes mellitus (exclusion based on fasting blood glucose level of ≥7 mmol/L and oral glucose tolerance test results), history of arterial hypertension (defined as a systolic blood pressure >140 mm Hg and a diastolic blood pressure >90 mm Hg), liver disease, renal disease, cardiovascular disease, autoimmune disease, or cancers. These subjects received no medication or supplements, including vitamins A, C, and E and NADH. The local ethics committee of Tlemcen Hospital University approved the study protocol. All the participants gave informed consent in accordance with the Helsinki Declaration. The characteristics of all participants are presented in Table 1.

Blood samples, lymphocytes isolation, and culture

Fasting venous blood samples were collected in 2 heparinized tubes from each subject. The first blood sample was centrifuged and plasma was separated for biochemical analysis. The remaining erythrocytes were used to prepare the hemolysates to be assayed for oxidant and antioxidant markers. The second blood sample was used for immediate lymphocyte isolation.

Peripheral blood lymphocytes were isolated from heparinized venous blood using differential centrifugation (400g for 40 min) on a density gradient of Histopaque 1077 (Sigma–Aldrich), as previously reported (Medjdoub et al. 2011). The peripheral blood lymphocytes at the interface of plasma and Histopaque were collected, washed, and suspended in RPMI 1640 culture medium (Gibco, USA). Cell viability was evaluated by the Trypan blue exclusion method. Cultures were established in triplicate in flat-bottomed microtiter plates (Nunc, Paris, France), and incubated in complete RPMI 1640 medium (medium RPMI 1640 supplemented with 25 mmol/L HEPES buffer, 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mmol/L L-glutamine, 5 × 10⁻⁵ mol/L 2-mercaptoethanol, 100 UI/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin), with or without the mitogen concanavalin A (Con A; Sigma–Aldrich), at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere for 48 h. To evaluate the in vitro effects of vitamins, lymphocytes were incubated with freshly prepared vitamin solutions, vitamin A (100 nmol/L final concentration), vitamin C (50 µmol/L final concentration), vitamin E (50 µmol/L final concentration), and NADH (500 µmol/L final concentration). These concentrations were used previously in other studies and have been shown to not affect cell viability (Dawson et al. 2006; Hernandez et al. 2008; Liu and Zhang 2003; Molina et al. 2014). Vitamin A (all-trans retinoic acid), vitamin E (DL-α-tocopherol), and vitamin C (L-ascorbic acid) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). NADH was purchased from G. Birkmayer (NADH Handels GmbH, Vienna).

Table 2. Plasma biochemical parameters and erythrocyte oxidant/antioxidant status in young and aged subjects.

| | Young men control | Young women control | Older men | Older women | P (ANOVA) |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----------|
| Glucose (mg/dL) | 92±0.07 | 86±0.08 | 96±0.06 | 108±0.15 | 0.110 |
| Cholesterol (mg/dL) | 122±0.22 β | 126±0.13 β | 180±0.16 α | 179±0.29 α | 0.006 |
| Triglycerides (mg/dL) | 108±0.14 β | 85±0.11 β | 115±0.14 β | 128±0.12 α | 0.010 |
| LDL-C (mg/dL) | 70±0.12 β | 72±0.06 β | 127±0.11 α | 123±0.05 α | 0.005 |
| Catalase (U/(min·gHb) ⁻¹) | 50.23±4.48 α | 53.22±4.35 α | 30.71±3.08 β | 35.38±2.14 β | 0.008 |
| GSH (mmol/L) | 5.66±0.54 α | 4.28±0.60 β | 3.09±0.54 γ | 2.47±0.46 Δ | 0.002 |
| MDA (μ mol/L) | 1.56±0.24 β | 1.87±0.33 β | 4.71±0.62 α | 4.75±0.59 α | 0.007 |
| Carbonyl proteins (μ mol/L) | 1.28±0.30 β | 1.15±0.29 β | 3.07±0.37 α | 2.97±0.42 α | 0.008 |

Note: Each value represents the mean \pm SD. GSH, reduced glutathione; LDL-C, low density lipoprotein-cholesterol; MDA, malondialdehyde. Statistical comparisons between older and young control subjects were performed by 1-way ANOVA. This analysis is followed by the Tukey's test for pairwise comparisons. Significant differences between groups are indicated by different Greek letters with a P-value (ANOVA) less than 0.05.

Vitamin A and vitamin E were initially dissolved in dimethyl sulphoxide dimethylsulfoxide (<1% in culture medium), and concentrations were adjusted by RPMI medium. Vitamin C and NADH solutions were directly prepared in RPMI medium.

Determination of lymphocytes proliferation

After 48 h of incubation, lymphocyte proliferation was monitored by MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) as described previously (Mosmann 1983). Lymphocyte proliferation is expressed as stimulation index (SI). The SI values were calculated as: mean optical density (at 565 nm) of Con A stimulated cultures/mean optical density of nonstimulated cultures \times 100 (Medjdoub et al. 2011).

IL-2 and IL-4 cytokine assays

Supernatants of lymphocyte cultures were collected and assayed for cytokine release by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturer's instructions (Abfrontier, Multiplex Human Cytokine ELISA Kit).

Determination of T-cell redox status

Lipid peroxidation in lymphocytes was assessed by measuring the concentration of MDA in cell homogenates by the thiobarbituric acid reactive species assay as previously described (Nourooz-Zadeh et al. 1996).

Protein oxidation in lymphocyte homogenates was assayed by measuring carbonyl protein concentrations using the 2,4-dinitrophenyl hydrazine reaction (Levine et al. 1990).

Reduced glutathione (GSH) levels in T-lymphocytes were measured using a Bioxytech GSH-400 kit (OXIS International Inc., Portland, Ore., USA).

Catalase (EC 1.11.1.6) activity in cell homogenates was measured as previously described (Aebi 1974), based on the spectrophotometric analysis of hydrogen peroxide decomposition rate at 240 nm.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SD. Statistical differences between 2 groups were determined by Student's *t* test. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the Tukey's test for pairwise comparisons. *P* < 0.05 was considered to represent statistical significance. All analyses were performed with STATISTICA (Statsoft, Paris, France).

Results

Plasma biochemical parameters and erythrocyte oxidant/antioxidant status in aged and young subjects

Significant increases in plasma cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were found in the elderly as compared with young controls. Plasma triglyceride concentrations were significantly high only in elderly women as compared with young women, while plasma glucose levels were not affected by

aging. Catalase activity was significantly lower in aged men and women compared with their respective control groups. Reduced GSH levels were significantly lower while MDA and carbonyl protein levels were significantly higher in aged men and women than their respective young controls (Table 2).

In vitro lymphocytes proliferation

In vitro Con A-stimulated lymphocyte proliferation rate was significantly decreased in aged men and women compared with young controls (Fig. 1). In young men and women, treatment with vitamin A, vitamin C, vitamin E, or NADH induced a significant increase in lymphocyte proliferation. In aged men and women, vitamin C, vitamin E, or NADH stimulated in vitro lymphocyte proliferation, whereas vitamin A had no effect. Indeed, in the presence of vitamins C, E, or NADH, lymphocyte proliferation in the elderly was normalized and restored to the same level as the young control group.

In vitro cytokine release

The secretion of IL-2 was significantly reduced in old men and women compared with their respective young controls (Table 3). Treatment with vitamin A and NADH had no effect, while vitamins C and E enhanced IL-2 release from cultured lymphocytes collected from both aged and young men and women. Indeed, in the presence of vitamins C and E, IL-2 levels in the aged groups became similar to those in the young groups, but remained low with vitamin A and NADH supplementation.

IL-4 levels were significantly increased in the elderly compared with young controls (Table 3). In young men and women, the addition of vitamins A, C, E, or NADH to culture medium induced a significant increase in IL-4 release by lymphocytes. In the elderly, vitamin C or NADH caused a significant increase in IL-4 secretion, whereas vitamins A or E had no effects. The stimulating effect was most pronounced with vitamin C treatment. In addition, in the vitamin C-treated groups the IL-4 levels were similar in old and young, whereas in the young groups, Con A supplementation did not achieve this effect.

The IL-2/IL-4 ratio, which represents the Th1/Th2 ratio, was significantly decreased in the elderly compared with young subjects (Fig. 2). Vitamins A and C and NADH supplementation each induced a significant decrease in IL-2/IL-4 ratio in young men and women lymphocytes. Vitamin E increased the IL-2/IL-4 ratio in young men and women. In aged men and women, IL-2/IL-4 was unaffected by vitamin A, decreased by vitamin C and NADH, and increased by vitamin E. Indeed, in the presence of vitamin C, vitamin E, or NADH, there were no significant differences in IL-2/IL-4 ratio between old and young groups, thus restoring the declined IL-2/IL-4 ratio in the elderly.

Fig. 1. In vitro T cell proliferation in the presence of different vitamins. Each value represents the mean \pm standard deviation. Con A, mitogenconcanavalin; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; Vit, vitamin. Statistical comparisons between older and young control subjects means were performed by 1-way ANOVA. This analysis is followed by the Tukey's test for pairwise comparisons. Significant differences between the incubations in the same group are indicated by different letters, with P (ANOVA) less than 0.05. *, Statistical difference between older men or women and young men or women, $P < 0.05$.

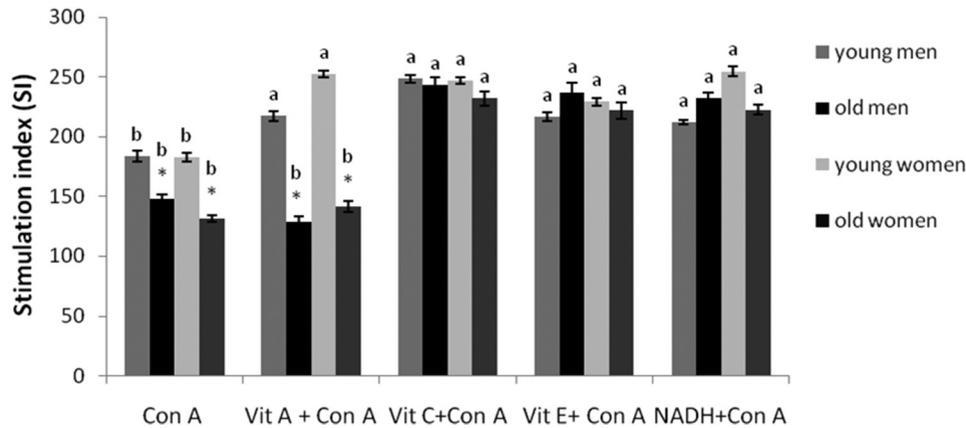
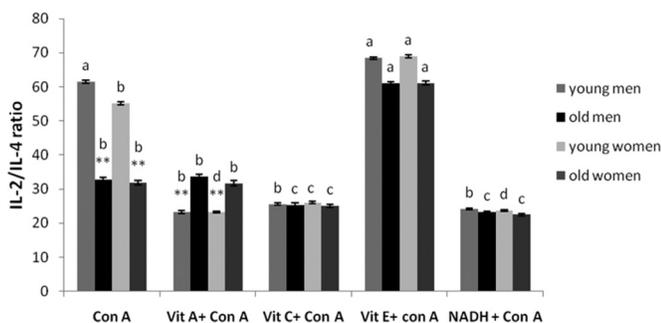


Table 3. Interleukin-2 (IL-2) and interleukin-4 (IL-4) secretion by Con A-stimulated T lymphocytes in the aged and young subjects.

| | Young men | Young women | Older men | Older women | P (ANOVA) |
|---------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| IL-2 (pg/mL) | | | | | |
| Con A | 2766 \pm 125 α b | 2866 \pm 154.68 α c | 2091.60 \pm 185 β b | 2069.40 \pm 121 β b | 0.010 |
| Vitamin A | 2833 \pm 216.70 α b | 2897 \pm 237.58 α c | 1977.70 \pm 121 β b | 1947 \pm 119 β b | 0.009 |
| Vitamin C | 3883 \pm 181a | 4036 \pm 158a | 4058.33 \pm 238a | 4116 \pm 238a | 0.234 |
| Vitamin E | 3608 \pm 141a | 3708 \pm 125b | 3833 \pm 265a | 3897 \pm 212.74a | 0.186 |
| NADH | 2788 \pm 112.74 α b | 2808.26 \pm 116 α c | 2061 \pm 120.94 β b | 2028.26 \pm 118 β b | 0.010 |
| P (ANOVA) | 0.004 | 0.005 | 0.007 | 0.007 | |
| IL-4 (pg/mL) | | | | | |
| Con A | 45.01 \pm 3.02 γ d | 50 \pm 1.53 β d | 63.89 \pm 1.19 α c | 65.04 \pm 1.37 α c | 0.020 |
| Vitamin A | 122.05 \pm 3.46 α b | 124.68 \pm 2.24 α b | 58.89 \pm 3.07 α c | 61.6 \pm 2.22 α c | 0.010 |
| Vitamin C | 152 \pm 8.66a | 155 \pm 11.42a | 161 \pm 9.59a | 164.47 \pm 10.69a | 0.106 |
| Vitamin E | 52.71 \pm 2.33 β c | 53.76 \pm 1.77 β c | 62.71 \pm 2.19 β c | 63.76 \pm 2.42 β c | 0.005 |
| NADH | 115.74 \pm 8.46 α b | 118.15 \pm 10.04 α b | 88.68 \pm 2.22 β b | 90.34 \pm 3.67 β b | 0.005 |
| P (ANOVA) | 0.005 | 0.004 | 0.003 | 0.004 | |

Note: Each value represents the mean \pm SD. Con A, mitogenconcanavalin A; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide. Statistical comparisons between older and young control subjects means were performed by 1-way ANOVA. This analysis is followed by the Tukey's test for pairwise comparisons. Significant differences between the incubations in the same group are indicated by different letters and between the 4 groups in the same incubation by different Greek letters, with a P value (ANOVA) less than 0.05.

Fig. 2. Interleukin 2/4 (IL-2/IL-4) ratio in the presence of different vitamins. Each value represents the mean \pm standard deviation. Con A, mitogenconcanavalin; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; Vit, vitamin. Statistical comparisons between older and young control subjects means were performed by 1-way ANOVA. This analysis is followed by the Tukey's test for pairwise comparisons. Significant differences between the incubations in the same group are indicated by different letters, with P (ANOVA) less than 0.05. **, Statistical difference between older men or women and young men or women, $P < 0.01$.



Intracellular lymphocytes antioxidant status

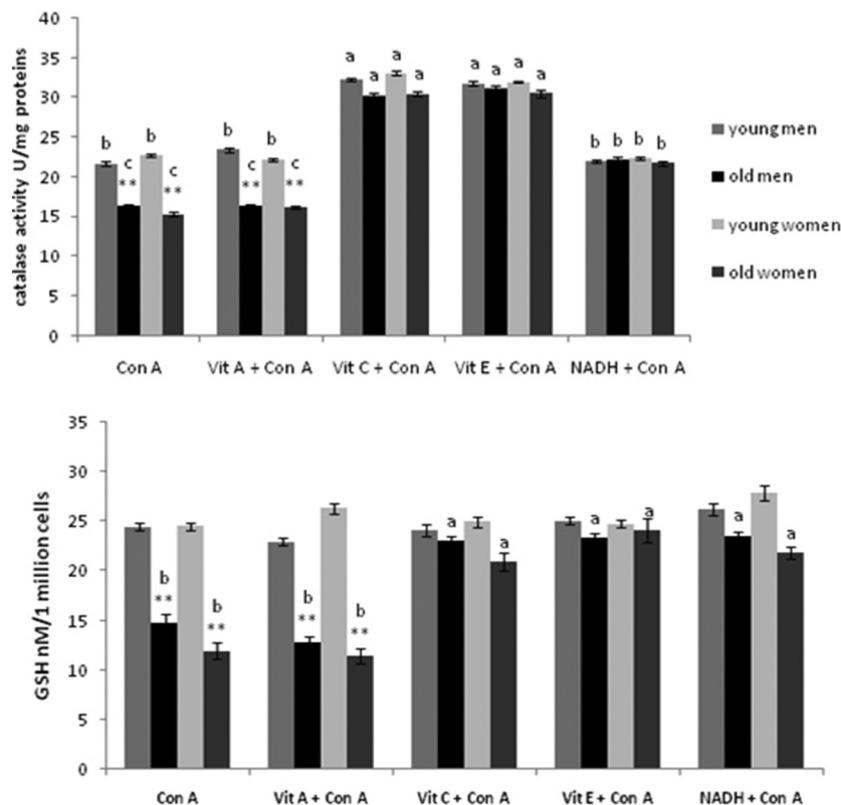
Lymphocytes of aged men and women presented lower catalase activities than lymphocytes of young men and women (Fig. 3). Treatments of lymphocytes with vitamins C or E significantly increased intracellular catalase activity, while vitamin A had no effects in young or elderly subjects. NADH addition did not affect catalase activity in young subjects, while significantly increasing it in the elderly. In the presence of vitamin C, vitamin E, or NADH, catalase activity in lymphocytes from aged subjects was normalized to control values.

Our results showed that lymphocyte GSH amounts were reduced in aged men and women as compared with young subjects (Fig. 3). Vitamin C, vitamin E, or NADH supplementation significantly increased GSH levels in aged subjects, but had no effect in young controls. Vitamin A did not affect GSH levels in young or aged groups. In the presence of vitamin C, vitamin E, or NADH, lymphocyte GSH contents in the elderly were restored to the levels observed in the young.

Intracellular lymphocytes oxidant status

MDA levels, as a marker of lipid peroxidation, and carbonyl proteins, as a marker for protein oxidation, were significantly increased in lymphocytes from the elderly as compared with young

Fig. 3. In vitro lymphocyte antioxidant markers in the presence of different vitamins. Each value represents the mean \pm standard deviation. Con A, mitogenconcanavalin A; GSH, reduced glutathione; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; nM, nmol/L; Vit, vitamin. Statistical comparisons between older and young control subjects means were performed by 1-way ANOVA. This analysis is followed by the Tukey's test for pairwise comparisons. Significant differences between the incubations in the same group are indicated by different letters, with *P* (ANOVA) less than 0.05. **, Statistical difference between older men or women and young men or women, *P* < 0.01.



controls (Table 4). Treatment with Vitamins C and E significantly decreased lymphocyte MDA and carbonyl protein levels in both aged and young men and women. Vitamin A did not affect lymphocyte oxidant markers in all groups. NADH supplementation did not affect intracellular MDA and carbonyl proteins in young subjects, while it caused a significant decrease in the elderly. Indeed, in the presence of vitamins C or E, lymphocyte MDA and carbonyl proteins in aged subjects were similar to those found in young subjects.

Discussion

Several mechanisms contribute to immunosenescence, such as chronic involution of the thymus, decreased IL-2 production, decreased expression of the IL-2 receptor, chronic infections, genetic predisposition with uncontrolled inflammatory responses, hormonal changes, alterations of mitochondrial function, oxidative stress, metabolic changes in adipose tissue, and suppressive factors produced by macrophages (Sandhu and Kaur 2002; Pae et al. 2012; Deleidi et al. 2015).

Nutritional supplementation of antioxidants such as vitamins may be a promising strategy to fortify immunity in the elderly. The ability of these nutrients to modulate the immune response has been demonstrated previously, but is still discussed in the context of aging. Here we investigated the in vitro effects of vitamins on lymphocyte function, and we attempted to determine whether these vitamins might contribute to immune improvement during aging.

Aging is associated with metabolic alterations often including an increase in visceral and subcutaneous adiposity (Garg et al. 2014). Higher abdominal adiposity is a risk factor for accelerated aging and for age-related diseases (Wagner et al. 2016).

In our study, aged men and women had normal body mass index without overweight or obesity. However, they showed biochemical, oxidative, and immune alterations. These elderly subjects presented dyslipidemia with high plasma triglyceride, cholesterol, and LDL-C levels as compared with young controls, but had normal plasma glucose concentrations. Hyperglycemia has been previously reported in the elderly, and it was associated with disturbances of carbohydrate metabolism (Szoke et al. 2008). It has been shown that older adults also have abnormal serum lipids and lipoproteins (Abbott et al. 1983; Kelley et al. 2005), in agreement with our results. These alterations might contribute to the development of atherosclerosis in the elderly. The reasons for lipid accumulation during aging are several, including hormonal deficiencies, increased sedentary lifestyle, metabolic changes such as reduced enzyme activity, reductions in receptor-mediated clearances of plasma lipoproteins, lipoprotein oxidation, age-related decreased in breakdown of cholesterol to bile acids, as well as increased intestinal cholesterol absorption (Kelley et al. 2005; Quiles et al. 2004; Mc Auley and Mooney, 2015; Uranga and Keller, 2010). There is a large body of evidence indicating a correlation between dyslipidemia, oxidative stress, and immunosenescence (Ohtsuka et al. 1990). Oxidized LDL induced a decrease in CD4+T cells' capacity to proliferate, Fas-mediated apoptosis, and an inhibition of IL-2 expression (Meier et al. 2007).

Our results showed reduced erythrocyte GSH and enhanced MDA and carbonyl protein levels in the elderly compared with young subjects, in line with previous studies (Cannizzo et al. 2012; Kregel and Zhang 2007). In addition, the decrease in erythrocyte catalase activity seen in aged subjects could reflect a reduction in antioxidant defense of the organism, inducing oxidative stress.

Table 4. MDA and carbonyl proteins levels in Con A-stimulated T lymphocytes in the aged and young subjects.

| Incubations | Young men | Young women | Older men | Older women | P (ANOVA) |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| MDA (nmol/L per 10⁶ cells) | | | | | |
| Con A | 3.86±0.50βa | 4.03±0.33βa | 6.35±0.46αa | 6.81±0.51αa | 0.007 |
| Vitamin A | 3.71±0.46βa | 4.15±0.54βa | 6.91±0.41αa | 6.66±0.43αa | 0.008 |
| Vitamin C | 2.32±0.23b | 2.24±0.25b | 2.61±0.41c | 2.58±0.39c | 0.207 |
| Vitamin E | 2.38±0.31b | 2.38±0.30b | 2.45±0.36c | 2.51±0.34c | 0.128 |
| NADH | 3.55±0.52βa | 3.69±0.48βa | 4.55±0.42αb | 4.74±0.43αb | 0.008 |
| P ANOVA | 0.008 | 0.007 | 0.002 | 0.003 | |
| Carbonyl proteins (nmol/L per 10⁶ cells) | | | | | |
| Con A | 1.35±0.14βa | 1.34±0.13βa | 2.96±0.16αa | 2.84±0.13αa | 0.007 |
| Vitamin A | 1.40±0.18βa | 1.31±0.11βa | 2.93±0.15αa | 3.03±0.25αa | 0.008 |
| Vitamin C | 1.08±0.05b | 1.06±0.05b | 1.07±0.04c | 1.05±0.04c | 0.217 |
| Vitamin E | 1.03±0.06b | 1.04±0.04b | 1.06±0.05c | 1.07±0.05c | 0.184 |
| NADH | 1.53±0.27βa | 1.55±0.23βa | 2.15±0.15αb | 2.11±0.16αb | 0.007 |
| P ANOVA | 0.006 | 0.008 | 0.005 | 0.004 | |

Note: Each value represents the mean ± SD. Con A, mitogenconcanavalin A; MDA, malondialdehyde; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide. Statistical comparisons between older and young control subjects means were performed by 1-way ANOVA. This analysis is followed by the Tukey's test for pairwise comparisons. Significant differences between the incubations in the same group are indicated by different letters and between the 4 groups in the same incubation by different Greek letters, with a P value (ANOVA) less than 0.05.

Beside metabolic abnormalities, *in vitro* lymphocyte proliferation and cytokine secretion were altered in aged men and women in this study. In our study, Con A-stimulated lymphocyte proliferation was reduced in aged subjects as compared with young controls. Since IL-2 is a potent T-lymphocyte growth factor, diminished IL-2 secretion by lymphocytes might be the reason for reduced lymphocyte proliferation in the elderly.

However, IL-4 secretion by Con A-stimulated lymphocytes was increased in elderly subjects.

IL-2 is a well characterized Th1 cytokine essential for cellular immunity by its role in mediating clonal expansion of activated T-cells. It acts as a growth factor/activator for T-cells, NK cells, and B cells, and promotes the development of lymphokine-activated killer cells. It therefore plays a critical role in regulating both cellular and humoral chronic inflammatory responses (Shaikh 2011). IL-4 is an anti-inflammatory Th2 cytokine associated with humoral immunity. It executes pleiotropic functions, including induction of Th2-differentiation, immunoglobulin class-switching, B cell proliferation, suppression of Th1-differentiation, and inhibition of the production of several proinflammatory cytokines (Sharma et al. 2008; Shaikh 2011). The Th2-like response was dominant in the elderly in response to Con A stimulation, in agreement with previous data, suggesting that the age-associated decrease in immunity may be related to an imbalance in the secretion of immune cytokines (Yen et al. 2000). Previous studies showed that aging involves a shift towards a dominance of the Type 2 cytokine response (Lee et al. 2012; Garg et al. 2014).

Additionally, in our study, the lymphocytes of aged subjects were exposed to an evident intracellular oxidative stress, as shown by the reduced lymphocyte catalase activity, GSH levels, and enhanced MDA and carbonyl protein contents compared with young control values.

Oxidative stress has been previously reported in aged lymphocytes, possibly arising from an uncontrolled production of free radicals with aging and decreased antioxidant defenses (Gautam et al. 2010). Our results were in agreement with this observation.

A previous study has demonstrated that lymphocyte GSH depletion in the elderly was linked to a reduced rate of lymphocyte proliferation, overproduction of IL-4, and a decline in lymphocyte functions (Peterson et al. 1998). Human T-lymphocytes depleted of GSH were unable to proliferate in response to mitogenic lectins, suggesting a direct correlation between cell proliferation and GSH availability (Hadzic et al. 2005). Indeed, high MDA and carbonyl protein levels in the elderly were associated with the Th2-dominant phenotype (Bennett and Griffiths 2013; Ponnappan and Ponnappan

2011). Redox balance is critical for modulating T-cell activation, proliferation, and cytokine synthesis. The oxidative microenvironment exerts an opposing effect on cytokine secretion by Th1 cells as compared with Th2 cells (Kesarwani et al. 2013). Oxidative stress induces the production and release of IL-4 by lymphocytes to support Th2 differentiation. Previous studies have shown that H₂O₂-induced IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1-dependent pathway (Frossi et al. 2003). On the other hand, prolonged exposure to high levels of ROS can inhibit T-cell proliferation and lead to apoptosis (Bennett and Griffiths 2013). The exposure of T-cells to oxidative stress results in decreased IL-2 production as a consequence of reduced intracellular calcium response and altered activity of the transcription factors required for IL-2 transcription.

Our results showed that vitamin treatments *in vitro* have important modulatory effects on T-cell function, with different kinetic profiles in aged and young lymphocytes. The immunomodulatory effects of vitamins were evident in regards to aged lymphocyte proliferation and cytokine secretion with a significant reduction in intracellular oxidative stress.

Vitamin A supplementation of the culture medium induced a significant increase in lymphocyte proliferation and a rise in IL-4 secretion without affecting IL-2 levels in young men and women. The ratio of IL-2/IL-4 was reduced by this vitamin. These findings were in line with a Th2-like response, likely reflecting the anti-inflammatory effect of vitamin A in young people. It has been demonstrated that vitamin A and its metabolite retinoic acid influence different cellular functions, including proliferation and cytokine synthesis, with a direct promotion of Th2-cell differentiation in immune cells via nuclear retinoic acid receptors (Dawson et al. 2006; Iwata et al. 2003). However, in aged lymphocytes vitamin A had no significant effects on *in vitro* proliferation or cytokine secretion. This is in agreement with recent reports showing a reduced response to retinoic acid in aged dendritic cells (Agrawal et al. 2016), and in T-cells from aged mice (Park et al. 2014). Cell resistance to vitamin A was previously reported in some tumor cell-lines, consequent to a point mutation within the ligand-binding domain of the RAR alpha transcript (Lawson and Berliner 1999). Although higher fasting plasma retinol concentrations have been observed in elderly subjects as compared with young subjects (Borel et al. 1998), and aging alters signaling pathways of vitamin A with a significant decrease in retinoic acid receptors (Feart et al. 2005), the mechanism underlying the decreased response to retinoic acid in aged cells remains elusive. Additional

research is needed to elucidate the mechanism by which aged lymphocytes are less responsive to vitamin A.

Our results showed that vitamin C treatment enhanced *in vitro* lymphocyte proliferation with a parallel increase in IL-2 and IL-4 release in both aged and young groups. The IL-2/IL-4 ratio was reduced by vitamin C in both aged and young subjects, in favor of a shift of Th1/Th2 balance toward the Th2 phenotype. Conflicting results have been published concerning the immune effects of vitamin C, depending on the dose administered. Several previous studies have suggested that supplementation with vitamin C improves cell-mediated immune parameters among the elderly (Casciari et al. 2003).

High concentrations (0.25–0.5 mmol/L) of vitamin C lowered cell viability, proliferation, and decreased cytokine secretion in activated T cells (Maeng et al. 2009). Vitamin C treatment enhanced the *in vitro* lymphocyte proliferative response in elderly individuals (Anderson et al. 1980; Kennes et al. 1983). Indeed, vitamin C supplementation enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (Jeng et al. 1996).

In our study, vitamin E induced a significant increase in lymphocyte proliferation with a concomitant increase in IL-2 secretion in both elderly and young subjects. IL-4 levels were increased in young subjects, while they remained unaffected in the elderly after vitamin E addition. Nevertheless, the IL-2/IL-4 ratio was significantly increased in the presence of vitamin E in both aged and young lymphocytes. Vitamin E appeared to have generated a Th1-like phenotype. Our findings were in agreement with clinical trials showing that vitamin E supplementation increased IL-2 production in healthy elderly individuals (Meydani et al. 1998), and other studies showing an increase of IL-2 production in aged mice (Adolfsson et al. 2001). Among antioxidants, vitamin E has been the most extensively studied with regard to immunostimulatory effects. It has been demonstrated that vitamin E regulates the production of cytokines through its effect on transcription factors that are regulated by redox status and by influencing PGE2 synthesis, which plays a key role in the Th1 response and regulation of proinflammatory cytokines (Han and Meydani 2000). These effects of vitamins C and E on immune function could be related to their functions as modulators of several signal transduction enzymes, such as protein kinases, phosphatases, transcription factor nuclear factor kappa B activity, and modulators of cytokine signal transduction pathways (Carcamo et al. 2004; Manning et al. 2013; Mucchegiani et al. 2014; Zingg 2015).

NADH is known to be important to restore depleted cellular stores of adenosine triphosphate (ATP) (Forsyth et al. 1999). Our study showed a stimulatory effect of NADH on lymphocyte proliferation, with a significant increase in IL-4 levels, without affecting IL-2 levels in both aged and young men and women. NADH appeared to have generated a Th2-like phenotype. Stimulatory effects of NADH on cell growth seemed to be related to increasing cellular ATP regeneration, since ATP plays a key role in cell proliferation, and T-cells require high levels of NADH (Delmastro-Greenwood and Piganelli 2013). NADH has been also shown to inhibit apoptosis and to maintain cell viability by inducing autocrine production of IL-4 in cell culture (Palaga et al. 2004). Indeed, it has been demonstrated that NADH diminished apoptosis in irradiated cells (Liu and Zhang 2003).

Our results showed that vitamins C and E modulated lymphocyte oxidant/antioxidant status in both aged and young subjects. However, no change in intracellular redox status was observed in the presence of vitamin A in the 2 groups, while NADH had beneficial effects only in the elderly groups. Vitamins C and E are known antioxidants and are able to scavenge free radicals. The previously reported pro-oxidant effects of vitamin A were not observed in our study (De Oliveira 2015; Murata and Kawanishi 2000).

In the current study, treatment of lymphocytes with vitamins C and E induced a significant increase in catalase activity, with a

concomitant decrease in MDA and carbonyl proteins in both young and elderly subjects. Indeed, vitamins C and E enhanced GSH contents of lymphocytes from aged men and women. Oxidative stress markers were decreased by vitamins C and E, following an enhancement of intracellular antioxidant defense. These findings suggest an upregulation of the enzymes responsible for GSH production and recuperation of extracellular GSH, with a resultant increase in intracellular levels of GSH in lymphocytes exposed to vitamins C and E in aged subjects. It was clear that the oxidant/antioxidant status of T-lymphocytes from older men and women were more sensitive to the presence of vitamins than those from young controls. It is important to note that in the presence of these 2 vitamins, the oxidant/antioxidant status of lymphocytes from aged subjects was normalized to that of young subjects. Our findings were in agreement with earlier reports on the antioxidant power of vitamins C and E (Guaquil et al. 2001; Traber and Atkinson 2007). Our results also confirmed previous findings showing that vitamins C and E can modulate cell-mediated immunity and reduce oxidative stress in lymphocytes (Lee and Wan 2000; Guaquil et al. 2001).

In our study, NADH had no effects on the redox status of lymphocytes from young subjects, while modulating it in aged lymphocytes. In the presence of NADH, lymphocyte GSH levels and catalase activity were enhanced, while MDA and carbonyl proteins were reduced in the elderly, reflecting a diminution in intracellular oxidative stress. Multiple studies have implicated NADH as an antioxidant (Olek et al. 2004). Recently, Cao et al. (2016) demonstrated that *in vitro* treatment of PC12 cells with 1 mmol/L of NADH induced an increase in the levels of nuclear Nrf2, catalase activity, and total glutathione by acting on sirtuins (SIRT2).

Taken together, our results show that except for retinoic acid, aged-lymphocyte proliferation is restored in the presence of vitamins C and E and NADH. However, vitamins alone were not as efficient in maintaining the Th1/Th2 balance in the elderly as compared with young subjects. A combination of vitamins with other bioactive compounds from food sources could be a good approach to mitigate oxidative stress and to maintain immune homeostasis during aging, similar to recent reports indicating beneficial effects of vitamins combined with other nutrients (minerals, fibers, omega-3 fatty acids) to enhance immunity (Bo et al. 2016; Castillo et al. 2015; Hermsdorff et al. 2012).

In summary, the present study shows that the proliferation rate of T-lymphocytes was decreased with aging, resulting from alterations in cytokine secretion, GSH depletion, and intracellular oxidative stress. Our results from this *in vitro* study demonstrate that at physiologic concentrations, vitamins C and E and NADH improved T-lymphocyte immune response and mitigated cellular oxidative stress in the elderly. These could be promising agents (especially vitamin C and E, because of the resulting lymphocyte profile) for the prevention of age-related immune alterations. In contrast, vitamin A at the tested concentration did not affect lymphocytes proliferation or cell redox status in this population. Further investigation is required to assess *in vivo* immunomodulatory effects of vitamin supplementation in the elderly, although the concentration used for human consumption should be chosen with caution.

Conflict of interest statement

The authors have declared no financial conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the Algerian Research Project (PNR, 2011) from the Algerian Health investigation office (ATRSS) and by SANMO (Algerian Society of orthomolecular nutrition and medicine) protocol. The authors thank Dr BAGHLI I (SANMO president) and his team for their technical help concerning vitamin supplementation. The authors thank F DJELTI, an ESP linguist at Tlemcen

University, for editing the manuscript. The manuscript was also supported by the Editage Online English editing service.

References

- Abbott, R.D., Garrison, R.J., Wilson, P.W., Epstein, F.H., Castelli, W.P., Feinleib, M., and LaRue, C. 1983. Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes: the Framingham Study. *Arteriosclerosis*, **3**: 260–272. doi:10.1161/01.ATV.3.3.260. PMID:6573877.
- Adolfsson, O., Huber, B.T., and Meydani, S.N. 2001. Vitamin E enhanced IL-2 production in old mice: naive but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2-producing capacity. *J. Immunol.* **167**: 3809–3817. doi:10.4049/jimmunol.167.7.3809. PMID:11564798.
- Aebi, H. 1974. Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Edited by H.U. Bergmeyer. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Germany. Vol. 2. pp. 673–684.
- Agrawal, A., Agrawal, S., Ganguly, S., and Tran, A. 2016. Dendritic cells from aged subjects display impaired responses to retinoic acid. *J. Immunol.* **196**: 59–63.
- Álvarez-Rodríguez, L., López-Hoyos, M., Muñoz-Cacho, P., and Martínez-Taboada, V.M. 2012. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol.* **273**: 124–132. doi:10.1016/j.cellimm.2012.01.001. PMID:22316526.
- Anderson, R., Oosthuizen, R., Maritz, R., Heron, A., and Van Rensburg, A.J. 1980. The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and humoral immune function in volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**: 71–76. PMID:7355784.
- Bennett, S.J., and Griffiths, H.R. 2013. Regulation of T-cell functions by oxidative stress. In *Studies on Arthritis and Joint Disorders, Oxidative Stress*. Edited by M.J. Alcaraz et al. Springer Science+Business Media. pp. 36. doi:10.1007/978-1-4614-6166-1_2.
- Bo, L., Jiang, S., Xie, Y., Kan, H., Song, W., and Zhao, J. 2016. Effect of vitamin E and omega-3 fatty acids on protecting ambient PM2.5-induced inflammatory response and oxidative stress in vascular endothelial cells. *PLoS ONE*, **11**: e0152216. doi:10.1371/journal.pone.0152216. PMID:27007186.
- Borel, P., Mekki, N., Boirie, Y., Partier, A., Alexandre-Gouabau, M-C, Grolier, P., et al. 1998. Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. *J. Gerontol. A Biol. Med. Sci.* **53**: 2. PMID:9520909.
- Cannizzo, E.S., Clement, C.C., Sahu, R., Follo, C., and Santambrogio, L. 2011. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J. Proteomics*, **74**: 2313–2323. doi:10.1016/j.jprot.2011.06.005. PMID:21718814.
- Cannizzo, E.S., Clement, C.C., Morozova, K., Valdor, R., Kaushik, S., Almeida, L.N., et al. 2012. Age-related oxidative stress compromises endosomal proteostasis. *Cell Rep.* **2**: 136–149. doi:10.1016/j.celrep.2012.06.005. PMID:22840404.
- Cao, W., Hong, Y., Chen, H., Wu, F., Wei, X., and Ying, W. 2016. SIRT2 mediates NADH-induced increases in Nr2f, GCL, and glutathione by modulating Akt phosphorylation in PC12 cells. *FEBS Lett.* doi:10.1002/1873-3468.12236.
- Carcamo, J.M., Pedraza, A., Borquez-Ojeda, O., Zhang, B., Sanchez, R., and Golde, D.W. 2004. Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits Ikb β kinase β . *Mol. Cell. Biol.* **24**: 6645–6652. doi:10.1128/MCB.24.15.6645-6652.2004. PMID:15254232.
- Casciari, J.J., Riordan, H.D., Mikirova, N., and Austin, J. 2003. Effect of Vitamin C supplementation on *Ex Vivo* immune cell functioning. *J. Ortho. Med.* **18**: 83–92.
- Castillo, Y., Tachibana, M., Nakatsu, Y., Watanabe, K., Shimizu, T., and Watarai, M. 2015. Combination of zinc and all-trans retinoic acid promotes protection against *Listeria monocytogenes* infection. *PLoS ONE*, **10**(9): e0137463. doi:10.1371/journal.pone.0137463. PMID:26351852.
- Dawson, H.D., Collins, G., Pyle, R., Key, M., Weeraratna, A., Deep-Dixit, V., et al. 2006. Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes. *BMC. Immunol.* **7**: 27. doi:10.1186/1471-2172-7-27. PMID:17118196.
- De la Fuente, M. 2014. The immune system, a marker and modulator of the rate of aging. In *Immunology of Aging*. Edited by A. Massoud and N. Rezaei. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 5–6. doi:10.1007/978-3-642-39495-9_2.
- De la Fuente, M., Ferrández, M.D., Burgos, M.S., Soler, A., Prieto, A., and Miquel, J. 1998. Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**(4): 373–380. doi:10.1139/y98-038. PMID:9795745.
- De Oliveira, M.R. 2015. Vitamin A and retinoids as mitochondrial toxicants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **13**. doi:10.1155/2015/140267.
- Deleidi, M., Jäggle, M., and Rubino, G. 2015. Immunaging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Front. Neurosci.* **9**: 172. doi:10.3389/fnins.2015.00172. PMID:26089771.
- Delmastro-Greenwood, M.M., and Piganelli, J.D. 2013. Changing the energy of an immune response. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* **2**: 30–54. PMID:23885324.
- Demarin, V., Podobnik, S.S., Storga-Tomic, D., and Kay, G. 2004. Treatment of Alzheimer's disease with stabilized oral Nicotinamide adenine dinucleotide: a randomized, double-blind study. *Drugs Exp. Clin. Res.* **30**: 27–33. PMID:15134388.
- Espino, J., Pariente, J.A., and Rodriguez, A.B. 2012. Oxidative stress and immunosenescence: therapeutic effects of melatonin. *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi:10.1155/2012/670294.
- Feat, C., Pallet, V., Boucheron, C., Higuieret, D., Alfos, S., Letenneur, L., et al. 2005. Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Euro. J. Endocrinol.* **152**: 449–458. doi:10.1530/eje.1.01858.
- Ferry, M. 2013. Les micronutriments chez le sujet vieillissant. *Cah. Année. Gérontol.* **5**: 308–317. doi:10.1007/s12612-013-0365-3.
- Forsyth, L.M., Preuss, H.G., MacDowell, A.L., Chiazze, L., Birkmayer, G.D., and Bellanti, J.A. 1999. Therapeutic effects of oral NADH on the symptoms of patients with chronic fatigue syndrome. *Ann. Aller. Asthma. Immunol.* **82**: 185–191. doi:10.1016/S1081-1206(10)62595-1. PMID:10071523.
- Frossi, B., De Carli, M., Daniel, K.C., Rivera, J., and Pucillo, C. 2003. Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* **33**: 2168–2177. doi:10.1002/eji.200323995. PMID:12884291.
- Fulop, T., Le Page, A., Fortin, C., Witkowski, J.M., Dupuis, G., and Larbi, A. 2014. Cellular signaling in the aging immune system. *Current. Opin. Immunol.* **29**: 105–111. doi:10.1016/j.coi.2014.05.007.
- Garg, S.K., Delaney, C., Colin, D., Shi, H., and Yung, R. 2014. Changes in adipose tissue macrophages and T cells during aging. *Crit. Rev. Immunol.* **34**: 1–14. doi:10.1615/CritRevImmunol.2013006833.
- Gautam, N., Das, S., Mahapatra, S.K., Chakraborty, S.P., Kundu, P.K., and Roy, S. 2010. Age associated oxidative damage in lymphocytes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**: 275–282. doi:10.4161/oxim.3.4.12860. PMID:20972374.
- Guaiquil, V.H., Vera, J.C., and Golde, D.W. 2001. Mechanism of vitamin C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione-depleted HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 40955–40961. doi:10.1074/jbc.M106878200. PMID:11533037.
- Guerra, B.A., Bolin, A.P., and Otton, R. 2012. Carbonyl stress and a combination of astaxanthin/vitamin C induce biochemical changes in human Neutrophils. *Toxicol. In Vitro*, **26**: 1181–1190. doi:10.1016/j.tiv.2012.06.010. PMID:22750055.
- Hadzic, T., Li, L., Cheng, N., Walsh, S.A., Spitz, D.R., and Knudson, C.M. 2005. The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion. *J. Immunol.* **175**: 7965–7972. doi:10.4049/jimmunol.175.12.7965. PMID:16339532.
- Han, S.N., and Meydani, S.N. 2000. Antioxidants, cytokines, and influenza infection in aged mice and elderly humans. *J. Infect. Dis.* **182**: 74–80. PMID:10944487.
- Hermesdorff, H.H.M., Barbosa, K.B.F., Volp, A-C.P., Puchau, B., Bressan, J., Zulet, M.A., et al. 2012. Vitamin C and fiber consumption from fruits and vegetables improves oxidative stress markers in healthy young adults. *Br. J. Nutr.* **107**: 1119–1127. doi:10.1017/S0007114511004235. PMID:21899800.
- Hernandez, J., Garibay-Escobar, A., Mendoza-Mendoza, A., Pinelli-Saavedra, A., and Valenzuela, O. 2008. Effect of exogenous vitamin E on proliferation and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells from patients with tuberculosis. *Br. J. Nutr.* **99**: 224–229. doi:10.1017/S0007114507795302. PMID:18290270.
- Hirokawa, K. 1999. Age-related changes of signal transduction in T cells. *Exp. Gerontol.* **34**: 7–18. doi:10.1016/S0531-5565(98)00667-9. PMID:10197724.
- Iwata, M., Eshima, Y., and Kagechika, H. 2003. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int. Immunol.* **15**: 1017–1025. doi:10.1093/intimm/dxg101.
- Jeng, K.C., Yang, C., Siu, W.Y., Tsai, Y.S., Liao, W.J., and Kuo, J.S. 1996. Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **64**: 960–965. PMID:8942423.
- Kelley, G.A., Kelley, K.S., and Tran, Z.V. 2005. Exercise, lipids, and lipoproteins in older adults: a meta-analysis. *Prev. Cardiol.* **8**: 206–214. doi:10.1111/j.0197-3118.2005.03769.x. PMID:16230875.
- Kennes, B., Dumont, I., Brohee, D., Hubert, C., and Neve, P. 1983. Effect of vitamin C supplements on cell-mediated immunity in old people. *Gerontology*, **29**: 305–310. PMID:6604680.
- Kern, S.E., Price-Whelan, A., and Newman, D.K. 2014. Extraction and measurement of NAD(P) + and NAD(P)H. In *Pseudomonas Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Edited by A. Filloux and J.L. Ramos. Springer Science+Business Media, New York. pp. 311. doi:10.1007/978-1-4939-0473-0_2.
- Kesarwani, P., Murali, A.K., Al-Khami, A.A., and Mehrotra, S. 2013. Redox regulation of T-cell function: From molecular mechanisms to significance in Human health and disease. *Antiox. Redox Signal.* **18**: 1497–1534. doi:10.1089/ars.2011.4073.
- Kregel, K.C., and Zhang, H.J. 2007. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**: R18–R36. PMID:16917020.
- Lawson, N.D., and Berliner, N. 1999. Neutrophil maturation and the role of retinoic acid. *Exp. Hematol.* **27**: 1355–1367. doi:10.1016/S0301-472X(99)00085-5. PMID:10480426.
- Lee, C.Y.J., and Wan, J.M.F. 2000. Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. *J. Nutr.* **130**: 2932–2937. PMID:11110849.
- Lee, N., Shin, M.S., and Kang, I. 2012. T-cell biology in aging, with a focus on lung disease. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **67**: 254–263. PMID:22396471.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., et al. 1990.

- Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth-ods Enzymol.* **186**: 464–478. doi:10.1016/0076-6879(90)86141-H. PMID:1978225.
- Liu, F.Q., and Zhang, J.R. 2003. X-ray induced L02 cells damage rescued by new anti-oxidant NADH. *World J. Gastroenterol.* **9**: 1781–1785. doi:10.3748/wjg.v9.i8.1781. PMID:12918120.
- Maeng, H.G., Lim, H., Jeong, Y.J., Woo, A., Kang, J.S., Lee, W.J., and Hwang, Y.I. 2009. Vitamin C enters mouse T cells as dehydroascorbic acid in vitro and does not recapitulate in vivo vitamin C effects. *Immunobiology*, **214**: 311–320. doi:10.1016/j.imbio.2008.09.003. PMID:19327547.
- Manning, J., Mitchell, B., Appadurai, D.A., Shakya, A., Jean-Pierre, L., Wang, H., et al. 2013. Vitamin C promotes maturation of T-cells. *Antiox. Redox Signal.* **19**: 2054–2067. doi:10.1089/ars.2012.4988.
- Mc, Auley, M.T., and Mooney, K.M. 2015. Computationally modeling lipid metabolism and aging: a mini-review. *Comp. Struct. Biotechnol. J.* **13**: 38–46. doi:10.1016/j.csbj.2014.11.006.
- Medjdoub, A., Merzouk, S.A., Merzouk, H., Chiali, F.Z., and 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. *Pestic. Biochem. Physiol.* **101**: 27–33. doi:10.1016/j.pestbp.2011.06.002.
- Meier, P., Spertini, F., Blanc, E., and Burnier, M. 2007. Oxidized low-density lipoproteins activate CD4+ T cell apoptosis in patients with end-stage renal disease through Fas engagement. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**: 331–342. doi:10.1681/ASN.2006050514. PMID:17182885.
- Meydani, S.N., Meydani, M., Blumberg, J.B., Leka, L.S., Pedrosa, M., Diamond, R., and Schaefer, E.J. 1998. Assessment of the safety of supplementation with different amounts of vitamin E in healthy older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**: 311–318. PMID:9701188.
- Mocchegiani, E., and Malavolta, M. 2009. Role of zinc and selenium in oxidative stress and immunosenescence: implications for healthy ageing and longevity. In *Handbook on Immunosenescence*. Edited by T. Fulop et al. Springer Science+Business Media. pp. 1368. doi:10.1007/978-1-4020-9063-9_66.
- Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Francesco, P., Basso, A., and Malavolta, M. 2012. Micronutrient (Zn, Cu, Fe)-gene interactions in ageing and inflammatory age-related diseases: implications for treatments. *Ageing Res. Rev.* **11**: 297–319. doi:10.1016/j.arr.2012.01.004. PMID:22322094.
- Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Malavolta, M., Basso, A., Piacenza, F., et al. 2014. Vitamin E-gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: implications for treatment. A systematic review. *Ageing Res. Rev.* **14**: 81–101. doi:10.1016/j.arr.2014.01.001. PMID:24418256.
- Mohajeri, M.H., Troesch, B., and Weber, P. 2015. Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: Implications for brain aging and Alzheimer-type dementia. *Nutrition*, **31**: 261–275. doi:10.1016/j.nut.2014.06.016. PMID:25592004.
- 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. *Int. Immunopharmacol.* **22**: 41–50. doi:10.1016/j.intimp.2014.06.026.
- Momtaz, S., and Abdollahi, M. 2012. A comprehensive review of biochemical and molecular evidences from animal and human studies on the role of oxidative stress in aging: an epiphenomenon or the cause. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* **7**: 1–19. doi:10.3923/ajava.2012.1.19.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**: 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID:6606682.
- Murata, M., and Kawanishi, S. 2000. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J. Biol. Chem.* **275**: 2003–2008. doi:10.1074/jbc.275.3.2003. PMID:10636903.
- Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., Ling, K.L., and Wolff, S.P. 1996. Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem. J.* **313**: 781–786. PMID:8611155.
- Ohtsuka, Y., Kobayashi, K., Hirano, T., Furukawa, S.I., Nagano, S., and Takahashi, T. 1990. Involvement of lipoproteins in suppression of interleukin-2 dependant cell proliferation by sera from aged humans. *Gerontology*, **36**: 268–275. doi:10.1159/000213211. PMID:2150198.
- Olek, R.A., Ziolkowski, W., Kaczor, J.J., Greci, L., Popinigis, J., and Antosiewicz, J. 2004. Antioxidant activity of NADH and its analogue - an in vitro study. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**: 416–421. PMID:15469728.
- Ostan, R., Alberti, S., Bucci, L., Salvio, S., Pasi, S., Cevenini, E., et al. 2006. Effect of zinc ions on apoptosis in PBMCs from healthy aged subjects. *Biogerontology*, **7**: 437–447. doi:10.1007/s10522-006-9059-1. PMID:17028933.
- Pae, M., Meydani, S.N., and Wu, D. 2012. The role of nutrition in enhancing immunity in aging. *Aging Dis.* **3**: 1.
- Palaga, T., Kataoka, T., and Nagai, K. 2004. Extracellular ATP inhibits apoptosis and maintains cell viability by inducing autocrine production of interleukin-4 in a myeloid progenitor cell line. *Int. Immunopharmacol.* **4**: 953–961. doi:10.1016/j.intimp.2004.04.006.
- Pandey, K.B., and Rizvi, S.I. 2014. Resveratrol in vitro ameliorates tert-butyl hydroperoxide-induced alterations in erythrocyte membranes from young and older humans. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **39**(10): 1093–1097. doi:10.1139/apnm-2014-0064. PMID:24914573.
- Park, J., Miyakawa, T., Shiokawa, A., Nakajima-Adachi, H., Tanokura, M., and Hachimura, S. 2014. Attenuation of migration properties of CD4+ T cells from aged mice correlates with decrease in chemokine receptor expression, response to retinoic acid, and RALDH expression compared to young mice. *Biosci. Biotech. Biochem.* **78**: 976–980. doi:10.1080/09168451.2014.910099.
- Peterson, J.D., Herzenberg, L.A., Vasquez, K., and Waltenbaugh, C. 1998. Glutathione levels in antigen presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 3071–3076. doi:10.1073/pnas.95.6.3071. PMID:9501217.
- Ponnappan, S., and Ponnappan, U. 2011. Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. *Antiox. Redox. Signal.* **14**: 8. doi:10.1089/ars.2010.3228. PMID:20812785.
- Quiles, J.L., Ochoa, J.J., Ramirez-Tortosa, C., Battino, M., Huertas, J.R., Martin, Y., et al. 2004. Dietary fat type (virgin olive vs. sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Exp. Gerontol.* **39**: 1189–1198. doi:10.1016/j.exger.2004.05.002. PMID:15288693.
- Ross, A.C., Chen, Q., and Ma, Y. 2011. Vitamin A and retinoic acid in the regulation of B-cell development and antibody production. In *Vitamins and hormones*. pp. 104–107. Elsevier Inc., Pa. doi:10.1016/B978-0-12-386960-9.00005-8.
- Sandhu, S.K., and Kaur, G. 2002. Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontology*, **3**: 161–173. doi:10.1023/A:1015643107449. PMID:12075135.
- Shaikh, P.Z. 2011. Cytokines and their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: a review. *Int. J. Pharm. Life Sci.* **11**: 1247–1263.
- Sharma, P., Chakraborty, R., Wang, L., Min, B., Tremblay, M.L., Kawahara, T., et al. 2008. Redox regulation of interleukin-4 signaling. *Immunity*, **29**: 551–564. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.019. PMID:18957266.
- Szoke, E., Shrayyef, M.Z., Messing, S., Woerle, H.J., Van Haeften, T.W., and Meyer, C. 2008. Effect of aging on glucose homeostasis. *Diabetes Care*, **31**: 539–543. doi:10.2337/dc07-1443. PMID:18083793.
- Traber, M.G., and Atkinson, J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free. Radic. Biol. Med.* **43**: 4–15. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024. PMID:17561088.
- Uranga, R.M., and Keller, J.N. 2010. Diet and age interactions with regards to cholesterol regulation and brain pathogenesis. *Current Gerontol. Geriatr. Res.* **14** pp. doi:10.1155/2010/219683.
- Visioli, F., and Hagen, T.M. 2007. Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: focus on micronutrients. *Pharmacol. Res.* **55**: 199–206. doi:10.1016/j.phrs.2007.01.008. PMID:17317208.
- Wagner, K.-H., Cameron-Smith, D., Wessner, B., and Franzke, B. 2016. Biomarkers of aging: from function to molecular biology. *Nutrients*, **8**: 338. doi:10.3390/nu8060338.
- Wu, J., Li, W., Liu, Z., Zhang, Y.Y., Peng, Y., Feng, D.G., et al. 2012. Ageing-associated changes in cellular immunity based on the SENIEUR protocol. *Scand. J. Immunol.* **75**: 641–646. doi:10.1111/j.1365-3083.2012.02698.x. PMID:22443369.
- Yen, C.J., Lin, S.L., Huang, K.T., and Lin, R.H. 2000. Age-associated changes in interferon-gamma and interleukin-4 secretion by purified human CD4+ and CD8+ T cells. *J. Biomed. Sci.* **7**(4): 317–321. PMID:10895055.
- Ying, W. 2008. NAD+/NADH and NADP/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences. *Antiox. Redox. Signal.* **10**: 2. doi:10.1089/ars.2007.1672.
- Zhang, Q., Li, N., Zhou, G., Lu, X., Xu, Z., and Li, Z. 2003. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacol. Res.* **48**: 151–155. doi:10.1016/S1043-6618(03)00103-8. PMID:12798667.
- Zingg, J.M. 2015. Vitamin E: a role in signal transduction. *Annu. Rev. Nutr.* **35**: 135–173. doi:10.1146/annurev-nutr-071714-034347. PMID:26185977.

Résumé

Le vieillissement est un événement biologique inévitable, associé à des altérations du système immunitaire. La supplémentation en nutriments pourrait améliorer ces anomalies. Le but de cette étude est d'établir des stratégies alimentaires simples afin d'améliorer la santé et la réponse immunitaire des personnes âgées. 50 personnes âgées (âge supérieur à 65 ans) et 80 personnes jeunes (âge compris entre 25 et 35 ans) sont sélectionnées dans la région Tlemcen. L'état nutritionnel est évalué en utilisant l'IMC, les scores MNA, SNAQ et dosage d'albumine plasmatique. Les paramètres biochimiques et métaboliques sont dosés par des kits colorimétriques et/ou enzymatiques. Le stress oxydant est évalué dans le lysat érythrocytaire en dosant le glutathion réduit (GSH), le malondialdéhyde (MDA), les protéines carbonylées (PC) et la catalase. Les lymphocytes du sang périphérique sont isolés en utilisant un gradient de densité d'Histopaque. Ils sont cultivés in vitro et stimulés par la Con A, en présence ou en absence de vitamines et des huiles. La prolifération cellulaire est déterminée par le test MTT et la sécrétion de l'interleukine-2 et de l'interleukine -4 est quantifiée par kit Elisa. Le statut oxydant / antioxydant intra-lymphocytaire était aussi déterminé. Nos résultats obtenus du score MNA montrent que 44 % des hommes âgés et 52% des femmes âgées ont un risque de malnutrition. Ces sujets présentent des altérations métaboliques et un stress oxydant évident. Le taux de prolifération des lymphocytes T est diminué avec l'âge résultant de l'altération de la sécrétion des cytokines, de la diminution du GSH et du stress oxydatif intracellulaire. Chez les personnes âgées, la vitamine C, E et le NADH, l'huile de nigelle améliorent de manière significative la prolifération des lymphocytes et le pouvoir antioxydant cellulaire, tandis que la vitamine A, les huiles de tournesol et de noix n'ont pas d'incidence sur la prolifération cellulaire ni sur l'état redox cellulaire dans cette population. Par contre, l'huile de lin diminue la prolifération lymphocytaire aussi bien chez les âgés que chez les jeunes. En conclusion, le traitement in vitro des lymphocytes par les vitamines et l'huile de nigelle améliore la réponse immunitaire chez les personnes âgées et peuvent être utiles dans la prévention des altérations immunitaires liées à l'âge.

Mots Clés: vieillissement, lymphocytes, nutrition, cytokines, stress oxydant.

Abstract

Aging is an inevitable biological event, associated with immune alterations, oxidative stress and malnutrition. Nutrient supplementation could improve these abnormalities. The purpose of this study is to establish simple dietary strategies to improve the health and immune response in the elderly. 50 old subjects (age over 65 years) and 80 young men and women (age between 25 and 35 years) were selected in Tlemcen area. The nutritional status was assessed by using BMI, MNA, SNAQ scores and plasma albumin assay. The biochemical and metabolic parameters were assayed by colorimetric and / or enzymatic kits. The oxidative stress was evaluated in the erythrocyte lysate by assaying reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), carbonyl proteins (CP) and catalase. Peripheral blood lymphocytes were isolated using histopaque density gradient. They were cultured in vitro and stimulated by Con A, in the presence or absence of vitamins and oils. Cell proliferation was determined by the MTT assay. Secretion of interleukin-2 and interleukin-4 was quantified by Elisa kit. The intra-lymphocyte redox status was also determined. Our results obtained from the MNA score show that 44% of elderly men and 52% of elderly women have a risk of malnutrition. These subjects exhibit metabolic alterations and oxidative stress. The rate of proliferation of T lymphocytes is decreased with age resulting from altered cytokine secretion, decreased GSH and intracellular oxidative stress. In the elderly, vitamin C, E, NADH, and Niger oil significantly improve lymphocyte proliferation and cellular antioxidant power, while vitamin A, sunflower and walnut oils do not affect cell proliferation and the cellular redox status in this population. On the other hand, linseed oil decreases lymphocyte proliferation in both the elderly and the young. In conclusion, the in vitro treatment of lymphocytes with vitamins and Niger oil improves the immune response in the elderly and may be useful in preventing age-related immune alterations.

Keywords: aging, lymphocytes, nutrition, cytokines, oxidative stress.

ملخص

الشيخوخة حدث بيولوجي لا مفر منه، يرتبط مع ضعف في الجهاز المناعي، زيادة في الأكسدة ونقص في التغذية. المكملات الغذائية يمكن أن تعالج هذا الاختلال. الغرض من هذه الدراسة هو وضع استراتيجيات غذائية بسيطة لتحسين الصحة والاستجابة المناعية للمسنين. تم تقييم الحالة الغذائية للمسنين في منطقة تلمسان باستخدام مقياس MNA، SNAQ وفحص الزلال في البلازما مع إجراء تحاليل بيوكيميائية وأيضيه باستخدام تجارب لونية وأنزيمية. تم تقييم الأكسدة الخلوية في خلايا الدم: GSH، MDA، PCAR وأنزيم الكاتالاز. تم عزل الخلايا للمفاوية من الدم باستخدام تدرج الكثافة (Histopaque). زرعت هذه الخلايا في المختبر بعد تحفيزها بواسطة Con A في وجود أو عدم وجود الفيتامينات والزيوت، مع تحديد تكاثر الخلايا بواسطة فحص MTT وإفراز الانترلوكين-2 و الانترلوكين-4 بواسطة فحص ELISA. تم أيضا تحديد وضع الأكسدة داخل الخلايا للمفاوية. بينت النتائج المتحصل عليها بواسطة مقياس MNA أن 44% من كبار السن من الرجال و 52% من النساء المسنات أكثر عرضة لخطر سوء التغذية مع زيادة في الأكسدة و تغيرات أيضيه لدى هذه الفئة. أظهرت أيضا النتائج أن معدل تكاثر الخلايا T انخفض مع التقدم في السن و صاحبه تغيير في إفراز السيتوكينات، و زيادة الأكسدة داخل الخلايا. لدى كبار السن، أدت كل من الفيتامينات ج، هـ، NADH، و زيت الحبة السوداء إلى زيادة كبيرة في تكاثر الخلايا للمفاوية والقوة المضادة للأكسدة الخلوية، في حين أن فيتامين أ، زيت عباد الشمس وزيت الجوز لم تؤثر على الخلايا لدى هذه الفئة من السكان عكس زيت بذر الكتان سببت انخفاض في معدل تكاثر الخلايا للمفاوية. في الختام، علاج الخلايا للمفاوية بالفيتامينات ج، هـ، NADH و زيت الحبة السوداء يعزز الاستجابة المناعية لدى كبار السن ويمكن أن تكون مفيدة في الوقاية من امراض التقدم في السن.

الكلمات المفتاحية: الشيخوخة، الخلايا للمفاوية، التغذية، السيتوكينات، الأكسدة.