

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAÏD-TLEMEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS**



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



**En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie
Option : Nutrition et santé.**

Les effets de la curcumine sur la fonction cellulaire in vitro

Présenté par : Mme BETAOUAF Nihel

Soutenu le : /06/2017

Devant le jury composé de :

Présidente: Mme LOUKIDI B. Maître de conférences A, Université Tlemcen.

Examinatrice : Mme MEDJDOUB A. Maître de conférences B, Université Tlemcen.

Promotrice : Mme MERZOUK H. Professeur, Université Tlemcen.

Année universitaire: 2016-2017



Dédicaces

Louange à Dieu tout puissant
J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail :

A celui qui m'a aidé, soutenu et encouragé

Mon père ;

*A la plus chère femme qui m'a donné la vie, et qui a
toujours veillé sur mon bien-être :*

Ma mère ;

*A mes chers frères Walid et le petit Ihab et à ma seule et
unique sœur Samah;*

A mon très cher mari Fethallah Bouabdallah ;

A mon bébé et mon rayon de soleil Nizar Toufik ;

*A ma belle-mère et à mes beaux frères et sœur et
surtout à mon beau-père allah yarahmou ;*

A ma chère grand-mère ;

*A tous les membres de ma famille : Oncles, Tantes, et
cousins (es) ;*

A toutes mes copines ;

*Et pour finir à toute la promotion Master2 Nutrition et
Santé 2016/2017.*

Remerciements

Avant tout je tiens à remercier Allah le tout puissant, le miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de m'avoir permis de finaliser se travail dans de meilleures conditions.

*Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à mon encadreur Mme **MERZOUK H**, Professeur à l'Université de Tlemcen pour l'encadrement de ce mémoire et pour la confiance qu'elle m'a accordée, sa disponibilité et ses excellents conseils.*

Je tiens à exprimer aussi mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de mémoire.

*Un remerciement particulier à tous les enseignants et surtout Melle **BADID N**.*

J'adresse un grand merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la finalisation de ce mémoire, votre soutien s'est avéré déterminant à l'aboutissement de ce projet.

Enfin, je remercie mes chers parents qui m'ont aidé à suivre mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont toujours soutenus et encouragés sans limite.

****Merci****

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	01
-------------------	----

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La curcumine.....	03
2. Effets bénéfiques de la curcumine.....	05
2.1. La curcumine et prévention de certains cancers.....	05
2.2. Effets bénéfiques de la curcumine sur le cerveau.....	06
2.3. Curcumine et effet anti-inflammatoire.....	08
2.4. Curcumine contre l'hypercholestérolémie.....	08
2.5. Curcuma comme source de vitamines.....	08
2.6. Curcumine contre le vieillissement.....	08
2.7. Bienfait de curcuma en cas d'insuffisance cardiaque.....	09
3. Stress oxydant et curcumine.....	09
3.1. Le stress oxydatif.....	09
3.2. Les radicaux libres.....	10
3.3. Balance oxydante anti-oxydante.....	12
3.4. Effets de la curcumine sur le stress oxydant.....	13

MATERIEL ET METHODES

1. Choix du modèle d'étude in vitro.....	15
2. Isolement des lymphocytes.....	15
3. Culture des lymphocytes.....	18
4. Comptage des lymphocytes.....	18
5. Détermination de la prolifération lymphocytaire ou splénocytaire par la méthode du MTT.....	18
6. Détermination des marqueurs du stress au niveau des lymphocytes.....	19
6.1. Détermination du taux de glutathion des lymphocytes.....	19
6.2. Détermination de l'activité de la catalase des lymphocytes (CAT, EC 1.11.1.6).....	20
6.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA) des lymphocytes.....	20
6.4. Détermination des protéines carbonylées des lymphocytes.....	20
7. Analyse statistique.....	20

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine.....	22
2. Statut antioxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine.....	23
2.1. Teneurs en Glutathion réduit lymphocytaire (GSH).....	23
2.2. Activité de la catalase lymphocytaire.....	24

3. Statut oxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine.....	25
3.1. Teneurs lymphocytaires en Malondialdéhyde (MDA).....	25
3.2. Teneurs en Protéines carbonylées lymphocytaires (PCAR)	26
Discussion.....	27
Conclusion.....	30
Références bibliographiques.....	31
Annexe.....	34

Liste des Figures

Figure 1. Origine de la curcumine.....	03
Figure 2. Structure chimique de la curcumine.....	04
Figure 3. Plante de la curcumine.....	04
Figure 4. Effets métaboliques de la curcumine.....	07
Figure 5. Le stress oxydatif.....	10
Figure 6. Environnement pro-carcinogène.....	11
Figure 7. Exemples de radicaux libres.....	11
Figure 8. Balance du stress oxydant.....	12
Figure 9. Méthode d'isolement et purification des lymphocytes.....	17
Figure 10. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de curcumine.....	22
Figure 11. Teneurs en Glutathion réduit lymphocytaire (GSH) en présence de l'agent mitogène ou de curcumine.....	23
Figure 12. Activité de la catalase lymphocytaire en présence de l'agent mitogène ou de curcumine.....	24
Figure 13. Teneurs lymphocytaires en Malondialdéhyde (MDA) en présence de l'agent mitogène ou de curcumine.....	25
Figure 14. Teneurs en Protéines carbonylées lymphocytaires (PCAR) en présence de l'agent mitogène ou de curcumine.....	26

Liste des Tableaux

Tableau 1. Effets de la curcumine sur le stress oxydatif.....14

Tableau 2. Taille et densité des cellules sanguines.....16

Liste des Tableaux en annexes

Tableau A1. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine.....33

Tableau A2. Statut antioxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine.....34

Tableau A3. Statut oxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine.....35

Liste des Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

CAT : Catalase.

ConA : Concanavaline A.

GSH : Glutathion réduit.

MDA : Malondialdéhyde.

PCAR : Protéine carbonylée.

INTRODUCTION

Introduction

Parmi les antioxydants, la curcumine (différolol méthane) est un important pigment naturel dérivé des rhizomes de curcuma qui possède un pouvoir antioxydant puissant (Fan et al., 2013). L'herbe connue sous le nom de *Curcuma longa* est originaire d'Inde et d'Asie du Sud, mais actuellement elle est connue aux quatre coins de la planète. La curcumine possède un potentiel antiprolifératif, anti-cancérigène et chimio-préventif (Kunnumakkara et al., 2008). Cette plante, traditionnellement utilisée comme épice en cuisine, possède de nombreux bienfaits pour la santé (Pulido-Moran et al., 2016).

Le curcuma *longa* est utilisé de façon intensive dans la médecine ayurvédique et chinoise. C'est aussi le principal ingrédient du curry, mélange d'épices omniprésent dans la cuisine indienne. La curcumine, présente dans le curcuma, est un agent antioxydant très puissant, capable de piéger les radicaux libres qui endommagent les membranes cellulaires, altèrent l'ADN et accélèrent le vieillissement (Pulido-Moran et al., 2016). Elle joue aussi un rôle prépondérant dans la détoxification cellulaire (Chuengsamarn et al., 2013).

La curcumine possède des propriétés anti-inflammatoires, antiprolifératives et pro-apoptotiques, ce qui en fait un excellent candidat comme agent de chimio-prévention dans le cancer colorectal (Aggarwall et al., 2003). Un grand nombre de travaux implique les effets de la curcumine *in vitro*, sur des lignées cellulaires et à un degré moindre sur des modèles animaux et ceci contraste avec le faible nombre de travaux cliniques en oncologie digestive (Pulido-Moran et al., 2016). Certaines études cliniques dans ce domaine montrent que la curcumine possède des effets positifs dans le traitement de certains cancers (Aggarwall et al., 2003; Sharma et al., 2004).

En fait, il a été établi que la curcumine est un antioxydant bi-fonctionnel. La curcumine exerce une action anti-oxydante directement et indirectement par une destruction directe des espèces réactives à l'oxygène et par une induction d'une réponse anti-oxydante de l'organisme où elle agit (Pulido-Moran et al., 2016).

De plus, le curcuma fait l'objet de nombreuses autres études scientifiques. Des essais cliniques ont démontré que le rhizome peut faire baisser le taux de cholestérol, réduire les douleurs articulaires (de la polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrose), et les douleurs postopératoires, grâce à son pouvoir anti-inflammatoire, soulager les troubles digestifs, stimuler la bonne humeur, l'attention, le sommeil, et même prévenir certaines maladies (Chuengsamarn et al., 2013; Howes et Simmonds, 2014; Pulido-Moran et al., 2016). Mais ce qui intéresse surtout les chercheurs, ce sont les bienfaits de cette plante dans la prévention comme le traitement de

Introduction

certaines cancers, particulièrement des poumons, du sein, de la prostate et du côlon. La communauté scientifique est tout simplement partie d'un constat : les populations asiatiques sont en moyenne huit fois moins touchées par ces pathologies (Fan et al., 2013). Il a ensuite été démontré que la consommation de curcumine durant plusieurs mois fait régresser des lésions précancéreuses comme les polypes intestinaux (Epstein et al., 2010). D'autres études ont démontré qu'associée à la chimiothérapie, la curcumine peut permettre la stabilisation d'un cancer colorectal ou du pancréas. Cette substance augmenterait enfin les effets de la radiothérapie et de la chimiothérapie, tout en limitant leurs effets secondaires (Aggarwall et al., 2003; Fan et al., 2013). Le curcuma intéresse bien d'autres spécialités médicales, telles la gastro-entérologie, la rhumatologie, la cardiologie et la neurologie.

Certains travaux se sont intéressés à l'immunité et ont montré que la curcumine stimule le système immunitaire et peut aider l'organisme à se défendre contre les agents pathogènes (Jagetia et Aggarwal, 2007). Il est à noter que l'effet combiné immuno-modulateur et antioxydant de la curcumine peut être très bénéfique pour l'organisme, notamment dans la prévention de nombreuses pathologies.

C'est dans ce contexte que s'orientent les travaux de recherche dans le cadre de ce mémoire de master en nutrition et santé. Le but de notre travail est de déterminer les effets du curcuma, à différentes concentrations, sur la prolifération *in vitro* des lymphocytes et sur le statut oxydant / antioxydant intracellulaire. Les lymphocytes sont choisis comme cellules représentant le système immunitaire, et sont isolés, par centrifugation dans un gradient de densité, à partir du sang total de personnes volontaires.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. La Curcumine

La curcumine est un dérivé du curcuma, le pigment qui donne au curry sa couleur jaune-orangé (Figure 1). C'est un composé polyphénol (Figure 2) qui a été l'objet de nombreuses études, et dont les effets sur la santé sont multiples. La conséquence est que le curcuma connaît un succès croissant en tant que complément alimentaire. 100 grammes de curcuma contiennent 3 à 5 grammes de curcumine (Savina, 2013).

Des études ont montré que le curcuma a une action préventive sur de nombreuses pathologies comme les cancers et les maladies cardiovasculaires (Aggarwal et al., 2004).

Sur le marché, le curcuma est nommé par plusieurs appellations. Ainsi appelée curcuma en France, cet ingrédient porte le nom de Turmeric au Royaume Uni, Haldi en Inde, et Ukon au Japon (Sharma et al., 2005).

Les différents travaux de recherche, associés aux connaissances traditionnelles et modernes, ont permis aux scientifiques d'établir une classification phylogénétique de cette plante (Figure 3) (Záveská et al., 2012). Cette classification est la suivante:

Espèce: *Curcuma Longa*.

Genre: *Curcuma*.

Famille: Zingiberaceae.

Ordre: Zingiberales.

Classe: Liliopsida.

Division: Magnoliophyta.

Règne: Plantae.



Figure 1. Origine de la curcumine (Pulido-Moran et al., 2016)

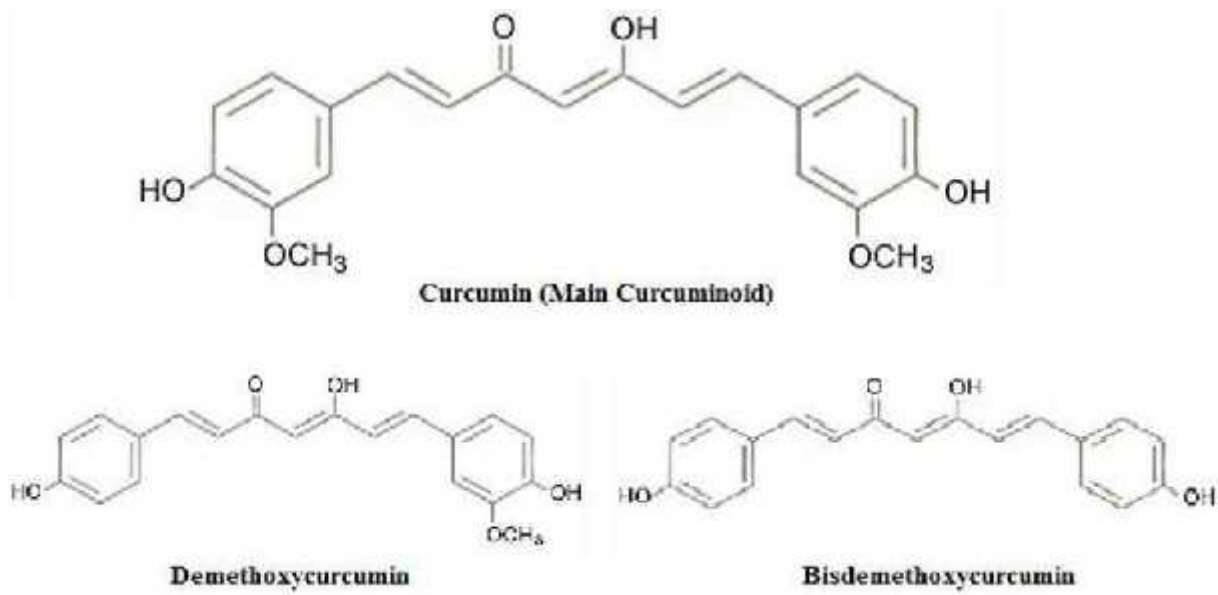


Figure 2. Structure chimique de la curcumine (Jayaprakasha et al., 2005)



Figure 3. Plante de la curcumine (Hermann et al., 1990)

Etat actuel du sujet

Le curcuma fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques. Déjà, en 1987, des essais cliniques menés en Chine ont démontré que le rhizome peut faire baisser le taux de cholestérol. Mais ce qui intéresse surtout les chercheurs désormais, ce sont les bienfaits de cette plante dans la prévention et le traitement de certains cancers, particulièrement des poumons, du sein, de la prostate et du côlon (Jiao, 2009). La communauté scientifique est tout simplement partie d'un constat: les populations asiatiques sont en moyenne huit fois moins touchées par ces pathologies. Il a ensuite été démontré que la consommation de la curcumine durant plusieurs mois fait régresser des lésions précancéreuses comme les polypes intestinaux (Brondino et al., 2014). D'autres études ont démontré qu'associée à la chimiothérapie, la curcumine peut permettre la stabilisation d'un cancer colorectal ou du pancréas, à des doses quotidiennes de 8 gr. Cette substance augmenterait enfin les effets de la radiothérapie et de la chimiothérapie, tout en limitant leurs effets secondaires (Joe, 2004).

Le curcuma intéresse bien d'autres spécialités médicales, telles la gastro-entérologie, la rhumatologie et la neurologie. Des études cliniques devraient être menées dans les années à venir. Les recherches concernent également la maladie d'Alzheimer (Hermann et al., 1990).

2. Effets bénéfiques de la curcumine

Le curcuma est un ingrédient phares de la médecine traditionnelle Ayurvédique (médecine traditionnelle indienne). La curcumine est utilisée comme additif alimentaire pour ses propriétés de coloration aromatique et nutritive. Ainsi, le curcuma est un remède contre les troubles gastro-intestinaux, les troubles digestifs, les maladies inflammatoires ou encore le vieillissement cellulaire. Cette épice est exploitée dans deux grands secteurs d'activité, l'alimentation et la santé (Sharma et al., 2005).

Le domaine de la santé exploite les composés actifs du curcuma et de ses différentes espèces pour leurs propriétés préventives et curatives face à de nombreuses maladies (Figure 4). Cependant, pour ces fins médicinales, les doses consommées chez l'homme sont inférieures à celles ingérées dans l'alimentation (Sharma et al., 2005).

Le curcuma est une épice aux multiples vertus préventives comme curatives. Excellent pour la digestion, le curcuma a aussi la capacité de diminuer les inflammations, prévenir le cancer et protéger le cerveau de la maladie d'Alzheimer (Pulido-Moran et al., 2016).

2.1. La curcumine et prévention de certains cancers

En luttant contre le stress oxydatif responsable de la dégénérescence cellulaire et contre l'inflammation, la curcumine agirait en prévention de certains cancers, notamment de la

sphère ORL, du poumon et du sein. La curcumine, présente dans le curcuma, possède même des effets positifs dans le traitement de certains cancers. En Chine, on l'emploie pour traiter les premières phases du cancer du col de l'utérus, en parallèle des traitements allopathiques habituels (Mahady, 2002).

Une étude a mis en évidence la faculté de la curcumine à inhiber la croissance des cellules vésicales cancéreuses, *in vitro*, à des concentrations de 10 à 25 μM et à induire une apoptose (Pulido-Moran et al., 2016). Cette même action a été observée dans une expérience de xénogreffe *in vivo*, où des cellules vésicales cancéreuses ont été transplantées chez des souris en bonne santé qui recevaient une dose de 50 mg/kg de cet extrait de curcuma tous les 2 jours pendant 18 jours. Les résultats montrent que la croissance tumorale a été considérablement réduite (Chadalapaka, 2008).

2.2. Effets bénéfiques de la curcumine sur le cerveau

La curcumine, associée à la turmérone, un autre composant du curcuma, aurait des effets positifs sur le cerveau. C'est une molécule prometteuse pour régénérer des cellules endommagées du cerveau dans les maladies neurologiques. Plus particulièrement dans la maladie d'Alzheimer, elle détruit les plaques de protéines responsables de la dégénérescence de certaines cellules cérébrales (en gênant la transmission des informations), tout en prévenant leur formation (Aggarwal et al., 2003).

L'organisme humain possède certains gènes qui régulent l'activité antioxydante. Un de ces gènes, héméoxygénase-1 (HO-1), est supposé défendre les cellules du cerveau exposées aux attaques radicalaires. Des chercheurs ont examiné les effets neuro-protecteurs de la curcumine et sa capacité à provoquer la réponse de HO-1 dans des cultures de neurones. Le traitement par la curcumine a eu pour résultat une augmentation de l'expression de HO-1 ainsi qu'une expression plus importante des enzymes anti-oxydantes. La pré-incubation des cellules dans la curcumine augmente la résistance des cellules aux lésions oxydatives. Selon les chercheurs, la curcumine pourrait être utilisée dans un but thérapeutique comme un puissant inducteur de HO-1 qui pourrait protéger les cellules du cerveau contre les lésions oxydatives (Motterlini, 2000). La curcumine a également augmenté les niveaux du glutathion et des enzymes responsables de sa régénération dans des régions spécifiques du cerveau incluant le cortex cérébral (Pulido-Moran et al., 2016).



Figure 4. Effets métaboliques de la curcumine (Pulido-Moran et al., 2016).

2.3. Curcumine et effet anti-inflammatoire

La curcumine améliore la mobilité des articulations. Elle aiderait aussi à réduire les douleurs articulaires (de la polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrose), et les douleurs postopératoires, grâce à son pouvoir anti-inflammatoire. Cette plante protège également des maladies inflammatoires du foie et de l'intestin (obstruction du canal biliaire et maladies chroniques du foie comme l'hépatite) (Aggarwal et al., 2003).

2.4. Curcumine contre l'hypercholestérolémie

Le curcuma n'a pas un effet direct sur le cholestérol mais il est intéressant chez les personnes qui en ont. Il abaisse le taux de triglycérides en réduisant le taux de sucre et il aide aussi à maintenir le taux de mauvais cholestérol bas, lié aux lipoprotéines LDL. En prévention, il contribue à maintenir un taux de bon cholestérol, lié aux lipoprotéines HDL. Il peut aussi être consommé en complément d'un traitement en cas de diabète (Aggarwal et al., 2003).

L'oxydation du LDL-cholestérol joue également un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. Des chercheurs ont rapporté que la curcumine, in vivo, avait non seulement la capacité de diminuer les taux de cholestérol total et de LDL-cholestérol mais également qu'elle peut exercer un effet protecteur dans la prévention de la lipoperoxydation des membranes cellulaires et protège contre l'athérosclérose (Ramirez-Tortosa, 1999).

2.5. Curcuma comme source de vitamines

Riche en fer, manganèse, potassium, vitamines C et B6, le curcuma consommé régulièrement est un bon moyen de rester en bonne santé. En période de fatigue par exemple il donne un coup de fouet. C'est aussi un super-aliment préventif pour la santé de façon générale. En prévention, il est conseillé de prendre une cuillère à café par jour de curcuma en poudre, saupoudré sur les plats (Prasad et al., 2014).

2.6. Curcumine contre le vieillissement

La curcumine est également reconnue en tant que puissant antioxydant, capable de piéger les radicaux libres qui endommagent les membranes cellulaires, altèrent l'ADN et accélèrent le vieillissement. En outre, la curcumine empêche l'agrégation des plaquettes du sang qui s'agglutinent pour former des caillots et déclencher ainsi des infarctus ou des AVC. Elle stimule la vésicule biliaire afin qu'elle produise plus de bile, améliorant du même coup la digestion. La Commission Allemande, chargée de déterminer les plantes qui peuvent être

prescrites en toute sécurité sur le sol allemand, a approuvé le curcuma comme moyen pour lutter contre les problèmes digestifs (Reddy,2005). Une étude en double-aveugle a montré en effet que le curcuma réduisait les symptômes de ballonnements et de gaz chez les personnes souffrant d'indigestion(Savina,p). L'efficacité de la curcumine dans la prévention de l'oxydation du cholestérol-LDL ainsi que la diminution du cholestérol total a été démontrée chez l'animal (Savina, 2013).

2.7. Bienfaits du curcuma en cas d'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque se produit lorsque le cœur ne peut plus pomper efficacement du sang. Elle peut conduire à une hypertrophie du muscle cardiaque qui s'accompagne de symptômes tels que la fatigue et des enflures. Des chercheurs ont testé la curcumine sur deux modèles d'insuffisance cardiaque: une maladie cardiaque associée à une pression sanguine élevée chez des rats sensibles au sel et sur des rats chez lesquels un infarctus du myocarde avait été induit chirurgicalement. Dans les deux cas, la curcumine a prévenu l'augmentation de l'épaisseur de la paroi du muscle cardiaque induite par l'insuffisance cardiaque. Les chercheurs ont attribué le mécanisme de la curcumine à l'inhibition d'une enzyme, la p300 HAT (histone acétyltransférase) (Prasad et al., 2014). L'histone acétyltransférase est une enzyme intervenant dans le remodelage de la chromatine. Son action consiste à acétyler les résidus lysine présents sur les queues N-terminales des histones. Cette acétylation va alors permettre à la chromatine de se décompacter et d'exposer des sites de liaison pour l'ARN polymérase II et pour les protéines de régulation de la transcription (facteurs de transcription). L'inhibition de cette enzyme permet de prévenir l'hypertrophie cardiaque (Morimoto et al., 2008).

3. Stress oxydant et curcumine

3.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif ou stress oxydant correspond à une agression des cellules par des radicaux libres, aussi appelés « espèces réactives de l'oxygène » (ERO). Il ne faut pas confondre stress oxydatif, qui s'observe au niveau cellulaire, et stress psychologique, au niveau de l'organisme (Favier, 2003). Le stress oxydatif peut être généré par différents facteurs comme la pollution, l'inflammation, le tabac, le déficit immunitaire, un régime déséquilibré, le vieillissement ...(Figure 5).



Figure 5. Le stress oxydatif (Favier, 2003)

Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes est présente:

- Excès des espèces réactives de O₂, N₂ ou Cl₂
- Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes)
- Mécanismes de réparation insuffisants.

Le stress oxydant n'est pas une maladie mais un mécanisme physiopathologique. Un excès d'espèces réactives mal maîtrisé favorisera une maladie ou un vieillissement accéléré. Il s'agit d'un état de déséquilibre entre la production d'espèces réactives et les défenses de l'organisme (Figure 6) (Favier, 2003).

Le stress oxydant est un bon indicateur du réel état de santé de tout individu ...et du sportif notamment qui doit tout particulièrement surveiller l'équilibre de son alimentation (Favier,1997).

3.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules chimiques instables produites en faible quantité par l'organisme (Figure7). Ils sont principalement synthétisés dans la cellule lors de réactions avec l'oxygène. Leur instabilité chimique fait que ces substances sont très réactives et certaines des réactions avec des structures de la cellule entraînent des dégâts. Des radicaux libres en surnombre auront ainsi un effet visible sur le vieillissement de la peau, et seraient impliqués dans de nombreuses pathologies comme des cancers, des maladies cardiaques, des maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, des intoxications à des médicaments, etc. (Favier, 1997).

Etat actuel du sujet

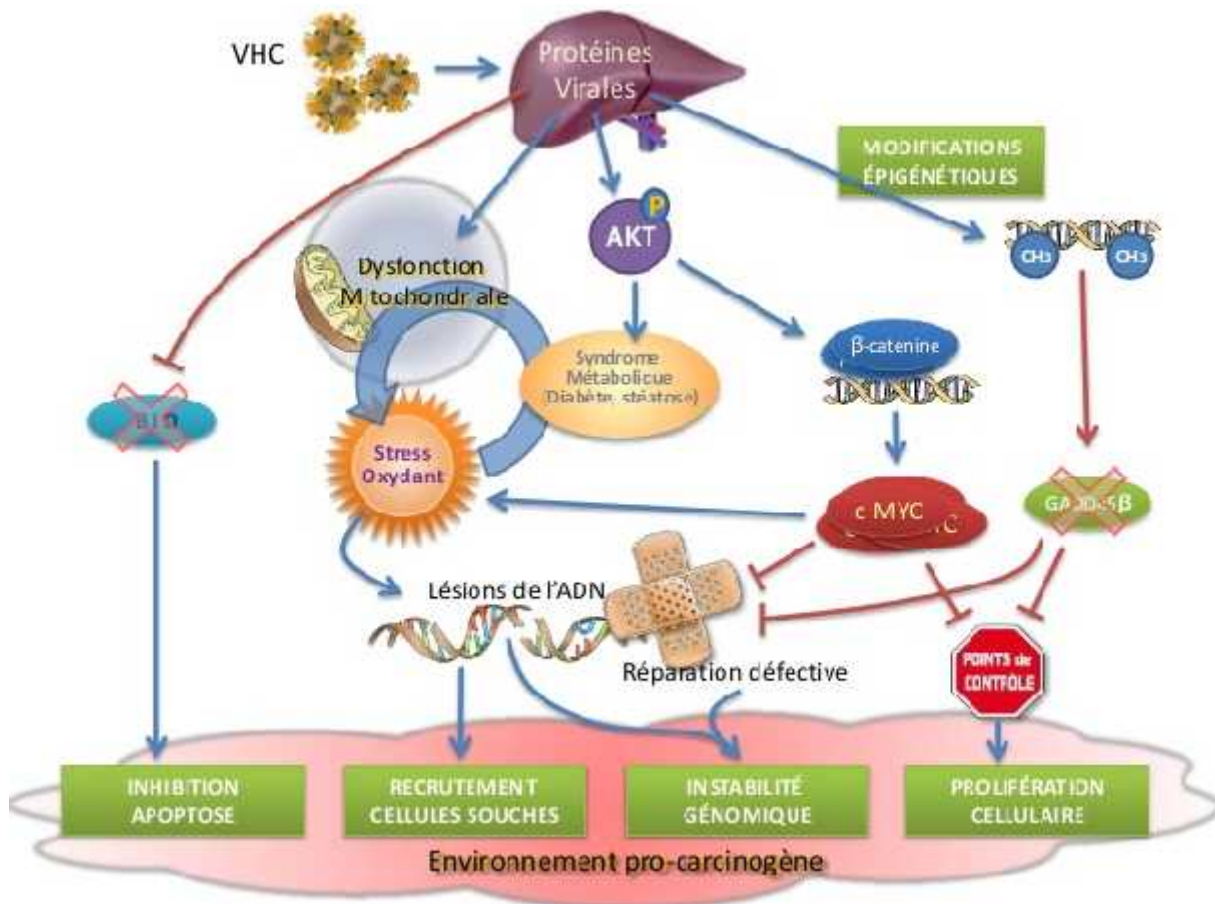


Figure 6. Environnement pro-carcinogène (Favier,1997).

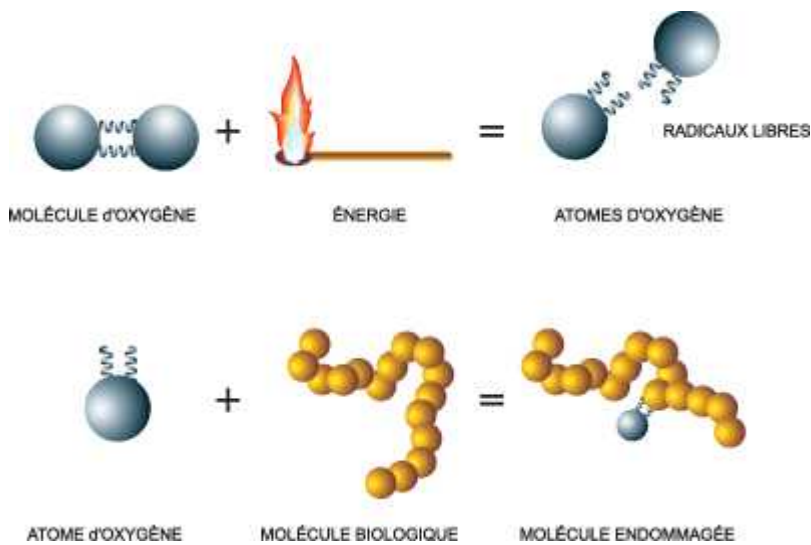


Figure 7. Exemples de radicaux libres (Barondeau et al., 2004)

3.3. Balance oxydante antioxydante

Le stress oxydant, les radicaux libres, les espèces oxygénées activées et les antioxydants sont devenus des termes familiers dans le milieu médical et dans la population générale. La balance oxydante antioxydante permet de connaître le niveau du stress oxydatif de l'organisme (Figure 8). Il existe des méthodes directes mesurant les réactions impliquées en temps réel mais elles sont difficiles et onéreuses. Les techniques indirectes sont plus souvent utilisées et mesurent des biomarqueurs ou des produits finaux des processus médiés, donnant ainsi une estimation de l'importance du stress oxydant. Ces biomarqueurs incluent les enzymes superoxyde dismutases, catalase, glutathion réductase, glutathion peroxydase, les concentrations de glutathion et des vitamines antioxydantes, la peroxydation des lipides, et la concentration en nitrite et de protéines glycosylées de manière non enzymatique. La mesure de la peroxydation des lipides et de l'oxydation des protéines sont les indicateurs les plus courants du dommage oxydatif. Enfin, au vue de ces données, il est incontestable que c'est par une alimentation saine, mais aussi par une hygiène de vie appropriée que nous pouvons bénéficier des effets protecteurs des antioxydants naturels. Il faut aussi garder à l'esprit que la prise de suppléments d'antioxydants (surtout au long cours et à fortes doses), chez des sujets qui n'en ont pas obligatoirement besoin, pourrait avoir des effets négatifs, contraires à ceux attendus. Ceci a été retrouvé dans plusieurs études, notamment portant sur des populations à haut risque de cancers (Prasad et al., 2014).

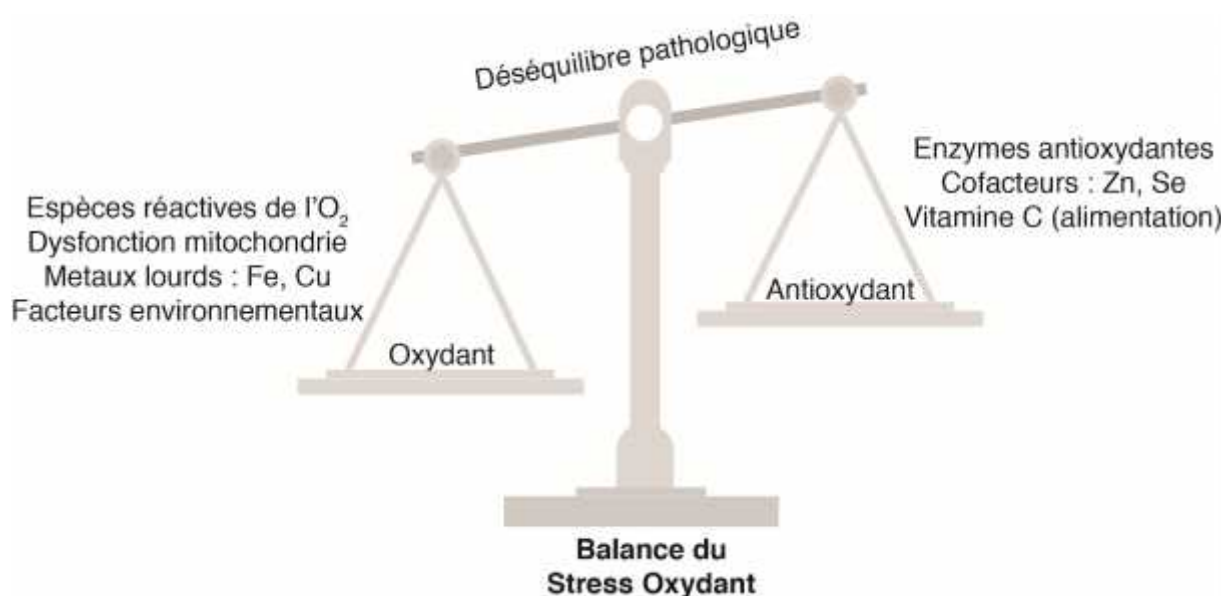


Figure 8. Balance du stress oxydant (Favier, 2003)

3.4. Effets de la curcumine sur le stress oxydant

Les effets du curcuma contre le stress oxydatif sont actuellement bien reconnus (Tableau 1). Le pouvoir antioxydant de la curcumine a été démontré par plusieurs études cliniques et expérimentales (Pulido-Moran et al., 2016). En fait, la curcumine possède la capacité de neutralisation des radicaux libres, ce qui permet la protection contre de nombreuses maladies associées au stress oxydatif. Le curcuma peut dans certains cas être contre-indiqué auprès des personnes qui souffrent de certaines pathologies. Ainsi, celles atteintes d'obstruction des voies biliaires-calculs doivent s'abstenir de prendre du curcuma. Les personnes qui souffrent d'une maladie du foie (hépatopathie) doivent également consulter leur médecin avant de songer à commencer un traitement à base de curcuma ou à base d'un autre type de plante. Les personnes qui auraient été sujettes à un surdosage de curcuma risquent quant à elles de vomissements, de nausées et de brûlures d'estomac. Il convient donc de faire attention à bien respecter la posologie du curcuma.

Etat actuel du sujet

Tableau1. Effets de la curcumine sur le stress oxydatif (Skalko-Basnet, 2011).

Propriétés Médicinales du Curcuma (Curcumine)	
Primaires	Secondaires
Anti oxydant (réduit ou élimine le stress oxydatif, les radicaux libres, détoxination, détoxification, rééquilibré).	Anti tumoral (lutte contre les tumeurs).
Anti-inflammatoire (combat-réduit-élimine les inflammations, les douleurs).	Cholagogue cholérétique (restaure les troubles digestives).
Hémato-protecteur (protège le foie).	Carminatif soulage (les douleurs digestifs)
Bactéricide (tue les bactéries).	Hypocholestérolémiant (fait diminuer la quantité de cholestérol dans le sang).
Fongicide (élimine les champignons).	Antispasmodique (lutte contre les spasmes musculaire).
Parasiticide (élimine les parasites).	Analgésiques externes (réduit les douleurs externes).
Antimutagène (empêche la mutation des gènes).	Vulnérable (guérit les plaies, les contusions).
Anti-angiogénèse (empêche le développement des vaisseaux sanguins, détruit les vaisseaux sanguins des tumeurs).	Antiviral (combat les virus)
Apoptose (Suicide cellulaire)	Fluidifiant sanguin (élimine les caillots de sang).
	Rubéfiant /stimulant circulatoire (élimine les troubles circulatoire).
	Emménagogue (soulage les aménorrhées)

MATERIEL ET METHODES

1. Choix du modèle d'étude *in vitro*

Nous avons utilisé un modèle de cellules humaines, les lymphocytes pour voir les effets de la curcumine *in vitro*.

Le sang est prélevé chez des étudiantes du département de Biologie, Faculté SNVTU de l'université de Tlemcen (n = 5), âgés entre 24 – 26 ans, en bonne santé et ne présentant aucune pathologie chronique. Ces étudiantes sont des volontaires, ayant donné leur consentement.

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

Le sang prélevé est recueilli à raison de 4 ml dans des tubes héparinés. Les échantillons collectés servent à l'isolement immédiat des lymphocytes.

2. Isolement des lymphocytes

L'isolement des lymphocytes se fait à partir du prélèvement sanguin, par centrifugation dans un gradient d'Histopaque (Sigma). L'histopaque, dont la densité est de 1,075, permet l'agrégation des hématies. La migration différentielle durant la centrifugation résulte en la formation de différentes couches contenant les différents types de cellules sanguines. Ainsi, les globules rouges et les granulocytes sédimentent complètement et se retrouvent dans le culot. Les lymphocytes ayant une densité inférieure à celle d'histopaque (Tableau 2) se trouvent à l'interface entre l'histopaque et le plasma après centrifugation. Ils sont par contre contaminés par d'autres cellules à sédimentation lente (Monocytes, plaquettes) (Figure 9). Les lymphocytes sont récupérés de l'interface puis sont lavés pour éliminer les contaminants (Histopaque, plasma, plaquettes,...). Le lavage se fait avec une solution saline équilibrée.

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


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

Afin de tester la viabilité des cellules isolées, 50µl de cette suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et sont mélangés à 50µl d'une solution de bleu de trypan 0,4 et 50µl de milieu RPMI 1640. La numération cellulaire est effectuée sur une chambre quadrillée «Cellule de Malassez ». Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 4.10^6 cellules/ml.

Matériel et Méthodes

Tableau 2. Taille et densité des cellules sanguines

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



Matériel et Méthodes

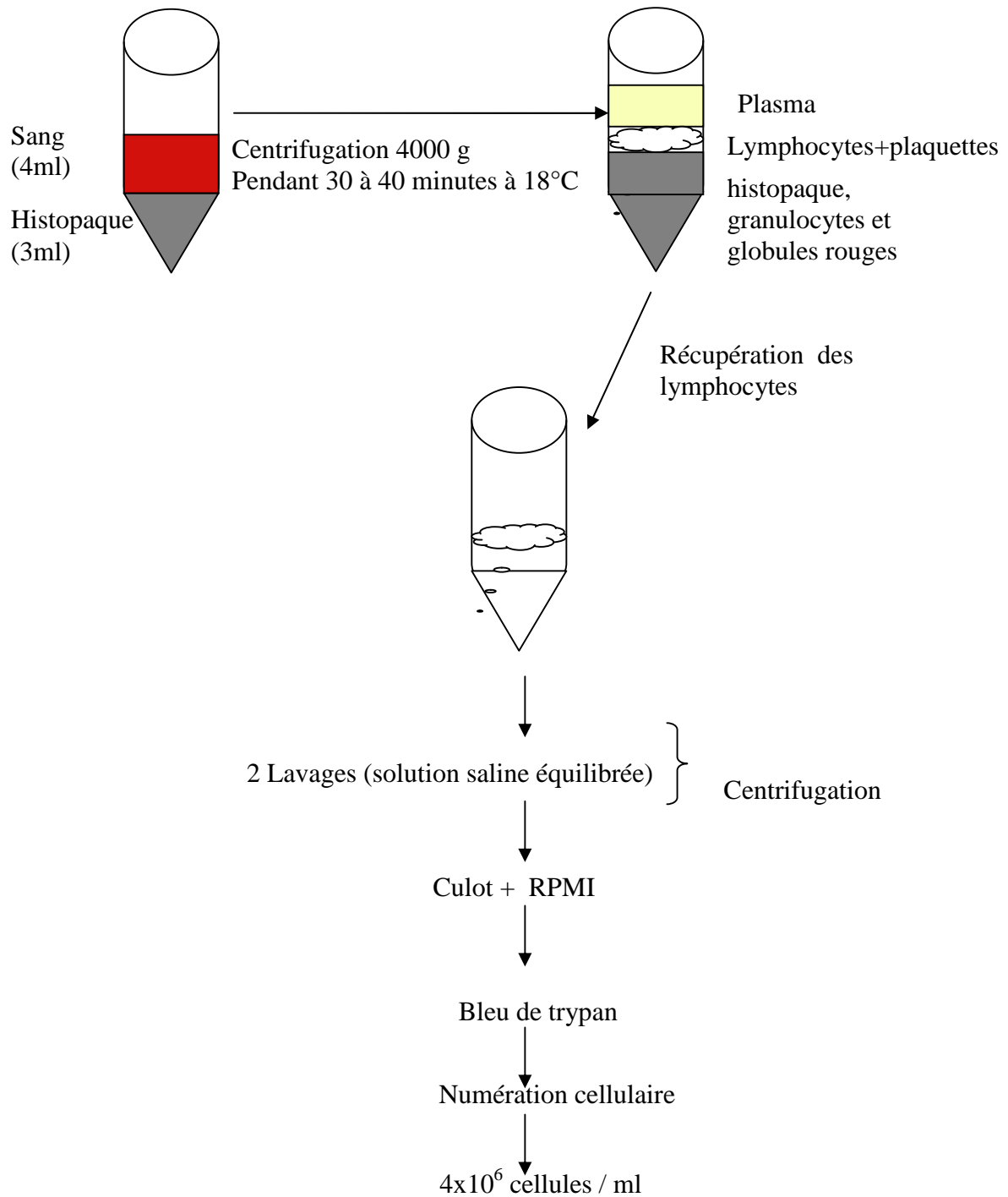


Figure 9. Méthode d'isolement et purification des lymphocytes

3. Culture des lymphocytes

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

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

Les essais sont réalisés en triples. Afin de déterminer les effets de la curcumine sur la prolifération *in vitro* des lymphocytes, les cellules sont mises en culture en sa présence à différentes concentrations finales [0 µM, 25 µM -50 µM – 100 µM].

Les plaques sont ensuite mises à incuber 24 heures à 37°C, dans un incubateur à 5% de CO₂. A la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées dans une nouvelle plaque Elisa 96 puits. Les puits sont lavés avec le milieu RPMI 1640 afin de récupérer l'ensemble des cellules. La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par comptage des cellules (cellule de malassez), confirmée par la méthode du MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide].

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

4. Comptage des lymphocytes

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

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

Matériel et Méthodes

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

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

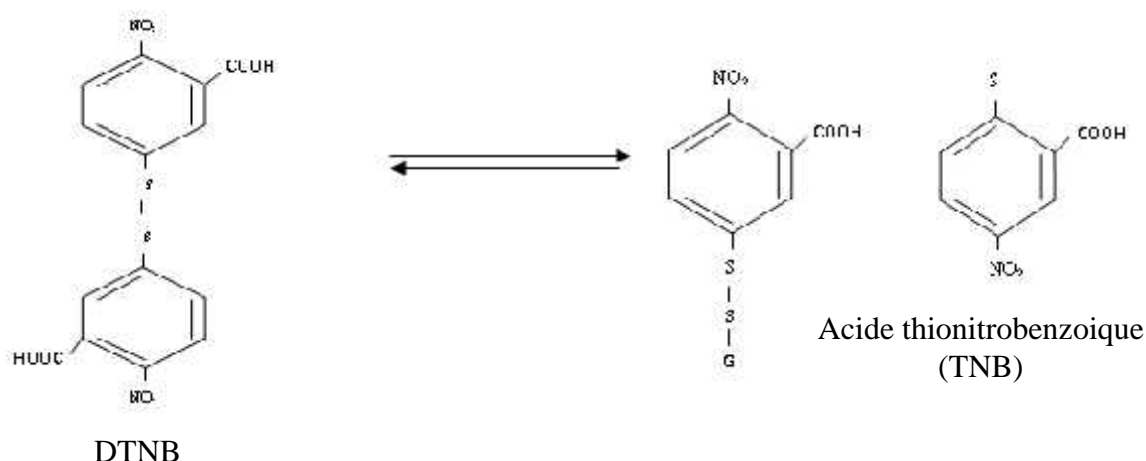
100µL de suspension cellulaire des différentes incubations (puits) sont incubés en présence de 10µL de MTT (5 mg/ml) à 37° C, 5 CO₂ pendant 3 heures. L'addition de 100 µL de HCL 0,04M dans l'isopropanol permet la dissolution des cristaux bleus Formazan. La lecture des densités optiques se fait au spectrophotomètre à 630 nm. L'indice de prolifération (IP) est calculé :

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

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

6.1. Détermination du taux de Glutathion des lymphocytes

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



Le thionitrobenzoïque (TNB) à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 mn avec un coefficient d'extinction égal à 13,6 mM⁻¹.cm⁻¹.

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

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

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

6.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA) des lymphocytes

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

6.4. Détermination des protéines carbonylées des lymphocytes

Les protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine selon la méthode de Levine et al. (1990). Le lysat lymphocytaire est incubé 1h à température ambiante en présence de la dinitrophénylhydrazine ou avec seulement du HCL pour le blanc. Ensuite, les protéines sont précipitées avec l'acide trichloroacétique (TCA) et lavées 3 fois par l'éthanol: ethylacetate 1:1 (v/v) et 3 fois par le TCA. Le culot est solubilisé dans une solution de NaOH. Les lectures se font à 350 et 375nm. La concentration des groupements carbonylés est calculée selon un coefficient d'extinction ($E = 21,5 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

7. Analyse statistique

Matériel et Méthodes

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

RESULTATS
ET
INTERPRETATONS

Résultats et Interprétation

1. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine (Figure 9 et Tableau A1 en annexes)

D'après les résultats obtenus, en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine, une élévation significative de l'indice de prolifération des lymphocytes est constatée par rapport à la prolifération à l'état basal. De plus, la présence de la curcumine dans le milieu de culture potentialise la prolifération des lymphocytes, l'effet est supérieur à celui de la concanavoline A. La curcumine à une concentration de 50 μM induit une stimulation de la prolifération lymphocytaire significativement plus élevée que celle induite par la curcumine à 25 μM et à 100 μM . D'un autre côté, la curcumine à une concentration de 100 μM induit une stimulation de la prolifération lymphocytaire significativement faible par rapport à la concentration de 25 μM et de 50 μM .

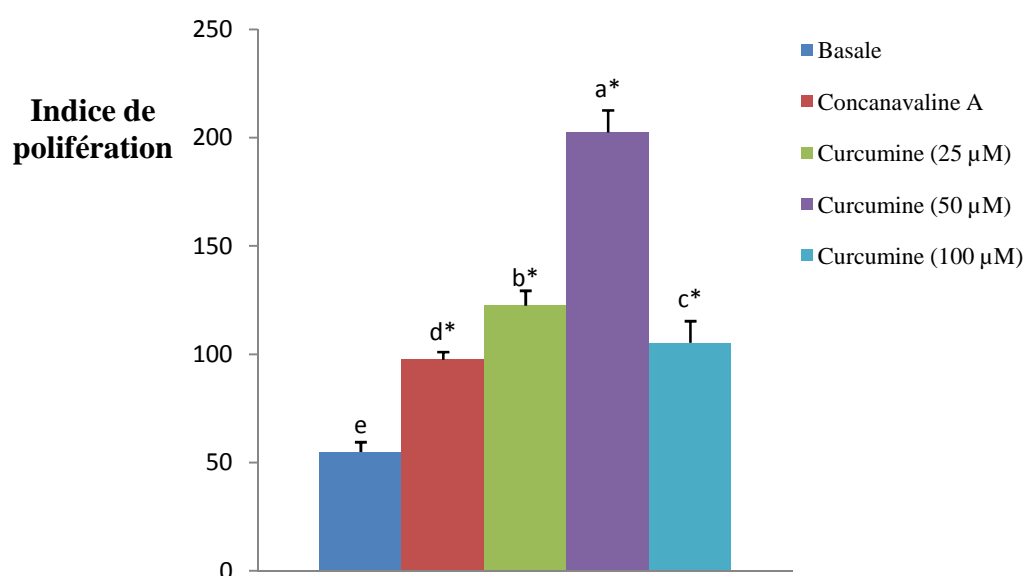


Figure 10. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de curcumine

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

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

Résultats et Interprétation

2. Statut antioxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine

2.1. Teneurs en Glutathion réduit lymphocytaire (GSH) (Figure 10 et Tableau A2 en annexes)

Les résultats montrent que la présence de la concanavaline A dans le milieu de culture ne modifie pas les teneurs lymphocytaires en GSH par rapport à l'état basal.

Les teneurs cellulaires en GSH sont significativement augmentées en présence de la curcumine à la dose de 25 μ M et de 50 μ M, l'effet est dose dépendant. Par contre, la curcumine à la concentration de 100 μ M induit une réduction significative du GSH lymphocytaire par rapport à celui en présence de la concanavaline A et aussi par rapport à celui en présence de la curcumine à 25 μ M et à 50 μ M.

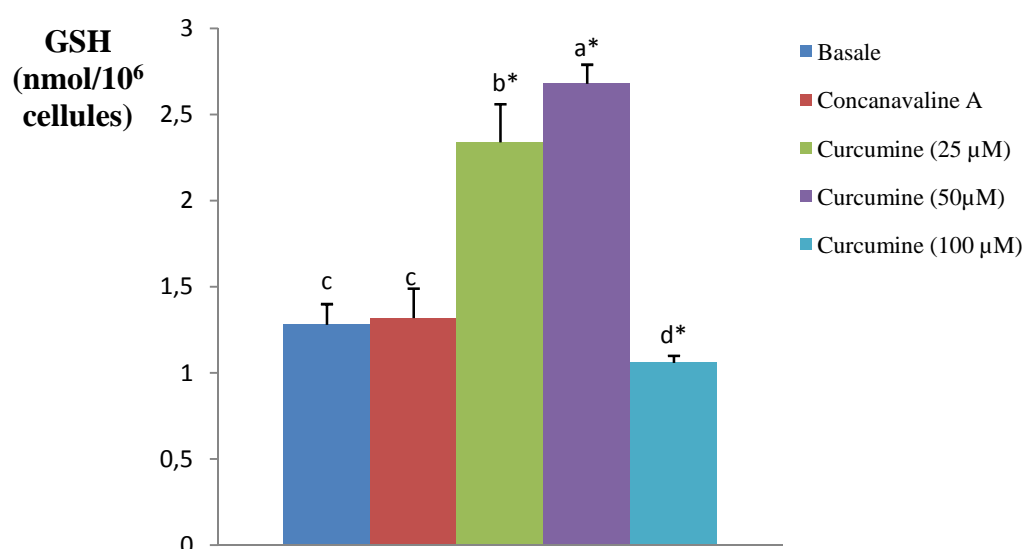


Figure 11. Teneurs en Glutathion réduit lymphocytaire (GSH) en présence de l'agent mitogène ou de curcumine

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

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

Résultats et Interprétation

2.2. Activité de la catalase lymphocytaire (Figure 11 et Tableau A2 en annexes)

L'activité de l'enzyme catalase lymphocytaire est significativement augmentée par l'agent mitogène par rapport à l'état basal.

La curcumine à une concentration de 25 μM et de 50 μM induit une élévation significative de l'activité catalase par rapport aux activités obtenues à l'état basal et avec la concanavoline A, l'effet est dose dépendant.

Cependant, la curcumine à une concentration de 100 μM ne modifie pas l'activité catalase comparée à celle de l'état basal. Mais, comparée à celles obtenues avec la curcumine à des doses inférieures, soit 25 μM et 50 μM , il ya une réduction significative de l'activité catalase suite à la supplémentation avec la curcumine à 100 μM .

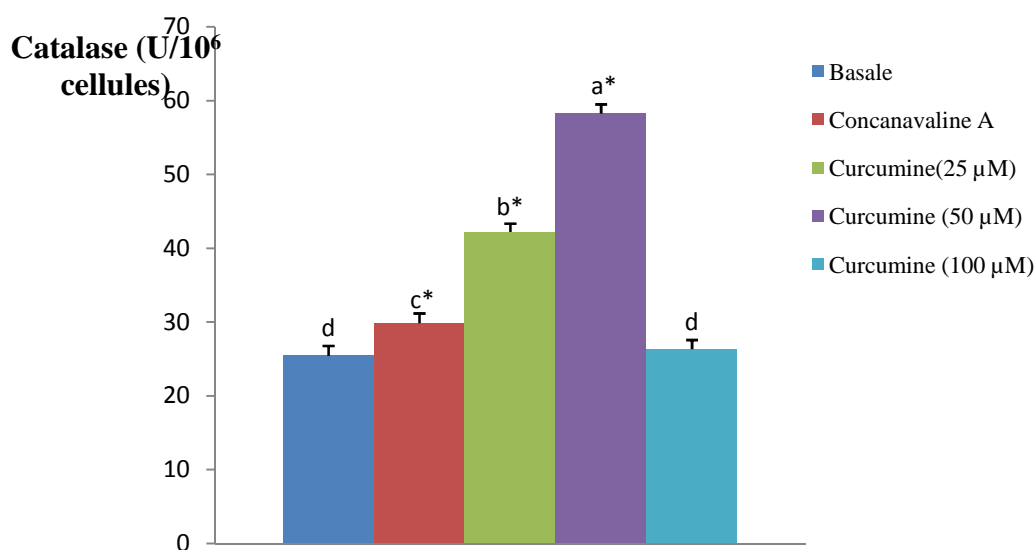


Figure 12. Activité de la catalase lymphocytaire en présence de l'agent mitogène ou de curcumine

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

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

3. Statut oxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine

3.1. Teneurs lymphocytaires en Malondialdéhyde (MDA) (Figure 12 et Tableau A3 en annexes)

Les teneurs lymphocytaires en MDA sont augmentées significativement en présence de l'agent mitogène par rapport à l'état basal. La curcumine à une concentration de 25 μ M induit aussi une augmentation des teneurs cellulaires en MDA par rapport à l'état basal, mais moins que celles obtenues en présence de la concanavaline A. De la même façon, la curcumine à la dose de 50 μ M induit aussi une élévation des teneurs en MDA par rapport à l'état basal, mais moins que celles obtenues en présence de la concanavaline A et en présence de la curcumine à 25 μ M. Cependant, la curcumine à la dose de 100 μ M provoque une forte augmentation du MDA lymphocytaire, dépassant les valeurs obtenues en présence de la concanavaline A et en présence de la curcumine à 25 ou 50 μ M.

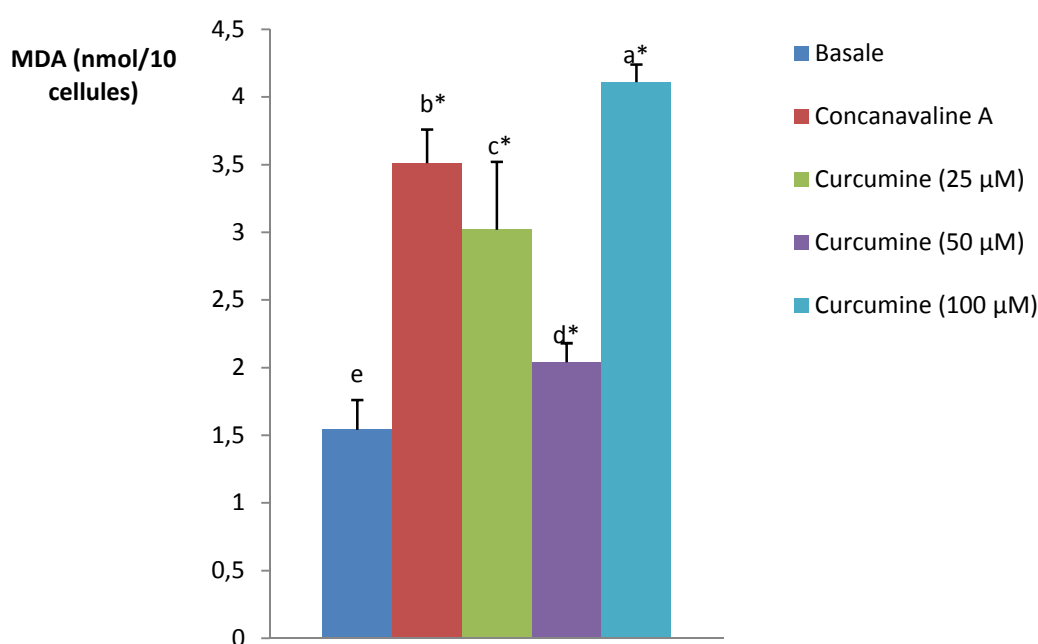


Figure 13. Teneurs lymphocytaires en Malondialdéhyde (MDA) en présence de l'agent mitogène ou de curcumine

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

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

Résultats et Interprétation

3.2. Teneurs en Protéines carbonylées lymphocytaires (PCAR) (Figure 13 et Tableau A3 en annexes)

Les teneurs lymphocytaires en PCAR sont significativement élevées en présence de l'agent mitogène par rapport à l'état basal. La curcumine à une concentration de 25µM provoque aussi une augmentation des teneurs cellulaires en PCAR par rapport à l'état basal, mais moins importantes que celles observées avec la concanavaline A. De plus, la curcumine à la dose de 50 µM induit aussi une élévation des teneurs en PCAR par rapport à l'état basal, mais moins importantes que celles obtenues avec la concanavaline A et avec la curcumine à 25 µM. Cependant, la curcumine à la dose de 100 µM induit une forte augmentation des PCAR lymphocytaires, dépassant les valeurs obtenues en présence de la curcumine à 25 ou 50 µM, mais se rapprochant des valeurs en présence de la concanavaline A.

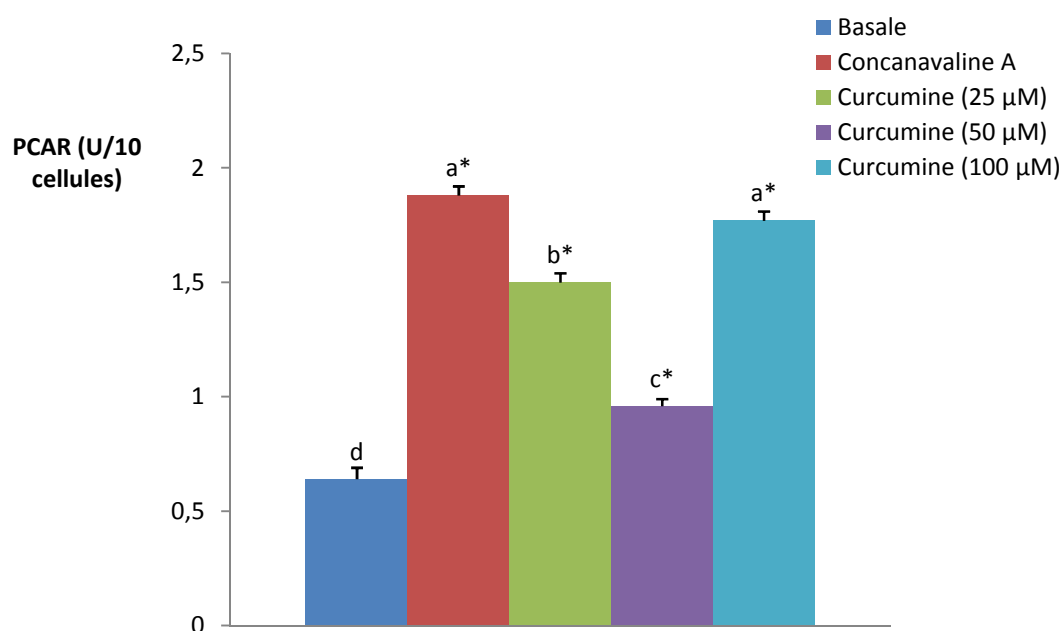


Figure 14. Teneurs en Protéines carbonylées lymphocytaires (PCAR) en présence de l'agent mitogène ou de curcumine

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

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

DISCUSSION

Discussion

Le curcuma est une épice aux multiples vertus préventives comme curatives. Excellent pour la digestion, le curcuma a aussi la capacité de diminuer les inflammations, prévenir le cancer et protéger le cerveau de la maladie d'Alzheimer. Le curcuma est également utilisé dans la préparation de la poudre de curry, qui est une épice indispensable dans la cuisine d'Asie du Sud. Bien que le curcuma est couramment utilisé à sec, sa racine peut également être râpé et utilisé. Traditionnellement, Cette épice efficace a été utilisée dans les traitements des allergies, le rhume, l'arthrite, les problèmes de digestion et gallstones. Utilisé par voie topique, le curcuma peut traiter les problèmes de peau et des plaies. Cette épice a un fantastique potentiel comme agent qui combat le cancer. Elle agit en synergie pour améliorer les effets de la chimiothérapie et la radiothérapie, et elle détruit efficacement les cellules tumorales, elle ne touche pas et ne nuit pas à celles qui sont saines (Savina, 2013).

Lorsqu'il est consommé dans les aliments, le curcuma est complètement sain, car il ne provoque pas d'effets secondaires, en plus de l'augmentation du risque de calculs rénaux chez les personnes qui sont sujettes à leur apparition. D'autre part, les suppléments de curcuma peuvent conduire à de nombreux effets secondaires; les avertissements et les interactions sont multiples (Sharma et al., 2005).

Notre travail consiste à mettre en évidence les effets bénéfiques de la curcumine sur la prolifération des lymphocytes et sur leur statut oxydant antioxydant. Pour cela, nous avons isolé les lymphocytes à partir de sujets sains en bonne santé et nous les avons mis en culture dans un milieu nutritif spécifique riche en éléments permettant la survie des cellules (milieu RPMI). Pour permettre la multiplication cellulaire, nous avons utilisé un agent mitogène la concanavaline A (con A). En effet la con A stimule la division des lymphocytes T in vitro.

Nos résultats montrent que la con A augmente l'indice de prolifération des lymphocytes dans le milieu de culture. Nos résultats sont en accords avec les résultats de Chadalapaka (2008) qui montre que le con A augmente la division cellulaire.

De plus, nous avons utilisé différentes concentrations de la curcumine pour tester ses effets sur les lymphocytes en culture.

L'effet de la curcumine sur le développement des réponses immunologiques à médiation par lymphocytes T reste largement inconnu. Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de la curcumine sur la prolifération induite par le mitogène spécifique des lymphocytes T. Nous avons constaté qu'à des concentrations de 25 et 50 μM , la curcumine stimule la prolifération des lymphocytes T en culture. A la concentration de 100 μM , la curcumine stimule aussi la prolifération des lymphocytes mais à moins qu'aux concentrations plus faibles. D'autres auteurs ont testé la curcumine sur l'induction de lymphocytes T cytotoxiques (CTL), des

Discussion

cellules de tueurs activées par lymphokine (LAK) et sur la production de cytokines par les lymphocytes T et les macrophages. Ces auteurs ont constaté que la prolifération induite par le mitogène, l'interleukine-2 (IL-2) ou l'alloantigène des lymphocytes spléniques et le développement de lymphocytes T cytotoxiques sont significativement supprimés à 12,5-30 $\mu\text{mol} / \text{L}$ de curcumine (Gao et al., 2004). Ces résultats sont différents des nôtres. Il faut noter que nous avons utilisé le curcuma donc l'épice non purifiée, qui contient de la curcumine et d'autres composants, alors que les autres auteurs ont utilisé la curcumine purifiée.

Concernant le statut redox des lymphocytes, nos résultats montrent que la con A induit un stress oxydatif intra cellulaire. En effet, elle provoque une augmentation significative du MDA et PCAR avec une petite augmentation de la catalase et aucun changement du GSH réduit.

La catalase est une enzyme qui permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) en eau et dioxygène. Au sein de la cellule, la catalase permet de protéger l'organisme de l'action oxydante et néfaste du peroxyde d'hydrogène (Aebi, 1984).

Les protéines carbonylées (PCAR) sont des marqueurs de l'oxydation des protéines. Les PCAR sont des molécules chimiquement stables ; cette caractéristique les rend détectables. Elles ont été observées dans plusieurs maladies comme le diabète et les maladies inflammatoires de l'intestin (Dalle et al., 2003).

Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. L'enzyme sélénée glutathion peroxydase est essentielle à la détoxification des oxydants de type peroxydes (eau oxygénée, peroxyde d'hydrogène), qu'ils soient d'origine exogène ou endogène. Le glutathion protège les cellules de plusieurs polluants et poisons, incluant certains issus de la combustion de carburants et de la fumée de cigarette. Il retarde également les dommages dus aux radiations comme ceux rencontrés à la suite de la diminution de la couche d'ozone. Aussi, il protège contre plusieurs pathologies comme le cancer, maladies cardiaques, cholestérol et diabète (Guttmann, 1966).

Le malondialdéhyde est présent naturellement dans les tissus, où il est une manifestation du stress oxydant. Il est issu notamment de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés. Il réagit avec la désoxyadénosine et la désoxyguanosine pour former des adduits à l'ADN (Smith et al., 1976).

Concernant la curcumine, nos résultats montrent qu'elle stimule les marqueurs antioxydants (la catalase, le glutathion) à des doses de 25 et 50 μM .

Par contre à 100 μM , la curcumine a un effet négatif puisqu'elle diminue le pouvoir antioxydant des lymphocytes.

Discussion

D'un autre coté, la curcumine réduit significativement les teneurs en malondialdéhyde MDA et en protéines carbonylées PCAR lymphocytaires à des concentrations de 25 et 50 μM .

Par contre à 100 μM , il y a un effet néfaste puisque Le MDA et les PCAR augmentent dans les lymphocytes.

Ainsi, la curcumine module le statut redox lymphocytaire en fonction de la dose utilisée. A faible dose, elle réduit le stress oxydatif et à fortes doses, elle augmente ce stress oxydatif intracellulaire.

Une qualité largement reconnue par les scientifiques de cette molécule naturelle est sa capacité antioxydante. Plusieurs essais cliniques et expérimentaux réalisés sur des rats de laboratoires, soumis à différents régimes ou à des activités physiques intenses, ont démontré que la curcumine peut lutter et améliorer les effets du stress oxydatif au niveau de l'organisme (Epstein et al., 2010; Howes et Simmonds, 2014; Pulido-Moran et al., 2016). Plusieurs études montrent aussi que la capacité antioxydante de la curcumine est potentialisée en présence d'autres antioxydants, comme la vitamine C et E (Howes et Simmonds, 2014). Sa capacité à réduire les dommages de l'ADN et des cellules, causés par les molécules radicaux libres est bien reconnue actuellement. De plus, les études précédentes soulignent aussi son éventuel effet pro-oxydant à des doses élevées (Pulido-Moran et al., 2016).

Récemment, certains auteurs soulèvent l'important effet de la curcumine dans l'organisme en provoquant l'autophagie. Ce phénomène est en fait une sorte de processus de nettoyage qui permet à l'organisme de combattre les dommages liés au stress oxydatif lors de la production d'énergie effectuée par les cellules (Pulido-Moran et al., 2016). Dans le cas où il y a absence d'autophagie, les dommages ne sont donc pas réparés correctement, alors des protéines et d'autres substances commencent à s'accumuler. Or cet agrégat de protéines et d'autres molécules présente un effet toxique sur la cellule, pouvant la mener à une mort prématurée. La curcumine semble alors nettoyer l'organisme des radicaux libres en excès.

Discussion

CONCLUSION

Conclusion

Au terme de notre étude, on a constaté que la curcumine a des effets positifs sur la fonction cellulaire in vitro, à faibles doses. En effet, nos résultats dévoilent les effets de la curcumine à différentes concentrations sur les lymphocytes en culture et sur leur statut oxydant/antioxydant. A faibles concentrations, la curcumine induit une stimulation des lymphocytes et une diminution du stress oxydatif intracellulaire, marqué par une réduction des taux lymphocytaires en MDA et PCAR et une élévation de la défense antioxydante par le GSH et la catalase. Cependant, à forte concentration, la curcumine peut inhiber la prolifération cellulaire et provoquer un stress oxydatif intracellulaire qui peut affecter le fonctionnement normal de la cellule.

Il est à rappeler que la curcumine est utilisée dans des applications diverses y compris en cuisine et elle contribue à inhiber la prolifération cellulaire et l'angiogénèse à différentes étapes du développement de différents cancers. Elle possède aussi un fort pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire et d'immuno-modulation. De plus, la curcumine est un puissant antiseptique et antibactérien.

Au final, la curcumine a un effet bénéfique sur la fonction cellulaire à des quantités faibles et adéquates mais en cas d'abus elle provoque des effets néfastes.

Ainsi, à titre préventif contre toutes pathologies associées au stress oxydatif, la prise de faibles quantités de curcumine, intégrée par exemple dans la cuisine, est recommandée.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Aebi H (1974). Catalase. In: H.U. Bergmeyer (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim. 673-684.
2. Aebi H (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
3. Aggarwall BB, Kumar A, Bharti AC (2003). Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anti-cancer Res*. 23: 363–398.
4. Barondeaud P, Kassmann J, BrunscK, Ttainer JA, Getzoffe D (2004). Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry*. 43: 8038-8047.
5. Basnet P, Skalko-Basnet N (2011). Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*. 16 : 4567–4598.
6. Brondino N, Re S, Boldrini A, Cuccomarino A, Lanati N, Barale F, Politi P (2014). Curcumin as a therapeutic agent in dementia: A mini systematic review of human studies. *Sci World J*. 69: 128-135.
7. Chadalapaka G (2008). Curcumin decreases specificity protein expression in bladder cancer cells. *Cancer Res*. 68: 5345-5354.
8. Chuengsamarn S, Rattanamon A, Gkolgul S (2013). La curcumine pour prévenir le diabète de type 2. *Minevra*. 2: 14-18.
9. Dalle-Done I , Rossi R, Giustarini D, Miizani A, Colombo R (2003). protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Ciinica chimica Acta*. 329: 23-38.
10. Draper H, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186: 421-431.
11. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT (2010). Curcumin as a therapeutic agent: The evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr*. 103: 1545–1557.
12. Fan X, Zhang C, Liu DB, Yan J, Liang HP (2013). The clinical applications of curcumin: current state and the future. *Curr Pharm Des*. 19: 2011-2031.
13. Favier A (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Bio Clin*. 55(1): 9-16.
14. Favier A (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*. 108-115.

Références bibliographiques

15. Gao X , Kuo J, Jiang H, Deeb D, Liu Y, DivineG (2004). Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro. *Biochemical pharmacology*, 68(1), 51-61.
16. Ghosh S, Banerjee S, Sil PC (2015). The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem Toxicol*. 83: 111-124.
17. Guttman, S (1966). Synthèse du glutathion et de l'oxytocine à l'aide d'un nouveau groupe protecteur de la fonction thiol. *Helvetica Chimica Acta*, 49(1), 83-96.
18. Howes MJ, Simmonds MS (2014). The role of phytochemicals as micronutrients in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 17: 558–566.
19. Jagetia GC, Aggarwal BB (2007). “Spicing up” of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol*. 27: 19–35.
20. Jayaprakasha G, Jaganmohanrao L, Sakariah K (2005). Chemistry and biological activities of *Curcuma longa*. *Trends in Food Science & Technology*. 16: 533-548.
21. Jiao Y (2009). Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. *Blood*. 22: 547-553.
22. Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR (2004). Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 44 : 97–111.
23. Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB (2008). Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett*. 269: 199-225.
24. Kurup PNV (1977). *Handbook of Medicinal Plants*, Vol. I, Central Council for Research in Indian Medicine and Homoeopathy (CCRIMH), New Delhi. 128p.
25. 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.
26. Mahady GB, Pendland SL, Yun G, Lu ZZ (2002). Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer Res*. 22: 4179–4181.
27. Medjdoub A, Merzouk SA, Merzouk H, Chiali FZ, Narce M (2011) Effects of Mancozeb and Metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 101(1): 27-33.

Références bibliographiques

28. Morimoto T (2008). The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. *J Clin Invest.* 28: 215-220.
29. Motterlini R (2000). Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protect cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 28: 1303-1312.
30. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB (2014). Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat.* 46: 2–18.
31. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Cesar Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa CM (2016). Curcumin and Health. *Molecules.* 21: 264-288.
32. Ramirez-Tortosa MC (1999). Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 147: 374-378.
33. Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN (2005). Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 326: 472–474.
34. Savina P (2013). Le Curcuma, un agent naturel de lutte contre le vieillissement cutané. master biologie gestion. France. 28-34.
35. Sharma RA, Euden SA, Platton SL (2004). Phase I clinical trial of oral curcumin biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res.* 10: 6847-6854.
36. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP (2005). Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 41(13): 1955-1968.
37. Smith J B, Ingerman, C. M, Silver M. J (1976). Malondialdehyde formation as an indicator of prostaglandin production by human platelets. *The Journal of laboratory and clinical medicine,* 88(1), 167-172.
38. Záveská E, Fér T, Šída O, Krak K, Marhold K, Leong-Škorni ková J (2012). Phylogeny of *Curcuma* (Zingiberaceae) based on plastid and nuclear sequences. Proposal of the new subgenus *Ecomata*. *Taxon.* 61(4): 747-763.

ANNEXES

Annexes

Tableau A1. Indice de prolifération des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine

Incubations	Indice de prolifération
Basale	54,95 ± 4,52 ^e
Concanavaline A	97,62 ± 3,47 ^{d*}
Curcumine (25 µM)	122,55 ± 6,84 ^{b*}
Curcumine (50 µM)	202,41 ± 10,25 ^{a*}
Curcumine (100 µM)	105,33 ± 10,05 ^{c*}

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

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

Annexes

Tableau A2. Statut antioxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine

Incubations	GSH (nmol/10⁶ cellules)	Catalase (U/10⁶ cellules)
Basale	1,28 ± 0,12 ^c	25,44 ± 1,35 ^d
Concanavaline A	1,32 ± 0,17 ^c	29,88 ± 1,31 ^{c*}
Curcumine (25 µM)	2,34 ± 0,22 ^{b*}	42,22 ± 1,13 ^{b*}
Curcumine (50 µM)	2,68 ± 0,11 ^{a*}	58,27 ± 1,22 ^{a*}
Curcumine (100 µM)	1,06 ± 0,04 ^{d*}	26,37 ± 1,21 ^d

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

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

Annexes

Tableau A3. Statut oxydant des lymphocytes en présence de l'agent mitogène ou de la curcumine

Incubations	MDA (nmol/10⁶ cellules)	PCAR (U/10⁶ cellules)
Basale	1,54 ± 0,22 ^e	0,64 ± 0,05 ^d
Concanavaline A	3,51 ± 0,25 ^{b*}	1,88 ± 0,04 ^{a*}
Curcumine (25 µM)	3,02 ± 0,22 ^{c*}	1,50 ± 0,04 ^{b*}
Curcumine (50 µM)	2,04 ± 0,14 ^{d*}	0,96 ± 0,03 ^{c*}
Curcumine (100 µM)	4,11 ± 0,13 ^{a*}	1,77 ± 0,04 ^{a*}

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

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

Résumé

L'objectif principal de ce travail de mémoire de Master est de déterminer les effets de la curcumine à différentes concentrations sur les lymphocytes en culture et sur leur statut oxydant/antioxydant. Pour cela, les lymphocytes sont isolés à partir de sang de volontaires en bonne santé, puis sont mis en culture en présence de l'agent mitogène et de la curcumine (25, 50, 100 μM). Nos résultats montrent que la curcumine à faibles concentrations (25, 50 μM) stimule la prolifération des lymphocytes et réduit le stress oxydatif intracellulaire (diminution du MDA, PCAR et augmentation GSH et catalase). Par contre, à forte dose (100 μM), elle a un effet néfaste car elle réduit la prolifération et augmente le stress oxydatif. En conclusion, la consommation de la curcumine doit être faible et bien contrôlée.

Mots clés : curcumine – agent mitogène – lymphocytes – stress oxydatif.

Abstract

The main objective of this Master work is to determine the effects of curcumin at different concentrations on cultured lymphocytes and on their oxidant / antioxidant status. For this purpose, the lymphocytes are isolated from blood of healthy volunteers and then cultured in the presence of the mitogenic agent and curcumin (25, 50, 100 μM). Our results show that curcumin at low concentrations (25, 50 μM) stimulates lymphocyte proliferation and reduces intracellular oxidative stress (decreased MDA, PCAR and increased GSH and catalase). On the other hand, at high dose (100 μM), it has an adverse effect because it reduces proliferation and increases oxidative stress.

In conclusion, consumption of curcumin must be low and well controlled.

Key words: curcumin - mitogenic agent - lymphocytes - oxidative stress.

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو رسالة ماجستير لتحديد آثار الكركم بتركيزات مختلفة على الخلايا في الثقافة وأكسدة / وضعهم المضادة للأكسدة. لهذا، يتم عزل الخلايا من الدم من المتطوعين الأصحاء وتم زرعها في وجود mitogen والكركمين (MICROM 100 50 25). نتائجا تظهر أن الكركم بتركيزات منخفضة (MICROM 50 25) انتشار الخلايا اللمفاوية وتخفيض الأكسدة داخل الخلايا () GSH MDA وزيادة PCAR (من سلبيات، جرعة عالية (MICROM 100)، فإنه له تأثير سلبي لأنه يقلل من انتشار ويزيد الإجهاد التأكسدي. في الختام، يجب أن يكون استهلاك الكركم منخفضة وتسيطر عليها بشكل جيد. : - وكيل مولد للتفتل - الخلايا الليمفاوية -