

## EFFETS DES ACIDES GRAS SUR LA PROLIFÉRATION LYMPHOCYTAIRE, LA PRODUCTION D'INTERLEUKINES, ET LE STATUT OXYDANT DANS UN GROUPE D'ENFANTS OBÈSES ALGÉRIENS

Radjaa Kaouthar Meziane, Hafida Merzouk, Meriem Saker, Samira Baba Ahmed<sup>1</sup>,  
Michel Narce<sup>2</sup>

Département de biologie, faculté des sciences, université de Tlemcen, Tlemcen, Algérie

<sup>1</sup> Service de pédiatrie, centre hospitalo-universitaire de Tlemcen, Tlemcen, Algérie

<sup>2</sup> UMR 866 « lipides, nutrition, cancer », faculté des sciences de la vie, 6 boulevard Gabriel,  
21000 Dijon, France

Radjaa\_kaouthar@hotmail.fr

(Received 3 May 2011 - Accepted 27 March 2012)

### RÉSUMÉ

*Les huiles alimentaires sont les meilleures sources d'acides gras essentiels. Des carences de ces derniers peuvent mener à des problèmes inflammatoires divers, à des troubles du poids et à des défaillances du système immunitaire. Le but de ce travail est de déterminer les effets in vitro des différents acides gras (AGMI, AGPI n-6 et AGPI n-3) sur la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion des interleukines 2, et la variation de quelques marqueurs du statut oxydant/antioxydant intracellulaire. Les lymphocytes T sont isolés à partir du sang d'enfants témoins (n=26) et obèses (n=20) de la région de Tlemcen (ouest algérien). Ces cellules sont incubées en présence de trois huiles alimentaires (huile de poisson, huile d'olive, et huile de nigelle), puis stimulées par l'agent mitogène (la Concanavaline A) pendant 48 heures. À la fin du traitement, les cellules sont comptées, et le surnageant sert pour le dosage des interleukines 2. Les cellules sont utilisées pour déterminer les paramètres du statut oxydant/antioxydant intracellulaire. Une diminution de la prolifération cellulaire, basale ou stimulée par l'agent mitogène (Con A) est observée chez les enfants obèses comparés aux témoins. Les huiles utilisées réduisent la lymphoprolifération aussi bien chez les enfants obèses que chez les témoins. De plus, ces huiles principalement l'huile de poisson, diminuent la sécrétion des interleukines 2. D'autre part, les différentes huiles, particulièrement l'huile de poisson régulent le statut oxydant/ antioxydant intracellulaire des lymphocytes des enfants obèses et tendent à le normaliser. L'ensemble de ces résultats indique que les acides gras (AGMI, AGPI n-6 et AGPI n-3) peuvent moduler l'activité des lymphocytes T et améliorer le statut oxydant/ antioxydant intracellulaire et la sécrétion des cytokines chez les enfants obèses.*

**Mots-clés:** obésité infantile, acides gras polyinsaturés, lymphocytes T, interleukines 2, stress oxydatif

### ABSTRACT

*Food oils are the best sources of essential fatty acids. Deficiency of these can lead to various inflammatory disorders, disorders of weight (wasting or obesity) and immune system failures. The aim of this work was to determine the in vitro effects of different fatty acids (MUFA, n-3 PUFA and n-6 PUFA) on T lymphocyte proliferation, the secretion of interleukins 2, and finally the variation of some markers of intracellular oxidant/ antioxidant status. The T lymphocytes were isolated from children's blood, control and obese living in Tlemcen area. These cells were incubated in presence of oils (fish oil, olive oil, and nigelle oil), and then stimulated by a "mitogen" agent (Concanavaline A) during 48 hours. At the end of the treatment, the cells were counted and the surnageant was used for interleukin 2 assay. The cells were used for oxidant/antioxidant parameter analysis. A reduction of cell proliferation, basal or stimulated by mitogen agent (Con A) was observed in obese children compared to controls. The presence of oils reduced the lymphoproliferation in obese children as well as in controls. Indeed, these oils, especially fish oil, decreased interleukin 2 secretion. On another hand, the different oils, especially fish oil improved the intracellular oxidant/antioxidant status of lymphocytes in obese children and normalized it. All these results indicated that fatty acids (MUFA, n-3 PUFA and n-6 PUFA) can modulate lymphocyte T activity and improve the intracellular oxidant/antioxidant status and the secretion of cytokines in obese children.*

**Keywords:** infantile obesity, polyunsaturated fatty acids, interleukins 2, lymphocytes T, oxidative stress

### INTRODUCTION

L'obésité figure parmi les plus graves problèmes de santé publique du XXI<sup>e</sup> siècle. C'est une véritable épidémie qui frappe aussi bien les pays industrialisés que les pays en voie de développement (Katzmarzyk & Janssen, 2004). L'Organisation Mondiale de la Santé place actuellement sa prévention et sa prise en charge comme une priorité dans le domaine de la pathologie nutritionnelle.

Aujourd'hui l'obésité n'est plus seulement l'apanage des adultes. Elle touche aussi depuis quelques années les enfants. L'accroissement dramatique de la prévalence de l'obésité pédiatrique et de ses conséquences morbides ainsi que sa tendance à persister à l'âge adulte constituent un problème de santé publique important.

En Algérie, selon l'enquête réalisée récemment dans la population urbaine de l'est Algérien, la prévalence du surpoids et l'obésité est de 21,5 %. Le surpoids seul touche 15,9% et l'obésité 5,6% des enfants (Oulamara *et al.*, 2006).

Les modifications du système immunitaire au cours de l'obésité ont été largement documentées. La plupart des défenses de l'hôte sont affectées par une malnutrition, en particulier l'immunité à médiation cellulaire, la production de cytokines, la fonction phagocytaire et le système du complément (Chandra *et al.*, 2002). La dénutrition chez les sujets obèses, peut aussi altérer les mécanismes de défense de l'organisme, notamment par le biais d'une augmentation de la production cellulaire de dérivés réactifs de l'oxygène et une diminution des molécules antioxydantes (vitamines C, E, caroténoïdes...) et de métallo-

enzymes impliquées dans la détoxification de ces substances réactives ce qui peut être à l'origine d'un stress oxydatif.

L'influence des acides gras provenant des huiles alimentaires sur les phénomènes inflammatoires et la réponse immunitaire a fait l'objet de nombreux travaux. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3) et oméga-6 (AGPI n-6) ont été tout particulièrement étudiés.

Il est généralement admis que les acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3) développent les activités immunomodulatrices les plus puissantes. Agissant comme des compétiteurs des AGPI n-6, ils entraînent une réduction de la production d'eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique, base de leur action clinique bénéfique observée dans diverses maladies inflammatoires chroniques (Belluzzi, 2002). Les acides gras polyinsaturés alimentaires sont également des catalyseurs essentiels favorisant le rendement utilitaire des vitamines contre le stress oxydatif, en particulier la vitamine E, principal antioxydant membranaire qui permet de préserver la fluidité des membranes des cellules immunitaires dont les fonctions dépendent aussi de leur contenu en acides gras.

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés sur l'immunomodulation par les acides gras polyinsaturés (AGPI) alimentaires qui peuvent être soit immunosuppresseurs soit immunostimulateurs. Les mécanismes d'action pourraient être liés à une modification de la sécrétion des cytokines ou à la composition en acides gras des lipides des membranes des lymphocytes (Sweeney *et al.*, 2005). Ainsi, les effets immunomodulateurs des acides gras polyinsaturés (AGPI) peuvent être exploités dans la prévention et le traitement des complications associées à l'obésité.

Le but de notre travail est de déterminer les effets *in vitro* de trois huiles alimentaires sur la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion des interleukines 2, et la variation de quelques marqueurs du statut oxydant/antioxydant cellulaire. Les huiles alimentaires testées sont l'huile de poisson, l'huile d'olive, et l'huile de nigelle.

L'étude est réalisée sur des enfants obèses et témoins de la région de Tlemcen.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Population étudiée

Cette étude est réalisée au niveau des établissements primaires et moyens de la wilaya de Tlemcen. Elle est menée en milieu scolaire auprès des enfants âgés de 6 à 14 ans.

Dans un premier temps, le poids, la taille, l'âge et le sexe de chaque enfant sont notés. L'obésité est définie par le calcul de l'index de masse corporelle (IMC, poids/taille<sup>2</sup>, kg/m<sup>2</sup>) à partir des courbes de corpulence. En Algérie, comme dans la plupart des pays du Maghreb, les courbes d'IMC sont celles des carnets de santé basées sur les courbes de la corpulence françaises (Rolland-Cachera *et al.*, 2002). Les enfants dont l'IMC est au-delà du 97<sup>ème</sup> percentile des courbes de corpulence sont considérés comme obèses.

Le but de l'étude est expliqué aux parents et aux enfants, leurs consentements par écrit sont obtenus préalablement. Les parents sont par la suite invités à emmener leurs enfants

à la polyclinique de Kiffane (Tlemcen) pour des prélèvements sanguins. L'étude est approuvée par le conseil éthique de l'hôpital de l'université de Tlemcen.

Les prélèvements sont effectués sur une population de 26 enfants témoins et 20 enfants obèses. Les caractéristiques de la population étudiée sont représentées dans le Tableau 1.

**TABLEAU 1**  
**Caractéristiques de la Population Étudiée**

	Enfants témoins	Enfants obèses
<b>Nombre</b>	26	20
<b>Sexe (Garçon/Fille)</b>	14/12	12/8
<b>Age (ans)</b>	9.85 ±0.63	10.30 ±0.27
<b>Taille (m)</b>	1.42 ±0.02	1.40 ±0.02
<b>Poids (kg)</b>	34.21 ±1.73	53.30 ±1.88 ***
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	17.03 ±0.50	26.07 ±0.53 ***

\* indique différence significative entre les témoins et les obèses (\*\*\*) p <0.001).

Chaque valeur représente la moyenne ± l'erreur standard. IMC : indice de masse corporelle, poids/taille<sup>2</sup>. La comparaison des moyennes entre témoins et obèses est réalisée par le test de Student après analyse des variances.

#### Test de prolifération lymphocytaire

L'isolement des lymphocytes se fait à partir d'un prélèvement sanguin par centrifugation (2000t/min pendant 45 minutes) dans un gradient de Ficoll (Pharmacia Biotech, UK). Les lymphocytes sont récupérés de l'interface puis sont remis en suspension dans le milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, USA). Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 4.10<sup>6</sup>cellules /ml et ainsi préparée pour les différentes incubations.

Le test de transformation lymphocytaire (TTL) permet d'étudier la prolifération *in vitro* des lymphocytes T stimulés par un agent mitogène spécifique, la Concanavaleine A (Con A Sigma, St. Louis, MO, USA).

Les lymphocytes sont mis en culture (4x10<sup>5</sup> cellules/puit) dans 200µl de milieu RPMI 1640 auxquels sont ajoutés le tampon HEPES (25 mM), le sérum de veau foetal (10 %), L - Glutamine (2mM), pénicilline (100 UI/ml) et streptomycine (100 µg/ml) en présence ou en absence de la Con A (5 µg/ml) et de l'insuline (5 µg/ml). Les cultures sont réalisées en triple sur des plaques ELISA de 96 puits à fond plat (Nunc- Elisa). Les cellules sont incubées en présence de trois huiles alimentaires (l'huile de poisson, l'huile d'olive, et l'huile de nigelle) afin d'évaluer leurs effets sur la prolifération lymphocytaire. La solution mère de chaque huile à 10 mM TG est préalablement préparée dans de l'éthanol absolu et est gardée à -20°C jusqu'à utilisation. A partir de chaque solution mère, une solution à 300 µM TG est utilisée pour les différentes incubations. Les plaques sont incubées à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>

pendant 48 heures. La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par comptage des cellules (cellule de malassez), confirmée par la méthode du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) (Mosmann, 1983). Une prise aliquote des suspensions cellulaires est centrifugée à 6000 tours/min pendant 15 minutes. Les cellules (culot) servent à la détermination des paramètres du statut oxydant/antioxydant cellulaire. Le surnageant sert au dosage des interleukines IL-2.

#### **Dosage des interleukines 2 (IL-2)**

Le dosage des interleukines 2 (IL-2) se fait selon le protocole du kit ELIZA (Genzyme, Cambridge, MA, USA) pour IL-2. La technique ELISA repose sur la mise en évidence des complexes antigènes-anticorps par l'utilisation d'un marqueur enzymatique lui-même révélaible par la transformation d'un substrat en produit coloré. Les résultats sont exprimés en pg/ml.

#### **Marqueurs du statut oxydant/antioxydant au niveau des lymphocytes**

Après récolte et centrifugation des lymphocytes initiaux ou stimulés, les cellules sont lysées (avec du NaOH 0.5 N) et le surnageant est prélevé afin de déterminer quelques marqueurs du statut oxydant/antioxydant cellulaire.

- **Dosage du malondialdéhyde**

Le malondialdéhyde (MDA) est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, notamment pour la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage. Après traitement acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit de condensation chromogénique de couleur rose et/ou jaune consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1996). L'absorption intense de ce chromogène se fait à 532 nm. La concentration en MDA est calculée en utilisant une courbe étalon de MDA ou seulement 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).

- **Dosage des hydroperoxydes**

Les hydroperoxydes (marqueurs peroxydation lipidique) sont mesurés par l'oxydation d'ions ferriques utilisant le xylénol orange (Fox2 ; kit Peroxoquant méthanol-compatible formulation, Rockford, IL, USA) en conjugaison avec le ROOH réducteur spécifique de la triphénylphosphine (TPP) (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1996). Cette méthode est basée sur une peroxydation rapide transformant le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  en milieu acide. Les ions  $\text{Fe}^{3+}$  en présence du xylénol orange [(O-cresolsulfonphthalein-3',3''-bis (methyliminodiacetic acid sodium)], forment un complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -xylénol orange. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration plasmatique en hydroperoxydes à une longueur d'onde de 560 nm.

- **Dosage des protéines carbonylées**

Les protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine (Levine *et al.*, 1996). La réaction aboutit à la

formation de la dinitrophényl hydrazone colorée. La concentration des groupements carbonyles est déterminée par lecture à des longueurs d'onde de 350, 360 et 375nm.

- Dosage de l'activité de la catalase

Cette activité enzymatique est mesurée 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  $H_2O_2$  en fonction du temps. Après incubation, les concentrations du  $H_2O_2$  restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de  $H_2O_2$ . La lecture se fait à 420 nm. L'activité de la catalase est exprimée en unité/g de protéine.

#### Analyse statistique

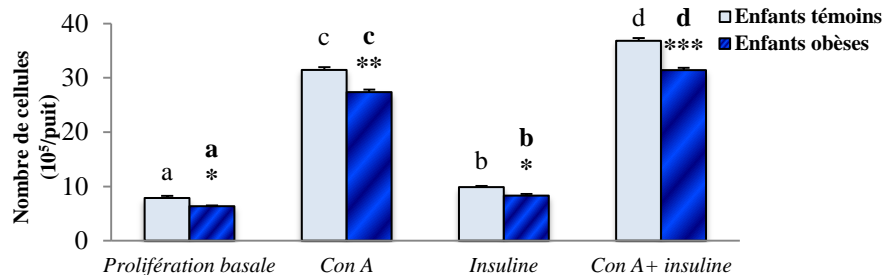
L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (Version 4.1, Statsoft, Paris, France). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard.

Après analyse des variances, la comparaison des moyennes est réalisée par le test «t» de Student entre les différents groupes (enfants obèses et témoins), ou entre deux incubations différentes dans le même groupe. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Les moyennes sont considérées significativement différentes à  $P < 0.05$ .

## RÉSULTATS

### Effet des acides gras sur la prolifération des lymphocytes T

La Figure 1 montre que les lymphocytes T des enfants obèses et témoins augmentent de manière nette et significative en présence de l'agent mitogène (Con A) par rapport aux incubations initiales (sans l'agent mitogène). Un supplément d'insuline cependant potentialise l'effet de la Con A où une augmentation de la prolifération est observée. La différence entre les enfants obèses et témoins reste significative. Ainsi, la prolifération des lymphocytes est significativement réduite chez les enfants obèses comparés aux témoins.



**Figure 1. Prolifération des lymphocytes stimulés par la Con A (nombre de cellules  $\times 10^5$  / puit) en présence ou en absence de l'insuline chez les enfants obèses et témoins.**

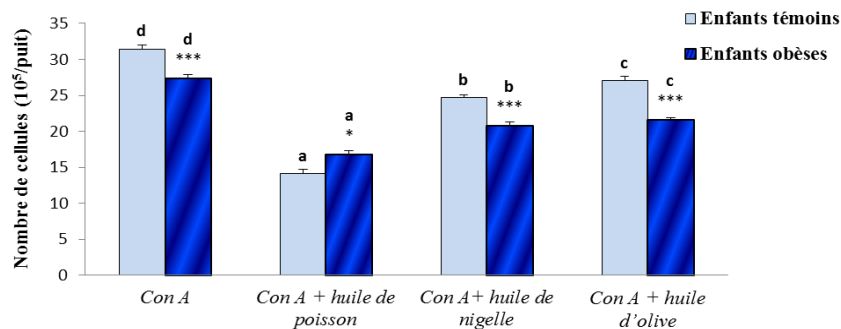
a, b, c, d indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ( $p < 0.05$ ) dans le même groupe.

\* indique différence significative entre les témoins et les obèses (\*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  ES des incubations réalisées en triples chez 26 enfants témoins et 20 enfants obèses. La prolifération est déterminée par le comptage cellulaire et par la méthode MTT. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Les comparaisons entre témoins et obèses sont réalisées par le test «t» de Student après analyse de variance.

La Figure 2 montre qu'en présence des agents mitogènes, les trois huiles provoquent une diminution significative de la lymphoprolifération chez les enfants obèses et témoins.

L'effet immunosuppresseur de l'huile de poisson, est plus marqué chez les enfants témoins. Cependant, l'effet immunosuppresseur de l'huile d'olive et de nigelle, est plus marqué chez les enfants obèses. L'huile de poisson semble plus immunosuppressive que l'huile d'olive et de nigelle quel que soit l'incubation.



**Figure 2. Prolifération des lymphocytes non stimulés par l'agent mitogène en présence de différentes huiles.**

a, b, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ( $p < 0.05$ ) dans le même groupe.

\* indique différence significative entre les témoins et les obèses (\*  $p < 0.05$ ).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  ES des incubations réalisées en triples chez 26 enfants témoins et 20 enfants obèses. La prolifération est déterminée par le comptage cellulaire et par la méthode MTT. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Les comparaisons entre témoins et obèses sont réalisées par le test «t» de Student après analyse de variance.

#### **Effet des acides gras sur la production des Interleukines 2 (IL-2)**

La présence de la Con A induit une stimulation de la production de l'IL-2 par les lymphocytes chez les enfants obèses et témoins (entre 5 et 10 fois plus). Un supplément

d'insuline potentialise l'effet de la Con A où une augmentation de la production d'IL-2 est observée chez les deux groupes d'enfants.

La production d'IL-2 par les lymphocytes T stimulés est réduite chez les obèses comparés aux témoins. L'addition des huiles (poisson, nigelle, olive) induit une diminution significative d'IL-2 chez les enfants témoins. L'effet est très marqué en cas d'huile de poisson.

#### Effet des acides gras sur les paramètres du stress oxydatif

Une augmentation nette et significative des teneurs en MDA et en hydroperoxydes des lymphocytes est notée chez les enfants obèses comparés aux témoins quel que soit l'incubation. Les teneurs en MDA et en hydroperoxydes des lymphocytes T sont significativement augmentées en présence des différentes huiles (poisson, olive, nigelle) chez les enfants obèses et témoins.

TABLEAU 2

#### Production d'Interleukines 2 (IL-2) par les Lymphocytes T Isolés des Enfants Témoins et des Enfants Obèses (IL-2, Pg / ml)

	Enfants témoins (Pg / ml)	Enfants obèses (Pg / ml)
<b>Prolifération basale</b>	558.34 ± 66 <sup>a</sup>	498.83 ± 59.01 <sup>a</sup>
<b>Con A</b>	4235.89 ± 255 <sup>d</sup>	2034.55 ± 111 <sup>c*</sup>
<b>Con A + insuline</b>	6752.33 ± 377.22 <sup>e</sup>	3771.54 ± 349.14 <sup>d*</sup>
<b>Con A + huile de poisson</b>	975.38 ± 155.32 <sup>b</sup>	1502.17 ± 165.14 <sup>b*</sup>
<b>Con A+ huile de nigelle</b>	2679.56 ± 345 <sup>c</sup>	1893.44 ± 246 <sup>c*</sup>
<b>Con A + huile d'olive</b>	3250.94 ± 337.04 <sup>c</sup>	2404.39 ± 301.95 <sup>c*</sup>

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les enfants obèses et témoins est effectuée par le test « t » de Student après analyse de variance.

a, b, c, d, e indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p< 0.05) dans le même groupe.

\* indique différence significative entre les témoins et les obèses (\* p<0.05).

Le Tableau 4 montre qu'une augmentation significative des teneurs en protéines carbonylées des lymphocytes T est notée chez les enfants obèses comparés aux témoins.

En présence des huiles, particulièrement l'huile de poisson, on note une diminution des teneurs en protéines carbonylées des lymphocytes T chez les enfants obèses et témoins. En présence de l'huile de poisson, les protéines carbonylées lymphocytaires chez les obèses deviennent similaires à celles des témoins.



**TABLEAU 3**  
**Teneurs en Malondialdéhyde et en Hydroperoxydes des Lymphocytes Stimulés en**  
**Présence des Différentes Huiles chez les Enfants Témoins et Obèses**

	Enfants témoins	Enfants obèses
<b>MDA (nM / 10<sup>6</sup> cellules)</b>		
Prolifération basale	1.16 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.81 ± 0.02 <sup>a *</sup>
Con A	2.40 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.12 ± 0.04 <sup>b *</sup>
Insuline	1.20 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.84 ± 0.02 <sup>a *</sup>
Con A + huile de poisson	3.97 ± 0.02 <sup>c</sup>	4.19 ± 0.05 <sup>c *</sup>
Con A+ huile de nigelle	3.90 ± 0.04 <sup>c</sup>	4.38 ± 0.11 <sup>d *</sup>
Con A + huile d'olive	3.92 ± 0.05 <sup>c</sup>	4.37 ± 0.12 <sup>d *</sup>
<b>Hydroperoxydes (nM / 10<sup>6</sup> cellules)</b>		
Prolifération basale	3.68 ± 0.05 <sup>a</sup>	5.08 ± 0.04 <sup>a *</sup>
Con A	5.78 ± 0.18 <sup>b</sup>	7.11 ± 0.13 <sup>b **</sup>
Insuline	3.66 ± 0.06 <sup>a</sup>	5.04 ± 0.05 <sup>a *</sup>
Con A + huile de poisson	8.93 ± 0.22 <sup>d</sup>	9.04 ± 0.24 <sup>c</sup>
Con A+ huile de nigelle	8.01 ± 0.15 <sup>c</sup>	10.38 ± 0.18 <sup>d *</sup>
Con A + huile d'olive	8.78 ± 0.11 <sup>d</sup>	10.40 ± 0.21 <sup>d *</sup>

a, b, c, d indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p< 0.05) dans le même groupe.

\* indique différence significative entre les témoins et les obèses (\* p<0.05 ; \*\* p< 0.01).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ES des incubations réalisées en triples chez 26 enfants témoins et 20 enfants obèses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Les comparaisons entre témoins et obèses sont réalisées par le test «t» de Student après analyse de variance.

**TABLEAU 4**  
**Teneurs en Protéines Carbonylées (nM / 10<sup>6</sup> Cellules) des Lymphocytes Stimulés en**  
**Présence des Différentes Huiles chez les Enfants Témoins et Obèses**

nM/ 10 <sup>6</sup> cellules	Enfants témoins	Enfants obèses
<b>Prolifération basale</b>	1.12 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.39 ± 0.06 <sup>c *</sup>
<b>Con A</b>	1.20 ± 0.06 <sup>c</sup>	1.50 ± 0.07 <sup>d *</sup>
<b>Insuline</b>	1.17 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.42 ± 0.04 <sup>c *</sup>
<b>Con A + huile de poisson</b>	0.84 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>Con A+ huile de nigelle</b>	1.00 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.26 ± 0.02 <sup>b *</sup>
<b>Con A + huile d'olive</b>	1.10 ± 0.06 <sup>c</sup>	1.35 ± 0.08 <sup>c *</sup>

a, b, c, d indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p< 0.05) dans le même groupe.

\* indique différence significative entre les témoins et les obèses (\* p<0.05).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  ES des incubations réalisées en triples chez 26 enfants témoins et 20 enfants obèses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Les comparaisons entre témoins et obèses sont réalisées par le test «t» de Student après analyse de variance.

Une diminution significative de l'activité de l'enzyme catalase des lymphocytes stimulés par l'agent mitogène et l'insuline, est notée chez les enfants obèses comparés aux témoins (Tableau 5). La présence des huiles (poisson, nigelle, olive) n'affecte pas l'activité catalase au niveau des lymphocytes des enfants témoins. Cependant, ces trois huiles induisent une stimulation de l'activité catalase au niveau des lymphocytes des enfants obèses. De plus, en présence de ces huiles, l'activité de la catalase lymphocytaire chez les obèses est similaire à celle des témoins.

TABLEAU 5

**Activité de la Catalase Intracellulaire (U/ng de Protéines) des Lymphocytes Stimulés en Présence des Différentes Huiles chez les Enfants Témoins et Obèses**

	Enfants témoins	Enfants obèses
<b>U/ng de protéines</b>		
<b>Prolifération basale</b>	6.15 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	5.57 $\pm$ 0.11 <sup>a*</sup>
<b>Con A</b>	16.25 $\pm$ 0,64 <sup>c</sup>	10.26 $\pm$ 0.85 <sup>c*</sup>
<b>Insuline</b>	7.18 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	6.21 $\pm$ 0.22 <sup>b*</sup>
<b>Con A + huile de poisson</b>	16.38 $\pm$ 1,04 <sup>c</sup>	15.65 $\pm$ 1.07 <sup>d</sup>
<b>Con A+ huile de nigelle</b>	16.35 $\pm$ 1,15 <sup>c</sup>	15.54 $\pm$ 0.88 <sup>d</sup>
<b>Con A + huile d'olive</b>	16.12 $\pm$ 0,99 <sup>c</sup>	15.36 $\pm$ 1.05 <sup>d</sup>

a, b, c, d indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ( $p < 0.05$ ) dans le même groupe.

\* indique différence significative entre les témoins et les obèses (\*  $p < 0.05$ ).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  ES des incubations réalisées en triples chez 26 enfants témoins et 20 enfants obèses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Les comparaisons entre témoins et obèses sont réalisées par le test «t» de Student après analyse de variance.

## DISCUSSION

La connaissance du lien étroit unissant le statut immunitaire au statut nutritionnel a considérablement évolué en quelques décennies. La mise en évidence de l'immunodéficience secondaire à une malnutrition globale a ouvert la porte à l'identification de micronutriments essentiels à l'acquisition et au maintien de l'immunocompétence. Les progrès en immunologie ont permis de décrire les aspects fonctionnels de la réponse immunitaire susceptibles d'être altérés par des déficits nutritionnels, majeurs, modérés ou marginaux (Calder, 2001).

Cette étude est réalisée sur les lymphocytes d'enfants témoins et obèses cultivés *in vitro* en présence ou en absence de différentes huiles alimentaires afin de déterminer les

anomalies de la fonction lymphocytaire au cours de l'obésité, et les effets des acides gras polyinsaturés (AGPI) sur la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion des interleukines 2, et la variation de quelques marqueurs du statut oxydant/antioxydant cellulaire.

Les huiles alimentaires testées sont : l'huile de poisson riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) dont les plus importants sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), l'huile d'olive riche en acide oléique, et l'huile de nigelle riche en acide linoléique et oléique.

Notre protocole expérimental nous permet donc de déterminer le rôle potentiel des différents acides gras (AGMI, AGPI n-6 et AGPI n-3) sur les fonctions immunes et la balance intracellulaire oxydante/antioxydante, chez des enfants en bonne santé et chez des enfants obèses.

Ces résultats montrent que la prolifération des lymphocytes à l'état basal ou stimulée par l'agent mitogène (Con A), est significativement plus faible chez les enfants obèses comparés aux enfants témoins.

Plusieurs études ont montré que les obèses avaient une faible réponse proliférative via les agents mitogènes (Moriguchi *et al.*, 1998 ; Schauenstein *et al.*, 1995 ; Nieman *et al.*, 1999).

La réduction de la prolifération des lymphocytes observée chez les enfants obèses peut être liée en partie à un état d'insulinorésistance, puisque l'insuline module la différenciation des cellules et la prolifération lymphocytaire (Saltiel, 1990). De plus, ces résultats montrent que l'insuline, additionnée au milieu d'incubation, potentialise l'effet de l'agent mitogène et la prolifération des lymphocytes T.

Les effets des acides gras polyinsaturés (AGPI) ont été énormément étudiés sur les cellules mononucléaires. Il a été démontré que le DHA, EPA, l'acide oléique, et l'acide linoléique inhibent *in vitro* la prolifération des lymphocytes stimulés par des mitogènes. Cette inhibition dépend de la concentration et du degré d'insaturation de l'acide gras utilisé. Les acides gras les plus inhibiteurs sont de la série n-3 (Calder, 2001).

Ceci va dans le même sens que ces résultats, puisque des trois huiles employées (huile de poisson, huile de nigelle, huile d'olive), l'huile de poisson est la plus immunosuppressive chez les enfants obèses et témoins en présence du mitogène.

Certains auteurs ont suggéré que l'activation de la phospholipase D peut être responsable de l'effet antiprolifératif du DHA dans les cellules lymphoïdes et que la surexpression de la phospholipase D dans les cellules T inhibe l'expression de l'ARNm des IL-2 (Diaz *et al.*, 2005).

D'autres études ont montré que l'EPA et DHA inhibent la prolifération lymphocytaire en inhibant l'activité de la MAP kinase (Denys *et al.*, 2002).

L'obésité affecte non seulement la fonctionnalité des cellules du système immunitaire mais aussi leur profil de sécrétion des cytokines (Rourke *et al.*, 2006). En effet,

ces résultats montrent que la production d'IL-2 par les lymphocytes stimulés par des mitogènes est faible chez les enfants obèses comparés aux enfants témoins.

Une diminution de la production des IL-2 de cellules mononucléaires stimulées par des mitogènes a déjà été reportée chez des rats obèses (Lamas *et al.*, 2007). Un déficit dans la production des IL-2 ou dans l'expression de leurs récepteurs membranaires peut aboutir à la réponse proliférative basse observée chez les enfants obèses.

Ces résultats montrent également une réduction de la production d'IL-2 par les lymphocytes stimulés en présence des huiles principalement l'huile de poisson, chez les enfants témoins et obèses. L'EPA et le DHA inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires : IL-6, IL-1 et de TNF- $\alpha$ . Cependant cet effet n'est pas observé avec les acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-6. Cette inhibition est vraisemblablement due à leur incorporation dans les membranes des cellules mononucléées. Certaines études ont montré une relation inverse entre le contenu en EPA des phospholipides membranaires des cellules mononucléées et la production d'IL-6 (Calder, 2006).

De nombreux travaux rapportent une augmentation du stress oxydatif au cours de l'obésité suite à un déficit des systèmes protecteurs antiradicalaires intracellulaires (Furukawa *et al.*, 2004 ; Suzuki *et al.*, 2003). Les facteurs pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , interleukines) induisent une production de ROS (espèces réactives de l'oxygène), de même que les facteurs hémodynamiques (flux sanguin, pression artérielle) l'hyperglycémie et l'hypertension (Negre-Salvayre & Salvayre, 2005).

Ces résultats confirment la présence d'un stress oxydatif chez les enfants obèses. En effet, les teneurs lymphocytaires en hydroperoxydes, en protéines carbonylées et en MDA sont significativement élevées chez les enfants obèses comparés aux témoins. Cependant, une diminution significative de l'activité de l'enzyme catalase des lymphocytes est notée chez les enfants obèses comparés aux témoins, indiquant des anomalies de la balance oxydante / antioxydante intracellulaire.

L'existence de ce stress oxydatif intracellulaire peut être à l'origine des perturbations de la prolifération des lymphocytes chez les enfants obèses. L'augmentation du taux de radicaux libres altère les lymphocytes circulants au niveau fonctionnel et au niveau structural. La peroxydation des lipides membranaires, notamment des AGPI des phospholipides, génère des peroxydes réactifs responsables d'une autocatalyse de cette réaction tandis que l'oxydation des protéines dérèglera les signaux cellulaires de prolifération ou de défense (Buttke & Sandstrom, 1994).

Ces résultats montrent que les teneurs en MDA et en hydroperoxydes des lymphocytes T sont significativement augmentées en présence des différentes huiles (poisson, olive, nigelle) chez les enfants obèses et témoins.

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des radicaux libres. La peroxydation lipidique est une conséquence du stress oxydant et aussi un relais pour la propagation (Guichardant *et al.*, 2006). Il a été démontré qu'une consommation excessive d'acide arachidonique induit une augmentation des processus de lipoperoxydation, en particulier chez les sujets souffrant d'un stress oxydatif (Lagarde & Vericel, 2004). Plus un acide gras est polyinsaturé plus il est fragile vis-à-vis des radicaux libres, et donc oxydable.

L'acide docosahexaénoïque (DHA) est particulièrement oxydable du fait de la présence de six doubles liaisons (Van Kuijk *et al.*, 1995).

Cependant, en présence des huiles, particulièrement l'huile de poisson, on remarque que les taux de protéines carbonylées sont diminués, et leurs valeurs chez les obèses se rapprochent de celles des enfants témoins. Ceci est en faveur d'un effet bénéfique des huiles sur la balance oxydante/antioxydante.

De plus, ces résultats montrent également que la présence des huiles (poisson, nigelle, olive) n'affecte pas l'activité catalase au niveau des lymphocytes des enfants témoins. Cependant, ces trois huiles induisent une stimulation de l'activité catalase au niveau des lymphocytes des enfants obèses, en réponse au stress oxydatif intracellulaire. L'augmentation de l'activité catalase par les huiles représente un moyen de défense intracellulaire.

On rappelle que les premiers résultats montrent que les lymphocytes des enfants obèses incubés en présence de l'huile de poisson présentent une prolifération plus importante que celle des enfants témoins. Cette prolifération a été estimée par le nombre de cellules et la sécrétion des IL-2. Il apparaît clairement que l'huile de poisson améliore le statut oxydant/antioxydant intracellulaire des lymphocytes et la sécrétion des cytokines chez les enfants obèses. Toutefois, les huiles d'olive et de nigelle possèdent aussi cet effet bénéfique mais il est moins important que celui de l'huile de poisson.

L'unique limite de l'étude est la petite taille de l'échantillon, malgré plusieurs recrutements et à cause des contraintes pratiques non quantifiables, nous n'avons pu incorporer dans l'étude que 46 sujets. L'hypothèse la plus plausible justifiant le nombre élevé d'abstention ou de refus de participer à l'étude serait le fait de subir une prise de sang pour les enfants (considérée par certains parents comme une atteinte à l'intégrité physique).

## CONCLUSION

Le système immunitaire et le statut oxydant/antioxydant sont altérés au cours de l'obésité. Ces résultats mettent en évidence les perturbations de la fonction lymphocytaire et de la balance oxydante/antioxydante intracellulaire chez les enfants obèses. De plus, les effets immunomodulateurs des différents acides gras (AGMI, AGPI n-6 et AGPI n-3) et leurs effets bénéfiques sur le statut oxydant/antioxydant intracellulaire sont confirmés et montrent l'importance de leur ingestion chez les enfants obèses.

Ainsi, des approches nutritionnelles utilisant un supplément d'acides gras surtout les AGPI n-3 dans les régimes amaigrissants, soit comme thérapie complémentaire soit comme thérapie alternative, sont potentiellement très importantes, car la régulation de l'expression génique, la production des eicosanoïdes et des cytokines, l'action des enzymes anti-oxydantes sont tous des mécanismes par lesquels les acides gras polyinsaturés peuvent exercer des effets bénéfiques sur le système immunitaire.

Pour compléter cette étude *in vitro*, il serait intéressant d'étudier les effets *in vivo* des régimes supplémentés en différents acides gras sur le système immunitaire et le statut oxydant/antioxydant intracellulaire chez les enfants obèses.

Il serait ainsi possible de proposer des interventions nutritionnelles basées sur une supplémentation en AGPI dans la prévention des effets à long terme de l'obésité infantile.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'Agence nationale pour le développement de la recherche en santé (ANDRS, 02/15/02/00/001 et 05/05/01/01/013). Nos remerciements sont présentés aux volontaires donateurs de sang.

#### RÉFÉRENCES

- Aebi, H. 1974. *Catalase*. In: BergMeyer, H. (Ed), Methods of enzymatic analysis, second ed., Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 673-684.
- Belluzzi, A. 2002. N-3 fatty acids for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Porc. Nutr. Soc.*, 61: 391-395.
- Buttke, T.M., Sandstrom, P.A. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today*, 15: 7- 10.
- Calder, P.C. 2001. Nutrition et fonction immunitaire (Nutrition and immune function). *La Revue Francaise d'Endocrinologie Clinique, Nutrition, et Métabolisme*, 15(4): 286-297.
- Calder, P.C. 2006. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83(6): 1505-1519.
- Chandra, R.K., Calder, P.C., Field, C.J., Gill, H.S. 2002. *Effect of post-natal protein malnutrition and intrauterine growth retardation on the immunity and risk of infection*. Nutrition and Immune Function, Cabi Publishing, p. 41 - 56.
- Denys, A., Hichami, A., Khan, N.A. 2002. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase enzyme activity in human T-cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 232: 143-148.
- Diaz, O., Mebarek-Azzam, S., Benzaria, A., Dubois, M., Lagarde, M., Nemoz, G., Prigent, A.E. 2005. Disruption of lipid rafts stimulates phospholipase D activity in human lymphocytes: implication in the regulation of immune function. *The Journal of Immunology*, 175: 8077- 8086.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, O. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, 114: 1752 -1761.
- Guichardant, M., Bacot, S., Molière, P., Lagarde, M. 2006. Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 13: 31 - 34.
- Katzmarzyk, P.T., Janssen, I. 2004. The economic costs associated with physical inactivity and obesity in Canada: an update. *Can. J. Appl. Physiol.*, 29: 90 - 115.
- Lagarde, M., Vericel, E. 2004. Effets et métabolismes spécifiques des acides gras  $\omega$ 3. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 11: 55 - 57.
- Lamas, O., Martinez, J.A., Marti, A. 2007. T-helper lymphopenia and decreased mitogenic response in cafeteria diet-induced obese rats. *Nutrition Research*, 4: 497 - 506.
- Levine, R.L., Garland, D., Olivier, C.N., Amici, A., Lenz, A.G., Shantirl, S., Stadan, E.R. 1996. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, 186: 464 - 478.
- Moriguchi, S., Kato, M., Sakai, K., Yamamoto, S., Shimizu, E. 1998. Exercise training restores decreased cellular immune functions in obese Zucker rats. *J. Appl. Physiol.*, 84: 311-317.

- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63.
- Negre-Salvayre, A., Salvayre, R. 2005. Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 12: 433 - 438.
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Nehlsen-Cannarella, S.L., Ekkens, M., Utter, A.C., Butterworth, D.E., Fagoaga, O.R. 1999. Influence of obesity on immune function. *J. Am. Diet Assoc.*, 99: 294 – 299.
- Nourooz-Zadeh, J., Ling, Kle., Wolef, S.P. 1996. Low density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. *Biochem. J.*, 313: 781 - 786.
- Oulamara, H., Agli, A.N., Frelut, M.L. 2006. Alimentation, activité physique et surpoids chez des enfants de l'est algérien. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, p. 46 - 54.
- Rolland-Cachera, M.F., Castetbon, K., Arnolt, N., Bellitiste, F. 2002. Body mass index into 9 year-old French children, frequency of obesity. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 1610 - 1616.
- Rourke, R.W., Kay, T., Lyle, E.A., Traxler, S.A., Deveney, C.W., Jobe, B.A., Rosenbaum, J.T. 2006. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clin. Exp. Immunol.*, 146: 39 - 46.
- Saltiel, A.R. 1990. Second messengers of insulin action. *Diabetes Care*, 13: 244 – 256.
- Schauenstein, K., Kromer, G., Sundick, R.S., Wick, G. 1995. Enhanced response to Con A and production of TCGF by lymphocytes of obese strain (OS) chickens with spontaneous autoimmune thyroiditis. *The Journal of Immunology*, 143: 872-879.
- Suzuki, K., Ito, Y., Ochiai, J., Kusuhara, Y., Hashimoto, S., Tokudome, S., Kojima, M., Wakai, K., Toyoshima, H., Tamakoshi, K. 2003. Relationship between obesity and serum markers of oxidative stress and inflammation in Japanese. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 4(3): 259 - 266.
- Sweeney, B., Puri, P., Reen, D.J. 2005. Modulation of immune cell function by polyunsaturated fatty acids. *Pediatr. Surg. Int.*, 21: 335 - 340.
- Van Kuijk, F.J., Siakotos, A.N., Fong, L.G., Stephens, R.G., Thomas, T.W. 1995. Quantitative measurement of 4-hydroxyalkenals in oxidized low-density lipoprotein by gas chromatography mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 224: 420 – 424.