

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE
Département de technologie alimentaire et nutrition humaine
Thèse Présentée en vue de l'obtention du grade de Magister
Option : Sciences alimentaires

Biodisponibilité et incidence physiologique du lycopène chez le rat

Présentée par:

Aïcha Yefsah-Idres

Directeur de thèse Mr AMMOUCHE A. Professeur (INA)
2007

devant le jury : Président Mr BELLALM.M. Professeur (INA) Examineur MmeKALEM K.
Professeur (CHU Parnet) Examineur Mr GRIENE L. Professeur(CHU Mustapha)

Table des matières

Remerciements . .	1
..	3
Abstract . .	5
Résumé .	7
Introduction . .	9
CHAPITRE I : Généralités sur les composés antioxydants .	11
I-1- Les vitamines antioxydantes . .	11
I-1-1- La vitamine E .	11
I-1-2- La vitamine C .	14
I- 2- Les caroténoïdes . .	15
I-2-1- Structure . .	15
I-2-2- Synthèse des caroténoïdes . .	16
I-2-3- Métabolisme des carotenoides . .	17
I-2-4- Facteurs affectant la biodisponibilité . .	18
I-2-5- Répartition tissulaire des carotenoides . .	19
I-2-6- Mise en évidence de l'effet anti-oxydant des carotenoides . .	19
I-2-7- Mécanisme d'action des carotenoides .	19
I-3- Le lycopène . .	20
I-3-1- Historique de la tomate .	20
I-3-2- Structure chimique du lycopène .	21
I-3-3- Propriétés physico-chimiques du lycopène .	22
I-3-4- Analyse du lycopène .	23
I-3-5- Les sources alimentaires de lycopène .	23
I-3-6- Les niveaux de consommation du lycopène . .	24
I-3-7- Absorption, transport et métabolisme du lycopène . .	25
I-3-8- Les concentrations tissulaires de lycopène .	27

I-3-9- Le lycopène et le cancer .	28
I-4- Les radicaux libres, une conséquence du métabolisme de l'oxygène .	29
I.4.1. Formation de radicaux libres par voie exogène .	30
I.4.2. Facteurs contribuant à augmenter le stress oxydant . .	31
I.4.3. Le système enzymatique, un moyen de défense endogène . .	33
I.4.4. Les moyens de défense exogènes .	34
I-5- Le foie et ses fonctions .	35
I-5-1- Les systèmes de détoxification .	35
I-5-2- Les cytochromes P450 .	37
I-5-3- Approche biochimique de la pathologie hépatique .	37
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES . .	41
II-1- MATÉRIELS .	41
II-1-1- Réactifs et solvants utilisés . .	41
II-1- 2- Appareillage .	42
II-1-3- Matériels biologiques .	42
II-2- Méthodes et techniques d'analyse .	45
II-2-1- Influence des régimes alimentaires sur le poids des rats . .	45
II-2- 2- dosage du lycopène . .	46
II-2-3- Dosage des marqueurs hépatiques .	48
II-2-4- Etude des effets du CCl4 et du lycopène sur le foie des rats . .	52
CHAPITRE III : Resultats et discussion .	57
III-1- Influence des régimes alimentaires sur la croissance des rats . .	57
III-1-1- Le poids des rats .	57
III-1-2- Le poids des organes .	60
III-1-3- Indice hépto-somatique . .	62
III-2- Dosage du lycopène . .	63
III-2-1- Dosage du lycopène dans le sérum . .	63
III-2-2- Dosage du lycopène dans le foie .	65
III-3- Etude de l'effet pathologique du CCl4 sur le bilan hépatique des rats . .	65

III-3-1- Effet du CCl4 sur les activités enzymatiques .	66
III-3-2- Effet du CCl4 sur les marqueurs biochimiques .	73
III-4 - Etude de l'effet hépatoprotecteur du lycopène sur les marqueurs hépatique des rats intoxiqués par le CCl4 .	77
III-4-1- Effet du lycopène sur les activités enzymatiques des rats intoxiqués par le CCl4 .	77
III-4-2- Effet du lycopène sur les marqueurs biochimiques des rats intoxiqués par le CCl4 .	80
III-5- Etude anatomopathologique des effets du CCl4 sur le foie des rats .	81
III-5-1- Le foie témoin . .	82
III-5-2- Le foie traite .	83
III-6- Etude de l'effet hépatoprotecteur du lycopène sur le foie de rats intoxiqués par le CCl4 .	88
Conclusion générale .	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .	95
Annexes . .	105
Annexe1 : Valeurs nutritionnelles pour 100 g de tomate .	105
Annexe 2 : Normes du régime ONAB . .	106
Annexe 3: Profil chromatographique du lycopène .	107
Annexe 4 : Rappels anatomiques du foie .	109

Remerciements

A l'issue de ce travail, qui n'aurait pu être mené à son terme sans l'aide de nombreuses personnes qui ont œuvré à son aboutissement, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à :

Monsieur le Professeur Ammouche A. pour m'avoir proposé le sujet de cette thèse et l'avoir dirigé. Sans lui ce travail n'aurait pu être possible. Il a fait énormément pour ce magistère, non seulement en tant que directeur de thèse mais également bien au-delà. Il m'a toujours soutenu même si c'était trop difficile.

Je remercie également :

- Monsieur le Professeur Bellal M.M. qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.
- Madame le Professeur KALEM K. (CHU Parnet) pour sa disponibilité, son aide et pour son analyse experte de plusieurs dizaines de lames histologiques ainsi que pour avoir accepté d'examiner ce travail.
- Monsieur le Professeur Griene A. (CHU Mustapha) pour ses conseils et pour avoir accepté d'examiner ce travail.
- Monsieur le Professeur Guermouche H. qui a aimablement accepté de réaliser, malgré ses nombreuses occupations, les analyses de mes échantillons sur HPLC.
- Madame Heneb M., chef de service du laboratoire d'Anatomo-pathologie (CHU de Tizi-Ouzou) ainsi que Monsieur KHELIL S., Chef de service du laboratoire central (CHU de Tizi-Ouzou) pour m'avoir permis de réaliser la biopsie hépatique et le dosage des enzymes dans leurs laboratoires respectifs.

Je ne saurai oublier Madame le Professeur BOUHADEF A. pour son accueil, ainsi que Messieurs les docteurs ZAOUANI M. et CHAKOU M. (CRD SAIDAL) qui m'ont permis de réaliser mon expérimentation au Centre de Recherche et Développement.

Que toute l'équipe du laboratoire de pharmacologie (Mohamed, Samy, Badredine, Sabrina, etc.) trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

Je ne saurai oublier Messieurs le Professeur BAKOUR R. (USTHB), AMALOU D. (Université de Blida) ainsi que Monsieur le Professeur Boufersaoui M. (USTHB) pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée.

Un grand merci à Madame le professeur Benazzoug Y. responsable du laboratoire de la matrice extra cellulaire (USTHB), pour m'avoir laissée conserver mes échantillons dans son congélateur.

Que tous ceux qui ont, de près ou de loin, participé à la réalisation de cette thèse et qui n'ont pas été cités nommément trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je dédie ce modeste travail à ma famille et à toutes les personnes qui me sont chères

Abstract

The research carried out on the process of ageing and the development of the chronic diseases (atherosclerosis, cancer, etc.) clearly established the role of the diet's quality in their development. Antioxidants, in particular carotenoids (lycopene), have therefore a significant contribution to the organism's defense, through the protection of biological systems' mechanisms.

In this thesis, we wanted to prove the hepato-protectoral role of the lycopene and its bio-availability by the realization of a supplementation of forty five Wistar rats. Divided into four groups of six rats, two from each group were sacrificed, every two weeks.

The groups two and four rats received daily, by oral way lycopene 5 mg per kg of body weight (in paraffin oil). Moreover, those of group four were poisoned by an oral amount of 2 ml of CCl₄ per kg of body weight in a solution of paraffin oil at 30%, twenty four hours before their sacrifice. The rats of group one were regarded as witnesses and received only paraffin oil like those of group three. The latter however, were poisoned with CCl₄, twenty four hours before their sacrifice.

The dosage of lycopene in the rats' livers revealed the presence of an antioxidant, but its quantification remains debatable owing to the fact that it is influenced by several factors such as the quantity administered, the way of administering it, etc.

Thanks to the intoxication of group three rats by CCl₄, we could observe a clear increase of the enzymatic activity rate in the hepatic assessment. On the other hand, the dosage of the biochemical markers and the enzymatic activities of the rats pretreated by lycopene and poisoned by CCl₄, showed a reduction of the rate of the latter according to the hepatic assessment.

The histological study made it possible to observe the damage caused by the intoxication, and to show the protection of the liver by the lycopene, which suggests that the latter is able to ensure a protection against the hepatic affections related to a poisoning by CCl₄.

Key-words Rats - lycopene - CCl₄ – Bilan hepatic

Résumé

Les recherches réalisées sur le processus de vieillissement et le développement de quelque maladies chroniques (athérosclérose, cancer, etc.) ont clairement établi le rôle de la qualité du régime alimentaire dans leur développement. Les antioxydants, en particulier les caroténoïdes (le lycopène), ont un apport significatif dans la défense de l'organisme, à travers les mécanismes de protection des systèmes biologiques. Dans cette thèse, nous avons voulu prouver le rôle hépatoprotecteur du lycopène et sa biodisponibilité par la réalisation d'une supplémentation de 43 jours, sur 24 rats wistar. Divisés en quatre lots de six rats, deux rats de chaque lot ont été sacrifiés, toutes les deux semaines. Les rats des lots 2 et 4 ont reçu quotidiennement, par voie orale 5 mg de lycopène par kg de poids corporel (dans de l'huile de paraffine), de plus, ceux du lot 4 ont été intoxiqués par une dose orale de 2 ml de CCl₄ par kg de poids corporel dans une solution à 30% d'huile de paraffine, 24 heures avant leur sacrifice. Les rats du lot 1 ont été considérés comme témoins et ils ont reçu seulement de l'huile de paraffine comme ceux du lot 3, mais ces derniers ont été intoxiqués au CCl₄, 24h avant leur sacrifice.

Le dosage du lycopène dans le foie des rats a révélé la présence de l'antioxydant mais sa quantification reste discutable du fait qu'il est influencé par plusieurs facteurs tels que la quantité administrée, la voie d'administration, etc.

Grâce à l'intoxication des rats du lot 3, par le CCl₄, nous avons pu observer une nette augmentation du taux des activités enzymatiques du bilan hépatique. Par contre, le dosage des marqueurs biochimiques et des activités enzymatiques du bilan hépatique, des rats prétraités par le lycopène et intoxiqués par le CCl₄, a montré une réduction du taux de ces derniers.

L'étude histologique a permis d'observer les dommages provoqués par l'intoxication et de montrer la protection du foie, par le lycopène, ce qui suggère que ce dernier est en mesure d'assurer un effet protecteur contre les affections hépatiques liées à un empoisonnement par le CCl₄.

Mots-clés : Rats – lycopène - CCl₄ - Bilan hépatique

Introduction

Il est actuellement admis que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) provoquent des dommages cellulaires importants pouvant conduire à des défaillances au sein de l'organisme. Ils sont, de plus en plus, impliqués dans le processus de vieillissement et le développement de maladies qui lui sont associées (athérosclérose, cancer, maladies neurodégénératives). Ces maladies ont suscité l'attention particulière des chercheurs car elles deviennent de plus en plus répandues, surtout dans le monde occidental. Bien que les facteurs génétiques et l'âge soient importants dans la détermination du facteur de risque, la qualité du régime alimentaire est également considérée comme un facteur important.

Le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les dommages oxydatifs des biomolécules sont les axes principaux de la recherche récente, liée aux maladies chroniques (Rao et Agarwal, 2000). A travers ces recherches, plusieurs auteurs ont montré le rôle des antioxydants, en particulier les caroténoïdes, dans la protection de l'organisme, agissant comme des agents inactivant des ROS.

Les mécanismes par lesquels les caroténoïdes (le lycopène) protègent les systèmes biologiques des dommages dus à l'oxygène singulet consistent en un ensemble de réactions physiques et chimiques entre ceux-ci et la molécule d'oxygène "excitée". Ainsi, l'énergie d'excitation de l'oxygène singulet est transférée vers le pigment, pour être ensuite dissipée au niveau des doubles liaisons conjuguées. Le lycopène est un caroténoïde présent principalement dans la tomate et dans ses produits de transformation, il fait partie des micronutriments qui participent à la défense de

l'organisme contre les espèces oxygénées réactives. Il est essentiellement le piègeur de l'oxygène singulet, mais il peut également neutraliser des radicaux libres (Gupta et *al.*, 2003).

Afin de mieux connaître le comportement du lycopène et son mode d'action, nous avons réalisé cette étude dans le but :

- D'évaluer l'effet des traitements administrés (lycopène et CCl₄) sur la croissance des rats, en effectuant des mesures pondérales (croissance, gain de poids et indices hépatosomatiques).
- De montrer la biodisponibilité du lycopène par son dosage, au niveau du sérum et du foie, par analyse chromatographique liquide haute performance (HPLC).
- De montrer l'effet hépatoprotecteur du lycopène vis-à-vis de la toxicité induite par l'ingestion du tétrachlorure de carbone (CCl₄), à partir du dosage des activités enzymatiques et des marqueurs biochimiques du bilan hépatique.

Sachant que le foie est la cible la plus sensible aux effets toxiques du tétrachlorure de carbone (métabolisé par les microsomes hépatiques du système mono oxygénase du cytochrome P-450) et dans le but de confronter les résultats du bilan hépatique, nous avons complété notre étude par une approche histologique (absence ou réduction de lésions hépatiques).

CHAPITRE I : Généralités sur les composés antioxydants

I-1- Les vitamines antioxydantes

Les vitamines sont des composants organiques nécessaires à la régulation de la majorité des fonctions de l'organisme. Ce sont des biocatalyseurs dont les modes d'action peuvent être multiples et complexes. Les vitamines antioxydantes jouent, la plupart du temps, le rôle de capteurs de radicaux libres. Ce sont de petites molécules qui détiennent des propriétés de type «substrats Suicides», qui agissent comme un bouclier antioxydant et protègent les acides nucléiques, les protéines et les lipides.

L'action protectrice des enzymes cytoplasmiques est complétée par des molécules antioxydantes, en particulier, l' α -tocophérol, les caroténoïdes (lycopène), le glutathion, l'acide ascorbique, etc...

I-1-1- La vitamine E

La vitamine E est le terme générique habituellement utilisé pour désigner les différents tocophérols ou tocotriénols. Ce sont des composés d'origine végétale, mineurs en

quantité mais très importants par leurs propriétés antioxydantes et leur activité vitaminique.

Les tocophérols ou tocotriénols (Fig.1) présentent une structure de benzopyranol. La fonction hydroxyle est en position 6 sur le cycle aromatique et en para de l'atome d'oxygène hétérocyclique. Les divers tocophérols et tocotriénols se différencient entre eux par le nombre et la position de groupements méthyles sur le noyau aromatique (Clause, 2001).

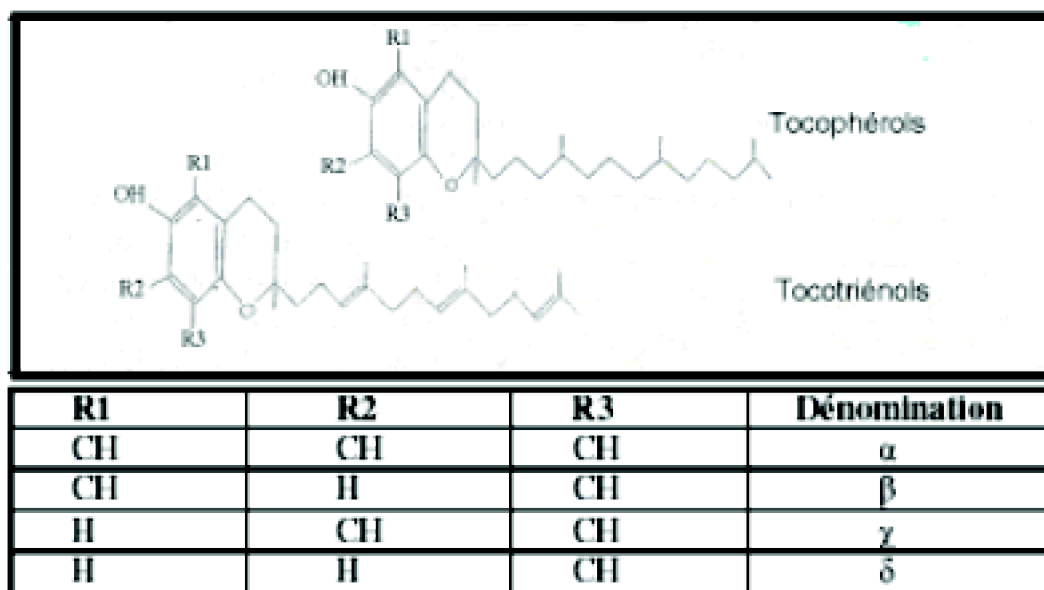


Figure 1: Structure chimique des différents tocophérols.

L' α -tocophérol est la vitamine que l'on retrouve le plus fréquemment dans la nature et qui présente l'activité biologique la plus élevée. Sa structure lui permet de capter les radicaux libres dans les zones lipophiles des membranes cellulaires (grâce à sa chaîne phytyle) ainsi que dans les zones hydrophiles à la surface des membranes plasmiques (grâce à son hydroxyle phénolique).

A- Mécanisme d'action de la vitamine E

L' α -tocophérol réagit avec les radicaux oxygénés lipidiques en empêchant leur propagation. La vitamine E et les autres antioxydants phénoliques neutralisent donc la peroxydation lipidique essentiellement par inhibition de la phase de propagation des radicaux libres (Clause, 2001). Elle joue également un rôle en participant à la structure membranaire et forme des complexes avec les résidus arachidoniques. Elle pourrait ainsi stabiliser les membranes, indépendamment de son action antioxydante. La vitamine E s'oppose à la peroxydation des acides gras en peroxydes par réactions radicalaires.

Le noyau chromane, oxydé sur le groupe OH lors des réactions radicalaires, est transformé en α -tocophérol radical, relativement stable, donc peu réactif, et qui est de plus régénéré en tocophérol par l'acide ascorbique ou le glutathion (Fig.2)

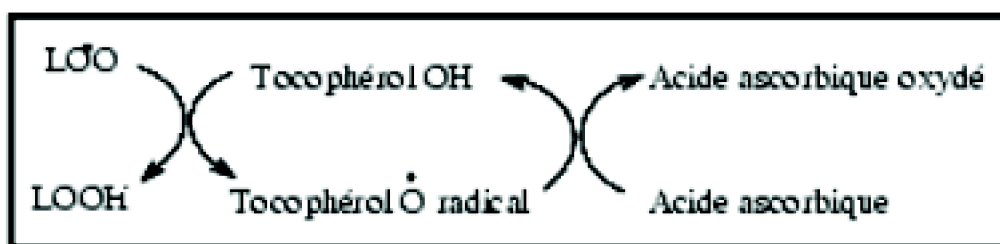


Figure 2: Action antiradicalaire de la vitamine E

B- Fonctions de la vitamine E

La principale fonction de la vitamine E est son action antioxydante. Un antioxydant a pour but de protéger certains éléments biologiques de notre corps contre les molécules d'oxygène qui pourraient interférer dans les réactions biochimiques et modifier la structure de certains composés. Par conséquent, elle permet de maintenir l'intégrité des membranes cellulaires et de régulariser les réactions biochimiques nécessitant de l'oxygène (ou oxydation) (Fig.3).

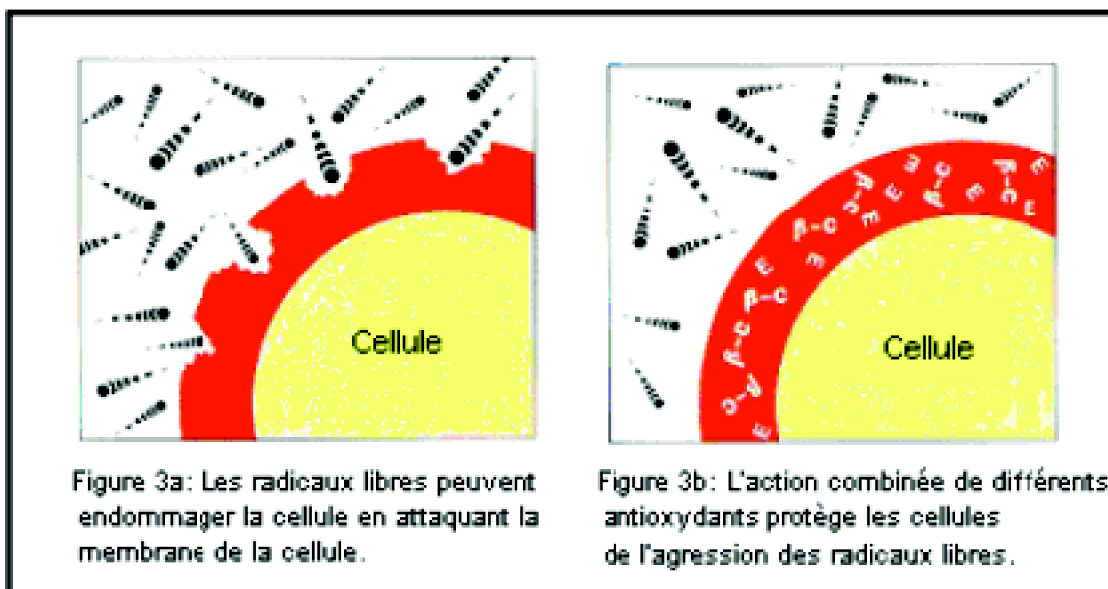


Figure 3: Protection des membranes cellulaires par l'action combinée des antioxydants.

C- Sources alimentaires de la vitamine E

Les huiles, les margarines et les produits céréaliers à grains entiers sont une excellente source de vitamine E. Certains fruits (pomme, mangue, pêche) et légumes (asperge, carotte) sont également des sources de vitamine E, mais en faible quantité (Tab.1).

Tableau 1: Sources et apports en Vitamine E (Withney et Rolfes, 1993).

Aliments	Portions	Quantités de vitamine E
Huile de germe de blé	15 ml / 1 c. à soupe	26 mg
Huile de tournesol	15 ml / 1 c. à soupe	7 mg
Huile d'amande	15 ml / 1 c. à soupe	5 mg
Huile de carthame	15 ml / 1 c. à soupe	5 mg
Huile de maïs	15 ml / 1 c. à soupe	3 mg
Huile d'olive	15 ml / 1 c. à soupe	2 mg
Pomme	Une	1 mg
Asperge	125 ml / 1/2 tasse	< 1 mg

I-1-2- La vitamine C

La vitamine C a été isolée la première fois en 1928 et sa structure déterminée en 1930. C'est un cycle lactonique à 6 carbones. Seul l'isomère L est actif. Par oxydation, on obtient l'acide déhydroascorbique (ascorbone). La vitamine C est très répandue dans la nature, surtout parmi les végétaux. Les sources principales sont les fruits et légumes frais, la pomme de terre, le pain et les céréales.

La vitamine C ou acide ascorbique a une structure apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone (Fig. 4). Elle est synthétisée dans le foie de la plupart des mammifères à partir du glucose. Les humains ainsi qu'un bon nombre de primates et le cobaye ont perdu la capacité de synthétiser cette vitamine et sont donc dépendants d'un apport régulier.

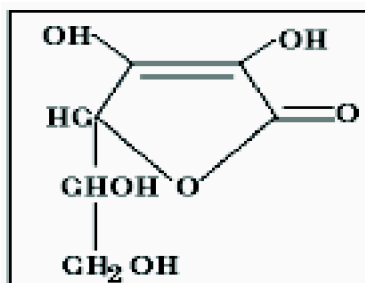


Figure 4: Structure chimique de la vitamine C (acide L-ascorbique) (Clause, 2001)

A- Mise en évidence de l'effet antioxydant de la vitamine C

Une étude a montré que des cobayes recevant oralement de la vitamine C à la dose quotidienne de 600 mg présente une augmentation significative de leur résistance antioxydante générale (Fig. 5). Cette dose de vitamine C exerce un effet protecteur significatif vis-à-vis de l'oxydation des lipides et des protéines hépatiques (Barja, 1994).

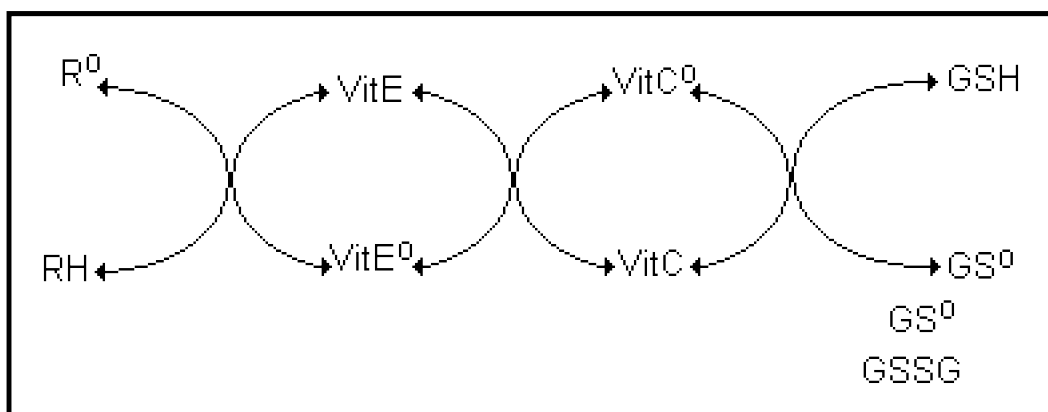


Figure 5: Effet de synergie des antioxydants lors de l'interaction des radicaux lipidiques avec la vitamine E et régénération du radical tocophéryl (vit E oxydée) par la vitamine C, permet de former de la vitamine E active (Gey et al., 1987).

B- Mécanisme d'action de la vitamine C

La vitamine C est l'un des antioxydants naturels les plus puissants. Cependant, son mécanisme d'action moléculaire reste mal connu. Il semble qu'il soit en rapport avec l'interconversion réversible entre sa forme réduite (l'acide ascorbique) et sa forme oxydée (l'acide déhydroascorbique) (Clausse, 2001).

La vitamine C forme donc un couple redox avec une forme intermédiaire radicalaire capable de capter l'oxygène singulet et certains autres radicaux comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou encore le radical hydroxyle. En plus de ce rôle de piègeur, la vitamine C est capable de régénérer l' α -tocophérol à partir du radical tocophéroxyde qui est formé lors de l'inhibition de la peroxydation lipidique par la vitamine E. La vitamine C (hydrophile) et la vitamine E (lipophile) semblent donc avoir un effet antioxydant synergique.

En plus d'exercer une activité antioxydante, la vitamine C catalyse la synthèse du collagène (Ligeard, 1981). Cette propriété est intéressante car elle permettrait d'activer la synthèse de la matrice extracellulaire.

I- 2- Les caroténoïdes

I-2-1- Structure

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux liposolubles qui contiennent une chaîne centrale hautement poly-insaturée. La structure de base des caroténoïdes est formée d'une longue chaîne hydrocarbonée en C18 où alternent simples et doubles liaisons portant quatre groupements méthyles, et de deux cycles en C6 (β -ionone) situés à chacune des extrémités de cette chaîne (Bender, 2003).

Selon les groupements fonctionnels, on distingue les xanthophylles (lutéine, Zéaxanthine, canthaxanthine) relativement moins apolaires car porteurs de fonctions oxygénées, et les carotènes (crypto xanthines, lycopène, α et β -carotène) exclusivement hydrocarbonés et donc extrêmement apolaires. Ils peuvent également comporter une structure cyclique à chaque extrémité.

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été identifiés, dont environ 50 dans la nourriture (Tab.2) et 20 dans le plasma (Faure et *al.*, 2000). Leur structure hautement poly-insaturée et la présence de cycle leur confèrent la capacité de recevoir un radical libre sans trop perdre de leur stabilité. Ils ont donc un effet antioxydant notable.

Tableau 2: Contenu en caroténoïdes ($\mu\text{g}/100\text{g}$) des tomates et du jus de tomate (Canene-Adams, 2005).

μg pour 100 g	Tomates crues	Jus de tomate
β -Carotène	449	270
γ -Carotène	101	0
Lycopène	2573	9037
Lutéine Zéaxanthine	123	60
Phytoène	1860	1900
Phytofluène	820	830

I-2-2- Synthèse des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont synthétisés dans les plastides. Dans les chloroplastes, ils s'accumulent principalement dans les membranes photosynthétiques en association avec les complexes d'absorption de lumière et les centres réactionnels. Dans les chromoplastes des fruits en cours de mûrissement et des pétales des fleurs ainsi que dans les chloroplastes des feuilles sénescents, les caroténoïdes peuvent se retrouver dans les membranes et les corps lipidiques ou dans d'autres structures à l'intérieur du stroma (Curzningham et Gantt, 1998).

Les pigments caroténoïdes liposolubles font partie des nombreux composés produits par la voie de biosynthèse des isoprénoïdes (Fig.6).

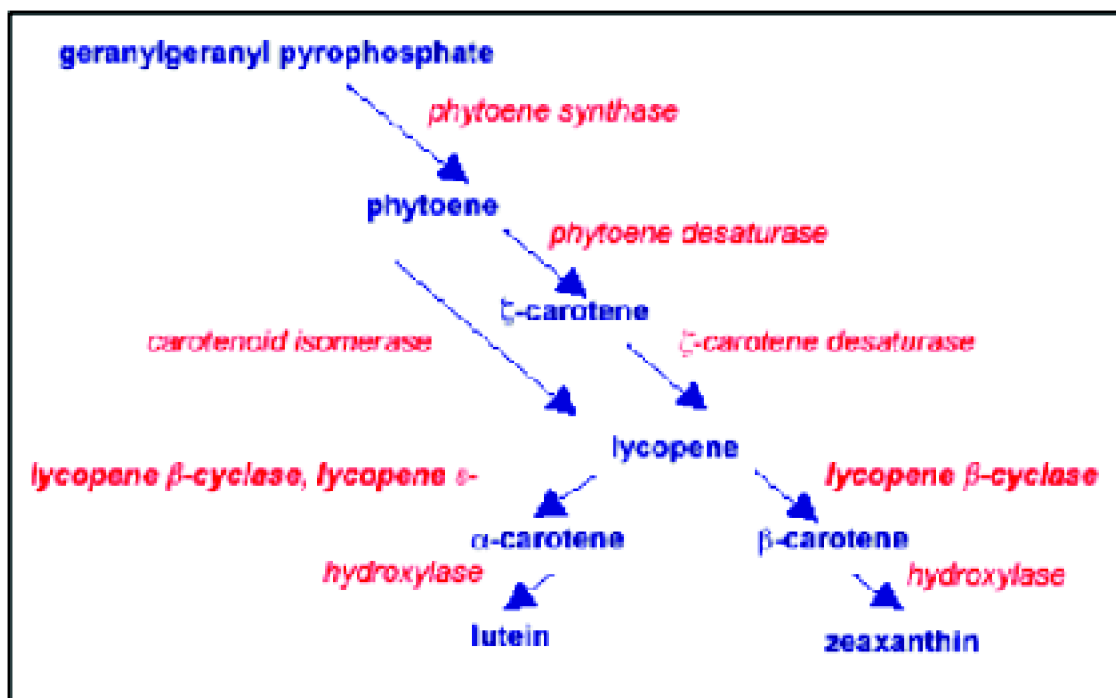


Figure 6: Biosynthèse des caroténoïdes.

I-2-3- Métabolisme des caroténoïdes

Du fait de leur variété biochimique, les différents caroténoïdes ont un mode d'absorption et un métabolisme spécifiques à chacun. Pendant longtemps, les recherches sont restées centrées sur le bêta carotène. Plus récemment, les chercheurs se sont penchés sur les autres caroténoïdes et en particulier sur le lycopène.

Les caroténoïdes diffusent passivement depuis les micelles vers les cellules de la muqueuse intestinale. Là, ils peuvent être convertis en vitamine A, pour les formes provitaminiques ou être pris en charge par des chylomicrons pour atteindre le foie. Du foie, les caroténoïdes peuvent réintégrer la circulation sanguine grâce au transport assuré par les lipoprotéines. Certains caroténoïdes sont préférentiellement pris en charge par les LDL alors que d'autres sont transportés aussi bien par les LDL que les HDL.

Le lycopène, très lipophile à cause de sa structure non polaire, se révèle être uniquement transporté par les LDL, et prend place dans le cœur même de ces lipoprotéines.

Les six principaux caroténoïdes (Fig.7) présents dans le plasma humain (bêta-carotène, alpha-carotène et bêta-cryptoxanthine, lutéine, zéaxanthine et le lycopène) sont transportés par les différentes classes de lipoprotéines (VLDL, LDL, HDL). Les caroténoïdes les moins hydrophobes (xanthophylles) se retrouvent dans les lipoprotéines riches en cholestérol, comme les HDL, alors que les plus hydrophobes (carotènes) se retrouvent dans les lipoprotéines riches en triglycérides (Borel *et al.*, 1999).

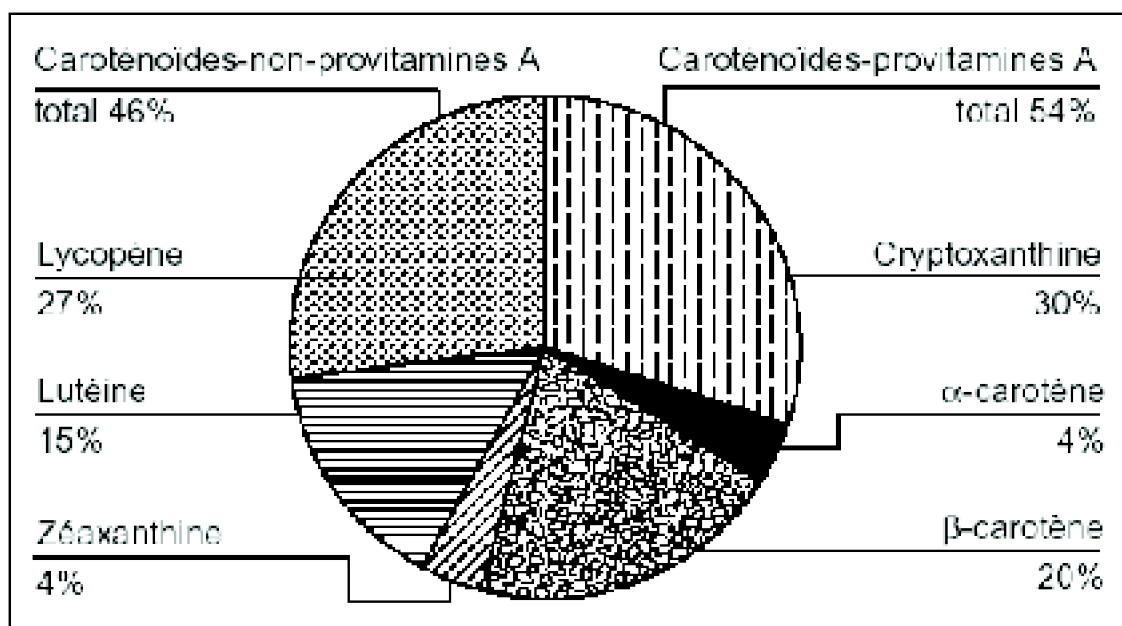


Figure 7: Diagramme circulaire d'une répartition typique des caroténoïdes dans le plasma.

I-2-4- Facteurs affectant la biodisponibilité

Le groupe de Wageningen a inventé un moyen mnémotechnique «SLAMENGI» pour aider à traiter du sujet complexe relatif aux facteurs affectant la biodisponibilité. Celui-ci rappelle le rôle spécifique de chacun de ces derniers (De Pee et West, 1996).

Chaque lettre du mot «SLAMENGI» représente un facteur : S pour *Species of carotenoids* (représente la biodisponibilité de chaque type de caroténoïdes), L pour *molecular Linkage* (Rôle des groupements additionnels parfois greffés sur les caroténoïdes : esters notamment), A pour *Amount of carotenoid consumed in the meal* (pour tenir compte de l'efficacité relative d'absorption en fonction de la quantité de caroténoïdes apportée par repas), M pour *Matrix in which the carotenoid is incorporated* (Tiens compte de l'effet de la matrice (tab.3) dans laquelle est incorporé le caroténoïde), E pour *Effectors of absorption* (Effet des nutriments et des médicaments qui affectent l'absorption), N pour *Nutrient status of the host* (intégration de l'effet du statut de l'individu en caroténoïde ou en vitamine A sur l'efficacité d'absorption), G pour *Genetic factors* (prend en considération les facteurs génétiques), H pour *Host-related factors* (tient compte des facteurs liés à l'hôte : âge, sexe, et pathologies notamment) et finalement, I pour *mathematical Interactions* (qui exprime la synergie pouvant exister entre ces différents facteurs).

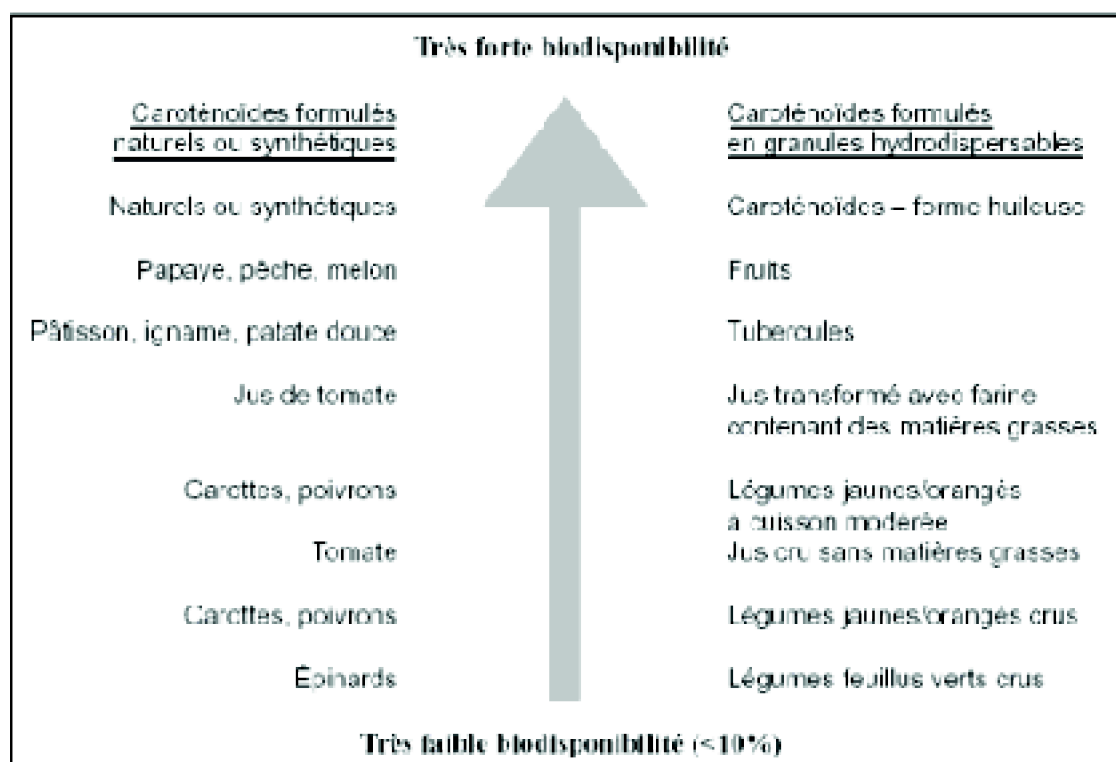


Tableau 3: Effet de la matrice alimentaire et de la transformation sur la biodisponibilité des caroténoïdes (Boileau et al., 1999)

I-2-5- Répartition tissulaire des caroténoïdes

Chez l'homme, les principales réserves de caroténoïdes sont constituées par le tissu adipeux (environ 80% des caroténoïdes totaux) et le foie (environ 10%). Cependant, d'autres organes présentent aussi des concentrations importantes de caroténoïdes, notamment les testicules, les ovaires et les glandes surrénales. Ces organes sont aussi riches en récepteurs LDL. Les variations de la concentration et de la nature des caroténoïdes d'un tissu à un autre suggèrent l'existence de facteurs pouvant jouer un rôle dans leur captation et leur accumulation (Kaplan et al., 1990).

I-2-6- Mise en évidence de l'effet anti-oxydant des caroténoïdes

Des études réalisées in vivo ont montré qu'une supplémentation en caroténoïdes présente un effet bénéfique sur la résistance des LDL. Clausse (2001) et Meydani et al. (1994) ont montré que l'administration du bêta carotène pendant 3 semaines, à une dose de 90 mg/j entraîne une augmentation de la capacité anti-oxydante du plasma par la diminution significative de la formation d'hydroperoxydes et de phospholipides.

I-2-7- Mécanisme d'action des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet (forme très réactive de

l'oxygène) qui s'est formé au cours d'une réaction photochimique en faisant intervenir, au préalable, l'activation d'une molécule sensible (pigment) (Clausse, 2001). L'énergie est transférée de l'oxygène singulet vers le β -carotène, qui se retrouve sous forme excitée à son tour pour retrouver ensuite son niveau énergétique de base en libérant son surplus d'énergie sous forme de chaleur (Volker, 2000). La molécule de caroténoïde reste intacte et inchangée à l'issue de ce processus et peut entamer un nouveau cycle de désactivation. Il a été estimé qu'une molécule de caroténoïde pouvait ainsi désactiver mille molécules d'oxygène singulet avant d'être chimiquement modifiée (Withney et Rolfes, 1993)

I-3- Le lycopène

Le lycopène, membre de la famille des caroténoïdes, est le petit dernier mais certainement pas le moindre, puisqu'il est l'un des plus puissants antioxydants naturels connus à ce jour. Retrouvé principalement dans la tomate, son effet antioxydant est supérieur à celui du bêta-carotène, mais il n'a pas d'activité provitamine A.

I-3-1- Historique de la tomate

La tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Fig. 8) est une plante herbacée qui fait partie de la famille des solanacées comme la pomme de terre, le piment, l'aubergine et le tabac. Elle fut d'abord cultivée au Pérou, pays d'origine de la pomme de terre. La tomate proviendrait d'une solanée sauvage, une «tomate-cerise», qui existe encore au Mexique, dans la région de Veracruz. Les plants étaient semblables à ceux de la vigne et donnaient des petits fruits connus localement sous le nom de «tomalt», l'annexe 1 nous donne sa valeur nutritionnelle.

Plus tard, les indiens du Mexique la cultivèrent parmi les plants de maïs. Les conquérants espagnols découvrirent alors des fruits amers de la grosseur d'une cerise et la rapportèrent en Europe. Il est curieux de noter que ces dernières années, on s'est donné du mal pour créer des «tomates-cerises», alors que celles-ci sont les mères de toutes les tomates !

En 1544, elle était connue en Europe grâce aux écrits d'un certain Mathiolus qui lui trouvait des points communs avec la Mandragore, réputée aphrodisiaque. On la baptisa donc «pomme d'amour». Les italiens l'adoptèrent aussitôt et la nommèrent «pomo d'oro», c'est à dire la pomme d'or, en raison de sa couleur jaune. D'ailleurs, tomate se dit encore aujourd'hui «pomodoro» en italien. Ils la consommèrent dès 1550 alors que les autres pays européens la cultivaient comme plante ornementale et la considéraient encore comme vénéneuse à cause de sa famille (les solanacées comme le tabac).

Au XVIII^e siècle, au sud de Naples, des jardiniers italiens la cultivaient régulièrement et l'appelaient alors «pêche de loup». A la fin de ce siècle apparaissèrent en Italie les premières usines de fabrication de la sauce tomate (Berry Ottaway, 2001). Les italiens mirent 200 ans avant de l'utiliser dans leurs recettes et 300 ans pour obtenir des plants

portant des grosses tomates et ce n'est finalement qu'au début du XX^e siècle qu'elle s'est finalement répandue. C'est donc grâce aux italiens, et non pas aux espagnols qui l'importèrent en Europe, que la tomate s'est répandue à travers le monde pour reconquérir finalement l'Amérique...

Aujourd'hui, la plante tropicale s'est adaptée à des régions plus froides que celles de son pays d'origine et la tomate est cultivée dans les pays chauds ou tempérés du monde entier.

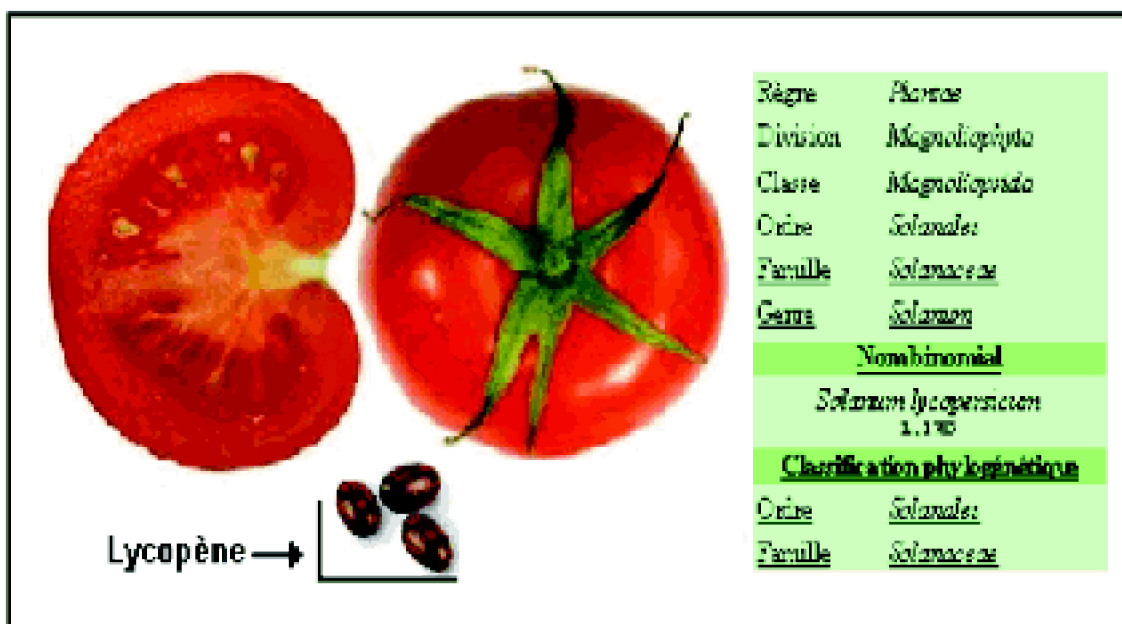


Figure 8: Lycopène et classification de la tomate.

I-3-2- Structure chimique du lycopène

À ce jour, plus de 600 substances caroténoïdes ont été reconnues. Elles existent sous la forme cis ou trans. Dans la tomate fraîche, le lycopène se présente sous la configuration trans, plus stable que la configuration cis. Le lycopène est une substance caroténoïde acyclique de couleur rouge contrairement à la majorité des substances caroténoïdes qui ont une forme moléculaire cyclique. Le lycopène comporte 11 doubles liaisons conjuguées et sa formule est : C₄₀H₅₆ (Clinton, 1998 ; Shie et Le Maguer, 2000). La structure moléculaire particulière du lycopène (Fig. 9) présente une influence sur sa biodisponibilité, son absorption, son transport, sa distribution dans les tissus et ses propriétés antioxydantes.

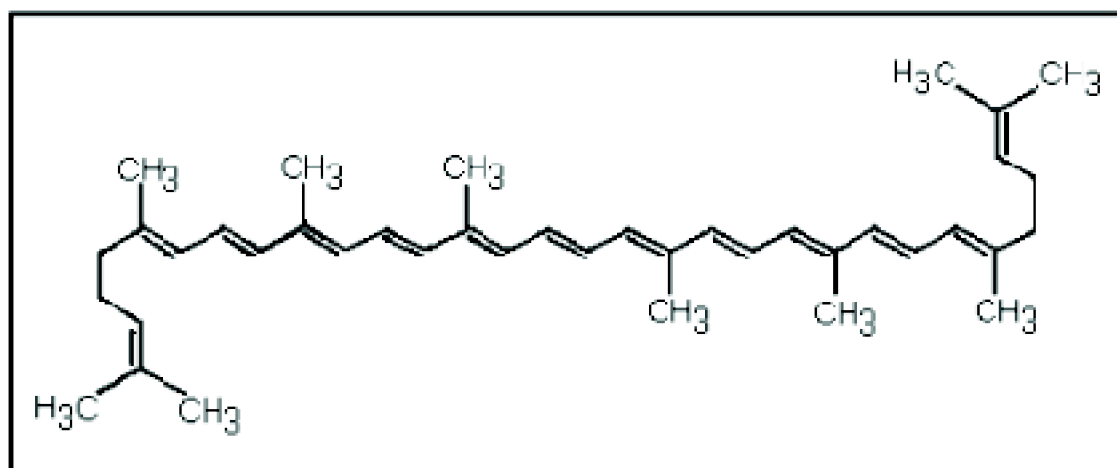


Figure 9: Structure moléculaire du lycopène

I-3-3- Propriétés physico-chimiques du lycopène

Les plus importantes propriétés physico-chimiques du lycopène sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques du lycopène (Shie et Le Maguer, 2000)

Paramètres	Propriétés
Formule brute	$C_{40}H_{56}$
Poids moléculaire	536.85
Couleur	Rouge foncé
Solubilité	Hydrophobe (Méthanol, Ethanol : insoluble dans l'eau et l'alcool), lipophile, soluble dans le chloroforme, acétone, éther et pétrole, benzène.
Sensibilité	Oxygène, lumière, acide, température élevée, ions métalliques.
Absorbance	Longueur d'onde optimale à 471nm.

Les procédés thermiques, tels la cuisson et le blanchiment représentent les principales causes de la perte et du changement de la configuration du lycopène (tab 5). Notons que les isomères cis augmentent avec la température et le temps de transformation de l'aliment (shie et Le Maguer, 2000).

Température (°C)	Perte de lycopène (%)		
	1 min de cuisson	3 min de cuisson	7 min de cuisson
90	0.6	0.9	1.1
110	2.2	3.2	4.4
116	3.7	6.0	8.1
124	5.5	8.5	12.5
130	7.4	11.5	17.1

Tableau 5: Taux de perte du lycopène lors de la cuisson du jus de tomate (Shie, Le Maguer, 2000).

La déshydratation et la fabrication de la poudre de tomate rendent le taux de lycopène instable, contrairement aux procédés de congélation et de stérilisation. Le lycopène est sensible à la lumière, à l'oxygène, aux températures élevées et aux acides. Les ions métalliques, comme le Cu^{2+} et le Fe^{3+} , catalysent son oxydation.

I-3-4- Analyse du lycopène

L'analyse chimique habituelle du lycopène passe d'abord par une extraction de la matrice alimentaire, suivie d'un dosage par spectrophotométrie à 520nm, mais la méthode la plus fiable est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Son extraction se fait à l'aide de solvants organiques et peut être facilitée par un traitement mécanique comme l'agitation, mais lors de cette étape le lycopène peut subir de fortes dégradations dues à la lumière et à l'oxygène.

I-3-5- Les sources alimentaires de lycopène

Plus de 80% du lycopène consommé provient de la tomate et des aliments contenant de la tomate (tableau 6).

L'estimation de l'apport quotidien en lycopène de la tomate et des produits à base de tomates			
Produits	Portion	Apport en lycopène (mg/jour/sujet)	% de l'apport quotidien recommandé en lycopène
Tomates	200 g	12,70	50,5
Sauce à spaghetti	125 ml	2,44	9,7
Pâte de tomate	30 ml	2,29	9,1
Jus de tomate	250 ml	2,20	8,7
Sauce aux tomates	227 ml	1,52	6,0
Purée de tomate	60 ml	1,02	4,1
Soupe aux tomates	227 ml	0,79	3,1
Sauce à pizza	60 ml	0,66	2,6
Ketchup aux tomates	15 ml	0,53	2,1
Cocktail de palourdes	250 ml	0,50	2,0
Sauce Chili	30 ml	0,30	1,2
Mélange à Bloody Mary	156 ml	0,15	0,6
Sauce barbecue	30 ml	0,06	0,2
Total :		25,16	

Tableau 6: Apport, en lycopène, de la tomate et des produits à base de tomate (Agarwal et Rao, 2000).

Le contenu, en lycopène, des tomates dépend en grande partie de la variété de la tomate et de son degré de mûrissement (Clinton, 1998).

Quelques autres aliments de consommation courante contiennent également du lycopène (Tab. 7).

A l'inverse d'autres caroténoïdes, on ne trouve du lycopène que dans un petit nombre de végétaux, principalement les fruits et les légumes de couleur rouge. La tomate et ses produits dérivés (jus, ketchup, sauce tomate, soupe) sont les sources de lycopène par excellence.

Le contenu en lycopène de différents aliments	
Aliments	Contenu en lycopène (mg/100g)
Abricots frais	< 0.01
Abricots en conserve	0.06
Abricots séchés	0.86
Pamplemousse rose frais	3.36
Goyave fraîche	5.4
Jus de goyave	3.34
Melon d'eau	23 à 7.2
Papaye fraîche	2 à 5.3
Tomate fraîche	0.88 à 4.2
Tomate cuite	3.7
Sauce tomate	6.2
Pate de tomate	5.1 à 150
Soupe aux tomates condencée	7.99
Jus de tomate	5 à 11.6
Tomate séchées(dans l'huile)	46.5
Sauce à pizza	12.71
Ketchup	9.9 à 13.44

Tableau 7 : Concentration en lycopène (mg/100g) contenue dans différents aliments (Khachik et al., 2002).

I-3-6- Les niveaux de consommation du lycopène

Le principal apport de lycopène est réalisé par la consommation de la tomate et de ses produits dérivés. On peut considérer que la consommation régulière cumulée de tomates et d'aliments à base de tomate (sous formes de sauces et de concentrés) par rapport à celle de tomates seules est susceptible d'augmenter d'un facteur 10 l'apport journalier en

lycopène. La teneur en lycopène de préparations concentrées est de l'ordre de 20 mg/100 g de produit frais et peut dépasser 40 mg/100 g dans certains cas (Reboul et *al.*, 2005).

Selon plusieurs études, il est difficile d'établir des recommandations de consommation pour la consommation des tomates. Il est toutefois suggéré qu'une consommation de plus de 6 mg de lycopène par jour apporte une protection (Franceschi et *al.*, 1994). Avec une consommation de 6 à 8 mg par jour, on observe une préservation de l'ADN lymphocytaire contre les radicaux libres et une réduction de l'oxydation des LDL.

En pratique une consommation quotidienne d'une portion de produit à base de tomates semble suffisante pour augmenter la concentration de lycopène dans le plasma et les lymphocytes. A l'inverse, ces concentrations diminuent rapidement après une alimentation dépourvue de tomate.

I-3-7- Absorption, transport et métabolisme du lycopène

La biodisponibilité de l'isomère cis dans les aliments est plus grande que celle de l'isomère trans. La transformation des tomates peut améliorer la biodisponibilité et l'absorption du lycopène en augmentant l'isomérisation, mais également en brisant les membranes cellulaires, rendant le lycopène plus accessible. Par captation d'énergie, le lycopène est isomérisé de la configuration trans à la configuration cis, résultant en une molécule plus instable et riche en énergie.

L'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du lycopène diffèrent beaucoup selon les substances caroténoïdes. La plupart des connaissances actuelles dans ce domaine dérivent des recherches effectuées avec le bêta carotène. Les substances caroténoïdes sont fortement liées aux macromolécules dans les aliments. Plusieurs facteurs inhérents aux substances caroténoïdes peuvent rendre difficile leur dissolution dans les gouttelettes de lipide à partir des aliments, dans l'estomac et le duodénum. Les lipides alimentaires jouent un rôle important dans la dissolution des substances caroténoïdes et leur absorption subséquente (Clinton, 1998). Les chylomicrons sont responsables du transport des substances caroténoïdes, de la muqueuse intestinale vers le sang, par le système lymphatique.

Dans le plasma, les substances caroténoïdes sont transportées exclusivement par les lipoprotéines. Le lycopène, substance caroténoïde dominante dans le plasma humain, possède une demi-vie de deux à trois jours dans l'organisme. Il est présent sous forme d'un mélange contenant 50 % de forme cis et 50 % de forme trans (Stahl et Sies, 1992). L'isomère cis présente une meilleure biodisponibilité que le trans, probablement parce qu'il est plus facilement solubilisé par les sels biliaires et ainsi plus facilement incorporé aux chylomicrons (Shie et Le Maguer, 2000).

Le lycopène naturellement présent dans la tomate sous la forme trans est peu absorbé. De récentes études ont démontré que la cuisson et la transformation de la tomate induisaient l'isomérisation du lycopène (Fig.10) sous sa forme cis, ce qui augmente sa biodisponibilité.

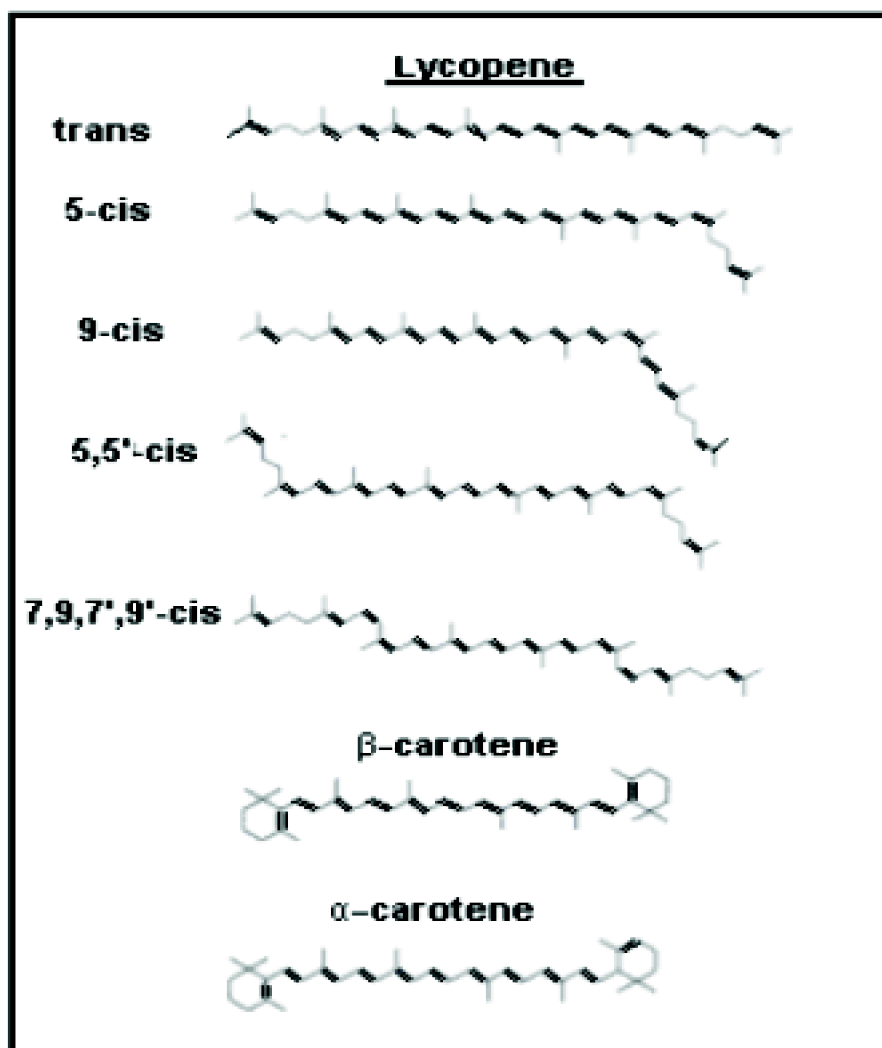


Figure10 : Structure de trois caroténoïdes : β -carotène, α -carotène et les isomères géométriques du lycopène (Ngyuen & Schwartz 1999).

L'absorption du lycopène semble plus importante lorsqu'il est ingéré à petite dose, toutefois la présence du bêta-carotène augmente son absorption (Jackson, 1997). Le contenu en lycopène des aliments constitue un renseignement utile, mais encore faut-il bien connaître sa biodisponibilité et son absorption chez l'humain. Celle-ci peut être affectée par plusieurs facteurs et propriétés des aliments. Parmi ces facteurs, mentionnons le lien avec d'autres molécules, la quantité de lycopène ingérée dans un repas, le type d'aliment dans lequel se trouve le lycopène, l'ingestion simultanée de fibres alimentaires, l'interaction du lycopène avec d'autres substances caroténoïdes ou nutriments, la présence de protéines ou de lipides, la grosseur des particules alimentaires et les facteurs génétiques (Shi et Le Maguer, 2000).

La concentration sérique du lycopène varie, de 50 nmol/L à 900 nmol/L, d'un individu à l'autre (Clinton, 1998). Les déterminants qui influencent la concentration sérique du lycopène ont été peu étudiés par rapport au bêta-carotène. Les données limitées suggèrent que les déterminants du lycopène sont différents de ceux du bêta-carotène. Par exemple, plusieurs études ont rapporté que les fumeurs avaient des concentrations

sériques de bêta-carotène inférieures à celle des non-fumeurs, ce qui ne semble pas être le cas pour le lycopène (Mayne et *al.*, 1999). Par contre, une autre étude indique que l'exposition du plasma à la fumée de cigarette mène à une déplétion de plusieurs antioxydants et il semble que ce soit le lycopène le plus sensible (Clinton, 1998). Les femmes ont généralement une plus grande concentration de plusieurs substances caroténoïdes, notamment les carotènes alpha et bêta, mais cette relation n'est pas constamment observée avec le lycopène.

Plusieurs études ont suggéré que la concentration de lycopène est inversement proportionnelle à l'âge et qu'elle est positivement associée au cholestérol sanguin. Mayne et *al.*, (1999) ont montré que le taux de cholestérol et l'apport en lycopène sont les déterminants les plus importants du taux de lycopène. Plusieurs études apportent une forte association du lycopène avec le cholestérol sanguin ce qui est probablement dû au fait que le lycopène est principalement transporté dans les lipoprotéines de basse densité, celles-ci étant le transporteur principal du cholestérol (Mayne et *al.*, 1999).

Dans le sérum et les tissus humains, plus de 50 % du lycopène se retrouve sous la configuration *cis*. Ce changement de structure implique également un changement de l'activité biologique (Shi et Le Maguer, 2000). Cependant, certains indices laissent croire que l'isomérisation (Fig. 9) peut avoir lieu lors du métabolisme dans le corps. De fortes concentrations d'isomères *cis* ont été observées dans le sérum et dans des tissus prostatiques suggérant que l'isomérisation du lycopène de sa forme *cis* à sa forme *trans* puisse se faire *in vivo* au niveau des tissus. Il a été récemment démontré que la concentration du lycopène au niveau du sérum et des tissus de la prostate était significativement plus basse chez les patients atteints de cancer de la prostate que chez des patients de même âge en bonne santé. Les auteurs suggéraient donc que les patients souffrant d'un cancer de la prostate ont un trouble d'isomérisation du lycopène alimentaire, ce qui diminue son absorption (Rao et Agarwal, 2000).

I-3-8- Les concentrations tissulaires de lycopène

Les teneurs en lycopène varient selon les tissus (Tab.8). Le tissu hépatique peut contenir jusqu'à 10 mg/g (soit 18 $\mu\text{mol/g}$) de lycopène. C'est la localisation tissulaire la plus importante après le tissu adipeux. La prostate en contient de faibles quantités, 400 fois moins que le foie chez le chien beagle (Korytko et *al.*, 2003), et moins de 1 $\mu\text{g/g}$ (soit environ 2 nmol/g) chez l'homme (Chen et *al.*, 2001).

QUANTITE DE LYCOPENE DANS LES TISSUS HUMAINS				
Tissu	Stahl et al. (1992)	Kaplan et al. (1990)	Nirenberg & Nann (1992)	Schmitz et al. (1991)
Foie	1.28	2.45		
Rein	0.15	0.39		5.72
Surrenales	1.90	21.60		0.62
Testicules	4.34	21.36		
Ovaries	0.25	0.28		
Tissu Adipeux	0.20	1.30		
Poumon			0.22	0.57
Colon			0.31	
Sein			0.78	
Peau			0.42	

Tableau 8: Quantité de lycopène (nmol/g) dans les tissus humains

I-3-9- Le lycopène et le cancer

De nombreuses études montrent une corrélation inverse entre la consommation de tomates et la survenue de divers cancers et des maladies cardiovasculaires (Slattery et al. 2000 et Thomas J.A. 1999).

Comme toujours il s'agit de corrélations et non de relations "de cause à effet ». Le lycopène inhibe la croissance de cellules cancéreuses en culture. Il induit la formation de "gap junctions", améliorant ainsi la communication entre les cellules, ce qui peut représenter un mécanisme protecteur contre le cancer, indépendamment de ses propriétés antioxydantes. En revanche, ce sont ces dernières qui sont à l'origine de l'effet cardioprotecteur du lycopène qui réduirait l'oxydation des LDL athérogènes (Bramley, 2000).

En Iran, des chercheurs ont rapporté que la consommation de tomates était associée à une diminution du risque de cancer de l'œsophage de 40 %. De même, une étude réalisée en Italie a démontré une corrélation inverse significative entre la consommation de tomates et la survenue des cancers de l'estomac.

Des chercheurs de l'Université de Berne rapportent que, in vitro, le lycopène, associé à de la vitamine E, inhibe la croissance de deux types différents de cellules cancéreuses de la prostate. Lorsqu'il est seul, le lycopène ne semble pas avoir cet effet (Giovannucci , 1995).

De nombreuses études ont suggéré un effet protecteur du lycopène vis-à-vis d'un certain nombre d'autres cancers (Cooper et al., 1999), mais de façon générale, la littérature est peu unanime.

Les relations entre statut nutritionnel et fonction immunologique ont été bien documentées (Chandra, 1991). Les expérimentations animales ont montré que les caroténoïdes pouvaient influencer les lymphocytes T et B, les cellules tueuses (K) et les

macrophages ; le lycopène en particulier, peut stimuler le système immunitaire (Kobayashi, 1996).

Des chercheurs ont montré que des patients atteints du virus VIH présentaient des déficiences en micronutriments (même pour ceux ayant un apport alimentaire correct) et plus particulièrement en caroténoïdes (Semba et Graham ,1993 ; Sappey, et al., 1994 ; Coodley et al. ,1995 ; Periquet et al. , 1995)

Chez des femmes séropositives, les teneurs en lycopène, alpha et bêta carotènes du sérum étaient significativement plus basses que dans le groupe témoin

I-4- Les radicaux libres, une conséquence du métabolisme de l'oxygène

L'oxygène est indispensable aux processus vitaux et notamment à la respiration cellulaire. Toutefois, le métabolisme de l'oxygène peut générer des éléments réactifs appelés radicaux libres, notamment l'ion superoxyde (O_2^-) et l'ion hydroxyle (OH^-). Ces composés chimiquement instables sont porteurs d'électrons libres qui réagissent avec d'autres molécules, les déstabilisant à leur tour, et induisant ainsi une réaction en chaîne. Les radicaux libres provoquent notamment des dommages sur l'ADN, les protéines cellulaires essentielles et les lipides membranaires (péroxydation lipidique), pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire.

Dans les conditions dites « physiologiques », il y a équilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes endogènes de défenses antioxydantes (Fig.11).

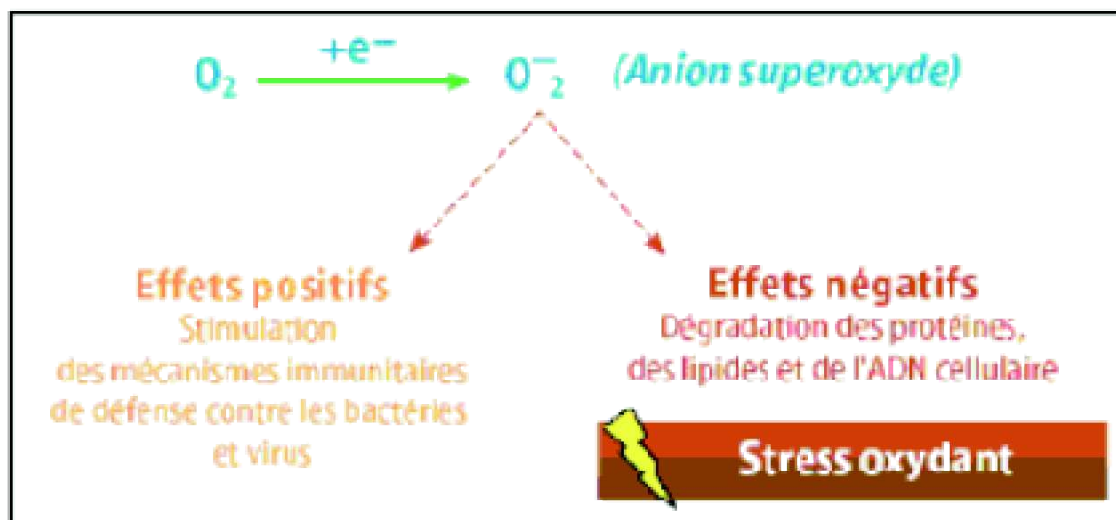


Figure11 : Effets des radicaux libres.

Ces mécanismes impliquent principalement des enzymes spécifiques (superoxyde dismutase ou SOD, catalase, glutathion peroxydase ou Gpx), ainsi que des molécules antiradicalaires «scavengers», qui piègent les radicaux libres (vitamines antioxydantes A,

C, E, thiols, lycopène et β -carotène) (Vouldoukis et al., 2004). Cependant, certaines conditions s'accompagnent d'une production accrue de dérivés instables d'oxygène : métabolisme des sucres au cours de l'effort physique, métabolisme des graisses, réponse immunitaire notamment vis-à-vis des infections microbiennes, exposition à des rayonnements, pollution, tabagisme... Par ailleurs, des études épidémiologiques indiquent que les niveaux de défenses antioxydantes diminuent avec l'âge lorsque les systèmes de défenses antioxydantes sont dépassés, il en résulte un stress oxydatif (excès de radicaux libres) qui, à long terme, peut contribuer au développement de processus inflammatoires ou dégénératifs.

On connaît le rôle important du stress oxydatif dans de nombreuses pathologies : maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, de Parkinson), athérosclérose, arthrite rhumatoïde et même certains cancers (Fig.12). Il est également acquis que les radicaux libres contribuent au vieillissement de l'organisme. On assiste donc actuellement au développement de nombreux produits antioxydants (aliments et médicaments). Cependant, bon nombre d'entre eux présentent une faible bioactivité par voie orale, ce qui limite leur efficacité. En outre, les substances présentes sur le marché sont destinées à corriger un éventuel déficit et ne permettent pas spécifiquement de stimuler les défenses antioxydantes endogènes.

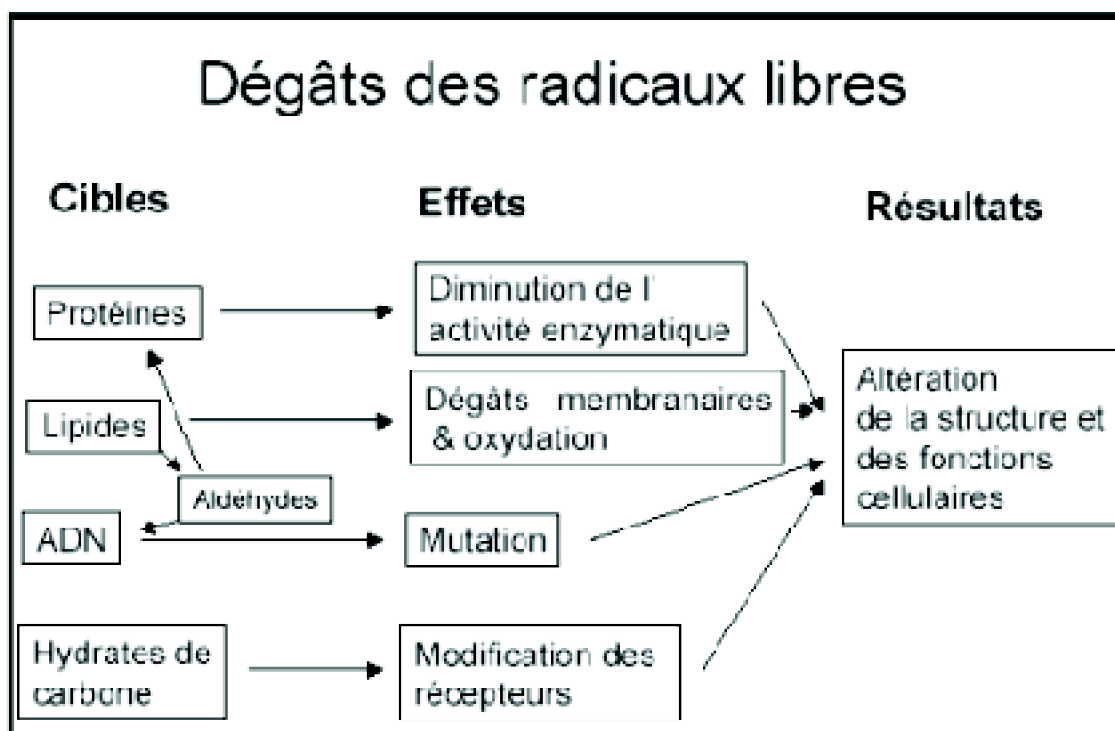


Figure12: Dégâts causés par les radicaux libres

I.4.1. Formation de radicaux libres par voie exogène

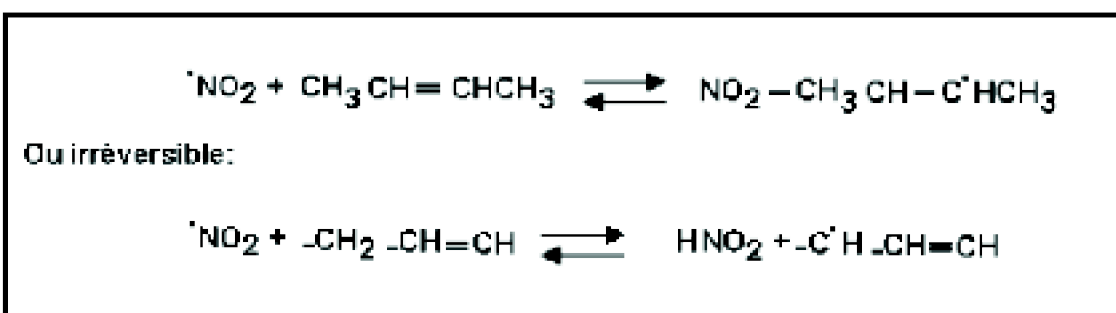
L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , O_2^{\cdot}) et de molécules génératrices de radicaux libres (H_2O_2) par

l'intermédiaire d'agents photosensibilisants. Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

Par exemple, l'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d'O₂. L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPHoxydase, NADPHcytochrome réductase, et du cytochrome P450. Enfin, Schisler et Singh (1989) ont montré que l'alcool pouvait diminuer l'activité des enzymes de protection (SOD-GSH-Px). De même, les concentrations sériques en sélénium et vitamine E sont abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère.

Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse de radicaux libres : ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras poly insaturés des alvéoles pulmonaires.

La réaction peut être réversible :



Ils peuvent aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux $\dot{\text{O}}\text{H}$.

La fumée de cigarette joue un rôle majeur dans la formation de ces espèces radicalaires : elle contient l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), renferme de fortes concentrations en composés insaturés et stimule, par son action irritante, les macrophages des alvéoles pulmonaires.

D'autres toxiques agissent par transfert d'électrons. Il en est ainsi du tétrachlorure de carbone (CCl₄), utilisé dans notre expérimentation, dont la toxicité s'exerce par l'intermédiaire des radicaux CCl₃[•] et mis en évidence dans des hépatocytes de rat par résonance paramagnétique électronique (RPE). La réduction de CCl₄ en CCl₃[•] s'effectue, soit sous l'action du cytochrome P450 hépatique $\text{CCl}_4 + \text{e}^- \rightarrow \text{Cl}^- + \text{CCl}_3^\bullet$, soit en présence de fer ferreux ($\text{CCl}_4 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{Cl}^- + \text{CCl}_3^\bullet$). Knecht et Mason, (1988), ont montré que le CCl₃[•] était capable d'induire l'auto oxydation des acides gras poly insaturés, et donc de provoquer une augmentation importante des hydro peroxydes lipidiques.

1.4.2. Facteurs contribuant à augmenter le stress oxydant

Un stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les

antioxydants et les pro-oxydants en faveur de ces derniers. In vivo, plusieurs systèmes biochimiques peuvent être à l'origine d'une production accrue d'EOA (espèces oxygénées activées). L'altération de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie est une première cause de l'augmentation du stress oxydant. Ce phénomène se produit lors du processus du vieillessement ou de toute situation caractérisée par un phénomène d'ischémie – reperfusion (la transplantation d'organes). L'activation des globules blancs est également une source très importante de réduction d'EOA. Sous l'action d'agents étrangers, dans notre cas le CCl_4 , ces cellules passent d'un état quiescent à un état activé, ce qui se traduit par une augmentation de 400% de la consommation en oxygène. Divers systèmes enzymatiques transforment la quasi-totalité de l'oxygène en EOA qui peuvent alors s'attaquer à des tissus sains : c'est le phénomène de l'inflammation.

L'environnement dans lequel nous vivons mais aussi notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation du stress oxydant dans notre organisme. En voici quelques exemples :

- Exposition prolongée au soleil
- Exposition aux radiations
- Contacts avec des agents cancérigènes (amiante) et pesticides
- Tabagisme (la fumée de cigarette contient 1019 EOA)
- Prise de médicaments, pilule contraceptive
- Pratique trop intense ou mal gérée d'un sport
- Consommation excessive d'alcool
- Stress intellectuel
- Pollution
- Agents infectieux

I-4-2-1- Une alimentation déséquilibrée : un important facteur de stress oxydant

Les antioxydants sont essentiellement apportés par les fruits et légumes qui sont particulièrement riches en vitamines (A, C, E), oligo-éléments et autres polyphénols. Actuellement, il est bien admis que les apports journaliers recommandés (AJR) en ces divers éléments peuvent être couverts par une prise quotidienne de cinq portions de fruits et légumes. Cette situation est toutefois loin de représenter la réalité puisque plusieurs enquêtes épidémiologiques indiquent que plus de 20% de la population des pays industrialisés, par exemple, ne mangent jamais de fruits. Dans une étude menée sur 123 sujets sains habitant la région liégeoise (Belgique), il a été montré que les taux plasmatiques de vitamine C sont diminués en moyenne de 26,3% chez des sujets ne mangeant aucun fruit en comparaison à des personnes ingérant entre un et quatre fruits par jour (Pincemail et al., 2000). Par ailleurs, l'avènement du fast-food contribue, tout particulièrement chez les jeunes, à avoir une alimentation de plus en plus déséquilibrée et appauvrie en antioxydants.

I.4.3. Le système enzymatique, un moyen de défense endogène

Ce sont les enzymes présentes naturellement chez l'animal qui ont pour rôle de protéger les cellules et les tissus contre l'agression radicalaire. Parmi ces enzymes, on distingue la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase et la catalase (Claude, 2001). Ces enzymes n'agissent pas en tant que capteur de radicaux libres mais sont capables d'empêcher leur formation en détournant les réactions chimiques responsables de l'apparition de ces radicaux.

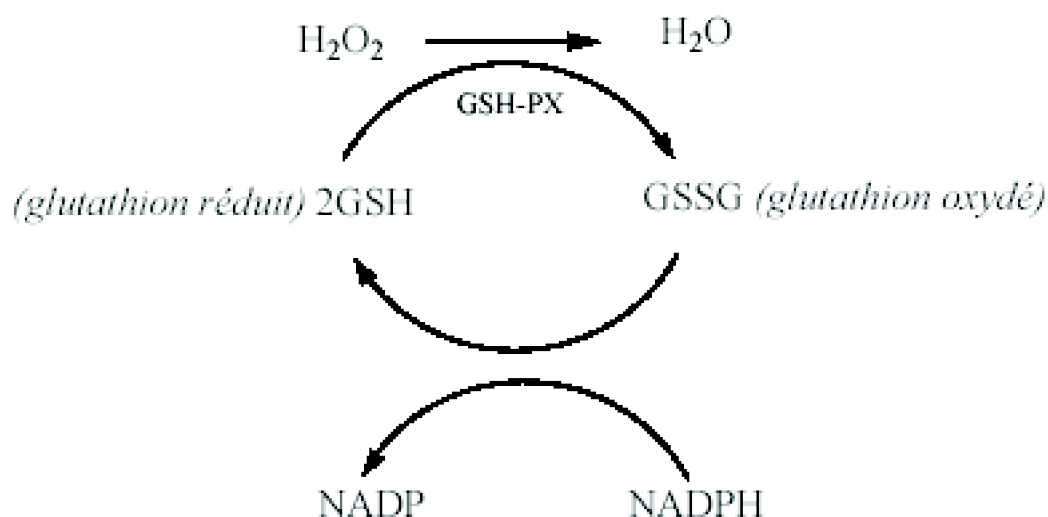
Deux formes de superoxyde-dismutases (SOD) se rencontrent chez les eucaryotes. La plus importante présente dans le cytoplasme de toutes les cellules, a pour cofacteurs le cuivre et le zinc (CuZn-SOD). L'autre enzyme a pour cofacteur le manganèse (Mn-SOD). Elle est située dans les mitochondries. Les superoxyde-dismutases exercent une action cellulaire protectrice en catalysant la dismutation de l'anion superoxyde. Leur localisation explique que les membranes externes et les espaces interstitiels sont moins bien protégés que les structures intracellulaires.

Les glutathion peroxydases (GSH-Px) sélénio-dépendantes sont des protéines qui contiennent quatre atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme sous forme de sélénocystéine. Un déficit en sélénium entraîne une chute de l'activité de l'enzyme. Avissar et al. (1989) ont, à partir de cultures cellulaires, individualisé deux formes de GSH-Px qui diffèrent par leur structure, leur activité et leurs sites antigéniques :

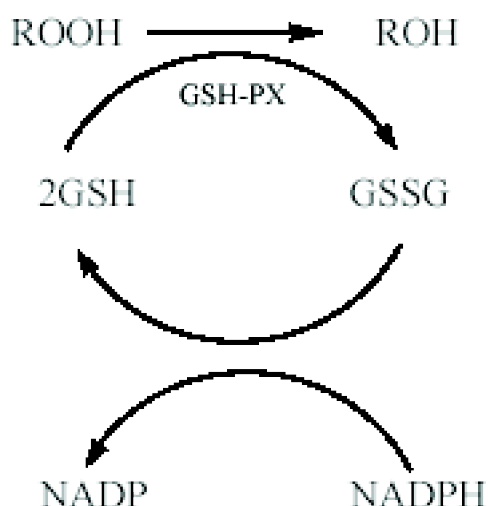
- une forme à localisation intracellulaire
- une forme glycosylée riche en ponts disulfures, à localisation extracellulaire.

Les GSH-Px ont une action détoxifiante vis-à-vis de deux substrats :

- le peroxyde d'hydrogène :

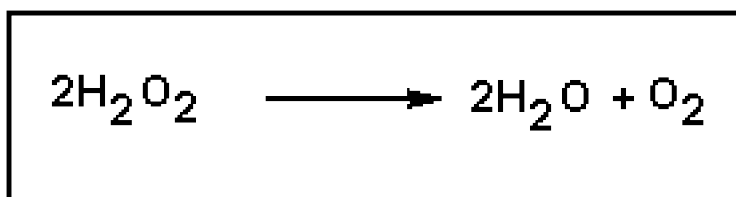


- les hydroperoxydes (ROOH) dérivés des lipides:



L'activité de détoxification des glutathion-peroxydases face aux hydroperoxydes nécessite une autre enzyme, la phospholipase A₂ (PLA₂). Cette dernière libère les peroxydes d'acides gras des membranes cellulaires en hydrolysant les fonctions esters des phospholipides membranaires. Les peroxydes libérés dans le cytosol sont alors transformés par les glutathion-peroxydases tandis que la chaîne d'acides gras manquante est resynthétisée.

La catalase permet de métaboliser le peroxyde d'hydrogène :



Elle est localisée dans les peroxysomes des cellules, mais son rôle semble mineur par rapport à celui de la glutathion peroxydase pour prévenir la peroxydation lipidique. Son affinité pour le peroxyde d'hydrogène est inférieure à celle de la glutathion peroxydase.

I.4.4. Les moyens de défense exogènes

Toute substance capable de capter l'électron célibataire d'un radical libre, sans donner elle-même un produit radicalaire, est défini comme un piègeur de radicaux libres. Ces piègeurs se caractérisent par leur affinité élevée pour les radicaux libres et leur spécificité pour certains d'entre eux. Il existe des « piègeurs occasionnels » de radicaux libres. Ce sont des molécules endogènes qui captent les électrons célibataires aux dépens de leur propre intégrité, comme par exemple les acides gras insaturés, les fonctions thiols de protéines, l'ADN et les acides aminés phénoliques. Les autres principaux piègeurs sont les chélateurs du fer et du cuivre et les antioxydants comme les caroténoïdes, l' α -tocophérols, la vitamine C et les flavonoïdes.

I-5- Le foie et ses fonctions

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme. Il est composé de 70% de cellules parenchymateuses ou hépatocytes et de 30% de cellules diverses telles les cellules de Ito, les cellules composant les canalicules biliaires et les cellules de Kuppfer (Fig.13).

L'une des fonctions fondamentales du foie est d'assurer la sécrétion et l'évacuation de la bile par les canalicules biliaires. D'autre part, la vascularisation du foie et sa situation privilégiée de relation entre l'appareil digestif et l'appareil circulatoire permet de réguler la distribution de nombreux métabolites issus de la nutrition.

Le foie est également capable d'assurer un grand nombre de fonctions métaboliques tels que la synthèse des protéines plasmatiques et des lipides, la synthèse de l'urée, le stockage et la libération du glucose dans le sang, la production de substrat à haut potentiel énergétique, mais aussi le stockage de nombreuses vitamines.

Enfin, le foie joue un rôle central au cours du processus de détoxification. C'est cette fonction qui présente une relation étroite avec le présent travail.

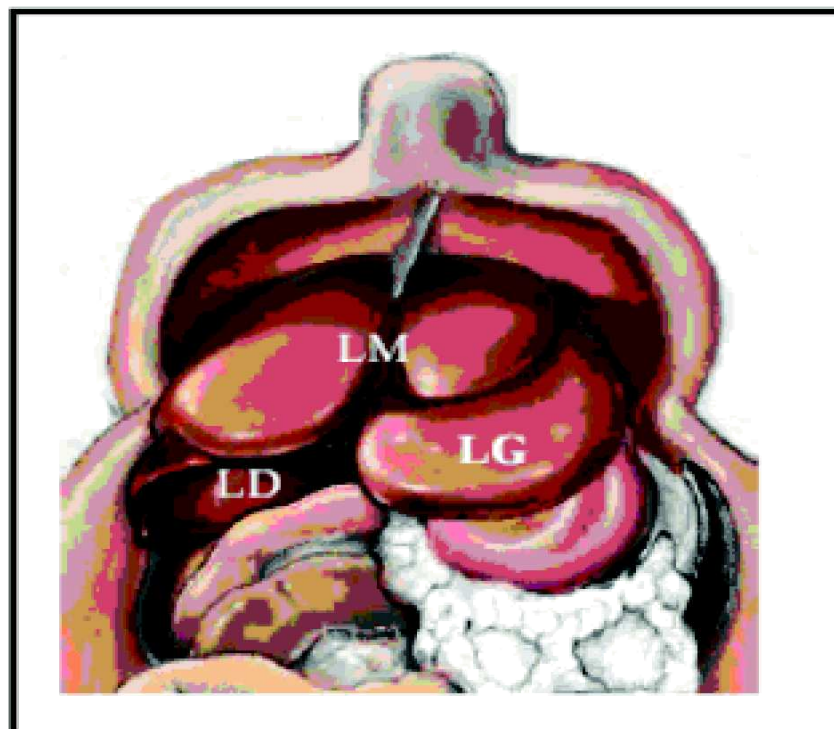


Figure 13 : Vue supérieure d'un foie de rat

LG : Lobe gauche, M : Lobe médian

LD : Lobe droit

I-5-1- Les systèmes de détoxification

De par notre environnement, nous sommes amenés à être exposés quotidiennement directement ou indirectement à des substances exogènes d'origine diverses, rassemblées sous le terme de xénobiotiques. Ces composés regroupent des produits naturels, des médicaments et des polluants de l'environnement : toxines végétales et animales, dérivés des combustibles domestiques et industriels, solvants, colorants, additifs alimentaires, pesticides, herbicides, etc. Ces molécules ont pour tendance naturelle de s'accumuler dans les phases lipidiques des membranes cellulaires. Elles entraîneraient ainsi une mort inéluctable des organismes si ceux-ci ne s'étaient dotés au cours de l'évolution, de systèmes enzymatiques permettant leur élimination. Le processus de détoxification se déroule selon trois phases regroupant différentes enzymes de biotransformation (phase, 1 et 2) et des transporteurs (phase, 3) (Fig.14).

Les réactions de la phase, 1, dites de fonctionnalisation, permettent l'introduction d'une fonction chimique nouvelle (-OH, NH₂, COOH) rendant la molécule plus polaire. Le plus souvent ces réactions sont des réactions d'oxydation, catalysées par les cytochromes P450, mais elles comportent également des réactions d'hydrolyse et de réduction.

Les réactions de la phase, 2, dites de conjugaison, permettent l'ajout d'un radical hydrophile et sont réalisées soit directement sur le xénobiotique inchangé, soit sur les métabolites « fonctionnalisés » générés par la phase, 1. Ces réactions de conjugaison augmentent l'hydrophilie de la molécule, facilitent son transport et activent son élimination hors des cellules.

Les enzymes de la phase, 3 permettent l'élimination des conjugués hydrophiles. Ce sont essentiellement des glycoprotéines membranaires permettant le transport actif des xénobiotiques et des conjugués de la phase, 2 hors de la cellule. Ils participent à l'excrétion hors de ces molécules par la voie biliaire et sont à l'origine de résistances multiples car ils diminuent la quantité de médicaments présente dans la cellule.

Toutefois le métabolisme des xénobiotiques ne conduit pas toujours à la détoxification de ces composés. Dans certains cas, le produit oxydé ou réduit peut manifester une très forte réactivité par attaque électrophile ou nucléophile des macromolécules environnantes (protéines, acides nucléiques).

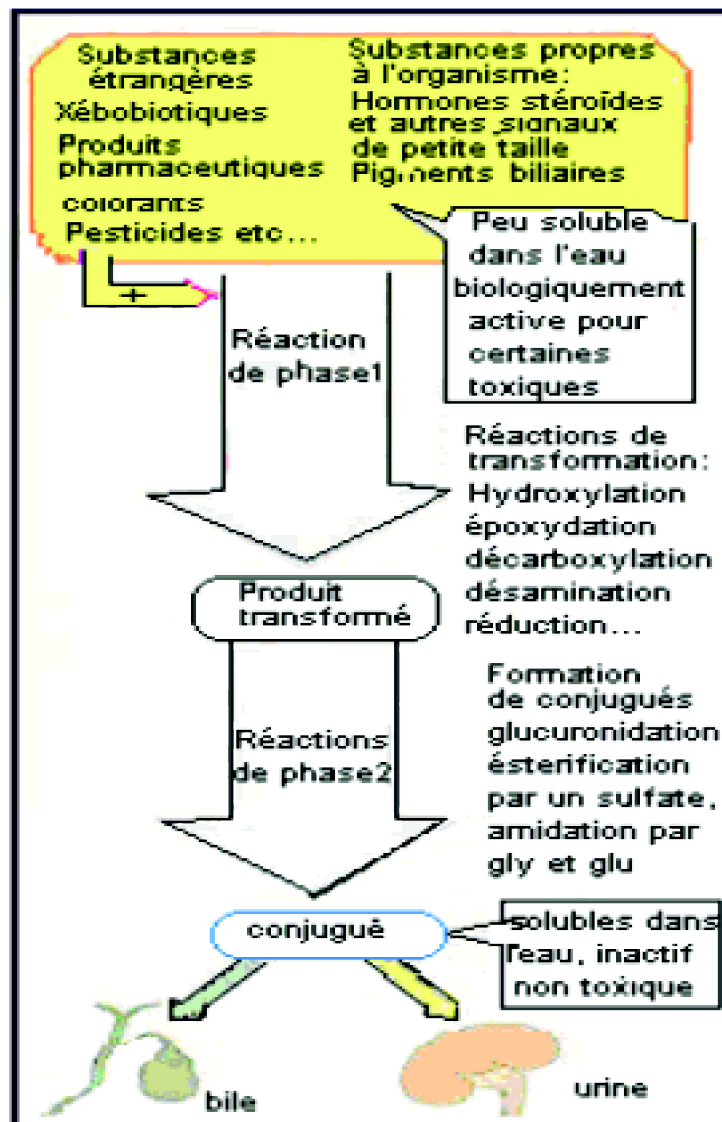


Figure 14: Etapes schématisées de la biotransformation et détoxification des xénobiotiques et substances endogènes (D'après Koolman et Röhm, 1994).

I-5-2- Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 sont sans conteste les enzymes clés de la fonction de la détoxification. Ils composent une famille multi-génique de mono-oxygénases localisés sur le réticulum endoplasmique. Ils ont acquis au cours de l'évolution des espèces un degré de diversité leur permettant de métaboliser d'innombrables corps chimiques. Compte tenu de leur capacité métabolique mais également de leur potentiel d'activation chimique permettant de générer des métabolites toxiques, on comprend ainsi tout l'intérêt qu'ils suscitent.

I-5-3- Approche biochimique de la pathologie hépatique

Un bilan hépatique consiste à doser un certain nombre d'enzymes ou de substances transformées ou fabriquées en totalité ou en partie par le foie, afin d'apprécier le bon fonctionnement de ce dernier ou du métabolisme hépatique.

I-5-3-1- Indice de captation, conjugaison, et excrétion hépatique : La bilirubine

La bilirubine est un pigment présent dans la bile et, à plus faible concentration, dans le sang. On distingue deux fractions de la bilirubine : la bilirubine libre et la bilirubine conjuguée, c'est-à-dire transformée par le foie, avant d'être éliminée dans les urines.

I-5-3-2- Indice de lésions hépatocellulaires

I-5-3-2-1- Aspartate aminotransferase (ASAT)

Elle est également appelée transaminase oxaloacétique glutamique (GOT ou SGOT). Elle est localisée dans le foie, le muscle, le rein, le cœur (également pas de spécificité d'organe). Elle est localisée dans le cytoplasme et les mitochondries de nombreux tissus comme le foie, le myocarde, les muscles squelettiques et les globules rouges.

I-5-3-2-2- Alanine aminotransferase (ALAT)

Elle est également appelée transaminase glutamique pyruvate (GPT ou SGPT). Elle est abondante dans le foie et dans le rein. Le sérum normal en contient peu.

I-5-3-2-3- Lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH, également appelée lactate déshydrogénase, est une enzyme cytoplasmique présente dans de nombreux tissus. Elle n'est pas spécifique du foie, mais la détermination des isoenzymes permet d'augmenter cette spécificité.

I-5-3-3- Indice de lésions canalaire ou enzyme de cholestase

I-5-3-3-1- Phosphatase alcaline (PAL)

La phosphatase alcaline, est une des métallo-enzymes contenant du zinc. Elle est dimérique et elle hydrolyse les esters phosphoriques à pH alcalin.

I-5-3-4- Indice de synthèse hépatique

Le foie synthétise de très nombreuses protéines circulantes. Leur concentration ne dépend pas seulement de ce niveau de synthèse, mais aussi de nombreux facteurs extra hépatiques : demi vie des protéines individuelles, leur catabolisme, leur volume de distribution.

I-5-3-4-1- L'albumine

L'albumine est le marqueur nutritionnel le plus anciennement utilisé. Elle a une bonne spécificité à part quelques exceptions (syndrome néphrotique, entéropathies exsudatives,...). C'est une protéine de transport (métaux, acides gras, bilirubine...) qui est responsable de 80% de la pression oncotique. Son renouvellement presque exclusivement hépatique est assez lent.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre, nous présenterons les différents matériels et méthodes utilisés dans l'analyse, des échantillons de sang et d'organes, prélevés après chaque sacrifice des rats ainsi que les conditions d'élevage de ces derniers.

II-1- MATÉRIELS

Les matériels utilisés dans la réalisation des analyses sont composés de réactifs, solvants, d'appareillage ainsi que des conditions matérielles d'élevage.

II-1-1- Réactifs et solvants utilisés

Les réactifs et les solvants les plus importants, utilisés dans notre expérimentation, sont : Le toluène, le xylène, l'alcool, l'hématoxyline de Haris, l'acétonitrile, l'éthanol absolu (Panreac Quimica), le dichlorométhane, l'héxane (Prolabo), le Eukitt (Laboratoire de France), le baume d'inclusion pour technique histologique, l'érythrosine (Fluka Chemika), le carbonate de lithium pur (Li_2CO_3) (Windsor laboratories limited) et enfin l'éther. Notons aussi que tous les réactifs utilisés dans notre étude sont de grade analytique ou HPLC.

II-1- 2- Appareillage

Les différents types d'appareils utilisés dans le cadre de cette étude peuvent être listés comme suit :

- Appareil Cobas integra 400 plus
- Appareil pour enrobage (Leica EG 1160)
- Appareil à circulation (Leica TP 1020)
- Appareil à coloration (Sakura Tokyo)
- Affûteuse (pour aiguiser les couteaux) (Leica SP 9000)
- Bain thermo staté réglé à 42°c (Leica HI 1210)
- Colonne (Supelco Discovery C18,5µm (0.25x4.6mm))
- Détecteur (Water996 photodiode Array decteur)
- Etuve (Sakura)
- Plaque chauffante (IKA-Combimag RCT)
- Plaque réfrigérante (Leica EG 1150c)
- Pompe (Waters 600 controller)
- Microtom (Leica RM 2135)
- Centrifugeuse
- Microscope photonique muni d'une camera numérique (olympus)
- Réactifs et matériels pour le sacrifice :
- Matériels chirurgicaux (scalpel, ciseaux, pince, etc.)
- Balance analytique
- Vortex (Hanna instruments)

II-1-3- Matériels biologiques

II-1-3-1- Choix des animaux

L'animal idéal est celui qui présente une absorption, un métabolisme, une excrétion et une organisation des tissus comparables à celle des humains. L'éventail des animaux répondant à ces critères est réduit par les difficultés matérielles liées à leur coût, disponibilité, etc. Ceci fait que les rongeurs (rats, souris, hamsters) sont devenus les espèces primaires les plus utilisées dans les études et expérimentations. Dans notre cas nous avons choisi des rats blancs (*Ratus norvegicus*, souche Wistar) de sexe mâle originaires de la firme IFFA-CREDO (France) et produits par l'Unité de Recherche en Médicaments et Techniques Pharmaceutiques (URMTP) du Centre de Recherche et Développement (CRD/SAIDAL). Nous avons choisi exclusivement des rats mâles pour

exclure toute variation métabolique d'origine hormonale.

L'élevage de ces animaux a été réalisé dans un local d'espace moyen (animalerie) dont la construction des murs et du sol facilite le nettoyage et la désinfection. Les dimensions de ce dernier sont les suivantes :

- Longueur : 6m
- Largeur : 3.15m
- Hauteur : 2.19m

Les caractéristiques du milieu ambiant de l'animalerie sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 9 : Paramètres du milieu ambiant de l'animalerie (U.R.M.T.P-SAIDAL)

Température	Ventilation	Humidité (%)	Eclairage	Bruit
22°C régulée par climatiseur	Fenêtre (2.05m x 2.6m) Ventilation	55% ± 10%	12h/24h Naturel et artificiel	Allées et venues limitées dans l'animalerie

II-1-3-2- Répartition des lots

L'expérimentation que nous avons menée porte sur vingt quatre (24) rats âgés entre cinq (05) et sept (07) semaines dont le poids varie de 60 à 90 gr. Ces rats sont répartis en quatre lots identiques de 6 rats chacun.

II-1-3-3- Traitements administrés

Les rats du premier lot (Lot 1) ont été considérés comme témoins et n'ont reçu, quotidiennement, que de l'huile de paraffine (1ml).

Les rats du second lot (Lot 2) ont reçu une supplémentation quotidienne en lycopène à raison de 5 mg/kg de poids corporel, dans l'huile de paraffine.

Les rats du troisième lot (Lot 3) ont reçu de l'huile de paraffine (1ml). Ceux qui doivent être sacrifiés, ont reçu une dose de tétrachlorure de carbone (CCl₄) de 2ml/kg de poids corporel dans une solution à 30% d'huile de paraffine, 24 h avant leur sacrifice.

Les rats du quatrième lot (Lot 4) ont reçu la même supplémentation que ceux du lot 2. Ceux qui doivent être sacrifiés ont, en plus, reçu une dose de tétrachlorure de carbone (CCl₄) de 2 ml/kg de poids corporel, dans une solution à 30% d'huile de paraffine, 24h avant leur sacrifice.

Notons que la supplémentation a duré 43 jours et les sacrifices ont eu lieu tous les 15 jours (02 rats de chaque lot). Tous les rats ont reçu un régime standard durant la durée de l'expérimentation et ont eu un accès libre à l'eau. Tous les rats à sacrifier sont isolés dans d'autres cages, 24 h avant le sacrifice. Ils sont pesés, étiquetés et laissés à jeun. Le tableau suivant permet de récapituler le traitement administré aux rats durant les 43 jours de l'expérimentation.

Tableau 10 : Traitements administrés aux rats suivant les lots et nombre de rats sacrifiés périodiquement par lot.

Numéro du lot	1	2	3	4
Supplémentation	Régime stand. Huile de paraffine	Régime standard lycopène	Régime standard CCl ₄	Régime standard CCl ₄ + Lycopène
Socrifice1 (15j)	2/6	2/6	2/6	2/6
Socrifice 2 (29j)	2/4	2/4	2/4	2/4
Socrifice3 (43j)	2/2	2/2	2/2	2/2

Le lycopène, administré aux rats des lots 2 et 4, est un antioxydant naturel extrait de la tomate. Il se présente sous forme de pastilles de 10mg (lyc-o-mato). Ce dernier est un extrait naturel de tomate, riche en lycopène et autres molécules bio actives naturelles, contenant une mixture de lycopène oléorésine, de l'huile d'olive, de la gélatine, de la glycérine, de la lécithine de soja et du caramel comme colorant.

Les solutions à administrer (lycopène dans 1ml d'huile de paraffine) sont préparées quotidiennement, à l'abri de la lumière, pour éviter toute oxydation (Lee et Chen, 2002).

Les pastilles de lycopène utilisées sont protégées par une enveloppe plastique opaque (Fig. 15).

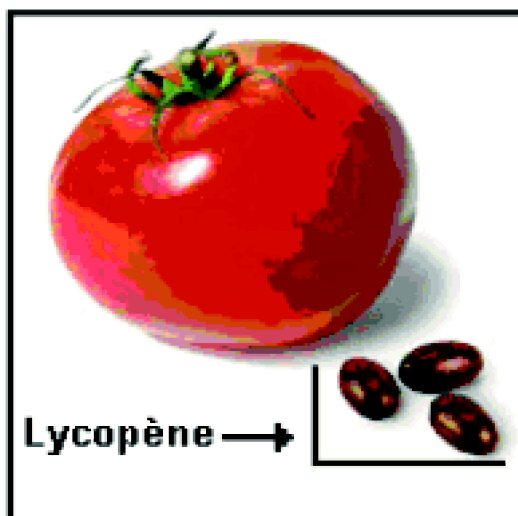


Figure15 : Pastilles de lycopène (lyc-o-mato, 10mg)

Le tétrachlorure de carbone (CCl₄) a été administré aux rats des lots 3 et 4, 24h avant leur sacrifice, dans le but d'induire une lésion hépatique. C'est le solvant toxique le plus utilisé dans le but d'induire des dommages du foie qui sont considérés comme analogues à ceux provoqués par une variété d'hépatotoxines chez l'homme. Il est de ce fait utilisé comme modèle pour étudier les mécanismes basiques de la toxicité hépatique dans de nombreuses études. C'est un liquide dense, clair, incolore, ininflammable, d'odeur caractéristique. Le tétrachlorure de carbone est absorbé principalement par inhalation et par voie orale. L'absorption cutanée est moins importante et moins rapide. Dans notre cas nous avons choisi la voie digestive (orale). La solution que nous avons administrée,

contient 30% de CCl₄ dans 70% d'huile de paraffine.

II-1-3-4- Composition du régime standard (granulés ONAB)

La composition du régime standard qui a servi à l'alimentation des rats, durant toute la durée de l'expérimentation, est résumée dans le tableau 10 bis. Ce régime contient du maïs, issues de meunerie, des tourteaux de soja, des vitamines, des acides aminés, des minéraux (sel, calcaire, phosphore), des oligo-éléments et des suppléments (antibiotiques). Les normes de cet aliment sont dans l'annexe 3.

L'abreuvement se fait à l'eau fraîche du robinet, à l'aide de biberons en plastique ou en métal, de contenance 250ml ou 500ml. L'identification des rats se fait soit par marquage, soit par des renseignements portés sur étiquette insérée dans les portes étiquettes. Les normes de l'aliment pour bétail utilisées par l'ONAB, sont dans l'annexe 2.

Tableau 10 bis: Composition du régime standard (granulés ONAB)

Paramètres Humidité E.D	Composition (%)	Paramètres Gly +	Composition
(Kcal) E.M (Kcal) E. DIG (Kcal) T.D.N Val.AMID	11.51 2092.79 2785.38	Ser 2.99 1.16 7.20 1.01 5.9	Valine 2.05 1.89 1.02 1.12 0.60 1.18
U.F U.F.L U.F.V E.N.A	0.99 0.99 43.80	Ac. Linoléique	1.55
P.D.I/N P.D.I.E	15.77 13.98	M.G	4.2
Prot.Br M.A.D	22.05 19.2	Calcium Phosphore total phosphore assimilable sodium Chlore Potassium	0.96 0.61 0.25 0.03 0.05 0.39
M.M Cellulose	6.31 3.60	Tryptophane Arginine Vitamine A Vitamine E Fer	0.28 1.52 12300µl/Kg 20mg/Kg 72mg/

II-2- Méthodes et techniques d'analyse

Les méthodes et techniques d'analyse que nous avons utilisées sont liées aux mesures pondérales, au bilan hépatique (activité enzymatique et marqueurs biochimiques), au dosage du lycopène (HPLC), et à l'histologie.

II-2-1- Influence des régimes alimentaires sur le poids des rats

II-2-1-1- Courbe de croissance

Tous les rats utilisés dans notre expérimentation sont pesés chaque semaine afin d'évaluer l'influence des régimes alimentaires sur l'évolution du poids des rats.

II-2-1-2- Gain de poids

Il est défini comme étant la différence entre le poids final et le poids initial. Il permet d'apprécier l'évolution de la croissance.

$$\text{Gain de poids (\%)} = \frac{\text{Poids final (g)} - \text{Poids initial (g)}}{\text{Poids initial (g)}} \times 100$$

II-2-1-3- Indice hépato-somatique (IHS)

Il est calculé à partir du rapport entre le poids du foie et de celui du corps multiplié par 100.

$$\text{IHS} = \frac{\text{Poids du foie (g)}}{\text{Poids du corps (g)}} \times 100$$

Cet indice nous renseigne sur l'état de l'hypertrophie du foie (Lopez-Varela et al., 1995).

II-2- 2- dosage du lycopène

Les caroténoïdes sont des pigments naturels, liposolubles, synthétisés uniquement par les plantes et certains microorganismes. Ils dérivent tous de précurseurs communs qui sont le lycopène et le bêta carotène.

Le dosage du lycopène est réalisé après une étape d'extraction à l'aide de solvants appropriés. La méthode d'extraction utilisée varie en fonction de la nature de l'échantillon (Plante, sérum, organes, etc. ...). Les extraits obtenus sont ensuite analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur à barrette de diodes. Le protocole d'analyse utilisé au laboratoire, permet de séparer et de quantifier en une seule analyse le lycopène présent dans l'échantillon.

Le dosage du lycopène a été réalisé sur des échantillons de sang prélevés sur les rats des lots 1 et 2 et sur ceux du foie prélevés sur les rats du lot 2. Le dosage du lycopène a été effectué par chromatographie liquide à haute performance.

II-2-2-1-Technique de prélèvement

Nous avons prélevé le sang par ponction du sinus rétro-orbital. C'est la méthode la plus indiquée pour le prélèvement du maximum de sang tout en gardant le rat vivant.

L'animal, après avoir été anesthésié avec de l'éther, est mis sur le ventre ou sur le côté. Le pouce et l'index de la main gauche le maintiennent en serrant le cou entre la tête et la ceinture scapulaire. Le creux de la main maintient le dos de l'animal et la pression du pouce sur le cou entraîne une stase veineuse vers la tête et une exophtalmie. De la main droite on introduit (à angle de 3°) le bout coupant de la pipette par pression rotative ; la fragile paroi des vaisseaux est perforée et le sang monte par capillarité.

Le sang est recueilli dans un tube sec et immédiatement centrifugé à 2500tr/mn et à 4°C pendant 10 mn. Le plasma est aliquoté en fractions pour le dosage du lycopène plasmatique et du bilan hépatique. Tous ces échantillons sont congelés à -20°C.

Nous avons ensuite prélevé rapidement les différents organes retenus pour notre étude, nous les avons lavés dans une solution glacée de NaCl à 9‰, pesés et congelés à -70°C jusqu'à leur analyse.

II-2-2-2- Extraction du lycopène dans le sérum

Elle est réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC), après extraction du sérum et du foie comme décrit ci dessous.

- Appareillage et conditions opératoires :
- Colonne (Supelco Discovery C18, 5µm (0.25x4.6mm))
- Détecteur (Water 996 photodiode Array detector)
- Débit 1 ml/mn, concentration du lycopène témoin: 50ng/ml
- Pompe (Waters 600 controller)
- Système d'injection Waters 600 pump (boucle de 20µl)
- Temperature de la colonne 35°C

Pour extraire le lycopène du sérum, nous avons mélangé 250µl de sérum avec 250µl d'éthanol absolu, ensuite nous avons additionné 150µl de la solution d'étalon interne. Les tubes ont été passés au vortex pendant 30 secondes, ensuite nous avons ajouté 1ml d'une solution d'hexane (concentration de 0.1g de BHT pour 100 ml d'hexane). Le mélange ainsi obtenu a été passé au vortex pendant 2 mn à une vitesse rapide suivi d'une centrifugation, à 4000 tr/mn, à température ambiante, pendant 10mn.

Nous avons ensuite prélevé la phase hexanique pour évaporer à sec sous azote. Le résidu sec a été repris dans 150 µl dans la phase mobile et redissout par agitation au vortex pendant 30 s.

Pour la préparation de la gamme d'étalonnage, on a mélangé la solution standard de lycopène à doser dans l'éthanol à la concentration 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 (v/v). Un blanc a été également réalisé avec de l'eau.

La solution standard de l'étalon interne(témoin) a été préparée à partir d'une solution mère de lycopène dans du chloroforme, aliquotée et stockée à -80°C. Une fraction de la solution mère est diluée au moment de l'emploi dans de l'éthanol. La densité optique de cette solution est mesurée à 472 nm, la concentration de la solution est ensuite

déterminée et exprimée en μM selon la loi de Beer-Lambaire.

La préparation de la phase mobile a été réalisée au moment de l'emploi. Elle consiste en un mélange d'acétonitrile/Méthanol/dichlorométhane au rapport de 70/20/10 (v/v/v). La détection du lycopène se fait à 472 nm.

II-2-2-3- Extraction du lycopène dans le foie

Pour réaliser le dosage du lycopène dans le foie, nous avons homogénéisé un (01) gramme de foie dans un tube en verre renfermant 8ml d'acétone contenant 0.25% de BHT (2.6-di-terte-butyl-4-méthylphénol). Nous avons ensuite passé le mélange au vortex pendant 2mn puis l'avons laissé dans la glace pendant 25mn. L'échantillon a été ensuite repris et centrifugé à 13000g (4°C) pendant 10mn pour enfin recueillir le surnageant. Une seconde extraction a été réalisée à partir du reste de l'échantillon et les deux phases ainsi obtenues ont été évaporées, à sec, sous azote (N_2) et à 30°C.

L'échantillon évaporé a été repris dans 2 ml d'éthanol - eau (1 :1 v/v) pour subir deux nouvelles extractions, comme décrit précédemment, en utilisant de l'hexane (4ml et 2ml, au lieu de l'acétone). Après évaporation sous azote, de la phase organique obtenue, nous avons re-dissous le résidu dans un volume final de 1ml d'hexane - dichlorométhane (1 :1, v/v). La solution obtenue a été injectée dans le chromatographe liquide à haute pression (HPLC) pour analyse. La phase mobile est constituée d'un mélange méthanol-acétonitrile(70:30 v/v),le lycopène est détecté à une longueur d'onde de 471nm. La concentration du lycopène standard est 1mg/l

Résultat = 1x Surface de l'échantillon/ surface du témoin

II-2-3- Dosage des marqueurs hépatiques

Après le sacrifice des rats, nous avons prélevé leur sang, par ponction du sinus rétro-orbital, dans des tubes secs. Après centrifugation à 4500 trs/min pendant 10 minutes, nous avons récupéré le plasma et l'avons directement acheminé vers le laboratoire d'analyse (Hôpital de Tizi-Ouzou) pour y effectuer les dosages. Les échantillons ont été transportés dans une enceinte thermo statée (glacière).

Les analyses ont été effectuées sur un analyseur de type «Cobas integra400 plus». C'est un analyseur sélectif et continu, conçu pour fonctionner sur un plan de travail. Il fonctionne avec trois systèmes de mesure séparés reconnaissant quatre différents principes de mesure (Tab. 11) :

Tableau 11: Systèmes et principes de mesure du Cobas integra400 Plus

Système de mesure	Principe de mesure
Photométrie FP Photométrie d'absorbance Module ISE (électrode sélective aux ions)	Polarisation de fluorescence Photométrie d'absorbance Turbidimétrie Potentiomètre sélective aux ions

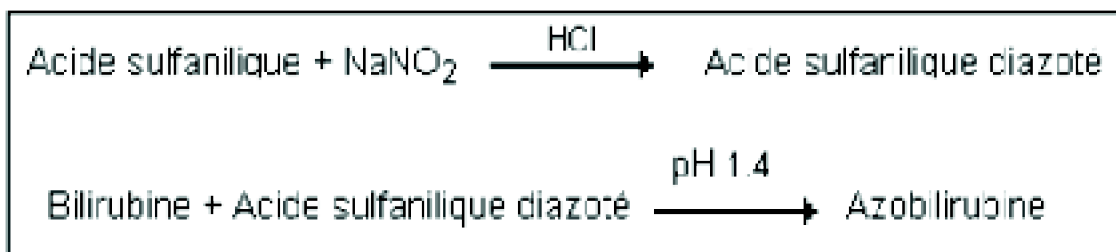
Pour effectuer les analyses, les échantillons sont automatiquement transférés d'un tube ou godet échantillon vers le module dans lequel sont pratiquées les mesures. Toutes les mesures optiques utilisent les mêmes réservoirs en plastique transparents appelés cuvettes. L'interface utilisateur graphique, tournant sous Windows-NT assure un accès rapide et facile aux échantillons, contrôle les données de calibration, tout en surveillant de manière ininterrompue les fonctions du système. Les icônes en couleur informent des changements d'état du système. La connexion à un système host permet le transfert automatique des résultats depuis et vers le cobas integra400 plus. Les réactifs sont fournis dans des cassettes en plastique spécifiques pour chaque type d'analyse. Le dosage du bilan hépatique se fait comme suit:

II-2-3-1- Dosage de la bilirubine

La bilirubine est un pigment présent dans la bile et, à plus faible concentration, dans le sang. On distingue deux fractions de la bilirubine : la bilirubine libre et la bilirubine conjuguée, c'est-à-dire transformée par le foie, avant d'être éliminée dans les urines.

La cassette COBAS INTEGRA « Bilirubine Directe (BIL-D) » contient des réactifs de diagnostic *in vitro* destinés à la détermination quantitative de la bilirubine directe (conjuguée) dans le sérum.

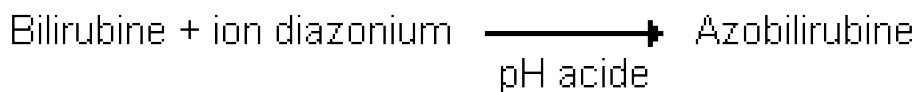
Le principe d'analyse est basé sur la méthode diazo (Malloy et Evelyn, 1937). La bilirubine conjuguée (directe) réagit directement avec l'acide sulfanilique diazoté dans un tampon acide pour former les azobilirubines de couleur rouge qui sont des dipyrroles diazotés.



Une molécule de bilirubine génère deux azobilirubines. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de bilirubine directe dans l'échantillon et est déterminée avec l'augmentation de l'absorbance à 552 nm. Le calcul des résultats est réalisé automatiquement par l'analyseur et le facteur de conversion est: $01\mu\text{mol/l} \times 0,0585 = 01\text{mg/dl}$.

La cassette COBAS INTEGRA « Bilirubin Totale Speciale (BILTS) » contient des réactifs de diagnostic *in vitro* destinés à la détermination quantitative de la bilirubine totale dans le sérum.

Le principe d'analyse est basé sur la méthode diazoreaction (Wahlefeld, 1972). En présence d'un agent solubilisant adapté, la bilirubine totale est couplée à un ion diazonium dans un milieu fortement acide (pH 1-2).



L'intensité de la coloration de l'azobilirubine, développée, est proportionnelle à la concentration en bilirubine totale de l'échantillon et peut être mesurée par photométrie. Le calcul des résultats est réalisé automatiquement par l'analyseur et le facteur de conversion est: $01 \mu\text{mol/l} \times 0,0585 = 01\text{mg/dl}$

II-2-3-2- Dosage de l'activité enzymatique de ASAT

La cassette COBAS INTEGRA Aspartate Aminotransferase (ASAT) contient des réactifs de diagnostic *in vitro* destinés à la détermination quantitative de l'activité catalytique de l'ASAT dans le sérum et le plasma.

Le principe d'analyse est basé sur les recommandations de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) avec le phosphate de pyridoxal. L'ASAT de l'échantillon catalyse le transfert du groupement amine entre le L-aspartate et le 2-oxoglutarate pour former de l'oxaloacétate et du L-glutamate. L'oxaloacétate réagit ensuite avec le NADH, en présence de malate-déshydrogénase (MDH), pour former du NAD^+ . Le phosphate de pyridoxal agit comme un coenzyme dans la réaction de transfert d' amino. Il garantit une activation enzymatique complète.



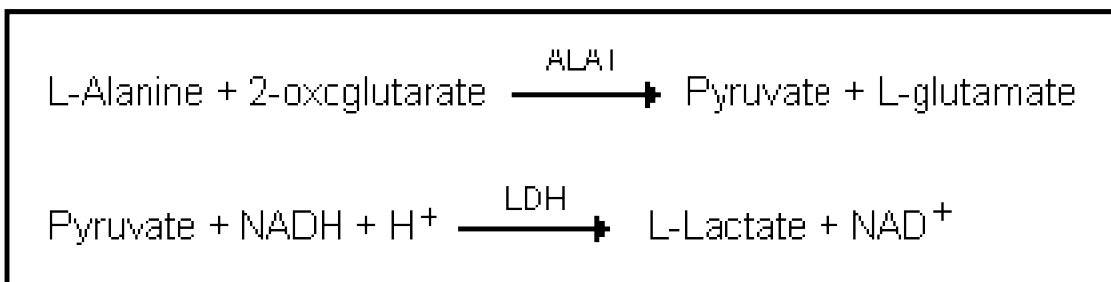
La vitesse initiale de formation du NAD^+ est directement proportionnelle à l'activité catalytique de l'ASAT. Elle est mesurée par la diminution de l'absorbance à 340 nm. Le calcul des résultats est réalisé automatiquement par l'analyseur et le facteur de conversion est: $01\text{U/l} \times 0,0167 = 01\mu\text{kat/l}$

II-2-3-3- Dosage de l'activité enzymatique de l'ALAT

L'enzyme Alanine-aminotransférase (ALAT) est présente dans de nombreux tissus. On la trouve surtout dans le foie, d'où l'intérêt de mesurer son activité pour le diagnostic des maladies hépatiques. La cassette COBAS INTEGRA Alanine Aminotransferase (ALAT) contient un système de réactifs de diagnostic *in vitro* destiné à la détermination quantitative de l'activité catalytique de l'ALAT dans le sérum et le plasma.

Le principe d'analyse est basé sur les recommandations de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) mais sans le phosphate de pyridoxal (Bergmeyer et al., 1986 et Eccls, 1999). L'ALAT catalyse la réaction entre la L-alanine et le 2-oxoglutarate. Le pyruvate formé est réduit par le NADH, dans une réaction catalysée

par la lactate-déshydrogénase (LDH) pour former du L-lactate et du NAD^+ .

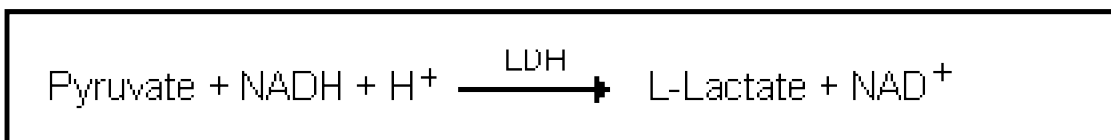


La vitesse initiale de formation du NADH est directement proportionnelle à l'activité catalytique de l'ALAT. Elle est déterminée par la diminution de l'absorbance à 340 nm. Le calcul des résultats est réalisé automatiquement par l'analyseur et le facteur de conversion est: $01\text{U/l} \times 0,0167 = 01\mu\text{kat/l}$

II-2-3-4- Dosage de l'activité enzymatique de la LDH

L'enzyme Lactate-Déshydrogénase (LDH) est présente dans de nombreux tissus et plus particulièrement dans le cœur, le foie, les muscles et le rein. La cassette COBAS INTEGRA Lactate Dehydrogenase (LDH) contient un système de réactifs de diagnostic *in vitro* destiné à la détermination quantitative de l'activité catalytique de la LDH dans le sérum.

Le principe d'analyse est basé sur la méthode standard optimisée selon les recommandations de la Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC) (Empfehlungen, 1970 et Empfehlungen 1972). La LDH catalyse la réaction entre le pyruvate et le NADH pour former le L-lactate et le NAD^+ .

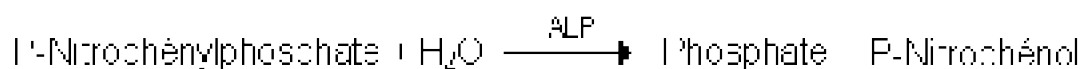


La vitesse initiale d'oxydation du NADH est directement proportionnelle à l'activité catalytique de la LDH. Elle est déterminée par la diminution de l'absorbance à 340 nm et le facteur de conversion est : $01\text{U/l} \times 0,0167 = 01\mu\text{kat/l}$

II-2-3-5- Dosage de l'activité enzymatique de la PAL

Les cassettes COBAS INTEGRA contiennent des réactifs *in vitro* destinés à la détermination quantitative de l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans le sérum.

Le principe d'analyse est basé sur la méthode standardisée du test colorimétrique (Tietz, 1983). En présence d'ions Mg^{++} et Zn^{++} , le p-nitrophénylphosphate est scindé par les phosphatases alcalines en phosphate et p-nitrophénol.

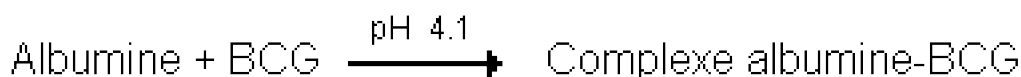


La concentration en p-nitrophénol libérée est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline. Elle est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 409 nm et le Facteur de conversion est: $01\text{U/l} \times 0,0167 = 01\mu\text{kat/l}$

II-2-3-6- Dosage de l'Albumine 2^{ème} génération

La cassette COBAS INTEGRA Albumin 2^{ème} génération (ALB2) contient des réactifs de diagnostic *in vitro* destinés à la détermination quantitative de l'albumine dans le sérum et le plasma.

Le principe d'analyse est basé sur la méthode standardisée du test colorimétrique (Doumas et al., 1971). À un pH de 4.1 l'albumine présente un caractère suffisamment cationique pour se combiner avec le vert de bromocrésol (BCG= bromocresol green) sous forme d'anion pour former un complexe bleu-vert.



L'intensité de la coloration bleu-vert développée est directement proportionnelle à la concentration en albumine et est mesurée par photométrie. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 583 nm et le Facteur de conversion est : $01\text{g/l} \times 15,2 = 01\mu\text{mol/l}$

II-2-4- Etude des effets du CCl4 et du lycopène sur le foie des rats

L'absence de corrélation parfaite entre les résultats des tests biologiques et la morphologie du foie rend nécessaire la réalisation de biopsies hépatiques, non seulement pour préciser le diagnostic d'une affection hépatique et sa sévérité mais également pour en surveiller son évolution. L'étude histologique a été effectuée sur le foie. Elle s'est déroulée en plusieurs étapes.

II-2-4-1- La fixation du foie

Les tissus vivants sont des systèmes dynamiques qui répondent à la présence ou à l'absence de multiples stimuli. Ainsi, lorsqu'un organe ou un tissu est prélevé, il change d'environnement. Ce changement entraîne des modifications plus ou moins importantes dans la chimie et la morphologie tissulaire. Dès que le tissu est coupé de l'organisme (donc soustrait aux influences auxquelles il est normalement exposé), il commence à ne plus ressembler à ce qu'il était pendant sa vie dans l'organisme bien que la mort des cellules et la dégradation des tissus ne surviennent qu'après un certain temps.

L'histologie permet d'étudier la morphologie des tissus vivants, c'est-à-dire la structure qui était la leur dans l'organisme. Mais pour que cette étude soit réalisable, il est nécessaire d'immobiliser les tissus dans un état aussi proche que possible de l'état vivant : C'est pourquoi on procède à leur fixation. Celle-ci doit aller plus loin que la simple préservation du tissu : Elle doit lui permettre de résister à toutes les manipulations qu'il aura à subir subséquemment. Enfin la fixation est une étape critique de la préparation des tissus, puisqu'un tissu mal préservé ne peut être reconstruit.

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi, comme agent fixateur, le Bouin aqueux car il est considéré comme l'un des meilleurs fixateurs pour la recherche de topographie et d'anatomie microscopique. L'objectif est de mettre en évidence l'hépatoprotection du lycopène.

II-2-4-2- La circulation

Le but de cette technique est de durcir beaucoup plus le tissu, pour pouvoir confectionner des coupes histologiques minces d'environ $2\mu\text{m}$. La circulation se fait dans un appareil d'inclusion en paraffine et consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires. Elle s'effectue en trois étapes :

- La déshydratation consiste à placer les cassettes contenant le prélèvement dans un panier et leur faire subir 6 bains d'alcool (éthanol) à concentration croissante (de 50% à 100%) pendant 12 heures (2 h pour chaque bain).
- L'éclaircissement consiste à remplacer l'alcool dans le tissu par un solvant de la paraffine (le xylène). Cette étape se fait pendant 8 h, dans 4 bains de xylène (2 h pour chaque bain).
- L'imprégnation représente la dernière étape de la circulation et consiste à faire pénétrer la paraffine dans le tissu afin de le rendre plus rigide. Elle s'effectue à chaud dans deux cuves en acier inoxydable et thermo statées contenant de la paraffine liquéfiée (HOULD, 1984).
- Les tissus sont transportés dans des cassettes perforées individuelles et étiquetées.

II-2-4-3- L'inclusion ou l'enrobage

Elle consiste à inclure les fragments à étudier dans des blocs de paraffine grâce à un appareil d'inclusion, selon les étapes suivantes :

- Préchauffage des moules et des cassettes dans une console thermique.
- Mise en place centré du tissu dans le moule à moitié rempli de paraffine, à l'aide d'une pince.
- Refroidissement du bloc sur une plaque réfrigérante.

La confection des coupes se fait à l'aide d'un microtome rotatif permettant l'obtention de rubans de $2\mu\text{m}$ d'épaisseur, en général. Dans notre cas l'épaisseur des coupes est de $0.3\mu\text{m}$.

II-2-4-4- L'étalement

Les rubans sont ramollis dans un bain marie à 42°C, puis recueillis sur lames préalablement numérotées à l'aide d'un crayon diamant. Après séchage sur une plaque chauffante, les lames sont rangées dans un chariot porte-lames qui est lui-même placé dans une étuve, à une température située entre 37°C et 45°C.

II-2-4-5- Le déparaffinage

Cette opération sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Le réactif utilisé est le xylène (agent éclaircissant qui dissout le mieux la paraffine). Le procédé consiste à plonger le chariot porte-lames dans du xylène pendant 5 à 10mn, puis le placer 5 à 10 mn dans l'étuve jusqu'au déparaffinage complet.

II-2-4-6- L'hydratation

Cette opération, qui est l'inverse de la déshydratation, a pour objet de retirer le xylène du tissu et le remplacer par de l'eau. Elle consiste à passer les lames dans des bains d'éthanol de degré décroissant (100°, 95°, 75°) pendant 3 à 5 mn chacun. On termine l'hydratation par un traitement de 3 à 5 mn à l'eau courante.

II-2-4-7- La coloration topographique des coupes histologiques

La méthode hématoxyline éosine (HE) est la coloration la plus utilisée dans le but d'obtenir une topographie générale de l'échantillon. C'est une combinaison entre deux colorants, l'un basique (hématoxyline) qui colore le noyau en bleu violacé et l'autre acide (éosine) qui confère une coloration rose au cytoplasme.

La coloration topographique se fait selon le mode opératoire suivant :

- Déparaffinage par passage de l'échantillon dans trois à quatre bains de xylène pendant environ 5 à 10 mn chacun.
- Hydratation par passage dans trois bains d'alcool de concentration décroissante (100°, 95°, 75°), pendant deux minutes pour chaque bain.
- Rinçage à l'eau courante.
- Coloration à l'hématoxyline pendant 10 mn en plongeant et retirant le chariot.
- Rinçage à l'eau courante.
- Passage des coupes dans une solution de carbonate de lithium (Li_2CO_3).
- Rinçage à l'eau courante.
- Coloration à l'éosine pendant 2mn puis rinçage.
- Déshydratation par passage dans l'éthanol à 95°C puis 100°C pendant 30 à 60 s.
- Eclaircissement par passage dans deux bains de xylène de 30 à 60mn chacun.
- Montage sur lame à l'aide de milieu synthétique Eukitt. .

Les colorations réalisées sur les lames accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation (Martoja, 1967).

Remarque :

Au vu du nombre restreint d'échantillons (02 rats par lot et par sacrifice), par manque de moyens, il ne nous a pas été possible de réaliser l'étude statistique. Nous avons donc utilisé la méthode comparative.

CHAPITRE III : Resultats et discussion

III-1- Influence des régimes alimentaires sur la croissance des rats

III-1-1- Le poids des rats

Les résultats obtenus aux différentes périodes de l'expérimentation sont regroupés dans les tableaux 12 et 12 bis (valeur moyenne et écart type). Ces résultats sont aussi représentés graphiquement (Fig. 16).

Durée (Jours)	Lots			
	Lot 1 (Témoins)	Lot 2 (Lycopène)	Lot 3 (CCM)	Lot 4 (Lycopène+CCM)
Jour J1 (Réception des rats)	211.01 ± 17.40	211.01 ± 17.01	211.01 ± 16.15	211.01 ± 17.14
Jour J8	32.60 ± 27.95	33.83 ± 14.54	91.33 ± 05.25	88.33 ± 11.86
Jour J15	117.66 ± 18.34	117.33 ± 11.74	113.33 ± 106.19	109.00 ± 15.15
Jour J22	131.00 ± 21.54	147.50 ± 16.16	117.50 ± 17.01	140.50 ± 7.35
Jour J29	152.25 ± 23.95	171.75 ± 38.73	157.00 ± 18.74	167.50 ± 11.15
Jour J36	163.00 ± 21.21	182.00 ± 35.65	187.50 ± 07.78	188.50 ± 14.85
Jour J43	185.50 ± 24.75	183.00 ± 12.72	200.50 ± 02.12	205.50 ± 12.05

Tableau 12: Poids des rats (g) en fonction de la durée de la supplémentation (Jours) et des régimes alimentaires.

Durée (Jours)	Lots			
	Lot 1 (Témoins)	Lot 2 (Lycopène)	Lot 3 (CCM)	Lot 4 (Lycopène+CCM)
Jour J8	25	37	31.70	29.06
Jour J15	62	65	63.34	60.29
Jour J22	81	108.50	98.32	106.61
Jour J29	113	151	126.45	146.32
Jour J36	130	163	170.20	177.20
Jour J43	152.96	173	159	202.20

Tableau 12 bis: Gain de poids des rats en %

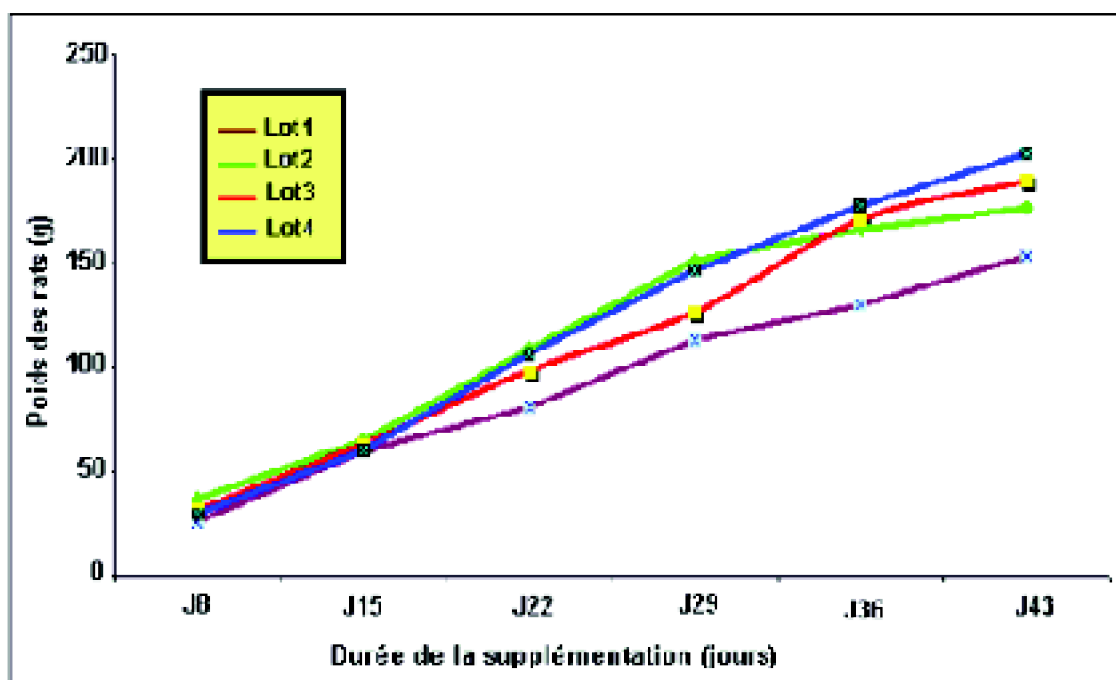


Figure16 : Evolution du poids des rats en pourcentage

- **Lot 1** : Rats témoins ayant reçu, quotidiennement, un régime standard (ONAB) et 01ml d'huile de paraffine par rat.
- Lot 2 : Rats ayant reçu, quotidiennement, un régime standard (ONAB) et 05mg de lycopène par kg de poids corporel dans 01ml d'huile de paraffine.
- Lot 3 : Rats témoins ayant reçu, quotidiennement, un régime standard (ONAB) et 01ml d'huile de paraffine par rat. Ils ont reçu, en plus, 02 ml de CCl4 (solution à 30% d'huile de paraffine) par kg de poids corporel, 24 h avant leur sacrifice.
- Lot 4 : Rats ayant reçu, quotidiennement, un régime standard (ONAB) et 5 mg de lycopène par kg de poids corporel dans 01ml d'huile de paraffine. Ils ont reçu, en plus, 02 ml de CCl4 (solution à 30% d'huile de paraffine) par kg de poids corporel, 24 h avant leur sacrifice.

NB : Notons que l'administration du lycopène, aux rats à sacrifier, a été suspendue 48h avant leur sacrifice.

• A la réception des animaux

A la réception, les rats ont un poids qui varie entre 60 et 90g. La répartition est faite de manière aléatoire. Le poids moyen des rats pour chaque lot est : 73.33 ± 12.48 g pour le lot 1, 68.33 ± 12.31 g pour le lot 2, 69.33 ± 05.89 g pour le lot 3 et 68.00 ± 10.14 g pour le lot 4.

• Après 15 jours d'expérimentation

A cet âge, les rats ont subi une croissance considérable et leur poids moyen est de : 117.66 ± 18.34 g pour le lot 1, 113.33 ± 11.74 g pour le lot 2, 113.33 ± 06.09 g pour le lot 3

et 109.00 ± 15.15 g pour le lot 4. Le gain de poids des rats est respectivement de 44.33 g pour le lot 1, 45.50 g pour le lot 2, 44.00 g pour le lot 3 et 41g pour le lot 4. On remarque que tous les rats ont une croissance, du même ordre de grandeur. Il est à signaler que pendant la 1^{ère} semaine de l'expérimentation, les rats ont eu une diarrhée due probablement à l'effet de l'huile de paraffine.

- Après 29 jours d'expérimentation

A cette étape de l'expérimentation, le gain de poids chez les rats du lot 1 est de 82.92 g, ceux du lot 2 103.42 g, ceux du lot 3 87.67g et les rats du lot 4, 99 g. Le poids moyen des rats du lot 2 présente une meilleure croissance. Notons par ailleurs que le gain de poids des rats est plus significatif que dans l'étape précédente.

- Après 43 jours d'expérimentation

Les rats du lot 1 ont un gain de poids moyen de 112 g, par rapport au poids initial, alors que ceux du lot 2, 3 et 4 ont respectivement un gain de 120 g, 130 g et 137g. A ce niveau de l'expérimentation (6 semaines) le poids des rats a sensiblement évolué. A la lumière de ce qui précède et après observations du tableau 12 bis et de la figure 16, on peut remarquer que le poids des rats ayant reçu du lycopène, ne présente pas de variation significative par rapport aux autres rats. On peut donc conclure que la prise de poids n'est pas influencée par le lycopène mais elle est plutôt fonction des variations physiologiques des animaux, ce qui est aussi observé par Ferreira et *al.*, (2000).

III-1-2- Le poids des organes

Les résultats portés sur le tableau 13 montrent l'évolution du poids des organes en fonction de l'âge des rats et des régimes alimentaires. Ces mêmes résultats sont traduits graphiquement par la figure 17. On remarque que parmi les organes des rats, le foie des rats des lots 3 et 4 présentent une augmentation plus importante que ceux des autres lots. Ceci pourrait s'expliquer probablement par l'administration du CCl₄ aux premiers.

	Organes	Sacrifice S1	Sacrifice S2	Sacrifice S3
Lot 1 (Léonin)	Cœur	0.59	0.62	0.72
	Foie	4.88	4.97	6.59
	Rein	0.59	1.09	2.50
	Testicule	1.29	1.72	2.50
	Race	0.62	0.76	1.34
Lot 2 (Lycopène)	Cœur	0.49	0.66	0.83
	Foie	4.94	6.09	6.70
	Rein	0.60	0.94	2.79
	Testicule	0.86	1.15	2.05
	Race	0.54	0.92	0.90
Lot 3 (CC4)	Cœur	0.47	0.67	1.62
	Foie	6.10	9.07	10.26
	Rein	0.54	0.61	2.00
	Testicule	1.17	1.19	1.95
	Race	0.74	0.78	1.17
Lot 4 (Lycopène+CC4)	Cœur	0.47	0.50	0.92
	Foie	6.62	8.85	10.37
	Rein	0.40	0.55	1.47
	Testicule	0.74	1.00	2.02
	Race	0.36	0.93	1.33

Tableau 13: Poids des organes (g) en fonction de la durée de la supplémentation

S1 : Sacrifice réalisé après 15 jours de supplémentation.

S2 : Sacrifice réalisé après 29 jours de supplémentation.

S3 : Sacrifice réalisé après 43 jours de supplémentation.

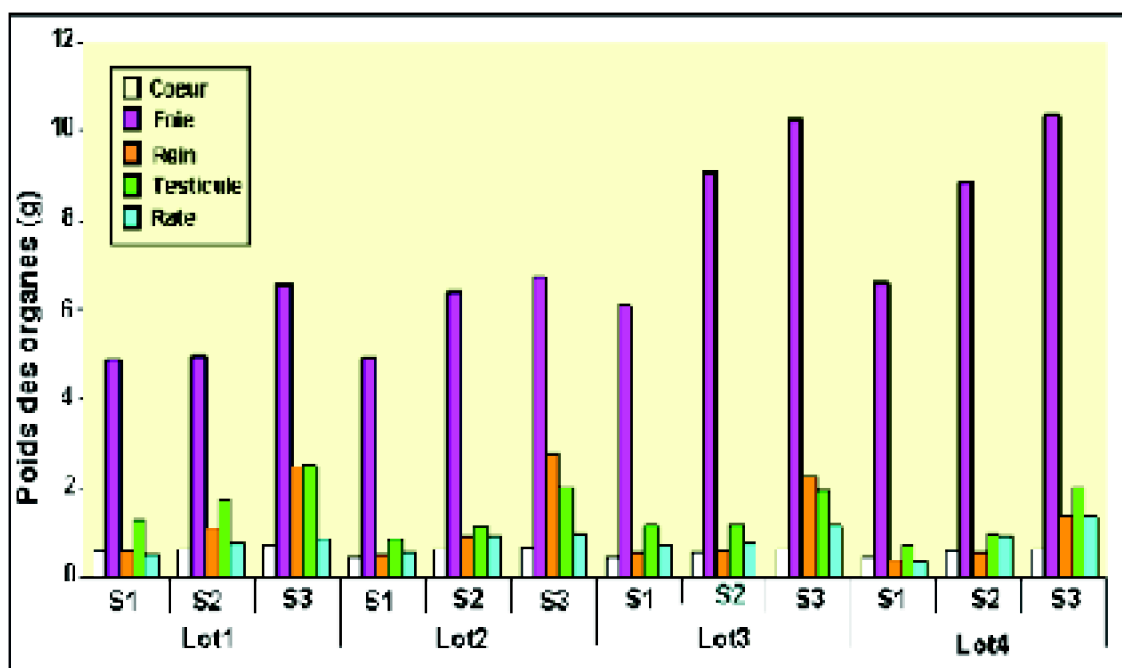


Figure17: Evolution des poids des organes en fonction de la durée de la supplémentation

III-1-3- Indice hépato-somatique

Il est calculé sur la base du poids du foie. Les indices hépato-somatiques des rats du lot 1 et 2 diffèrent de ceux des lots 3 et 4.

Au S1 l'IHS des lots 3 et 4, est respectivement de 1.47 et 1.58 fois supérieur aux valeurs de l'IHS du lot témoin. Au S2, elles sont 1.75 et 1.70 fois supérieurs et au S3, elles sont 1.32 et 1.29 fois supérieur à celles du lot témoin (Tab. 14)

Durée (semaines)	Indice hépato-somatique			
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
S1 (7j)	2.81	3.70	5.32	5.71
S2 (28j)	2.87	3.82	5.22	5.05
S3 (45j)	2.78	3.75	5.07	4.91

Tableau 14 : Variation de l'indice hépato-somatique en fonction du temps et du type de traitement

Nous pouvons déduire que les rats issus des lot 3 et 4 témoignent d'une hypertrophie du foie comme par ailleurs ce phénomène est constaté par de nombreux auteurs (Potteau et al., 1997, Sanchez-Muniz et al., 1998 et Bitam, 2005). En effet, les hépatocytes augmentent de taille et s'enrichissent en vacuoles. Les dommages causés sont probablement dus aux effets du CCl4.

III-2- Dosage du lycopène

III-2-1- Dosage du lycopène dans le sérum

Dans le cadre de ce travail, nous avons dosé le lycopène, dans le sérum et le foie, pour les rats des lot 1(témoin) et lot 2 (lycopène). Rappelons que les rats du lot2 ont reçu une dose de 5 mg de lycopène par kg de poids corporel pendant six semaines. Deux rats de chacun des deux lots ont été sacrifiés toutes les deux semaines. Le but de cette analyse est de prouver la biodisponibilité du lycopène dans le sérum et dans le foie des rats traités.

Le dosage du lycopène au niveau du sérum des rats témoins (lot 1) et des rats supplémentés avec 5 mg de lycopène par kg de poids corporel (lot 2) n'a pas montré la présence de ce caroténoïde. Pour les rats témoins l'absence de lycopène est attendue, étant donné que ces derniers ne l'ont pas reçu et que le régime standard (ONAB) n'en contient pas, contrairement aux rats du lot 2.

Pour essayer de comprendre l'origine de l'absence du lycopène dans le sérum des rats du lot 2, nous avons analysé, avec un autre protocole d'extraction, du sérum blanc auquel nous avons ajouté du lycopène et le résultat a été concluant. Nous avons ainsi conclu que l'absence de résultat positif dans l'analyse du sérum est probablement liée au protocole expérimental (conditions opératoires) et non à la supplémentation. D'ailleurs les dosages du foie, que nous verrons plus loin, vont dans le sens de cette argumentation.

La différence essentielle entre les deux protocoles expérimentaux est que dans le second cas nous avons utilisé la méthode d'extraction de Froescheis et *al.*, (2000), une centrifugeuse réfrigérée tournant à 13000 g et 4°C et des tubes opaques car le lycopène est sensible à la lumière. Signalons que nous avons dû réaliser les étapes d'extraction dans des laboratoires différents car nous n'avons pas pu disposer d'un laboratoire intégré permettant de réaliser toutes les opérations.

Susan et al (2003), qui ont supplémenté des rats pendant 30 jours, avec 0.25g de lycopène mélangé à l'alimentation, ont trouvé une concentration de 536 nmol/l dans le sérum. Cependant Boileau et *al* et Breinholt et *al* (2000) ont trouvé une concentration inférieure (82 à 295 nmol/l) et (16 à 72 nmol/l). Cohen (2002), qui a trouvé une concentration allant de 160 à 285 ng/ml, a conclu que la concentration du lycopène dans le plasma montre une relation non linéaire avec la dose administrée. Des résultats similaires sont rapportés par Ferreira et al (2000). Notons que la biodisponibilité du lycopène dans le sérum est influencée par plusieurs facteurs. Aussi le terme « biodisponibilité » représente l'ensemble des étapes métaboliques qui contrôlent : La libération des pigments caroténoïdes de la source alimentaire vers la muqueuse intestinale (bio accessibilité), leur absorption intestinale et leur transport et métabolisme. De nombreux facteurs sont identifiés pour moduler une ou plusieurs de ces étapes et sont regroupés sous l'acronyme SLAMENGHI (établie dans les généralités). Parmi ceux-ci,

nous avons :

- Le type de caroténoïde

Les caroténoïdes oxygénés comme la lutéine, sont plus polaires et s'incorporent plus facilement dans les micelles mixtes intestinales que les carotènes (b-carotène, lycopène). Leur biodisponibilité, mesurée par la réponse postprandiale (quelques heures) après le repas ou par la réponse plasmatique à moyen terme, est en effet meilleure que celle des carotènes.

Le lycopène est un caroténoïde extrêmement lipophile. Dans les tomates, il est essentiellement sous forme *trans*, alors que dans les tissus, les isomères *cis* représentent plus de 50% du lycopène total. On suggère une meilleure biodisponibilité du lycopène *cis* ou une conversion *trans-cis* dans l'organisme.

Le lycopène est sensible à la lumière et à la température (Lee et Chen, 2002).

Il existe dans la nature de façon prédominante sous la forme *tout-trans*, conformation thermodynamique la plus stable. Les traitements thermiques liés aux transformations technologiques influent peu sur le passage de la configuration *trans* à la configuration *cis*.

- La matrice alimentaire

Dans les aliments, les caroténoïdes sont souvent associés à des protéines dans des structures subcellulaires (chromo plastes, chloroplastes) qui limitent la libération des pigments dans la lumière intestinale. Lorsque l'on hache la matrice alimentaire où que l'on chauffe l'aliment, la biodisponibilité des caroténoïdes est améliorée. Ainsi les réponses postprandiales et/ou plasmatiques en lycopène sont meilleures quand on consomme de la purée de tomate que des tomates crues. Reste qu'une cuisson excessive pourrait réduire cette biodisponibilité en favorisant une dégradation oxydative des caroténoïdes.

- La présence de graisses et de fibres dans le repas

Les caroténoïdes étant très hydrophobes, les lipides sont indispensables à l'absorption et leur transport, cependant, 3 à 5 g de lipides par repas sont suffisants pour optimiser leur absorption; au-delà la réponse obtenue n'est pas améliorée. La nature des lipides est aussi importante. Les fibres (pectines, cellulose) en piégeant les caroténoïdes et en réagissant sur les acides biliaires nécessaires à la formation des micelles, favoriseraient l'élimination fécale des graisses et des composés liposolubles. Riedl et *al.*, (1999) ont confirmé qu'elles diminuent l'absorption des caroténoïdes .

- Le statut nutritionnel

Des apports inadéquats en protéines affectent l'absorption et le métabolisme des caroténoïdes. D'autres facteurs comme le mélange de plusieurs caroténoïdes, des apports excessifs en vitamine E, les infections parasitaires, l'âge des sujets, la génétique (répondeurs, non répondeurs) sont également susceptibles de moduler la biodisponibilité des caroténoïdes (Borel ,2003).

III-2-2- Dosage du lycopène dans le foie

Les teneurs en lycopène varient selon les tissus. Le tissu hépatique peut contenir jusqu'à 10 mg/g (soit 18 μ mol/g) de lycopène. C'est la localisation tissulaire la plus importante après le tissu adipeux. La présence de formes *cis-trans* dans les tissus pose la question de l'existence de propriétés propres à ces structures, à l'image des propriétés de biodisponibilité évoquées précédemment.

Les résultats relatifs au dosage du lycopène dans le foie, sont rassemblés dans le tableau 15 et annexe 3.

Sachets	Sachet S1 (15 μ)			Sachet S2 (29 μ)			Sachet S3 (43 μ)		
	Rat 1	Rat 2	Moy.	Rat 1	Rat 2	Moy.	Rat 1	Rat 2	Moy.
Quantité de lycopène (ng/g)	5.4	5.8	5.6	4.8	2.6	3.7	4.2	1.8	3.0

Tableau 15 : Concentration en lycopène dans le foie des rats du lot 2.

Si nous remarquons que le taux de lycopène dans le foie diminue lorsque la durée de la supplémentation augmente, nous ne pouvons discuter de sa quantification, celle-ci ne faisant pas l'unanimité de la communauté scientifique, puisque les résultats trouvés par les auteurs varient beaucoup, 36-89 nmol/g (Boileau et al., (2002)), 16-61 nmol/g (Boileau et al., (2000)), 78-224 nmol/g (Zhao et al., (1998)) et 0.042-0.120 ng/g (Cohen, 2002). Notons que nos échantillons ont été congelés à -70°C, pendant 10 mois, avant d'être analysés. Ceci pourrait avoir une influence sur la quantité de lycopène détectée et sur la nature de sa variation. Selon Cohen (2002) et Mathews-Roth et al., (1990), la quantité de lycopène dans les tissus varie en fonction de la dose administrée, de la voie d'administration, de la présence d'autres caroténoïdes dans le régime alimentaire, la manière dont la supplémentation a été faite (lycopène dans l'eau, en injection, dans l'huile ...etc.) en plus des facteurs énoncés précédemment.

III-3- Etude de l'effet pathologique du CCl4 sur le bilan hépatique des rats

Le bilan hépatique permet, d'une part, de rechercher une éventuelle anomalie de la fonction hépatique et d'autre part, de préciser la nature de l'anomalie mise en évidence afin de mieux comprendre l'origine de l'atteinte. Parmi les différents types de dysfonctionnements du foie, on distingue différents syndromes dont les principaux sont l'insuffisance hépatique (ou insuffisance hépatocellulaire), la cytolyse, la cholestase (avec

ou sans ictère) et l'inflammation.

III-3-1- Effet du CCl4 sur les activités enzymatiques

III-3-1-1- Effet du CCl4 sur l'ALAT

Les activités enzymatiques de l'ALAT mesurées au niveau du sérum des rats intoxiqués pendant 24h avec une dose orale de 2 ml de CCl4/kg de poids corporel dans une solution à 30% d'huile de paraffine (lot 3), sont reportées sur le tableau 16 et Figure18.

A la lumière de ces résultats, il apparaît que les taux de l'ALAT sont très élevés chez les rats du lot 3 comparés à ceux des rats du lot 1 (lot témoin). Les valeurs de l'ALAT, des premiers, varient entre 1043.5 et 1682 U/l, soit 21.56 fois plus élevées que celle des seconds, qui varient entre 40 et 78U/l. L'ALAT est une enzyme confinée au cytoplasme et les concentrations les plus élevées sont retrouvées au niveau du foie. Lorsque les tissus sont lésés, avec une augmentation de la perméabilité membranaire et de la nécrose cellulaire, ils libèrent leurs enzymes dans le sang.

Activités enzymatiques (U/l)	Lots		Lot1 (Témoin)	Lot2 (ycopène)	Lot3 (CCl4)	Lot4 (Lycopène-CCl4)
	Sacrificés					
ALAT (U/l)	31		76	41	1043.5	1003
	32		40	54	1553.5	588
	33		78	43	1682	288
ASAT (U/l)	31		124	141	1410	1286
	32		118	133	1727	898
	33		170	151	2076	605
LDH (U/l)	31		697	712	1265	1258
	32		540	539	1707	658
	33		628	626	1708	658
PAL (U/l)	31		217	198	468	709
	32		251	238	382	346
	33		270	237	344	198

Tableau16 : Dosage des activités enzymatiques du bilan hépatique chez les rats

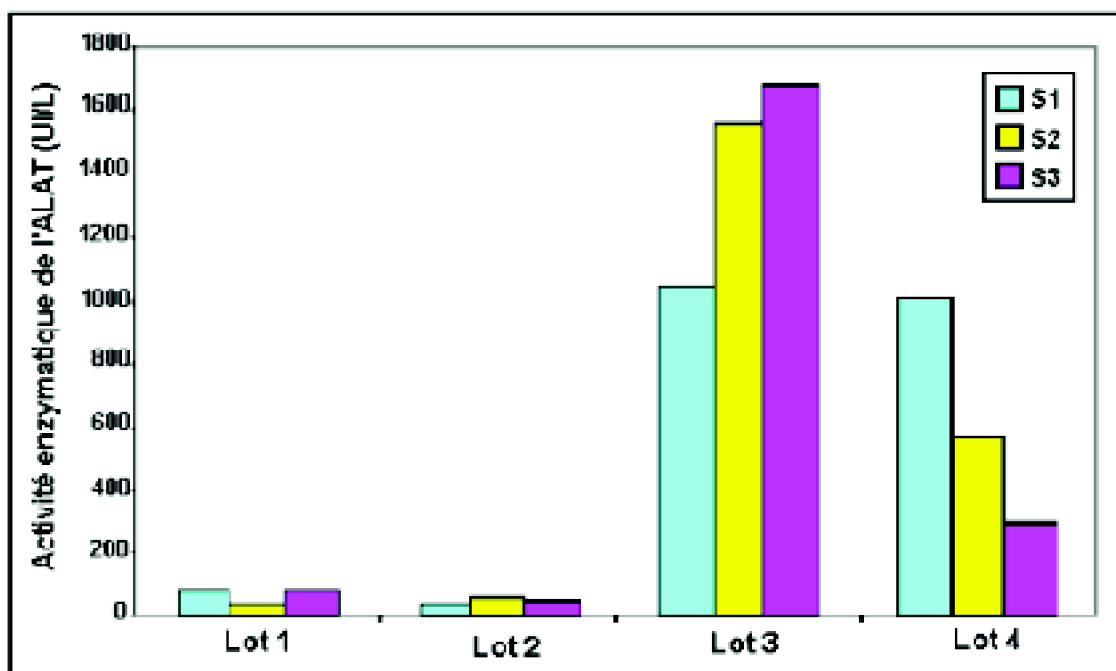


Figure18: Détermination des activités enzymatiques de l'ALAT dans le sérum des rats soumis aux différents traitements.

En pathologie, l'augmentation des transaminases glutamiques pyruvates est signe d'une cytolyse hépatique. Nos résultats concordent avec ceux Hanefi et al. (2004). Il a démontré que l'intoxication des rats avec une dose de 1.5 ml de tétrachlorure de carbone par kg de poids corporel, a provoqué l'augmentation de l'activité enzymatique de L'ALAT au niveau du sérum.

III-3-1-2- Effet du CCl₄ sur l'ASAT

Les activités enzymatiques de l'ASAT mesurées au niveau du sérum des rats intoxiqués pendant 24h avec une dose orale de 2 ml de CCl₄/kg de poids corporel dans une solution à 30% d'huile de paraffine (lot 3), sont reportées sur le tableau16 et Figure19.

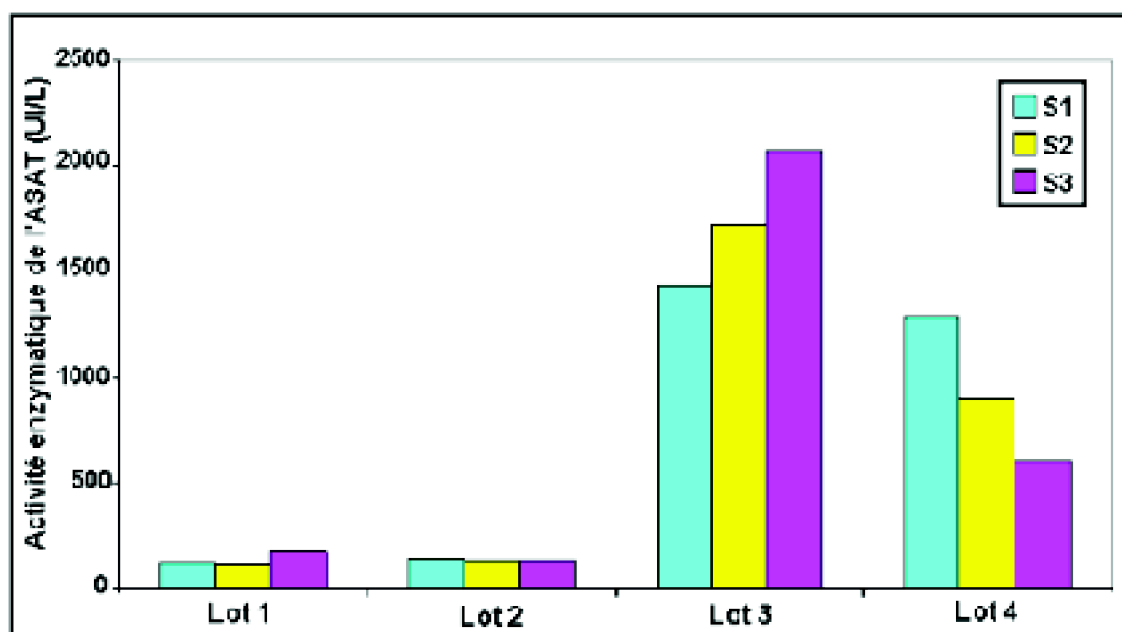


Figure 19 : Détermination des activités enzymatiques de l'ASAT dans le sérum des rats soumis aux différents traitements.

Ces concentrations varient entre 1440 et 2076 U/l, soit 12 fois plus élevées que celle du lot 1, qui varient entre 118 et 170.5 U/l. Cette étude est en accord avec les résultats trouvés par Sanzgiri et *al.* (1997). Selon ces auteurs une seule dose de CCl₄ suffit pour augmenter l'activité enzymatique de l'ALAT et de l'ASAT. Cette enzyme est retrouvée dans le cytoplasme et les mitochondries de nombreux tissus, comme le foie, le myocarde, les muscles squelettiques et les globules rouges. Sa concentration dans les organes est (par ordre croissant) importante dans le cœur, le foie, le muscle, le rein et le pancréas. Ces deux marqueurs constituent des indicateurs très sensibles et fiables des lésions hépatocellulaires, telles que la nécrose et l'inflammation.

L'augmentation des activités enzymatiques (ALAT et ASAT), citée précédemment, peut s'expliquer par la métabolisation du CCl₄ en libérant l'ion trichlorométhyl initiant la peroxydation lipidique des membranes plasmiques et provoquent la libération de ces enzymes dans la circulation sanguine. Le taux d'enzymes sériques reflète l'état des tissus : l'augmentation dans le sérum de l'activité d'une enzyme est signe d'une altération ou une souffrance cellulaire. On observe une augmentation de la perméabilité membranaire d'où fuite des enzymes membranaires des tissus vers le sang. En fait, le volume cellulaire est déterminé par des pompes ioniques membranaires ATP dépendants qui intègrent le potassium et rejettent le calcium, le sodium et l'eau. Cependant, dans les situations pathologiques provoquées par l'ingestion d'une dose de CCl₄, l'ATP intracellulaire vient à manquer au-delà des limites physiologiques et le fonctionnement de ces pompes ioniques est perturbé, le volume augmente (la cellule gonfle). On notera parallèlement à ce phénomène une augmentation du calcium intracellulaire, qui ira activer les filaments contractiles à l'intérieur de la membrane. Il y aura formation de vésicules et de brèches membranaires. Ces brèches sont des pores cellulaires, par lesquels les enzymes vont quitter la cellule atteinte. Le degré de la souffrance cellulaire dépend de la dose ingérée, de la voie d'administration et du régime alimentaire. La dose létale du CCl₄

(DL50), chez le rat (tab.17), est de 10054 mg/kg de poids corporel (Kennedy et *al.*, 1986).

Espèces	DL ₅₀ (mg/kg)	Auteurs
Souris	12 100 - 14 400	Dybing et Dybing, 1946
Rat (femelle)	2 821	Smyth et <i>al.</i> , 1970, Klaassen et Plaa, 1969
Rat (male)	10 054	Kennedy et <i>al.</i> , 1986
Chien	2 300	Klaassen et Plaa, 1967

Tableau 17 : Les différentes DL50 après administration du CCl4 par voie orale

Dans le cas de notre étude, la dose de CCl4 administrée, par voie orale, est de 2 ml/kg de poids corporel dans une solution à 30% d'huile de paraffine, ce qui équivaut à une dose de 954 mg/kg de poids corporel de CCl4 pur. Le CCl4 est absorbé principalement par inhalation et par voie orale. Environ 50% du CCl4 sont excrétés inchangés, l'autre partie étant métabolisée. Une quantité minime est excrétée dans les urines (4 à 8%) et les fèces (Reynolds et *al.*, 1984 ; Page et Carlson, 1994 ; Mac Collister et *al.*, 1951 ; Paustenbach et *al.*, 1988). Le CCl4 est activé par les cytochromes P450E1 (Raucy et *al.*, 1993 ; Gruebele et *al.*, 1996) 2B1 ou 2B2, probablement 3A pour former un radical trichlorométhyl (CCl₃[•]). Ce radical peut se fixer à des molécules cellulaires (ADN, protéines, lipides) altérant les métabolismes essentiels comme celui des lipides (dégénérescence graisseuse).

Des adduits résultant de l'action du CCl₃[•] sur l'ADN sont observés. Le radical CCl₃[•] peut également réagir avec l'oxygène pour conduire à la formation d'un radical trichlorométhyl peroxyde (CCl₃OO[•]) hautement réactif. Ce radical initie la chaîne des réactions de peroxydation lipidique (fig.20). Il en résulte une destruction d'acides gras poly-insaturés, en particulier ceux associés aux phospholipides.

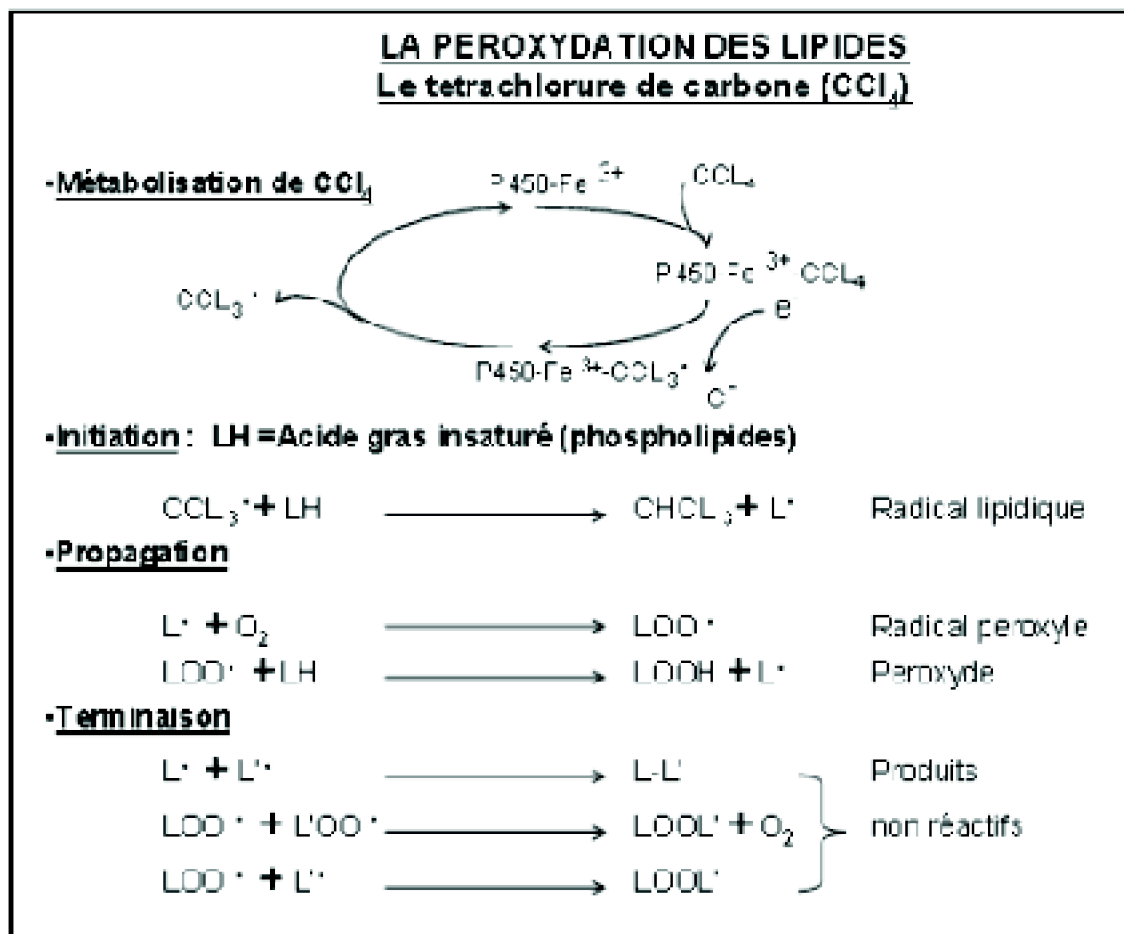


Figure 20: La peroxydation lipidique par le CCl₄

La perméabilité des mitochondries, du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques est altérée (Plaa, 1980) ce qui conduit à un trouble de l'homéostasie calcique. Le radical trichlorométhyl peut aussi subir des réactions anaérobies conduisant à la formation de chloroforme, d'hexachloroéthane et de monoxyde de carbone. Enfin, ce radical peut former du trichlorométhanol précurseur de phosgène qui est rapidement hydrolysé en dioxyde de carbone (fig.21).

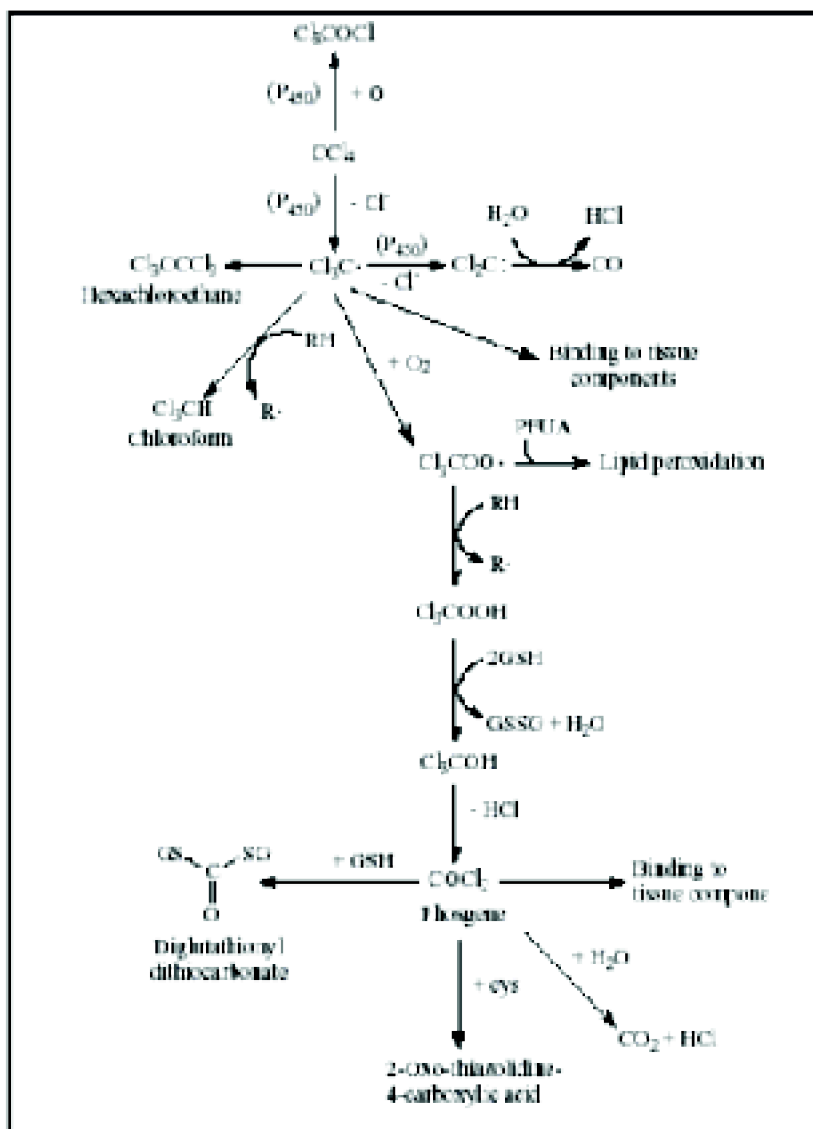


Figure 21: Biotransformation du tétrachlorure de carbone. (Selon Harris & Anders, 1980; Anders & Jakobson, 1985; McGregor & Lang, 1996).

Le tétrachlorure de carbone est rapidement absorbé par le tractus gastro-intestinal. Rechnagel et Litteria (1960) ont montré que, chez le rat, le pic sanguin apparaît 90 minutes après l'administration orale. L'adsorption du tétrachlorure de carbone est rapide et influencée par l'alimentation (augmentée par l'alcool ou les graisses).

Du fait de ses propriétés lipophiles, le tétrachlorure de carbone s'accumule dans les tissus riches en graisses, comme le tissu adipeux, le foie et la moelle osseuse (Robbins, 1929 ; Mc Collister et al., 1951). Il apparaît clairement que la toxicité aiguë du tétrachlorure de carbone est faible.

III-3-1-3- Effet du CCl_4 sur la LDH

Les activités enzymatiques de la LDH mesurées au niveau du sérum des rats intoxiqués pendant 24h avec une dose orale de 2 ml de CCl_4/kg de poids corporel dans une solution

à 30% d'huile de paraffine (rats du lot 3) sont reportées sur le tableau 16 et figure 22.

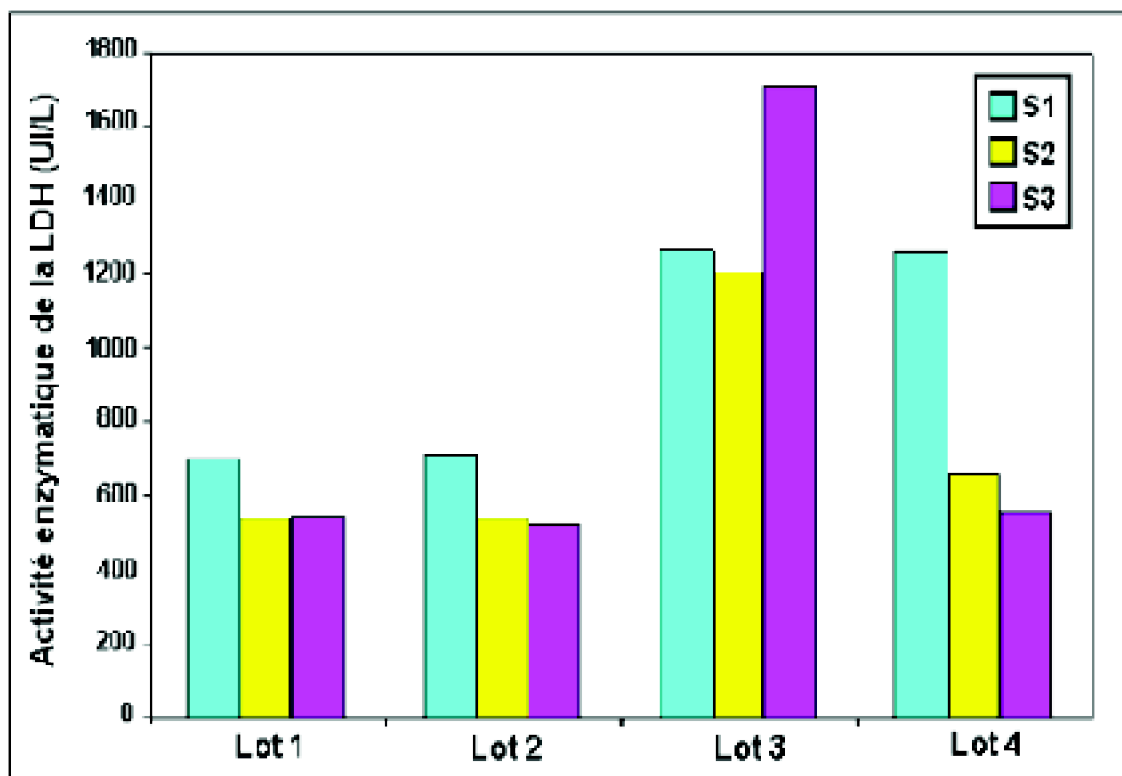


Figure 22 : Détermination des activités enzymatiques de la LDH dans le sérum des rats soumis aux différents traitements.

La concentration en LDH du lot 3 varie entre 1202.5 et 1708.5 U/l. Elles sont 2.2 et 2.45 fois plus importantes que celle du lot 1(témoin) qui varient entre 540 et 697 U/l.

La LDH est retrouvée dans le cytoplasme de nombreux tissus. Sa spécificité est donc faible, mais peut augmenter par la détermination des isoenzymes. Dans notre cas cette augmentation de la LDH peut s'expliquer par une souffrance du foie qui est privé d'une circulation correcte due à la métabolisation du CCl4 et à la bio activation des métabolites générés comme expliquée précédemment (Paduraru et al., 1996).

III-3-1-4- Effet du CCl4sur la PAL

Les activités enzymatiques de la PAL mesurées au niveau du sérum des rats intoxiqués pendant 24h avec une dose orale de 2 ml de CCl4/kg de poids corporel dans une solution à 30% d'huile de paraffine (lot 3), sont reportées sur le tableau16 et figure 23.

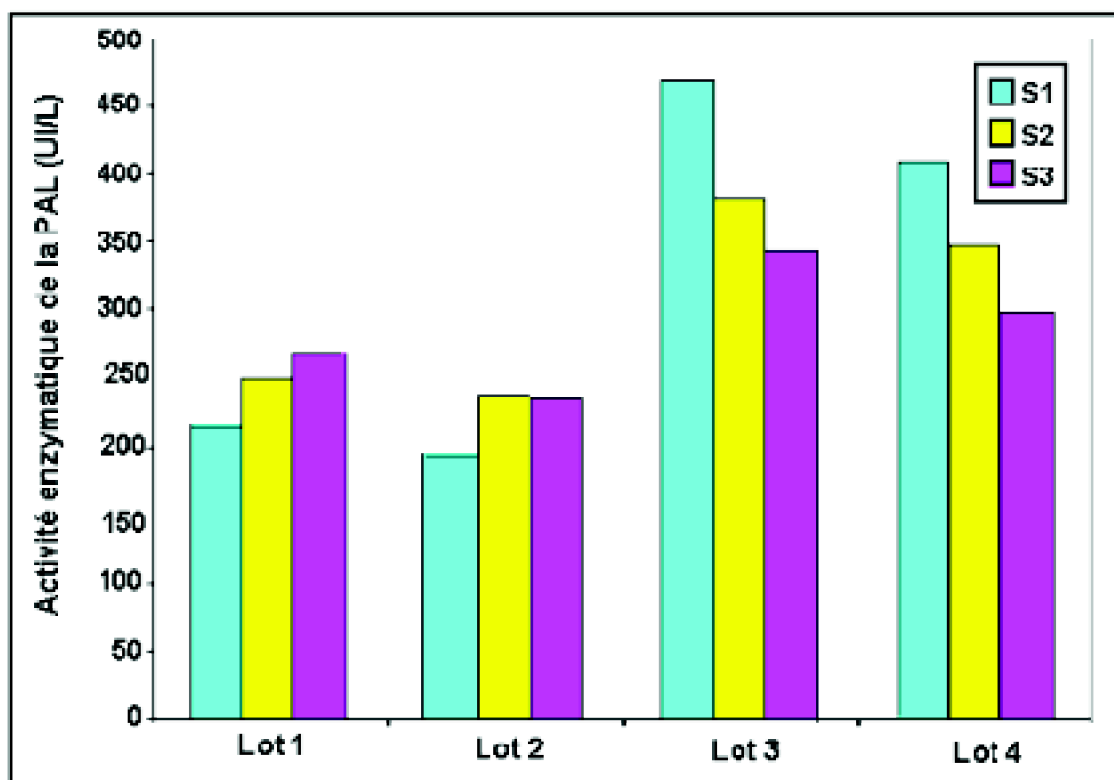


Figure 23 : Détermination des l'activités enzymatiques de la PAL dans le sérum des rats soumis aux différents traitements

Les valeurs de la phosphatase alcaline varient entre 344 et 468 U/l pour le lot 3 et 1.58 et 1.73 fois plus importantes que celle du lot 1 (témoin) qui varient entre 217 et 270.4 U/l. La phosphatase alcaline, qui est un marqueur de la toxicité, exprime une éventuelle défaillance biliaire. Comme l'ampleur de la toxicité par le CCl₄ est en relation avec la dose ingérée, il semblerait que 954 mg/Kg de poids corporel n'est pas très toxique pour que cette enzyme soit très affectée (Brensilver et Caplan, 1975). Lors de l'intoxication des rats par le CCl₄, les hépatocytes ont augmenté leur production de la PAL que l'on a retrouvé au niveau du sérum. La PAL est retrouvée principalement dans le foie, les leucocytes, les reins, l'os et le placenta. La PAL dosée au niveau du sérum augmente dans une certaine mesure dans la plupart des dommages du foie (Aruna et *al.*, 2002). Les acides biliaires expliquent cette augmentation : ils induisent la synthèse de la PAL et exercent un effet détersif sur la membrane canaliculaire permettant la fuite dans le sérum (Kaplan, 1993 ; Kaplan, 1986). La spécificité de la PAL pour le foie est faible à cause de son augmentation dans d'autres pathologies comme la maladie de l'os.

En conclusion, les bilans enzymatiques sont très souvent perturbés lors d'affections hépatiques car le foie est l'organe le plus riche en enzymes. De plus, après une affection hépatique, les enzymes passent directement dans la circulation sanguine sans emprunter le secteur interstitiel ou la voie lymphatique. Donc les pathologies hépatobiliaires sont les plus riches en variation enzymatique.

III-3-2- Effet du CCl₄ sur les marqueurs biochimiques

III-3-2-1- Effet du CCl₄ sur la bilirubine totale et directe

Les concentrations en bilirubine mesurées au niveau du sérum des rats intoxiqués pendant 24h avec une dose orale de 2 ml de CCl₄ par kg de poids corporel sont reportées sur le tableau 18 et les figures 24 et 25.

La bilirubine est le pigment qui donne sa couleur à la bile et qui est issu de la dégradation des globules rouges. On distingue deux fractions de bilirubine : La bilirubine libre ou indirecte et la bilirubine directe ou conjuguée c'est-à-dire celle transformée par le foie avant d'être éliminée dans les urines. La bilirubine totale des rats témoins est de 3.5 mg/l durant tout le traitement. Celles des rats du lot 3 varient entre 4.5 et 5.5 mg/l. Elles sont 1.28 et 1.57 fois plus importantes que celles des rats témoins.

La bilirubine directe varie entre 0.5 et 1 mg/l chez les rats témoins et de 1.5 à 3 mg/l chez les rats du lot 3. Ces valeurs sont 3 fois plus élevées que chez les rats du lot témoin. Nous remarquons que la bilirubine conjuguée est plus élevée que la bilirubine totale, de plus nous savons que la bilirubine est conjuguée normalement par les hépatocytes du foie mais dans ce cas on remarque qu'il y a obstacle à son excrétion biliaire sous forme de glucuronide.

Cette accumulation de bilirubine directe, bien qu'elle soit faible, peut être considérée comme le signe d'un désordre hépatobiliaire que l'on peut expliquer par l'altération des mécanismes de biotransformation résultant des métabolites produits par le CCl₄ ou par une hémolyse. En général, leur degré d'augmentation ne correspond pas à la gravité de l'affection. Les taux sériques de bilirubine représentent un indicateur peu sensible de la maladie hépatique, mais ils donnent une idée du fonctionnement global du foie.

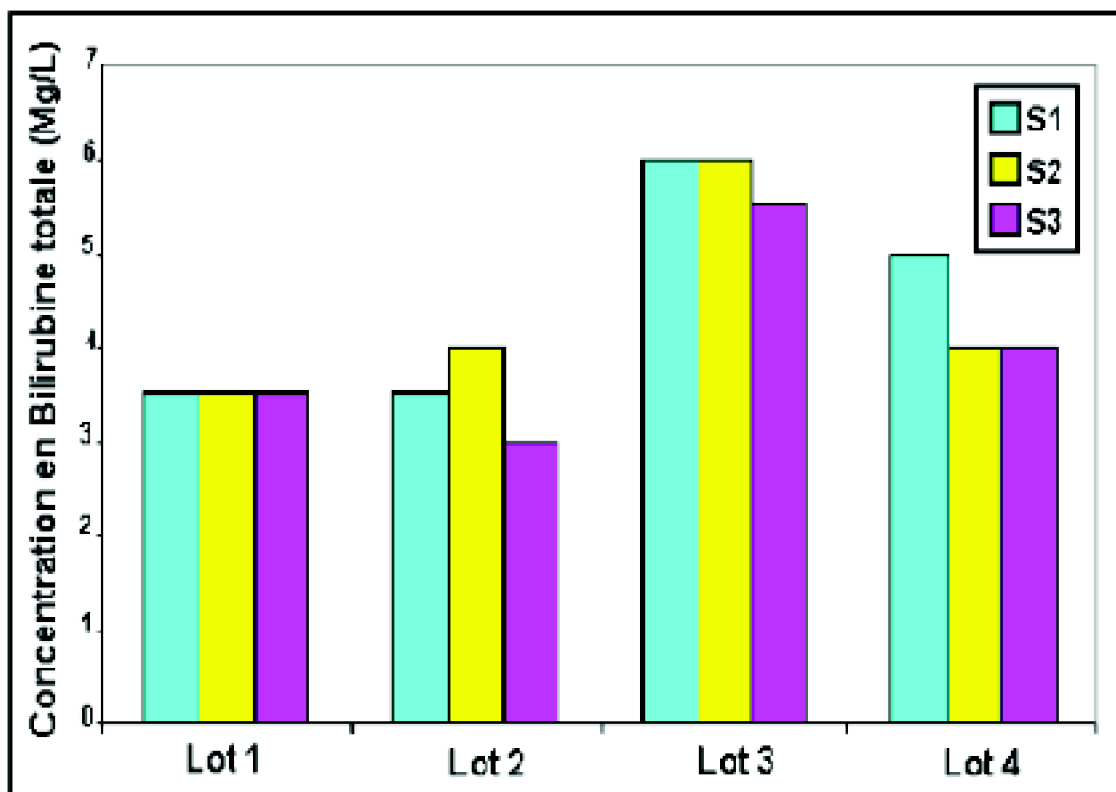


Figure 24 : Détermination des concentrations en bilirubine totale (mg/l) dans le sérum des rats soumis aux différents traitements

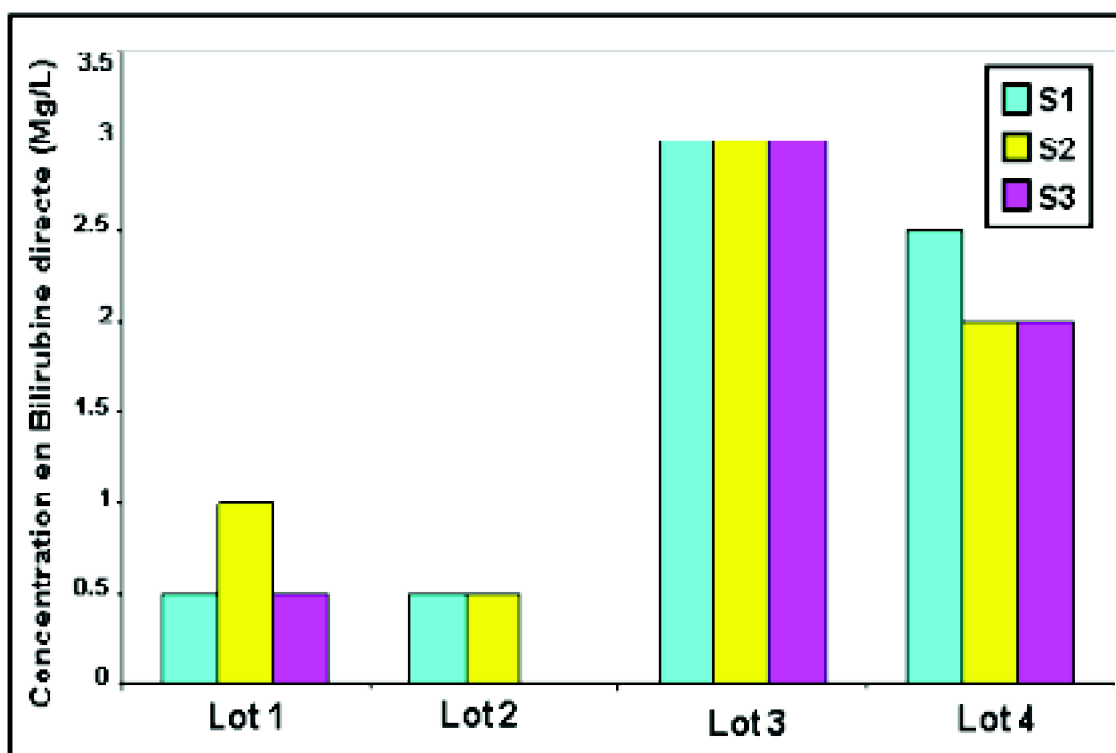


Figure 25 : Détermination des concentrations en bilirubine directe (mg/l) dans le sérum des rats soumis aux différents traitements

III-3-2-2- Effet du CCl4 sur l'albumine

Les concentrations en albumine mesurées au niveau du sérum des rats intoxiqués pendant 24 heures, avec une dose orale de 2 ml de CCl4 par kg de poids corporel, sont reportées sur le tableau 18 et figure 26.

L'albumine sérique est la principale protéine synthétisée dans le foie, de ce fait elle est le marqueur utile de la fonction hépatique. Sa demi-vie est de 20 jours donc relativement longue à modifier. Plusieurs facteurs peuvent affecter la synthèse de l'albumine, comme le régime alimentaire et la dénutrition. La concentration en albumine varie entre 16 et 18 g/l pour le lot témoin et de 17.5 à 19 g/l pour les rats du lot 3. La variation de la concentration en albumine, entre les deux lots, ne paraît pas importante, son rapport est de 1.16 fois. On peut conclure que l'albumine est un marqueur hépatocytaire à réponse lente, son dosage n'est pas très adapté à évaluer les effets d'une toxicité aigue.

Marqueurs biochimiques	Lots				
	Sacrifice	Lot1 (Témoin)	Lot2 (Lycopène)	Lot3 (CCl4)	Lot4 (Lycopène+ CCl4)
Bilirubine totale (mg/l)	S1	3.5	3.5	6.0	5.0
	S2	3.5	4.0	6.0	4.0
	S3	3.5	3.0	5.5	4.0
Bilirubine directe (mg/l)	S1	0.5	0.5	3.0	2.5
	S2	1.0	0.5	3.0	2.0
	S3	1.5	0	3.0	2.0
Albumine (g/l)	S1	16.0	16.0	17.5	16.0
	S2	16.0	16.0	19.0	16.0
	S3	17.0	17.5	17.5	17.5

Tableau18 : Dosage des paramètres biochimiques du bilan hépatique des rats

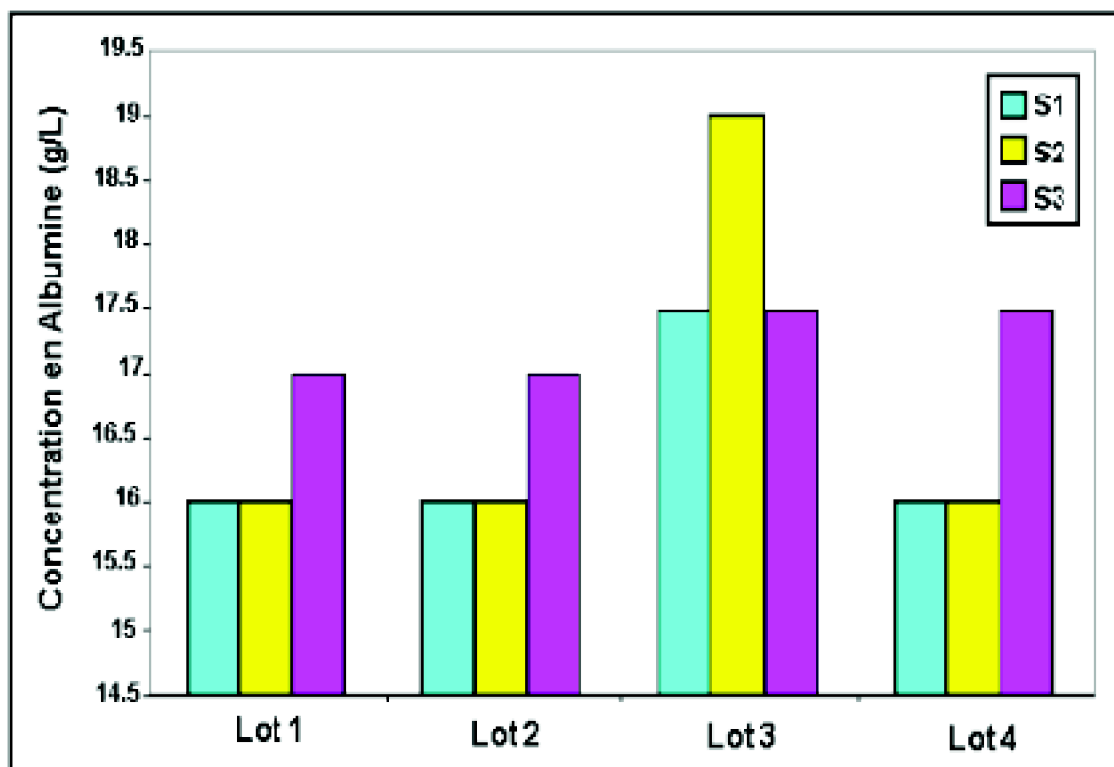


Figure 26 : Détermination des concentrations de l'Albumine (g/l) dans le sérum des rats soumis aux différents traitements

III-4 - Etude de l'effet hépatoprotecteur du lycopène sur les marqueurs hépatique des rats intoxiqués par le CCl₄

III-4-1- Effet du lycopène sur les activités enzymatiques des rats intoxiqués par le CCl₄

III-4-1-1- Effet du lycopène sur l'ALAT

Les activités enzymatiques de l'alanine aminotransférase (ALAT) mesurées au niveau du sérum des rats prétraités avec une dose orale de 5 mg de lycopène par kg de poids corporel pendant 45 jours et intoxiqués avec une dose orale de 2ml de CCl₄, 24h avant chaque sacrifice (15^{ème}, 29^{ème} et 43^{ème} jour) (lot 4) sont reportées au niveau du tableau 16 et la figure 18.

Ces valeurs nous montrent une réduction de l'activité enzymatique de l'ALAT au niveau du lot 4 comparé au lot 3 (intoxiqué au CCl₄, sans avoir reçu de lycopène), mais

toujours une augmentation de celles-ci par rapport aux lot 1 (témoin) et lot 2 (supplémenté avec du lycopène mais non intoxiqué). Nous remarquons que l'activité enzymatique chez les rats du lot 4 commence à baisser à partir du premier sacrifice (15^{ème} jour de la supplémentation). Cette valeur est de 1003.5 U/l au S1 puis diminue encore jusqu'à 566 U/L au S2 pour atteindre 288 U/L au S3.

III-4-1-2- Effet du lycopène sur l'ASAT

Les activités enzymatiques de l'aspartate aminotransferase (ASAT) mesurées au niveau du sérum des rats prétraités avec une dose orale de 5mg de lycopène par kg de poids corporel pendant 45 jours et intoxiqués avec une dose orale de 2 ml de CCl₄, 24 heures avant chaque sacrifice (15^{ème}, 29^{ème} et 43^{ème} jour) sont reportées sur le tableau 16 et figure 19.

Ces résultats nous montrent une réduction de l'activité enzymatique de l'ASAT chez les rats du lot 4 comparé au lot, 3, mais on observe toujours une augmentation par rapport aux lots, 1 et 2. Cette activité est de 1286.5 U/L au S1, de 898 U/L au S2 et de 605 U/L au S3. Selon Kim (1995) la supplémentation par le lycopène supprime la peroxydation lipidique au niveau des hépatocytes intoxiqués par le tétrachlorure de carbone. De plus l'étude réalisée par Astrog et *al.* (1997) démontre clairement que le prétraitement des rats par le lycopène module l'activité du cytochrome P450 E2i responsable de la métabolisation des xénobiotiques dans le foie. Selon Pan et *al.* (2003) la supplémentation par le lycopène par voie orale pendant 4, semaines augmente le niveau de SOD, GSH-Px et diminue le niveau de MDA (Malondialdehyde). De ce fait, il conclue que le lycopène peut diminuer la peroxydation lipidique. Nos résultats sont en accord avec les résultats trouvés par ces études et pour quantifier cette diminution des activités enzymatiques, qui est d'ailleurs le but recherché, nous avons appliqué la formule de Singh et *al.* (1998) qui nous a permis de déterminer les pourcentages de la protection (Tab. 18). Ces pourcentages sont respectivement 87.6% au S1 ; 51.52% au S2 et 77.19% au S3 et ceux de l'ALAT sont respectivement de 4.31% au S1 ; 65% au S2 et 86,90% au S3. Cette baisse d'activité des enzymes sériques est due à la supplémentation par le lycopène qui inactive les radicaux libres issus de la métabolisation du CCl₄. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Ahmed et Khater, (2001). Nous pouvons conclure que le lycopène a pu préserver l'intégrité des membranes hépatocellulaires en réduisant leurs activités enzymatiques.

III-4-1-3- Effet du lycopène sur la LDH

Les activités enzymatiques de la LDH mesurées au niveau du sérum des rats prétraités avec une dose orale de 5 mg de lycopène par kg de poids corporel pendant 45 jours et intoxiqués avec une dose orale de 2 ml de CCl₄, 24 heures avant chaque sacrifice (15^{ème}, 29^{ème} et 43^{ème} jour) sont reportées au niveau du tableau 16 et la figure 22.

Ces valeurs montrent une réduction des activités enzymatiques de la LDH au fur et à mesure que le traitement se poursuit. Nous avons 1258 U/L au S1, 658 U/L au S2 et 558 U/L au S3. Ces valeurs sont 1.8 fois plus importantes que pour le lot1. Nous remarquons qu'au bout de six semaines de prétraitement, les valeurs de la LDH rejoignent celles des

lots 1 et 2. Selon Campbel et *al.* (2004) la supplémentation par le lycopène altère la biotransformation des xénobiotiques qui sont pharmacologiquement et toxicologiquement des substances actives non produites par l'organisme. La valeur de la protection (tab.28) est de 2% au S1, de 82% au S2 et de 98% au S3.

La LDH est une enzyme cytoplasmique, elle est présente dans de nombreux tissus donc elle n'est pas spécifique, et les 24h d'intoxication ne sont pas suffisantes pour mieux apprécier son évolution, néanmoins elle nous oriente vers une pathologie hépatique.

En conclusion, concernant les activités enzymatiques, le foie est l'un des organes les plus vastes de notre corps. Il métabolise les éléments que nous mangeons, les décompose en parties utiles et nous protège des effets dommageables de nombreux composants toxiques. La détoxification est une partie capitale du métabolisme, et le foie joue un rôle clé dans ce processus. Le foie utilise trois voies principales de détoxification :

- En filtrant le sang pour éliminer les grandes toxines : Un foie en bonne santé évacue pratiquement 100% des bactéries et toxines du sang avant qu'ils ne rejoignent la circulation générale.
- En décomposant les produits chimiques indésirables par voie enzymatique : les enzymes de la phase 1 (fonctionnalisation) neutralisent certains de ces composés chimiques et en convertissant d'autres en formes intermédiaires qui seront des cibles plus faciles pour des systèmes enzymatiques de la phase 2 (conjugaison). Ces formes intermédiaires sont souvent beaucoup plus actives chimiquement et donc beaucoup plus toxiques que les substances originelles. Si les systèmes de détoxification de la phase 2 ne fonctionnent pas de façon adaptée, ces substances intermédiaires subsistent et causent des dommages (cas du lot 3). Un effet secondaire de cette activité métabolique est la production de radicaux libres, des molécules hautement réactives qui vont se lier à des composants cellulaires et provoquer des dégâts. Il est donc important que ces oxydants soient neutralisés.

Au niveau du foie, l'antioxydant le plus important est le glutathion un acide aminé complexe issu de cystéine, d'acide glutamique et de glycine. Il est indispensable au bon déroulement des phases 1 et 2 de la détoxification. Lorsque les quantités de toxines arrivent au niveau du foie, les radicaux libres sont produits en telle quantité que la totalité du glutathion est utilisée, au cours de la phase 1 pour les neutraliser. Pour rétablir les niveaux de glutathion, les rats sont soumis à un traitement avec du lycopène pour ainsi rétablir le processus de détoxification de la phase 2.

III-4-1-4- Effet du lycopène sur la PAL

Les activités enzymatiques de la phosphatase alcaline (PAL) mesurées au niveau du sérum des rats prétraités avec une dose orale de 5 mg de lycopène par kg de poids corporel pendant 43 jours et intoxiqués avec une dose orale de 2ml de CCl₄, 24 h avant chaque sacrifice (15^{ème}, 29^{ème} et 43^{ème} jour) sont reportées au niveau du tableau 16 et la figure 23. Ces valeurs sont de 409.5 U/l au S1, de 346.5 U/l au S2 et 298.5 U/l au S3. L'intoxication par le CCl₄ dépend de la dose ingérée. La quantité ingérée est proportionnelle aux dommages provoqués. Notons que ces valeurs sont d'environ 1.9 fois

plus élevées que celles des lot 1 et 2, donc l'atteinte hépatique par la PAL est très modérée. Selon la FDA (2000), elle est jugée considérable lorsque cette activité atteint trois fois la limite supérieure du lot témoin.

La PAL est un indicateur de la toxicité. La dose administrée a provoqué une légère défaillance biliaire. Le pourcentage de protection est de l'ordre de 23% au S1 ; 27% au S2 et de 61% au S3.

III-4-2- Effet du lycopène sur les marqueurs biochimiques des rats intoxiqués par le CCl4

III-4-2-1- Effet du lycopène sur la bilirubine

Les concentrations en bilirubine mesurées au niveau du sérum des rats prétraités avec une dose orale de 5 mg de lycopène par kg de poids corporel pendant 43 jours et intoxiqués pendant 24h avec une dose orale de 2 ml de CCl4 par kg de poids corporel sont consignés dans le tableau 18 et les figures 24 et 25.

Les concentrations en bilirubine totale enregistrées chez les rats du lot 4 sont de 5 mg/l au S1 et de 4 mg/l au S2 et au S3. Ainsi le pourcentage de la protection est de 40%, 80% et 68% respectivement au S1, S2 et S3. La protection par le lycopène est aussi partielle. Les taux sériques de bilirubine représentent un indicateur peu sensible de la maladie hépatique, mais ils donnent une idée du fonctionnement global du foie. En général, leur degré d'augmentation ne correspond pas à la gravité de l'affection. Cependant, ils peuvent se révéler utiles pour suivre l'évolution clinique de la maladie.

Les concentrations en bilirubine directe obtenues chez les rats du lot 4 varient entre 2.5 mg/l au S1 et 2 mg/l au S2 et S3, contre 3 mg/l pour tous les rats du lot 3. Cependant celles du lot 2 varient de 0 mg/l à 0.5 mg/l. Le taux de protection pour ce marqueur est de l'ordre de 20% au S1, de 33% au S2 et de 80% au S3. Nous remarquons que le prétraitement par le lycopène protège partiellement les rats de la toxicité induite par le tétrachlorure de carbone. Quand le foie lésé ne parvient pas à évacuer la bile en excès vers la vésicule biliaire, le taux de bilirubine sanguine augmente. Le prétraitement par le lycopène a amélioré le fonctionnement du foie. Selon Alam et al (1990), la composition du régime alimentaire influe aussi sur les paramètres plasmatiques. Or ici la composition du régime alimentaire des rats, est pauvre spécialement en lipide et le vecteur du lycopène est l'huile de paraffine.

III-4-2-2- Effet du lycopène sur l'albumine

Les concentrations en albumine mesurées au niveau du sérum des rats prétraités avec une dose orale de 5 mg de lycopène par kg de poids corporel pendant 43 jours et intoxiqués pendant 24h avec une dose orale de 2 ml de CCl4 par kg de poids corporel sont consignées sur le tableau 18 et la figure 26.

Le dosage de l'albumine est un indicateur de la synthèse hépatique. Les valeurs enregistrées sur le tableau 16, varient pour le lot 4, entre 16 g/l et 17.5 g/l au S3 contre

17.5 g/l pour le lot 3. Le pourcentage de protection est de 100% pour tous les sacrifices.

Dosages (%)	Sacrifices	lot4
ASAT	S1	87.6
	S2	51.52
	S3	77.19
ALAT	S1	4.31
	S2	65
	S3	86.90
LDH	S1	2
	S2	82
	S3	98
PAL	S1	23
	S2	27
	S3	61
La bilirubine totale	S1	40
	S2	80
	S3	60
Bilirubine Directe	S1	20
	S2	33
	S3	80
Albumine	S1	100
	S2	100
	S3	100

Tableau19: *Activité hépatoprotective des rats prétraités avec le lycopène et intoxiqués pendant 24 heures avec 2 ml de tétrachlorure de carbone*

III-5- Etude anatomopathologique des effets du CCl₄ sur le foie des rats

Cette étude nous a permis d'étudier les caractères macroscopiques et histologiques du foie des rats témoins (lot 1) et ceux soumis aux différents traitements (lots 2, 3 et 4).

Les différents lots de rats à sacrifier ont été identifiés. Plusieurs prélèvements ont été effectués sur chaque foie. Ces prélèvements ont été traités et inclus en paraffine. Des coupes sériées ont été effectuées. Une coloration de routine à l'hémalin-éosine est

réalisée pour chaque préparation. Cette dernière colore les noyaux, les ribosomes et le réticulum endoplasmique en bleu violacé et le cytoplasme en rose ou en rouge rosé.

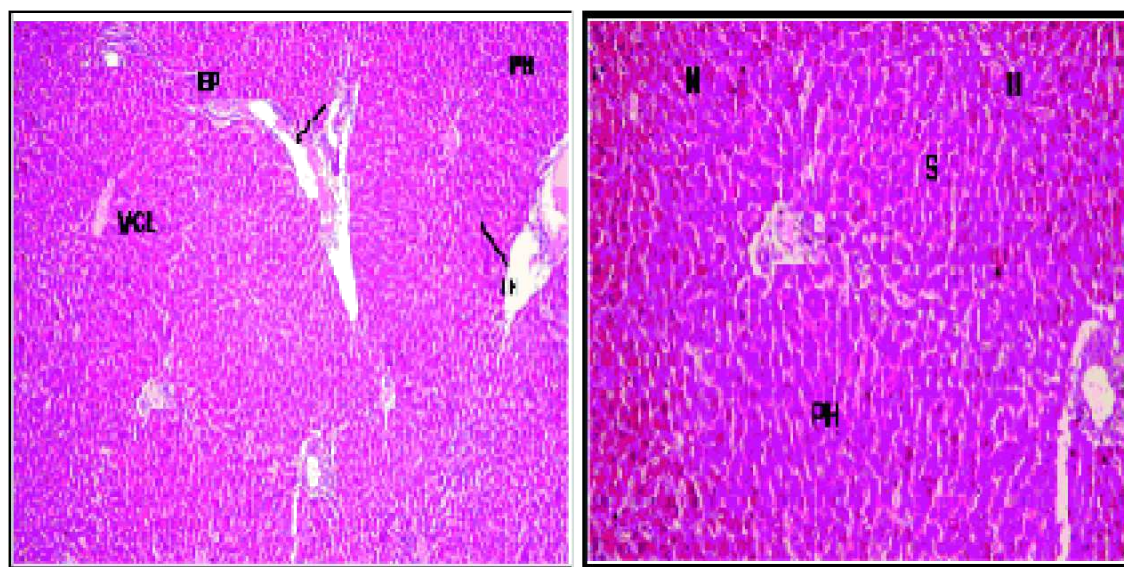
III-5-1- Le foie témoin

- Etude macroscopique

Les pièces d'hépatectomies ne montrent pas de variations de taille, de couleur ou de consistance.

- Etude histologique

Les micrographies de la figure 27 représentent des coupes histologiques du foie des rats du lot témoin, colorées à l'hémalin-éosine. L'identification des différents tissus et structures composant le foie est montrée en annexe 4.



Foie des rats témoins(lot 1).H.E.Gx 100

Foie des rats témoins(lot 1).H-E.Gx 200

Figure 27 : Morphologie du foie de rats témoin, montrant un parenchyme hépatique normal .H-E. Gx.100 et 200.

Ces micrographies nous montrent une architecture lobulaire de base normale. Les espaces portes (EP) sont normaux et ne présentent pas d'infiltrations inflammatoires. Les hépatocytes (H) sont organisées en travées radiaires autour de la veine centrolobulaire. Ces travées sont séparées par des sinusoides (S). Le parenchyme hépatique ne révèle ni stéatose, ni cholestase ni fibrose.

Nous remarquons aussi que certaines cellules sont polyédriques et binucléées, à noyaux volumineux de position centrale (Fig. 28). Une représentation schématique est présentée dans l'annexe 3.

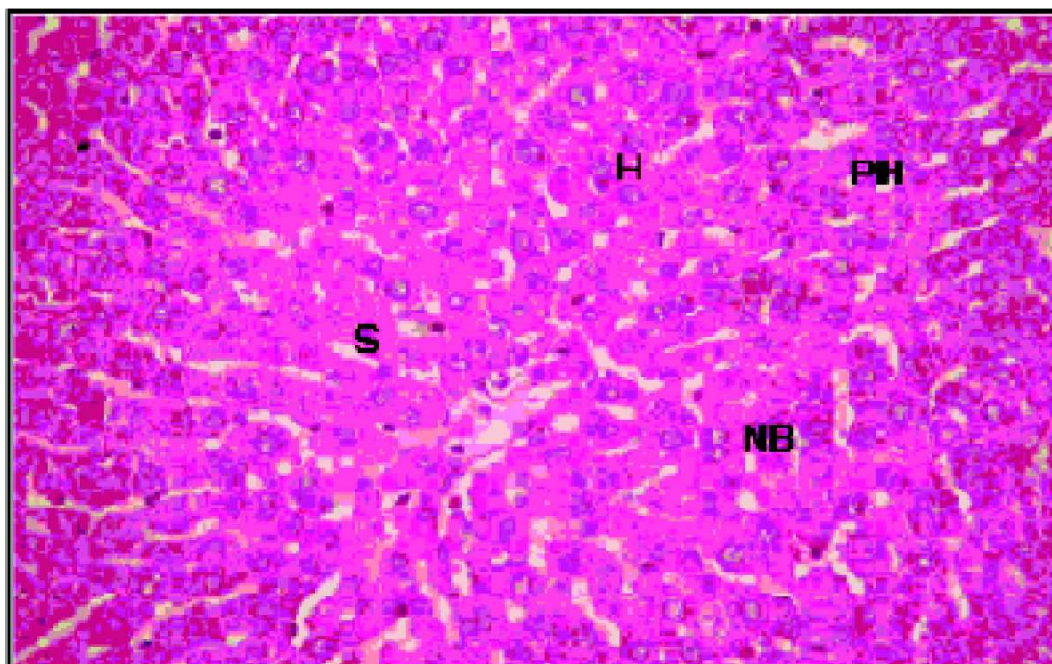


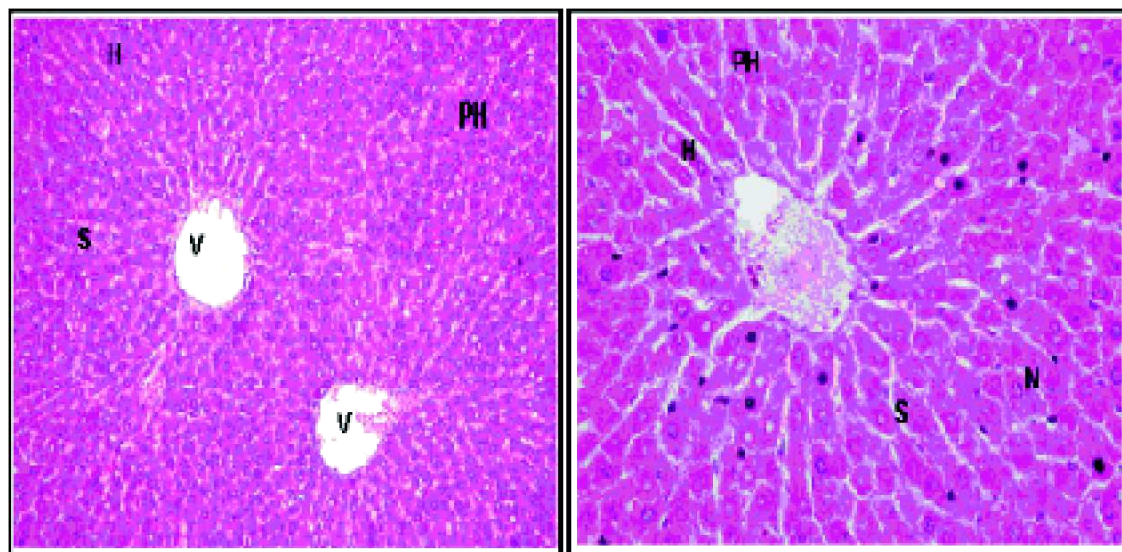
Figure 28: Morphologie du foie de rats témoins, montrant un parenchyme hépatique normale avec des noyaux binucléés (NB) .H-E.Gx.400

Foie des rats témoins (lot 1). H-E. Gx 400

III-5-2- Le foie traite

III-5-2-1- Le foie traite avec le lycopène

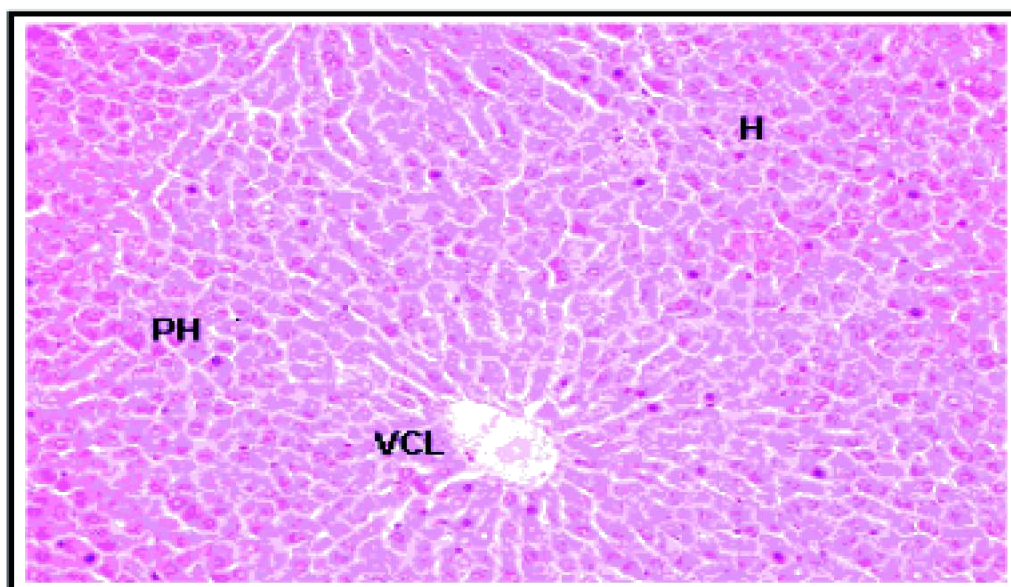
Les rats du lot 2, sont supplémentés quotidiennement avec une dose orale de 5 mg de lycopène par kg de poids corporel dans l'huile de paraffine. Les micrographies correspondantes (Fig. 29 et 29 bis), ne nous montrent pas seulement un parenchyme hépatique normal comme sur les micrographies des figures 27 et 28 mais mieux encore, elles montrent, des travées hépatocytaires très distinctes par rapport à celles des lots témoins.



Foie des rats prétraités avec le lycopène
(lot 2, S1) H.E. Gx 200

Foie des rats prétraités avec le lycopène
(lot 2, S2) H.E. Gx 400

Figure 29 : Morphologie du foie de rats traités avec le lycopène (lot2).H-E.Gx.200 et 400.



Foie des rats prétraités avec le lycopène
(lot 2, S3). H-E. Gx 400

Figure 29 bis : Morphologie du foie de rats traités avec le lycopène (lot2).H-E.Gx. 400.

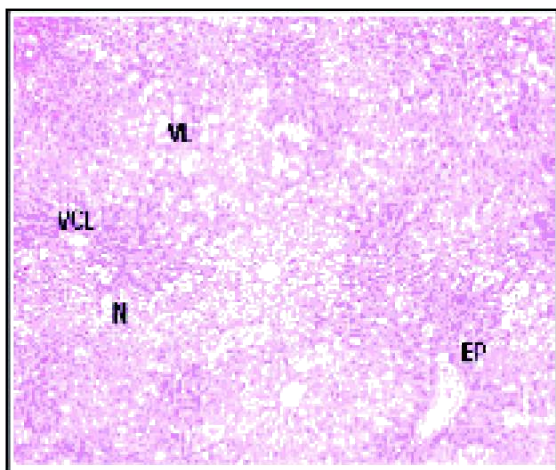
Les sinusoides sont très distincts et ne présentent aucune dilatation. Les espaces portes sont normaux et ne présentent pas d'infiltrations inflammatoires.

Le foie de ces rats présente une architecture normale, on n'y décèle aucune anomalie. On peut conclure que le lycopène n'a pas causé de détérioration de la structure du foie mais a permis une amélioration de l'architecture générale (fig. 29 et 29 bis).

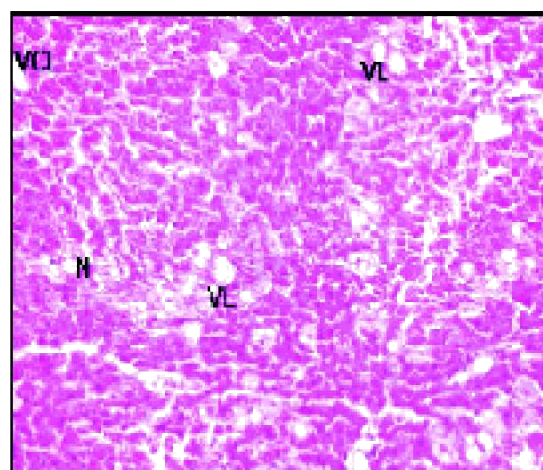
III-5-2-2- Le foie traite avec le CCl4

Le foie des rats traités par une dose orale de 2 ml/kg de poids corporel de tétrachlorure de carbone (lot 3) pendant 24 heures, montre des modifications et une désorganisation du parenchyme hépatique.

Les micrographies de la figure 30 nous montrent une altération des cellules hépatiques et ballonnissement.

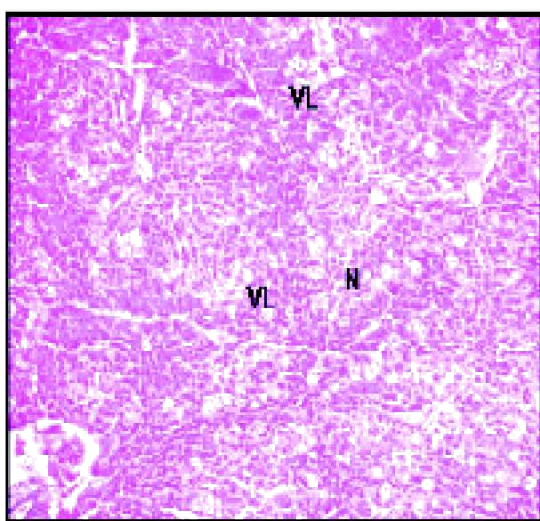


Modifications morphologiques du foie des rats traités par 2 ml de CCl4 (lot 3).H.E. Gx 100.

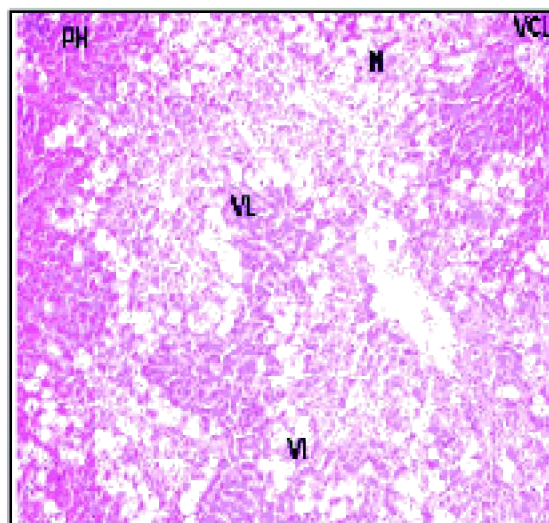


Modifications morphologiques du foie des rats traités par 2 ml de CCl4 (lot 3).H.E. Gx 200.

Figure 30 : Modifications structurales de la morphologie du foie des rats intoxiqués par le CCl4



Modifications morphologiques du foie des rats traités par 2 ml de CCl4 (lot 3).H.E. Gx 200.



Modifications morphologiques du foie des rats traités par 2 ml de CCl4 (lot 3).H.E. Gx 400.

Figure 30 bis : Modifications structurales de la morphologie du foie des rats intoxiqués par le CCl4

Les hépatocytes des espaces centrolobulaires nous montrent des vacuoles optiquement vides, qui occupent le cytoplasme. Ces vacuoles sont tantôt petites, tantôt grandes. Par ailleurs, on note également des hépatocytes en dégénérescences hydropiques. Les cellules de la zone proche de la veine centrolobulaire sont atrophiques

et montrent des images de nécrose. La même observation a été faite par Mukul et Dasgupta, (2002), après administration d'une dose identique de CCl₄ aux rats.

La distribution du tétrachlorure de carbone dépend de la voie d'administration, de sa concentration et de la durée de l'exposition (Von oettingen, 1964). A cause de sa solubilité et de sa lipophilicité, il s'accumule dans les tissus riches en graisse comme les adipocytes et le foie (Fowler, 1969). Les métabolites du CCl₄ sont aussi retrouvés au niveau du tissu adipeux et du foie (DHS, 1987). Le temps maximum d'accumulation, quand il est ingéré par voie orale, est de 15mn pour le foie et de 120, mn pour le tissu adipeux (Sanzgiri et al., 1997). Lors de l'administration du CCl₄, ce dernier subit une métabolisation et une bioactivation, le radical trichlorométhyl initie la peroxydation lipidique (Fig.31).

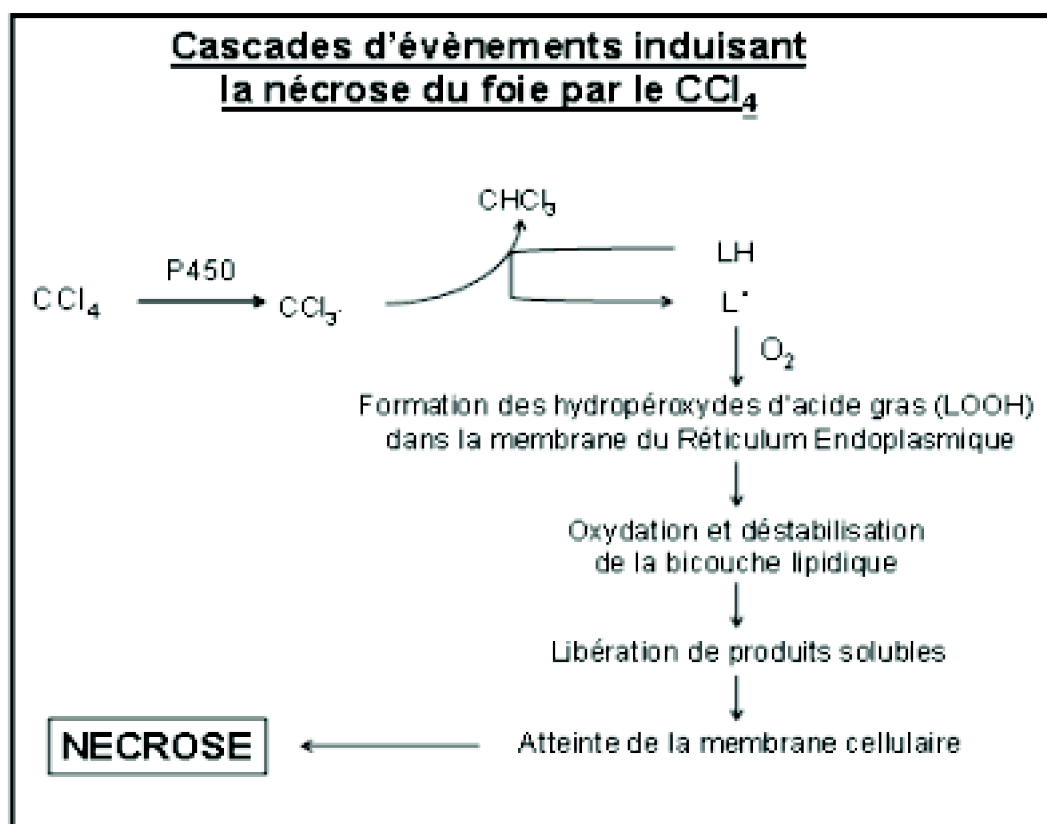


Figure 31: Cascade d'événements induisant la nécrose du foie par le CCl₄

Cette peroxydation provoque une diminution du potentiel antioxydant créé par la réduction des mécanismes enzymatiques et leur déplétion, dont le fonctionnement est altéré dans l'insuffisance hépatique.

La peroxydation lipidique provoque des altérations importantes au niveau des membranes cellulaires et modifie le métabolisme normal des hépatocytes. La figure, 32 nous montre les modifications morphologiques entre un parenchyme hépatique sain, à droite et un parenchyme atteint à gauche. On y voit des cellules hépatiques et des sinusoides d'un foie normal et des changements survenant lors d'une agression par un agent chimique ou physique. Dans ce cas, les hépatocytes perdent leur microvillosité, les cellules endothéliales perdent leur fenestration. Les cellules de kupffer activées.

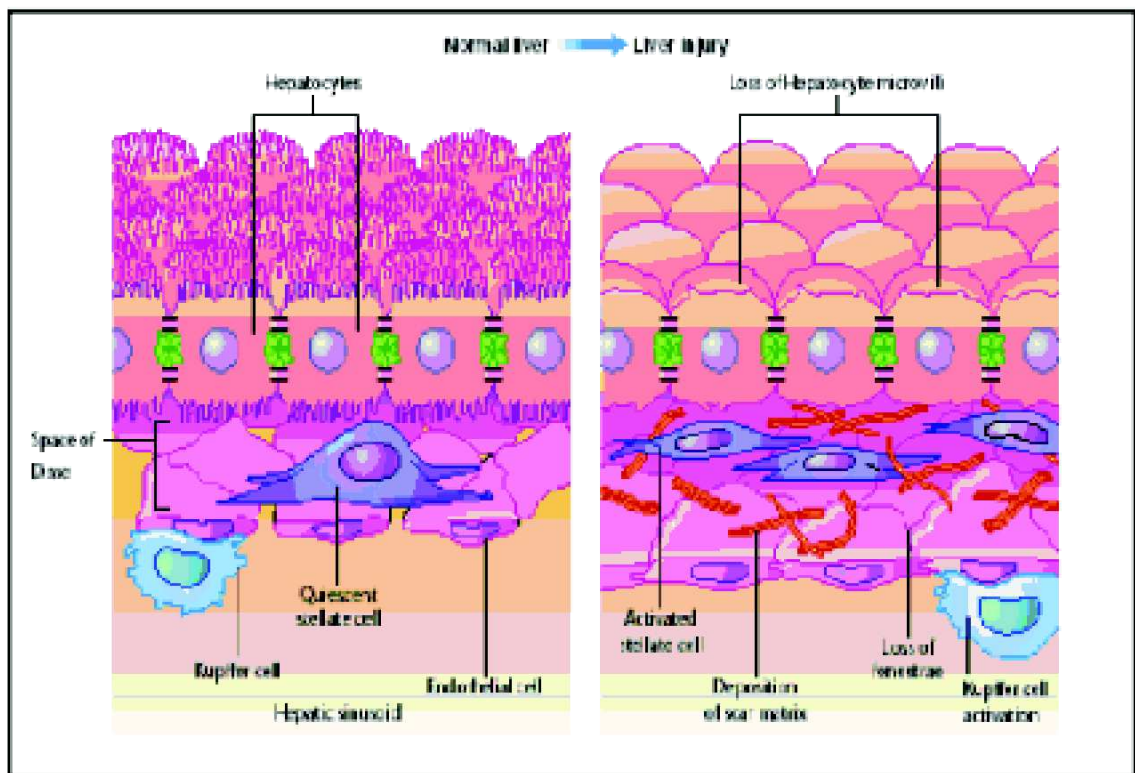


Figure 32 : Parenchyme hépatique sain, à droite, parenchyme atteint à gauche.

Les principaux facteurs causant un engorgement du foie en triglycérides ou « stéatoses » hépatiques sont dus à un déséquilibre entre les triglycérides que synthétise la cellule hépatique (hépatocyte) et leur évacuation dans le sang. Cette dernière, se fait sous forme de VLDL. Ces VLDL sont l'association de triglycérides et d'une protéine transporteuse. On observera alors l'accumulation des triglycérides dans l'hépatocyte lorsque :

- Il y a un surplus de triglycérides, par excès d'apport, ce qui n'est pas notre cas car nos animaux sont restés à jeun depuis l'administration du CCl₄.
- Il y a une carence en protéine transporteuse, il gardera alors en son sein les triglycérides synthétisés.
- Il y a un dysfonctionnement enzymatique.

Dans certains cas, du fait d'une carence enzymatique (par défaut ou par excès de sollicitation), les voies de transformation des aliments (métaboliques) vont, préférentiellement, vers la synthèse de triglycérides, il y a donc une surcharge lipidique.

En conclusion, le CCl₄ est susceptible d'entraîner une surcharge lipidique du cytoplasme hépatocellulaire (stéatose). Les graisses accumulées correspondent en majorité à des triglycérides. Les micrographies précédentes (Fig.30 et 30 bis) montrent des micro et macro vésicules prédominantes dans la zone périphérique (zone 3 de l'acinus) où les lipides s'accumulent en vacuole, refoulant le noyau.

Selon Bruckner et *al.*, (1986) 80 mg de CCl₄ suffisent pour provoquer une

vacuolisation centrolobulaire hépatique et une élévation des enzymes sériques.

III-6- Etude de l'effet hépatoprotecteur du lycopène sur le foie de rats intoxiqués par le CCl4

Rappelons que les rats du lot 4, sont prétraités au lycopène pendant six (06) semaines et qu'un sacrifice est réalisé toutes les deux semaines de supplémentation. Vingt quatre (24) heures avant chaque sacrifice, les rats à sacrifier reçoivent une dose de 2ml de CCl4 par kg de poids corporel, puis jeûnent jusqu'au lendemain. Après le sacrifice, le foie est récupéré, coupé, fixé et coloré à l'hémalin-éosine.

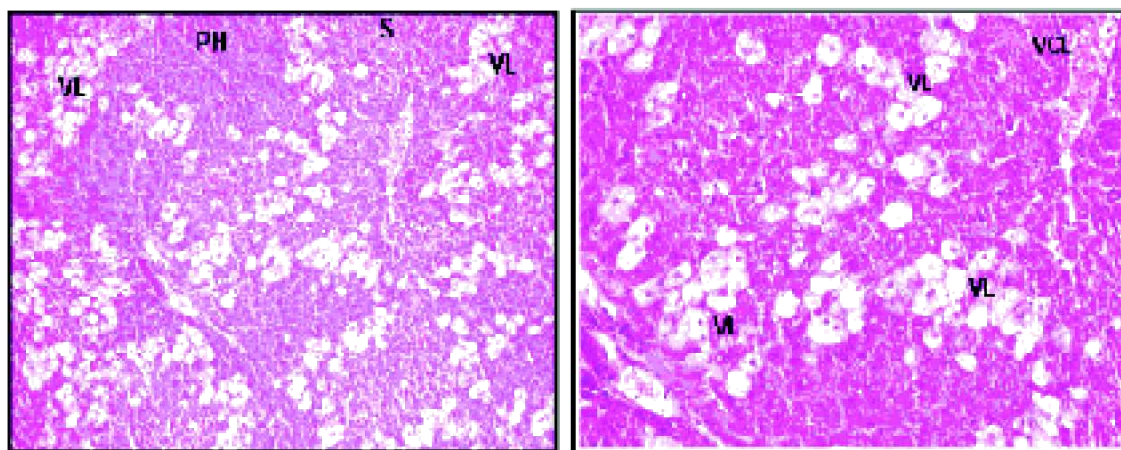
Le CCl4 est facilement absorbé par le tube digestif (86% en 24h chez le rat) (Paul et Rubinstein, 1963). Il est souvent utilisé dans les expériences *in vivo* chez le rat pour induire des lésions hépatiques. Reuber et Glover (1970) ont observé des différences marquées dans la sensibilité de diverses souches de rats à l'induction des dommages du foie.

Les rats du lot 3 ont montré des modifications structurales du parenchyme hépatique. Cette altération est très visible au microscope optique. Des vacuoles lipidiques envahissent les zone de nécrose (fig.30 et 30 bis), contrairement aux rats traités avec le lycopène seul (fig.29 et 29 bis) ou aux rats témoins (fig.27 et 28).

Les micrographies des figures 33, 34, 35 correspondent aux foies des rats du lot 4. Elles révèlent une modification structurale et une morphologie peu altérée par rapport aux rats du lot 3. La veine centrolobulaire est entourée d'hépatocytes avec des sinusoides dilatées, des cellules inflammatoires occasionnelles et quelques vésicules lipidiques. Le parenchyme hépatique n'a pas encore complètement récupéré. La supplémentation par le lycopène est censée récupérer l'intégrité des membranes altérées par la peroxydation lipidique due au CCl4. Le foie est l'organe du corps responsable de la détoxification : La détoxification de la phase, 1 met en œuvre une famille d'enzymes nommées Cytochrome P450 dont le rôle est de désagréger les lésions chimiques qui attachent les xénobiotiques les uns aux autres.

La détoxification de la phase 2 permet de terminer le travail en attachant les xénobiotiques libérés par la phase 1 à des enzymes détoxifiantes (conjugaison). Cette opération permet d'éviter que ces métabolites n'aillent altérer l'ADN dans les cellules saines. Les deux principales enzymes détoxifiantes sont l'acide glucuronique et le glutathion. Le glutathion est l'arme de pointe contre les carcinogènes. Plusieurs autres nutriments stimulent le processus de détoxification de la phase 2 pour permettre l'augmentation du taux sérique de glutathion. A cet effet, nous avons utilisé le lycopène. Il existe beaucoup d'arguments épidémiologiques en faveur d'un effet protecteur du lycopène contre les xénobiotiques (Venket, 2000).

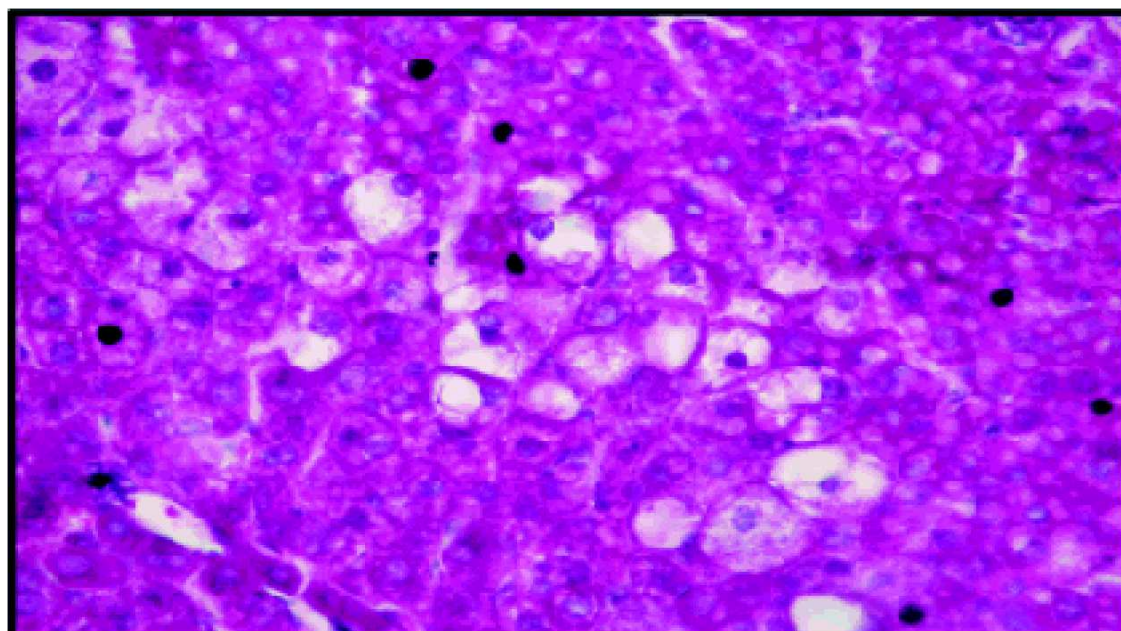
Au sacrifice (S1)



Foie des rats prétraités avec le lycopène et intoxiqués par le CCl4 (lot 4, S1). H.E.Gx 100.

Foie des rats prétraités avec le lycopène et intoxiqués par le CCl4 (lot 4, S1). H.E.Gx 200.

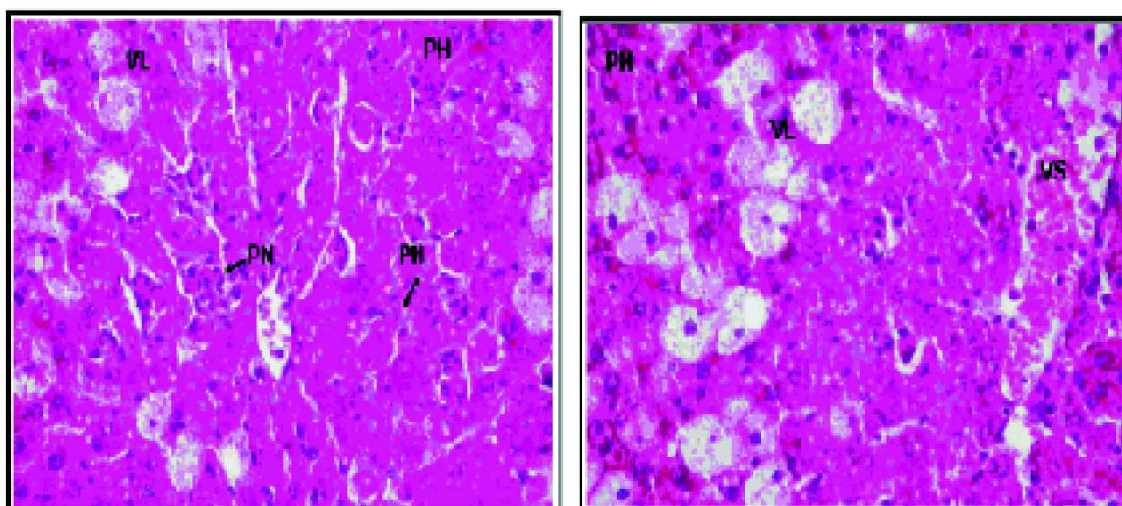
Figure 33 : Morphologie du foie de rats prétraités avec le lycopène et intoxiqués au CCl4 (lot 4 sacrifice 1 (S1))



Foie des rats prétraités avec le lycopène et intoxiqués par le CCl4 (lot 4, S1).H-E0Gx400

Les micrographies (Fig.33) révèlent la présence d'une surface importante de parenchymes sains, par rapport aux micrographies de la figure 30. Elles renferment des lésions dispersées montrant des hépatocytes ballonnées, isolées ou en petit amas. Les surcharges graisseuses sont moins importantes par rapport aux micrographies de la figure 30. La nécrose cellulaire est donc minime.

Au sacrifice (S2)



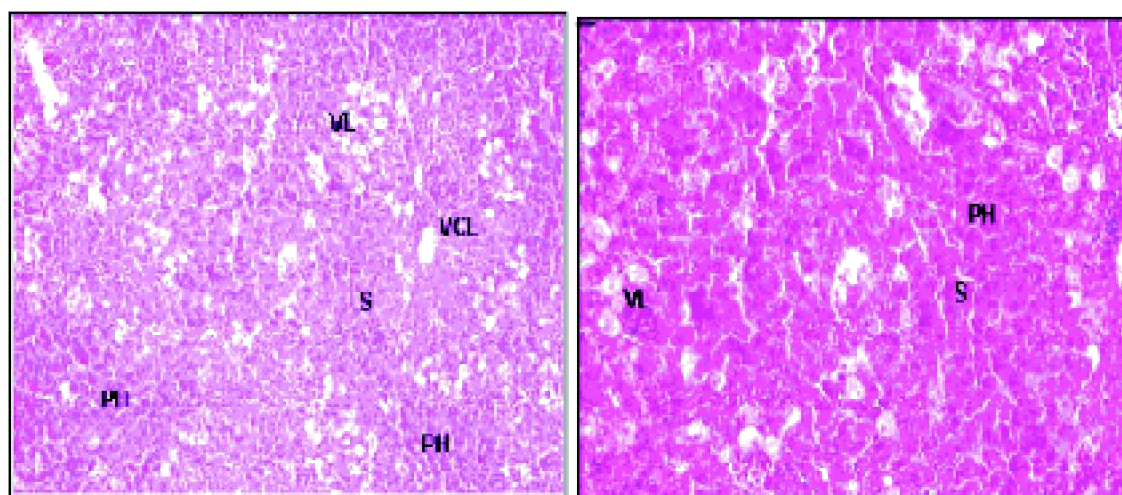
Foie des rats prétraités avec le lycopène et intoxiqués par le CCl4 (lot 4, S2).H-E.Gx 400

Foie des rats prétraités avec le lycopène et intoxiqués par le CCl4 (lot 4, S2).H-E.Gx 400

Figure34: Morphologie du foie de rats prétraités avec le lycopène et intoxiqué au CCl4 [Lot 4 sacrifice 2 (S2)]

Au sacrifice (S2), la protection est sensiblement meilleure (Fig.34). On voit la présence de plus de parenchymes sains par rapports à celui des micrographies des figures 30 et 30 bis et même sur la figure 33. Nous observons encore moins de lésion. Les hépatocytes sont le siège d'une stéatose micro vacuolaire et d'une dégénérescence granulo vacuolaire.

Au sacrifice (S3)



Foie des rats prétraités avec le lycopène et intoxiqués par le CCl4 (lot 4, S3).H-E.Gx200

Foie des rats prétraités avec le lycopène et intoxiqués par le CCl4 (lot 4, S3).H-E.Gx200

Figure 35: Morphologie du foie de rats prétraités avec le lycopène et intoxiqués au CCl4 [Lot 4 sacrifice 3 (S3)]

Au sacrifice S3, les micrographies (Fig.35) montrent encore une amélioration par rapport aux sacrifices S1 et S2 (Fig. 33 et 34). Les lésions sont encore plus rares et le parenchyme est très peu modifié. Le foie est en train de récupérer, mais le temps semble

encore insuffisant.

Les hépatocytes jouent en particulier un rôle majeur dans les mécanismes de la détoxification de l'organisme. Les réactions enzymatiques (Fig.36) permettent la formation de métabolites non toxiques qui seront éliminés par l'organisme, mais au niveau de notre expérimentation, les sacrifices ont eu lieu seulement 24heures après l'intoxication, c'est-à-dire le mécanisme de détoxification n'a pas eu suffisamment de temps pour se débarrasser du CCl₄ et de ses métabolites. Or Le lycopène module l'activité du cytochrome P450 E2i responsable de la métabolisation des xénobiotiques dans le foie. Selon Johnson (2000), la supplémentation par le lycopène supprime la peroxydation lipidique des hépatocytes intoxiqués avec le CCl₄ et améliore le système de jonction intercellulaire en atténuant les effets néfastes de ce xénobiotique et en éliminant ses déchets.

Les cellules hépatiques vont recruter la cellule ovale, considérée comme une cellule souche hépatique et située dans le canal de Hering entre la travée d'hépatocytes et le canalicule biliaire, pour amorcer le processus de régénération.

De plus, les cellules hépatiques sont douées d'une particularité intéressante, elles possèdent un contenu en ADN correspondant à deux copies du génome ou d'avantage. Au cours de la vie foétale et néonatale les hépatocytes sont principalement diploïdes, ensuite progressivement une polyploïdisation se met en place et résulte de façon évolutive dans l'apparition des cellules de contenu ADN plus grand (Kudryavtsev, et *al.*, 1993).

Une autre caractéristique des hépatocytes est que l'expression génique est fonction de leur distribution spatiale au sein du lobule hépatique, on parle d'hétérogénéité métabolique (Gebhardt, 1992).

En conclusion, les micrographies montrées précédemment (lot 4), ne montrent pas une hépato-protection complète mais partielle, comme d'ailleurs pour les enzymes du lot 4.

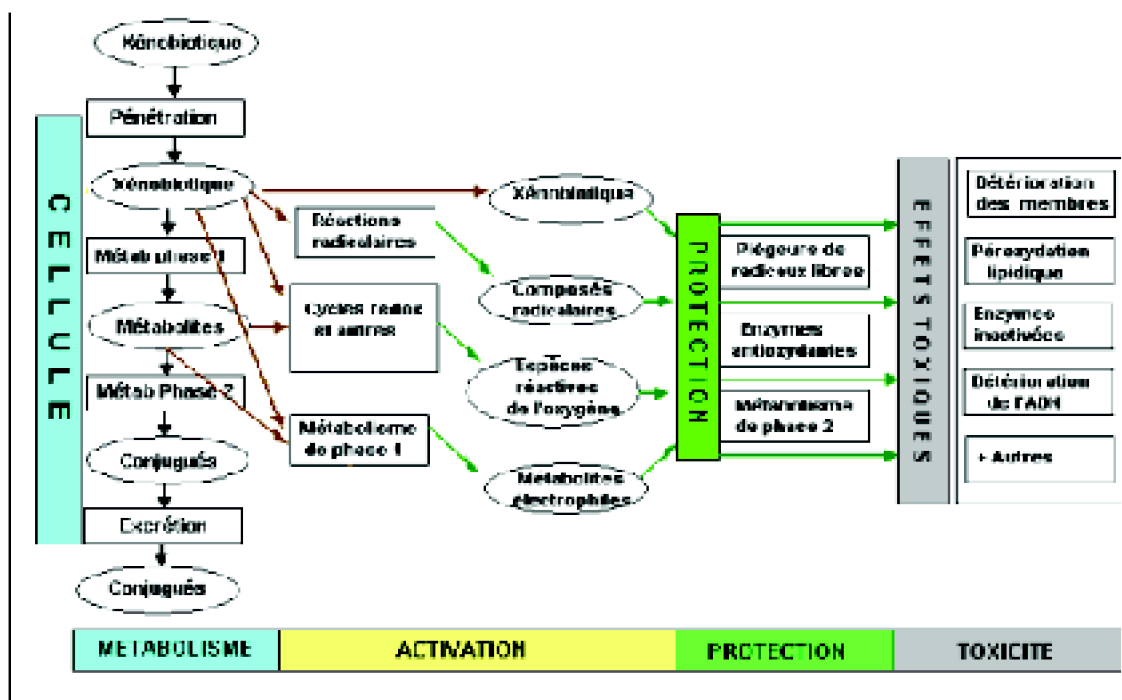


Figure 36 : Schéma des voies majeures conduisant à la détoxification et à toxication des xénobiotiques organiques chez les animaux (Lagadic et al., 1997)

Cette même remarque est déjà établie au niveau des marqueurs enzymatiques du lot 4. Après une insuffisance hépatique, le foie a des possibilités de restauration de la masse tissulaire. Le foie initie sa régénération généralement en trois jours.

Shivashangari et al. (2006) ont confirmé qu'une supplémentation en lycopène avec une dose de 10 mg par kg de poids corporel, l'intoxication ayant été réalisée avec des LPS (lipopolysaccharides) assure une protection du foie et une réduction importante des marqueurs enzymatiques.

Zhao et al. (2002) ont montré l'activité antioxydante du lycopène contre le radical trichlorométhyl peroxy ($\text{CCl}_3\text{O}_2 \cdot$) en créant une atmosphère riche en ce radical par radiolyse. Les réactions qui ont eu lieu sont décrites par Packer et al. (1998). A la fin de leur expérience, ils ont conclu que :



Cette expérience exprime l'interaction entre le lycopène et les radicaux libres du CCl_4 .

Conclusion générale

Il est admis maintenant qu'il existe une relation étroite entre le stress oxydant et la santé. Aussi l'accumulation progressive de dérivés oxydés dans l'organisme et l'apparition de pathologies oxydatives avec l'âge indique un lien entre le stress oxydant et les maladies dégénératives. De même, l'ensemble des données épidémiologiques et expérimentales conforte l'hypothèse que la lutte contre le stress oxydant, à l'aide de micronutriments antioxydants comme le lycopène, contribue à diminuer les dommages radicalaires, à améliorer certaines fonctions cellulaires et à préserver la santé de l'organisme. L'hypothèse récente est que le lycopène pourrait être le principal composé phytochimique responsable de la réduction des risques de maladies dégénératives.

Le dosage du lycopène dans le foie des rats a révélé la présence de 5.6 ng/g au S1, 3.7 ng/g au S2 et 3 ng/g au S3. Si la biodisponibilité de l'antioxydant a été prouvée, sa quantification reste discutable. En effet, nous remarquons que la quantité trouvée diminue tout au long de la supplémentation, ce qui peut être lié aux conditions d'analyse qui nécessitent la disponibilité d'un laboratoire intégré. De plus la biodisponibilité du lycopène dépend de son niveau de consommation mais aussi de son efficacité d'absorption. Celle-ci est encore mal connue et des études sont en cours pour préciser l'impact des interactions entre le lycopène et les autres constituants des aliments, notamment d'autres antioxydants, sur la biodisponibilité de ce microconstituant.

Nous savons que la quantité de lycopène, dans le foie, dépend de beaucoup de facteurs tels que la quantité administrée, la voie d'administration, la matrice d'incorporation du lycopène, de la sensibilité de l'appareil d'analyse (HPLC) et enfin de sa

captation et de son accumulation.

L'intoxication par le CCl₄ a permis d'observer une nette augmentation du taux de l'activité enzymatique de l'ASAT et de l'ALAT contrairement aux autres marqueurs dosés, ce qui pourrait être lié à la dose administrée et la durée de l'intoxication. Les mêmes résultats sont observés par plusieurs auteurs (Hanefi et *al.*, 2004 ; Sanzgiri et *al.*, 1997 et Sambath, 2005).

Le dosage des marqueurs biochimiques et des activités enzymatiques du bilan hépatique, des rats prétraités par le lycopène et intoxiqués par le CCl₄, a montré une réduction du taux de ces derniers. Les taux de la protection exprimés en pourcentage, selon la formule de Singh et *al.*, (2004), vont dans le même sens que ceux trouvés par Al-Quarawi et *al.* (2004).

A travers l'étude histologique du foie des rats, nous avons pu observer les dommages provoqués par l'administration d'une seule dose orale de 2 ml de ccl₄ dans une solution à 30% d'huile de paraffine. En effet, les micrographies montrent une dégénérescence graisseuse, une vacuolisation, donc une altération de la morphologie du tissu hépatique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hanefi et *al.* (2004) et Hewawazam (2004).

Le traitement par le lycopène a permis d'assurer une protection partielle aux hépatocytes. L'examen, au microscope des coupes histologiques, a montré une réduction de la surface nécrosée. Nous avons ainsi observé une protection qui semble s'améliorer en fonction de la durée de la supplémentation. La durée de l'intoxication a aussi un rôle dans la quantification de la protection, une durée plus importante aurait probablement permis d'observer une régénération du foie perceptible au microscope optique. Notons que les sections du foie des rats traités avec du lycopène seul ont montré une morphologie normale du foie, sans anomalies histologiques.

Enfin, les résultats de cette l'étude semblent suggérer que le lycopène est en mesure d'assurer un effet protecteur contre les affections hépatiques liées à un empoisonnement par le CCl₄.

En terme de perspectives, et au vu de nos connaissances, les mécanismes moléculaires de cette protection antiradicalaire sont loin d'être élucidés compte tenu de la complexité des interactions entre les différents constituants. Toutefois si de telles études devraient être poursuivies, il serait intéressant de considérer :

- Les conditions pouvant contribuer à une amélioration de la biodisponibilité des apports usuels de lycopène.
- L'effet dose du CCl₄ et la durée de l'exposition.
- L'effet du lycopène sur l'âge (vieillesse), le sexe, et enfin
- D'évaluer le système de protection enzymatique tel la SOD, le GPx et la catalase ainsi que celui de la détoxification (cyt P450).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarwal S. and Rao A.V. (2000).** Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Can. Med. Am J*; **163**: 734- 739.
- Ahmed MB. and Khater MR. (2001).** The evaluation of the protective potential of *Ambrosia maritima* extract on acetaminophen-induced liver damage. *J. Ethnopharmacol*; **75**: 169-174.
- Alam BS., Brown LR. And Alam SQ. (1990).** Influence of dietary fats and vitamin E on plasma and hepatic vitamin A and beta-carotene levels in rats fed excess beta-carotene *Nutrition and Cancer***14**: 111-116.
- Al-Qarawi A.A., Merghany M., Hassan Hamed A., Badr Eldin A.R. and El-Mougy H.A.S. (2004).** Protective Effect of Extracts from Dates (*Phoenix dactylifera* L.) on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Intern. J. Appl. Res .Vet Med*; **3**(2): 176-180.
- Anders M.W. and Jakobson J. (1985).** Biotransformation of halogenated solvents. *Scand. J. Work. Environ Health*; **11**(1): 23–32.
- Aruna K., Kalpana C., Viswanathan P. and Menon VP. (2002).** Toxic effects of sunflower oil on ethanol treated rats. *Hepatol. Res*; **24**: 125-135.
- Astrog P., Gradelet S., Berges R. and Suschetet, M. (1997).** Dietary lycopene decreases initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in rat. *Nutr.Cancer*, **29**: 60-68.

- Avissar N., Whitin J.C. and Allen P.Z. (1989).** Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem*; **2**: 850-855.
- Barja G. (1994) .** Vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde and lipid peroxydation and maintains fatty acid on saturation in the guinea pig liver. *Free Rad. Biol. Med*; **17**: 105-115.
- Bender D.A. (2003).** Nutritional biochemistry of the vitamins. Cambridge University Press.
- Bergmeyer H.U., Herder M. and Rej R. (1986).** Approved recommendation 1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem*; **24**: 481-495.
- Berry Ottaway P. (2001).** The roots of a healthy diet. *Chemistry and Industry* 22 January, pp. 42-45
- Bitam A. (2005).** Effets nutritionnels des huiles thermooxydées sur certains paramètres structuraux et fonctionnels chez le rat en croissance. Thèse Doct. Univ., INA, pp : 68-69.
- Boileau A.C., Merchen N.R., Wasson K., Atkinson C.A. (1999).** Cis-lycopene is more bioavailable than translycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *J. Nutr*; **129**: 1176-1181.
- Boileau T.W.M., Clinton S.K. and Erdman J.W.Jr. (2000).** Tissue lycopene concentrations and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats. *J. Nutr* ; **130**: 1613–1618.
- Boileau T.W., Boileau A.C. and Erdman J.W.Jr. (2002).** Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* ; **227**: 914-919.
- Borel P., Azais-Braesco V. et Hautekeete M. (1999).** Absorption et métabolisme des vitamines et caroténoïdes. Centre de recherche en nutrition humaine d’auvergne.
- Borel P. (2003).** Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clin. Chem. Lab Med*; **41**: 979-994.
- Bramley P.M. (2000).** Is lycopene beneficial to human health, *Phytochemistry*, **54**: 233-236.
- Breinholt V., Lauridsen S.T., Daneshvar B. and Jakobsen J. (2000).** Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett.* **154**: 201- 210.
- Brensilver HL, and Kaplan MM. (1975).** Significance of elevated liver alkaline phosphatase in serum. *Gastroenterology* ; **68**:1556-1562.
- Bruckner J., MacKenzie W., Muralidhara S., Luthra, R., Kyle G. and Acosta D. (1986).** Oral toxicity of carbon tetrachloride. Acute, subacute, and subchronic studies in rats. *Fund. Appl. Toxicol*; **6**: 16-34.
- Campbell J., Canene-Adam K. and Lindshiel B. (2004).** Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. *J. Nutr*; **134**: S3486-S3492.
- Canene-Adams K. (2005).** *J. Nutr*; **135**: 1226-1230.

-
- Chandra R.K. (1991).** McCollum Award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future 1990 McCollum Award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am. J. Clin. Nutr*; **53** : 1087-1101.
- Chen L., Stacewicz-Sapuntzakis M., Duncan C. and Sharifi R. (2001).** Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention, *J. Natl. Cancer Inst*; **93**: 1872 -1879.
- Clause F. (2001)** : Radicaux libres et molécules à activité anti-oxydante. Thèse Doct. Vét., Alfort.
- Clinton SK. (1998).** Lycopene Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev*; **56** (2): 35-51.
- Cohen Leonard A. (2002).** A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention. *Experimental Biology and Medicine*, **227**: 864-868.
- Coodley G.O., Coodley M.K. and Thompson A.F. (1995).** Clinical aspects of HIV infection in women. *J. Gen. Intern Med*; **10**(2): 99-110
- Cooper D.A., Eldridge A.L. and Peters J.C. (1999).** Dietary carotenoids and lung cancer . A review of recent research. *Nutr. Rev* ,57, **5** : 133-145.
- Curzningham F.X. and Gantt E. (1998).** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev. Physiol. Plant Mol. Biol*; **49**: 557-583
- De Pee S. and West C. (1996).** Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency. a review of the literature. *Eur. J. Clin. Nutr*; **50** : S38-S53.
- DHS, (1987).**Part B. Health effects of carbon tetrachloride. Report to the air resources board on carbon tetrachloride submitted to the scientific review panel for review. California department of health services. Currently the air toxicology and epidemiology section, office of environmental health hazard assessment, california environmental protection agency.
- Doumas BT., Watson, WA. and Biggs HG. (1971)** . Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta*; **31**: 87-96.
- Dybing F. and Dybing O. (1946).** The toxic effect of tetrachloromethane and tetrachlorethylene in oily solution. *Acta. Pharmacol*; **2** : 223-226.
- ECCLS (1999).**Determination of the catalytic activity concentration in serum of L-alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2, ALAT). *Klin. Chem. Mitt* ; **20**: 204-211.
- Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie.(1970).** *Zklin Chem u. klin. Biochem* ; **8**: 658-659.
- Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische (1972).***Chemie. Zklin Chem u klin. Biochem*; **10**: 182-190.
- Faure H. Shi J. Le Maguer, M. (2000).** Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*; **40** (1):1-8.
- FDA Working Group, (2006).** CDER-PhRMA-AASLD Conference 2000: clinical white paper on drug-induced hepatotoxicity, In (Drug-Related Hepatotoxicity Victor J. Navarro, M.D., and John R. Senior, M.D 2006 **354**: 731-739).
-

- Ferreira ALA., Yeum K-J., Liu C., Smith D., Krinsky NI., Wang X-D. and Russell RM. (2000).** Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation. *J. Nutr*; **130**: 1256–1260.
- Fowler J.S. 1969 .** Carbon tetrachloride metabolism in the rabbit. *Br. J. Pharmacol*; **37**: 733-737.
- Franceschi S., Bidoli E. and Lavecchia C. (1994).** Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. *Int .J. Cancer*; 59: 181-184.
- Froescheis O., Moalli S., Liechti H. and Bausch J. (2000).** Determination of lycopene in tissues and plasma of rats by normal-phase high-performance liquid chromatography with photometric detection. *Journal of Chromatography B*, 739 291–299.
- Gebhardt R. (1992).** Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol. Ther.* **53**: 275-354.
- Gey KF., Brubacher GB. and Stâhelin HB. (1987).** Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J ,Clin Nutr*; **45**: 1368-1377
- Giovannucci E. (1995).** Intake of carotenoids and retinal in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer. Inst* 6; **87**(23): 1767-1776.
- Gruebele A., Zawaski K., Kaplan D. and Novak R.F. (1996).** Cytochrome P4502E1- and cytochrome P4502B1/2B2 catalysed carbon tetrachloride metabolism. *Drug. Metab. Dispos*; **24**: 15-22.
- Gupta SK., Trivedi D., Srivastava S., Joshi S. and Halder N. (2003).** Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: an in vitro and in vivo study. *Nutrition*, **19**: 794-799.
- Hanefi Özbek, Serdar Ugras, Irfan Bayram, Ismail Uygan , Ender Erdogan, Abdurrahman Öztürk, and Zübeyir Huyut, (2004).** Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil: A carbon-tetrachloride induced liver fibrosis model in rats. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* **31** (1): 9-17.
- Harris RN and Anders MW. (1980).** Effect of fasting, diethyl maleate, and alcohols on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Appl Pharmacol*; **56**:191–198.
- Hewawasam R.P., Jayatilaka K.A.R.w., Pathirana and mudduwa L.K.b. (2004).** Hepaprotective effect of epaltes *divaricata* extract on carbone tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Indiiian.J. Med. Res* ; **120** : 30-34.
- Hould R. (1984).** Techniques d'histologie et de cytopathologie. Editeur Maloine Paris pp. 133-155.
- Jackson MJ. (1997).** The Assessment of biodisponibility of micronutrients: Introduction. *Eur. J .Clin .Nutr*; **51**: S1.
- Johnson EJ. (2000).** The role of lycopenein health and disease. *Nutr. Clin. Care*; **3**: 35-45.
- Kaplan MM. (1986).** Serum alkaline phosphatase another piece is added to the puzzle. *Hepatology*, **6**: 526-528.
- Kaplan LA., Lau JM. and Stein EA. (1990).** Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clin. Physiol .Biochem*; **8**: 1-10.

-
- Kaplan MM. (1993).**Laboratory tests. Schiff L Schiff ER eds. Diseases of the liver 7th ed. 108-144 JB Lippincott Philadelphia.
- Kennedy GL ., Ferez RL . and Burgess BA. (1986).** Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD50. J. Appl .Toxicol; **6**: 145–148.
- Khachik F., Carvalho L., Bernstein PS., Muir GJ., Zhao DY. and Katz NB. (2002).** Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. Exp. Biol Med ; **227**: 845-851.
- Kim H. (1995).** Carotenoids protect cultured rat hepatocytes from injury caused by carbon tetrachloride. Int. J. Biochem . Ce11 Bi01; **27**: 1303-1309.
- Klaassen C.D. and Plaa G.L. (1967).**Relative effects of various chlorinated hydrocarbons on liver and kidney function in dogs. Toxicol. Appl. Pharmacol, **10**: 119-131.
- Klaassen C.D. and Plaa G.L. (1969).** Comparaison of the biochemical alterations elicited in livers from rats treated with carbon tetrachloride, chloroform, 1,1,2-trichloroethane and 1,1,1-trichloroethane. Biochem. Pharmacol; **18**: 2019-2027.
- Knecht K.T., Mason R.P. (1988).** In vivo Radical trapping and biliary secretion of Radical adducts of carbon tetrachloride-derived free Radical metabolites. Drug. Metab. Dispos; 813 – 817.
- Kobayachi T. (1996).** Effects of lycopene, a carotenoid, on intrathymic T cell differentiation and peripheral CD4/CD8 ratio in a high mammary tumor strain of SHN retired mice. Anti-Cancer .Drugs; **7**: 195-198.
- Koolman J. and Röhm KH. (1994).** Atlas de poche de biochimie. Paris médecine-sciences flammariion. p.426.
- Korytko P.J., Rodvold K.A., Crowell J.A. and Stacewicz-Sapuntzakis M. (2003).**Pharmacokinetics and tissue distribution of orally administered lycopene in male dogs. J .Nutr; **133**: 2788-2792.
- Kudryavtsev BN. , Kudryavtseva MV., Sakuta GA. and Stein GI. (1993).** Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. Virchows Arch. B Cell. Pathol ; **64**: 387-393.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C. and Ramade F. (1997).**Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, p.419.
- Lee MT. and Chen BH. (2002).** Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. Food. Chem ; **78**: 425-432.
- Ligeard B. (1981).** Les vitamines dans l'alimentation du cheval. Thèse Doct. Vét., Toulouse.
- Lopez-Varela S., Sanchez-Muniz F.J. and Cuesta C. (1995).**Decreased food efficiency ratio, growth retardation and changes in liver fatty acid composition in rats consuming thermally oxidised and polymerised sunflower oil used for frying. Food. Chem..Toxic; **33**(3): 181-189.
- Malloy HT. and Evelyn KA. (1937).**The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J .Biol. hem; **119**: 481-490.
- Martoja R. (1967).** Initiation aux techniques d'histologie animale. Ed Masson. 574-824.
-

- Mathews-Roth M. M., Welankiwar S., Sehgal P. K., Lausen N. C., Russett M. and Krinsky N. I. (1990).** Distribution of [¹⁴C]canthaxanthin and [¹⁴C]lycopene in rats and monkeys. *J. Nutr*; **120**:1205-1213.
- Mayne ST., Cartmel B. and Silva F. (1999).** Plasma lycopène concentrations in humans are determined by lycopene intake, plasma cholesterol concentrations and selected demographic factors. *J. Nutr* ; **129**: 849-854.
- Mc Collister D.D., Beamer W.H., Atchison G.J. and Spencer H.C. (1951)** .The absorption, distribution and elimination of radioactive carbon tetrachloride by monkeys upon exposure to low vapor concentrations. *J. Pharmacol. Exp. Ther*; **102** (2) : 112-124.
- Mc Gregor D. and Lang M. (1996).** Carbon tetrachloride: genetic effects and other modes of action. *Mutat Res*; **366**: 181–195.
- Meydani S., Martin A. and ribaya J.D. (1994).** Beta-carotene supplementation increases antioxidant capacity of plasma in older women. *J. Nutr*; **124**: 2397-2403.
- Mukul K.G. and Dasgupta S. (2002).** Role of plant metabolites in toxic liver injury. *Asia Pacific J. Clin. Nutr*; **11**(1): 48-50.
- Nguyen M.L., Schwartz S.J. (1999).** Lycopene: Chemical and biological properties. *Food Tech*; **53**: 38-45.
- Nierenberg D.W., Dain B.J., and Mott L.A. (1997).** Effects of 4-year oral supplementation with beta-carotene on serum concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids. *Am.J. Nutr*; **66**: 315- 319.
- Packer J. E., Slater T. F. and Willson R. L. (1998).** *LifeSci.* **23**: 2617-2620
- Paduraru I., Saramet A. and Danica GH. (1996).** Antioxidant action of a new flavonoic derivative in acute carbon tetrachloride intoxication. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet* ; **21**: 1-16.
- Page D.A. and Carlson G.P. (1994).** The role of the intestinal tract in the elimination of carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol*; **124**: 268-274.
- Paul B.B. and Rubinstein D. (1963).**Metabolism of carbon tetrachloride and chloroform by the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **141**: 141-145.
- Paustenbach D.J., Clewell H.J., Gargas M.L. and Andersen M.E. (1988).** A physiologically based pharmacokinetic model for inhaled carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol*; **96**: 191-211.
- Periquet B.A., Jammes N.M. and Lambert W.E. (1995).** Micronutrient levels in HIV-1-infected children AIDS, **9**: 887-893.
- Pincemail J. Siquet J. and Chapelle J-P. (2000).** Evaluation des concentrations plasmatiques en antioxydants, anticorps contre les LDL oxydées et homocystéine dans un échantillon de la population liégeoise. *Ann. Biol. Clin*; **58**: 178-185.
- Plaa G.L. (1969).** Toxic responses of the liver. Dans: Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 2e édition. J. Doull, C.D.Klaassen et M.O. Amdur. *Am. J. Epidemiol* ; **134**: 1347-1355.
- Plaa G.L. (1980).**Toxic responses of the liver. In (Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons). 2e édition. Doull J. Klaassen C.D. and Amdur M.O. (éditeurs). MacMillan, New York, NY.

-
- Potteau B., Grangirad A., L'huissier M. and Causeret J. (1977).** Recherche recente sur les effets physio-pathologiques des huiles végétales. *Biblit. Nutr.Diet.* **25:** 122-133.
- Rao A.V. and Agarwal S. (2000).** Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J. Am. Coll. Nutr;* **19:** 563-569.
- Raucy J.L., Kraner J.C. and Lasker J.M. (1993)** . Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1. *Crit. Rev. Toxicol ;* **23** : 1-20.
- Riedl J. , Linseisen J., Hoffmann J. and Wolfram G. (1999).** Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *J .Nutr;* **129:** 2170-6. **50:** S38-S53. (revue générale. *Ann. Biol. Clin .2005;* **63** (2): 165-77).
- Reboul E., Borel P., Mikail C. and Abou L. (2005).** Enrichment of tomato paste with 6% tomato peel increases lycopene and beta-carotene bioavailability in men, *J .Nutr;* **135:** 790-794.
- Recknagel R. and Litteria M. (1960).** Biochemical changes in carbon tetrachloride fatty liver: concentration of carbon tetrachloride in liver and blood. *Amer. J. Pathol;* **36:** 521-525.
- Reuber M.D. and Glover E.L. (1970).** Cirrhosis and carcinoma of the liver in male rats given subcutaneous carbon tetrachloride. *J. Natl. Cancer Inst;* **44:** 419-425.
- Reynolds E.S., Treinen R.J., Farrish H.H. and Treinen-Moslen M. (1984).** Metabolism of [14C] carbon tetrachloride to exhaled excreted and bound metabolites. *Biochem. Pharmacol ;* **33:** 3363-3374.
- Robbins B. (1929).** the absorption, distribution, and excretion of carbon tetrachloride in dogs under various conditions. *J .Pharm. Exp .Ther;* **37:** 203-216.
- Sambath R., Kumar T., sivakumar P., Nethaji R., Vijayabasker M., Perumal P., Malayagupta and upal kanti MMazumder. (2005).** hepatoprotective and in vivo antioxidant Effects of careya arborea against carbone tetrachloride induced liver damage in rats. *Int J of molecular Medecine and advances sciences* **1(4):** 418-424.
- Sanchez-Muniz F.J., Lopez-Varela S., Polonio G.M. and Cuesta C. (1998).** Dietary effect on growth, liver peroxides and serum lipoprotein lipids in rats fed a thermooxidised and polymerised sunflower oil. *J. Sci. food Agric;* **76:** 364-372. (In Thèse Bitam INA).
- Sanzgiri U., Srivatsan V., Muralidhara S., Dallas C. and Bruckner J. (1997)..** Uptake, distribution, and elimination of carbon tetrachloride in rat tissues following inhalation and ingestion exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143(1):** 120-129.
- Sappey C., Leclercq P. and Coudray C. (1994).** Vitamin, trace element and peroxide status in HIV seropositive patients: asymptomatic patients present a severe beta-carotene deficiency. *Clin Chim Acta;* **230:** 34-42.
- Schisler N.J. and Singh S.M. (1989).** Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free Radicals. *Free Radical Biol. Med;* **7:** 117-123.
- Schmitz H.N., Poor C.L., Welman R.B. and Erdman Jr. J.W. (1991).** Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. *J. Nutr;* **5:** 1913-1621.
- Semba R.D. and Graham N.M.H. (1993).** Increased mortality associated with vitamin A
-

- deficiency during human immunodeficiency virus type 1 infection .Arch. Intern. Med; **153** : 2149-2154.
- Sharoni Y. (2000).**Drug development research. **50**:448-456.
- Shivashangari Kanchi Subramanian, Vilwanathan Ravikumar, Radhakrishnan Silverman,(2006).** Hepatoprotective Potential of Lycopene on D Galactosamine/ Lipopolysaccharide Induced Hepatitis in Rats Pharmacologyonline; **2**: 151-170.
- Shi J. and Le Maguer M. (2000).** Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. Crit. Rev .Food. Sci. Nutr ; **40**(1): 1-8.
- Singh B, Saxena AK and Chandan BK. (1998).** Hepatoprotective activity of verbenaolin on experimental liver damage in rodents. Fitoterapia; **69**: 135–140.
- Slattery ML., Benson J., Curtin K., Ma KN., Schaeffer D and Potter JD. (2000).** Carotenoids and cancer. Am. J. Clin. Nutr; 71(2): 575-582
- Smyth H.F., Weil C.S., West J.S. and Carpenter C.P. (1970).** An exploration of joint toxic action: II. Equitoxic versus equivolume mixture. Toxicol. Appl. Pharmacol; **17**: 498-503.
- Stahl W. and Sies H. (1992).** Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans.J. Nutr; **122**: 2161-2166.
- Stahl W., Schwarz W., Sundquist A. R. and Sies H. (1992).** Cis-trans Isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. Arch. Biochem. Biophys; **294**: 173-177
- Tietz NW. (1983).** J. Clin .Chem. Clin. Biochem ; **21**: 731-748.
- Thomas J.A. (1999).** Diet, micronutrients, and the prostate gland. Nutr. Rev , **57**(4): 95, 103 -210.
- Venket A. (2000).** J. Am. Coll. Nutr; **19** (5): 563-569.
- Vinodhkumar, Sheik Abdul Azeez Sheriff, and Thiruvengadam Devaki,(2006).** Hepatoprotective Potential of Lycopene on D-Galactosamine/Lipopolysaccharide Induced Hepatitis in Rats.Pharmacologyonline; **2**: 151-170.
- Volker D.H. (2000).**Efficacy of fish oil concentrate in the treatment of rheumatoid arthritis. J. Rheumatol; **27**(10): 2343-2346.
- Von Oettingen W. (1964).**The halogenated hydrocarbons of industrial and toxicological importance. Elsevier Publishing Co., 107-170.
- Vouldoukis I., Conti M. Krauss P. (2004).**Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress. Phytother. Res ; **18** (12): 957-962.
- .Wahlefeld AW. (1972).**Scand. J. Clin. Lab. Invest, 29 Supplement. 126-190.
- Withney and Rolfes., (1993).**Understanding nutrition. The fat-soluble vitamins: A, D, E and K, 6e édition, West Publisher, É.-U. 337-360.
- Zaripheh S., Boileau M.T.W., Ann Lila M. and Erdman Jr. (2003).** [¹⁴ C]- Lycopene and [¹⁴ C]-labeled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats prefed lycopene. J.Nutr. **133**: 4189-4195.
- Zhao Yaping., Qian Suping. ,Yu Wenli. , Xue Zheng. ,Shen Hong. ,Yao Side. and**

- Wang Dapu. (2002).** Antioxidant activity of lycopene extracted from tomato paste towards trichloromethyl peroxy radical $\text{CCl}_3\text{O}_2 \cdot$. *Food. Chemistry* ; **77**: 209 –212.
- Zhao Z., Khachik F., Richie J.P., Jr and Cohen L. A. (1998).** Lycopene uptake and tissue disposition in male and female rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **218**:109-114.

Annexes

Annexe1 : Valeurs nutritionnelles pour 100 g de tomate

Nutriments	Unités	Tomates crues
Eau	g	38.76
Energie	Kcal	27
Protéine	g	0.59
Lipides totaux	g	1.48
Glucides	g	4.62
Fibres totales	g	1.1
Minéraux		
Calcium	mg	5
Phosphore	mg	1.46
Magnésium	mg	17
Fluorure	mg	26
Potassium	mg	222
Sodium	mg	3
Zinc	mg	0.39
Cuivre	mg	1.1
Manganèse	mg	0.105
Sélénium	mcg	0.1
Vitamines		
Vitamine C	mg	9.1
4-1 (thiamine)	mg	1.5
B-2 (riboflavine)	mg	0.348
4-1 (niacine)	mg	9.4
D-5 (acide panthothémique)	mg	0.347
4-3 (pyridoxine)	mg	1.8
Acide folique	mcg	15
B-12	mcg	3
Vitamine A	IU	628
Vitamine A	mcg RE	62
Vitamine E	mcg A	1.11
Lipides		
Acides gras saturés	g	1.5
Acides gras monoinsaturés	g	0.55
Acides gras polyinsaturés	g	0.185
Acide linoléique (18:2)	g	1.11
Acide alpha-linolénique (18:3)	g	0.005
Cholestérol	mg	3

USDA, National Database for Standard Reference, Release 13 (November 1999)

Annexe 2 : Normes du régime ONAB

Caractéristiques :

Au minimum

- Energie digestible.....3000 /Kg Kcal
- Protéines brutes.....22%
- ENA.....38%
- Matière grasse.....3%
- Calcium.....1%

· Phosphore.....0.6%

Au maximum

Humidité.....14%

Cellulose.....4%

Matière minérale.....6%

Vitamines (/100Kg)

· Vit A.....1230000 UI

· Vit D3.....205000 UI

· Vit B1.....150 mg

· Vit B2.....500mg

· Vit B3.....1000 mg

· Vit B6.....500 mg

· Vit B12.....02 mg

· Vit E.....2000 mg

· Acide folique.....100 mg

Oligo-éléments : (/100Kg)

- Fer.....7500 mg

- Cuivre.....750 mg

- Zinc.....4600 mg

- Cobalt.....90 mg

- Sélénium.....03 mg

- Iode.....98 mg

- Magnesium.....2500 mg

- Manganèse.....4500 mg

- soufre.....4700 mg

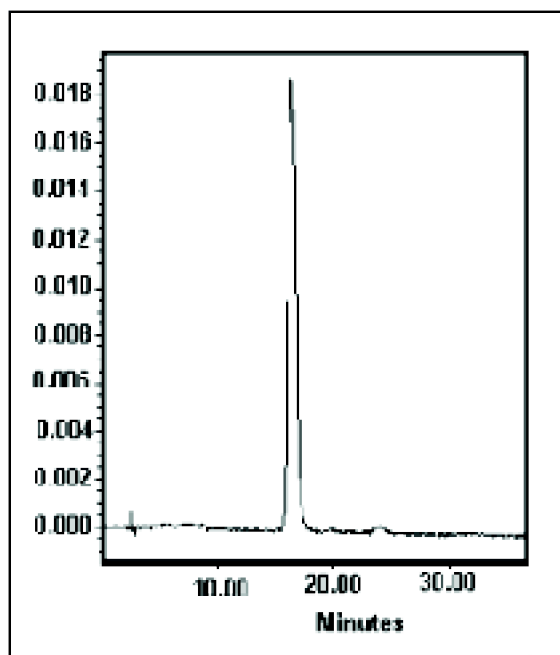
- Supplémentations:

-antibiotique.....Flavomycine 2 ppm

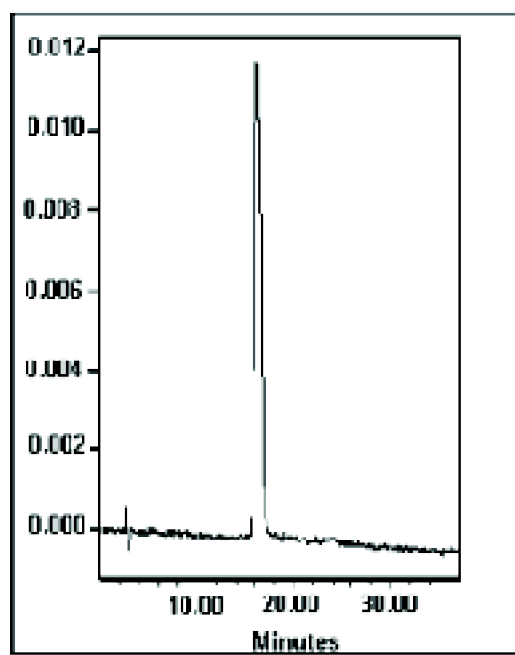
- Acide aminé.....DL-Méthionine 0.1%

- Antioxydant.....BHT 125 ppm

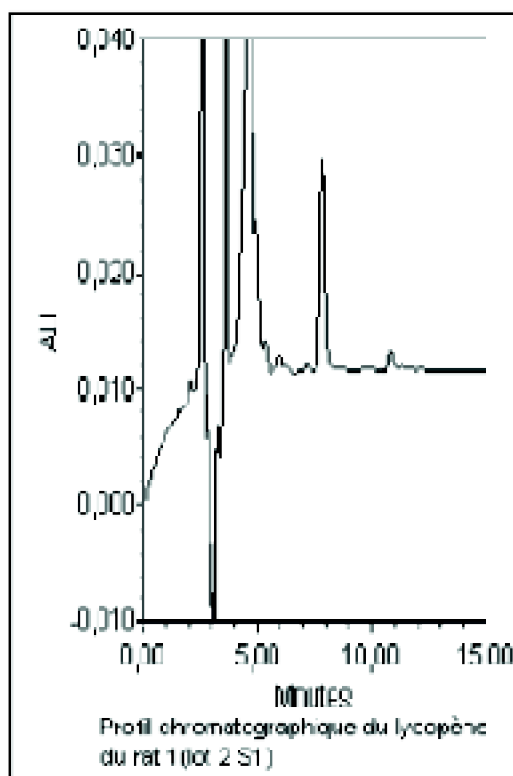
Annexe 3: Profil chromatographique du lycopène



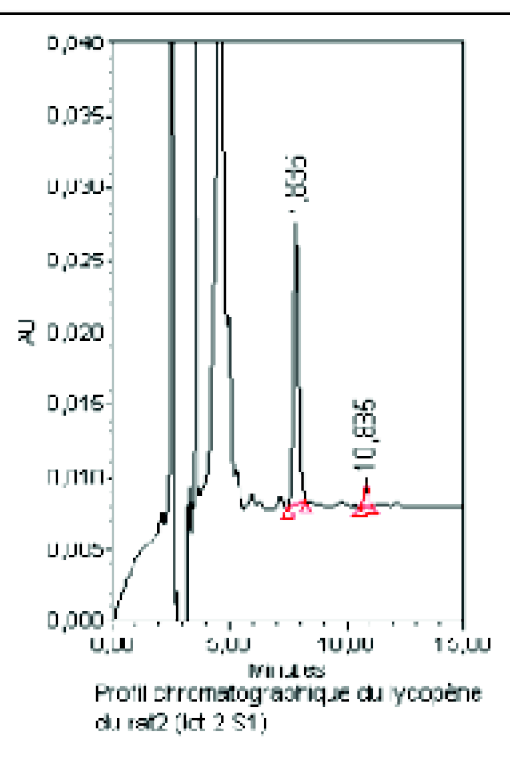
Profil chromatographique du lycopène essai (sérum)



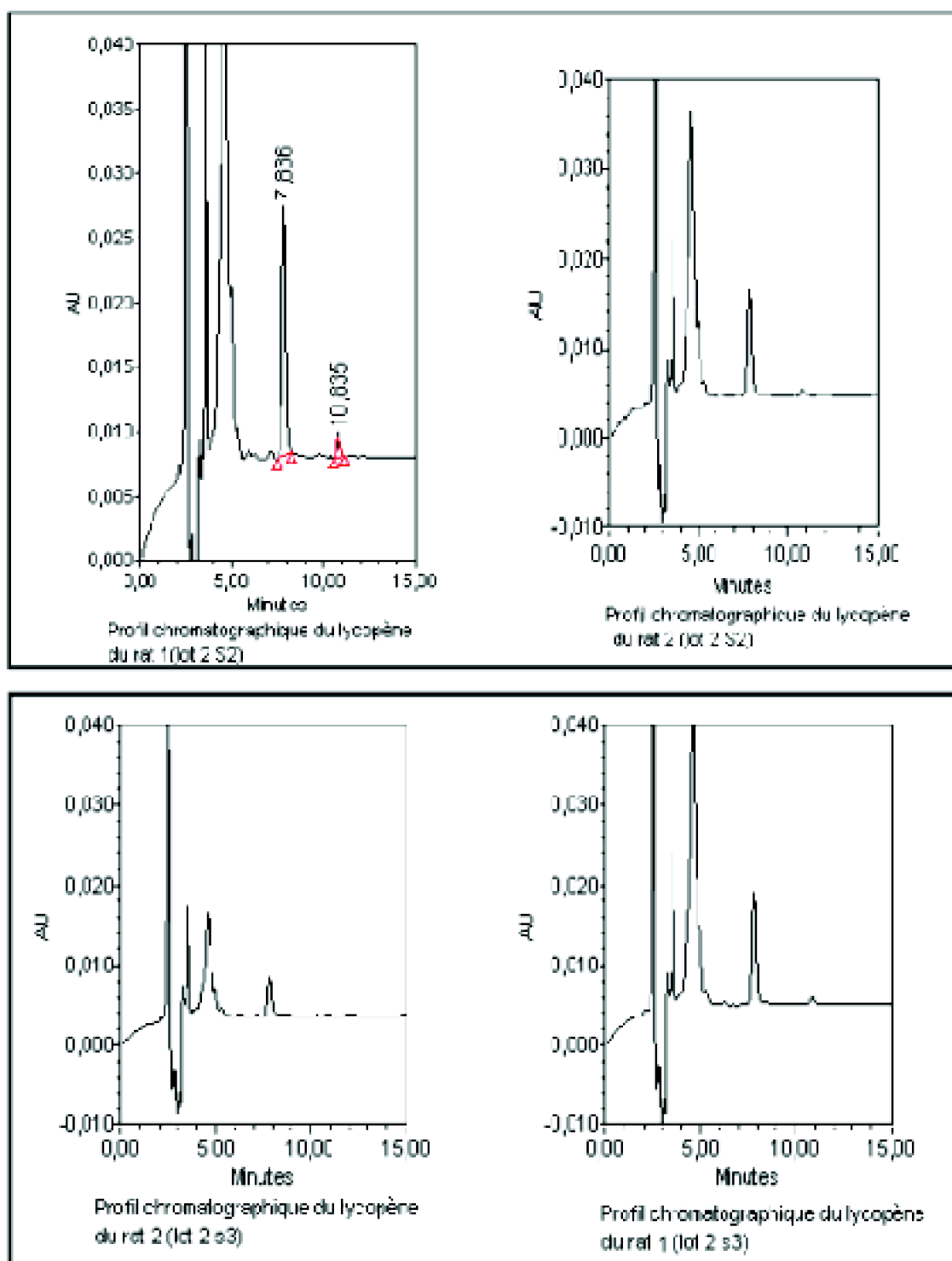
Profil chromatographique de l'étalon interne du lycopène



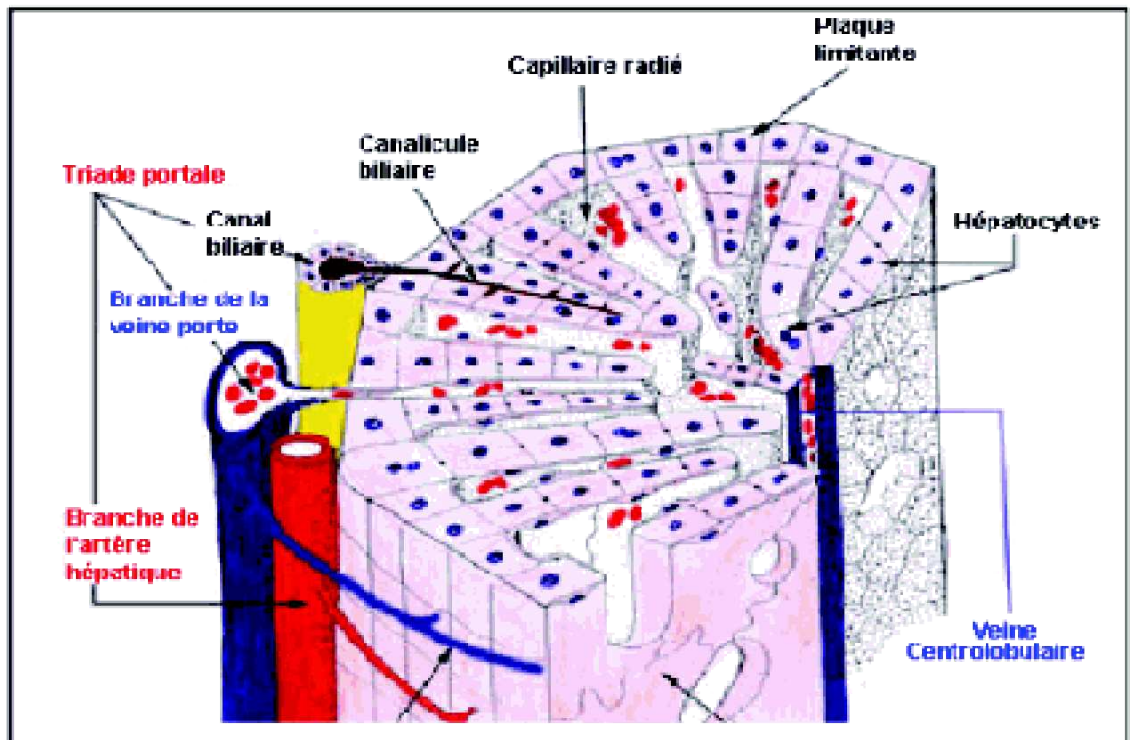
Profil chromatographique du lycopène du rat 1 (lot 2 S1)



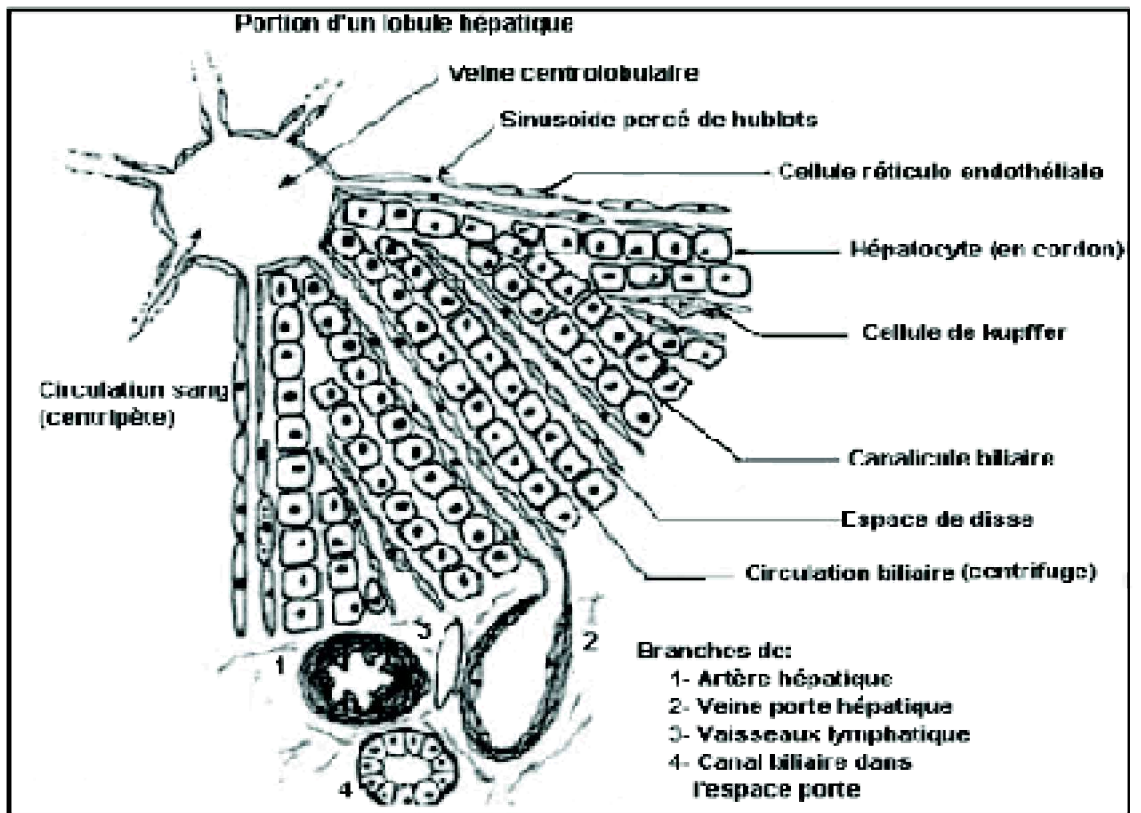
Profil chromatographique du lycopène du rat2 (lot 2 S1)



Annexe 4 : Rappels anatomiques du foie



Structure tridimensionnelle du lobule hépatique



Structure d'une portion d'un lobule hépatique

