

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université - SAAD DAHLAB - Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Agronomiques



Mémoire en vue de l'obtention du
Diplôme de Master Académique en Science de la Nature et de la Vie
Filière: Sciences Alimentaires
Spécialité : Nutrition et contrôle des aliments

Thème
**La détoxification hépatique
chez le rat
hyperhomocystéinémique**

Réalisé par : M^{elle} ALI MARICHE Wissam

Devant le jury

Président :	M. RAMDANE S. A.	MAA	USDB
Examineurs:	M. AMALOU	MAA	USDB
	M. BEN ZEKRI Z.	MCA	USDB
Promotrice :	M ^{me} IDRES A.	MAA	USDB
Co-promotrice :	M ^{me} DJABRI N.	Docteur	CRD-Saïdal

Année Universitaire 2012/2013

REMERCIEMENTS

Je remercie dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

*Je tiens à remercier très sincèrement **Madame IDRES Aicha** pour avoir accepté d'être la promotrice de mon mémoire, ainsi que pour son esprit de responsabilité et pour son encadrement scientifique, qui ont conduit à ce travail.*

*Je remercie chaleureusement **Madame AZINE Kenza**, responsable de laboratoire pharmacotoxicologie au centre de recherche et de développement (CRD) à SAIDAL.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Mme DJABRI Nadia, M. BOUDJIDA Rédouane, M. DAHMANE Moussa, M. BOUZIANE Mohammed, Mme SAHRAOUI Fatma** et à tous les chercheurs de laboratoire pharmacotoxicologie de CRD à SAIDAL.*

*Un grand merci à **HASSINI Tarek** et **BOUNAMA Abd el Hakim** et à toute l'équipe de laboratoire d'histologie de Parnet à l'Hussein Dey.*

*À tous les chercheurs au niveau du laboratoire d'histologie de la faculté de médecine à Blida sans oublier **Dr BOUCHARBEB** et **Dr TRABOLSSI** et à **Dr BOUDANI**.*

Pour les membres de jury

Monsieur RAMDANE S. A., M. AMALOU, M. BEN ZEKRI Z., Madame IDRES A., Madame DJABRI N.

Je vous suis reconnaissante d'avoir bien voulu accepter de participer au jury de soutenance de mon mémoire.

DÉDICACE :

Je remercie dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mme. IDRES AICHA**, je la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

Je dédie ce modeste travail ...



À mes chers parents (Saïd & Mazia)



Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.



À mon cher fiancé (RACHEDI A .Djalil)



L'homme de ma vie, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde toujours avec moi.



À ma chère sœur (Dr. Fattouma) à son mari (Hocine) et sa petite fille



Nourhène



Mes petits mots restent toujours incapables d'exprimer mon amour pour vous, que dieux vous donne tout le bonheur du monde ...

 **À Mon frère (Oussama) à son épouse (Naima) et son petit Farouk** 

Je n'oublierais jamais votre aide ... Je vous aime très fort et je vous souhaite tout le bonheur du monde mes chers...

 **À mon grand-père** 

Je salue ici la mémoire de mon grand-père, Repose en paix...

 **À ma grand-mère** 

Qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur dans les deux vies.

 **À mes chers grands-parents** 

**À mes chers oncles, tantes, leurs époux et épouses
Surtout ...**

**Mon oncle Mohammed et ses enfants Ismail et Karima
Mon oncle Ahmad et son épouse Souhila et ses adorables filles
Maroua, Amira, Aridj et Maramé
Ma tante Souad et son mari Ismail et ses adorables filles
Rahma, Inssaf et Zahra.**

 **À mes chers cousins et cousines** 

 **À ma belle-mère et mon beau-père** 

A ma belle sœur (Dr Nassima) et son mari (Hakim)

A Aimad, Alaa, Fidaa et ses parents.

Sans oublier mon petit beau-frère Abd el hak

 *À tous mes amis de ma promotion de spécialité
Nutrition et Contrôle des Aliments (NCA)
sans exception* 

 *Je vous aime tous et je ne vous oublierai jamais* 

 *À Mr. BEN KORTBI A.* 

*À tous les chercheurs au niveau du centre de recherche et de développement (CRD)
sans oublier Mme. AZINE K.*

*Mme. DJABRI N. , Mr .Moussa ,Mr. BOUZIANE , Fatma , sihème ,Linda ,Louiza
,Rafik ,Taher*

*À tous les chercheurs au niveau du laboratoire d'histologie de Parnet à Hussein Dey
à Alger sans oublier Tarek et Hakim et Wafa*

*À tous les chercheurs au niveau du laboratoire d'histologie de l'université de
médecine de Blida sans oublier Dr BOUCHARB, Dr TRABOLSSI et Dr
BOUDANI.*


Merci

WISSAM

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LA DETOXIFICATION HEPATIQUE ET LE FOIE

I. DETOXIFICATION HEPATIQUE.....	02
I.1.DEFINITION.....	02
I.2.HOMOTOXINE.....	02
I.3. TOXICITE	03
I.4. ORGANE CLE DE LA DETOXIFICATION.....	04
I.5. MECANISME DE DETOXIFICATION	05
I.5.1. REACTIONS DE PHASE I OU PHASE DE DEGRADATION.....	05
I.5.2. REACTIONS DE PHASE II OU PHASE DE CONJUGAISON.....	06
I.6. GLUTATHION.....	09
I.6.1. DEFINITION.....	09
I.6.2. GLUTATHION ET DETOXIFICATION HEPATIQUE	09
I.7. FOIE	10
I.7.1. ORGANISATION ANATOMIQUE DU FOIE.....	10
I.7.2. HISTOLOGIE DU FOIE.....	10
I.7.3. FONCTIONS DU FOIE.....	12
I.7.4. EVALUATION D'UNE HEPATOTOXICITE.....	13

CHAPITRE II: L'HOMOCYSTEINE ET L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE

II. HOMOCYSTEINE (HCY)	14
II.1. HISTOIRE ET DEFINITION	14
II.2. DIFFERENTES FORMES PHYSICOCHIMIQUES D'HOMOCYSTEINE.....	15
II.3. METABOLISME DE L'HOMOCYSTEINE.....	16
II.4. CAUSES D'ELEVATION DE L'HOMOCYSTEINE PLASMATIQUE.....	19
II.5. HYPERHOMOCYSTEINEMIE.....	19
II.5.1. DEFINITION.....	19
II.5.2. CLASSIFICATION DES HYPERHOMOCYSTEINEMIES.....	19
II.5.3. FACTEURS FAVORISANT L' HYPERHOMOCYSTEINEMIE	20
II.5.3.1. FACTEURS NUTRITIONNELS.....	20
II.5.3.2. FACTEURS GENETIQUES	21
II.5.3.3. FACTEURS NON SPECIFIQUES	21
II.5.3.4. LES MEDICAMENTS	21

II.5.3.5. AUTRES SUBSTANCES	21
II.5.4. HYPERHOMOCYSTEINEMIE ET STRESS OXYDATIF.....	21
II.5.5. HOMOCYSTEINE ET LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.....	22
II.5.6. ROLE DU FOIE DANS LA REGULATION DE L’HOMOCYSTEINEMIE.....	22

CHAPITRE III: LYCOPENE

III. LYCOPÈNE	23
III.1. HISTORIQUE ET DEFINITION.....	23
III.2. STRUCTURE CHIMIQUE.....	23
III.3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	24
III.4. SOURCES ALIMENTAIRES DE LYCOPENE.....	24
III.5. APPORTS CONSEILLES	25
III.6. ABSORPTION ET METABOLISME DU LYCOPENE.....	25
III.7. CONCENTRATIONS TISSULAIRES EN LYCOPENE.....	26
III.8. EFFETS DU LYCOPENE.....	26
III.8.1. MALADIES CARDIOVASCULAIRES.....	27
III.8.2. CANCER DE PROSTATE.....	27
III.8.3. EFFETS ANTIOXYDANTS DU LYCOPENE	27

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL.....	29
I.1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	29
I.2. MATERIEL NON BIOLOGIQUE.....	30
II. METHODES.....	31
II.1. PREPARATION DES LOTS DE RATS.....	31
II.2. PROCEDURE D’EVALUATION DE L’EXPERIENCE	32
II.3. PRELEVEMENT SANGUIN.....	33
II.4. ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	33
II.4.1 LES TRANSAMINASES SERIQUES OU AMINO TRANSFERASES.....	33
II.4.1.1. DOSAGE DE L’ASPARTATE AMINO-TRANSFERASE (ASAT).....	34
II.4.1.2. DOSAGE DE L’ALANINE AMINO-TRANSFERASE (ALAT).....	34
II.4.2. DOSAGE DE L’HOMOCYSTEINE	34
II.5. SACRIFICE DES ANIMAUX ET PRELEVEMENT D’ORGANE.....	35
II.6. ETUDE HISTOLOGIQUE.....	35
II.7. ETUDE STATISTIQUE.....	38

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II. RESULTATS.....	42
1. POIDS DES ANIMAUX.....	42
2. EVOLUTION DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES.....	43
2.1. TRANSAMINASES SERIQUES	43
2.1.1. ASAT PLASMATIQUE.....	43
2.1.2 ALAT PLASMATIQUE.....	44
2.2.HOMOCYSTEINEMIE.....	45
3. ETUDE HISTOLOGIQUE ET DU FOIE	47
III. DISCUSSION.....	45

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

ANNEXE

ABREVIATIONS

- 5-MTHF** : 5-méthyltétrahydrofolate.
- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- AH** : Artère hépatique.
- ALAT** : Alanine Amino-Transférerase.
- ASAT** : Aspartate Amino-Transférerase.
- BHMT** : Bétaïne homocystéine méthyl-transférerase.
- C**: Collagène.
- CB** : Canal biliaire.
- CD** : Cystéine Dioxygénase.
- CO₂** : Oxyde de carbone.
- CoA** : Coenzyme A.
- CRD** : Centre de Recherche et de Développement.
- CSS** : γ Cystathionine β -Synthase.
- DC** : Diminution de collagène autour de la V.C.L.
- DES** : Désorganisation structurale.
- DTT** : Dithiothréitol.
- EP**: Espace porte.
- FPIA** : fluorescence polarisation immunoassay.
- GOT** : Glutamate oxaloacétate transaminase.
- GPT** : Glutamate pyruvate transaminase.
- GS** : Glutathione Synthétase.
- GS** : γ Glutamylcystéine Synthétase .
- GSH** : glutathion.
- H**: Hépatocytes.
- Hcy** : Homocystéine.
- Hhcy**: Hyperhomocystéinémie.
- HO**: Huile d'olive.
- LDH** : Lactate déshydrogénase.
- LH** : Lobule hépatique.
- Lyc** : Lycopène.
- MAT** : Méthionine-adénosyl transférerase.
- MDA** : Malon dialdéhyde.

MDH : Malate déshydrogénase.

Met : Méthionine.

MS : Méthionine synthase.

MT : Méthyle Transférase.

MTHFR : Méthylénetétrahydrofolate réductase.

NA : Non disponible.

NAD+ : Nicotinamide adénine dinucléotide.

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogène.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène.

ND : Non détectable.

ND: Noyau dense.

NH : Noyaux des hépatocytes.

NO : *Monoxyde d'azote*.

ONAB : Office Nationale des Aliments de Bétail.

PLP : Pyridoxal 5'-phosphate.

RC : Réorganisation cellulaire.

ROS : Espèce réactive de l'oxygène.

S: Capillaire sinusoïdal.

SAH : S-adénosyl-homocystéine.

SAHase : S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase.

SAHH : S-adénosyl-homocystéine hydrolase.

SAM: S-adénosyl-Méthionine.

SD : Capillaire sinusoïdal dilaté.

SD : Déviation standard.

SHT : Sérine Hydroxyméthyl Transférase.

SN : Sinusoïdes normales.

SRB1: *Scavenger receptor B*.

Te : Témoin.

TGF : Facteur de croissance tissulaire bêta.

TH : Travées hépatocytaires.

THF : Tétrahydrofolate réductase.

THN : Travée hépatique normale.

USTHB : Université des sciences et de la technologie HOUARI BOUMEDIENE.

VCL : Veine centre lobulaire.

VLDL: Very low density lipoprotein.

VPH : Veine porte hépatique.

Vs : Versus.

LISTES DES FIGURES

Figures	Titre	page
1	La réaction d'oxydation de Lauryl-Sulfate (Raisonnier, 2004).	5
2	La réaction de réduction de l'Acide picrique (Raisonnier, 2004).	6
3	La réaction de sulfocojugaison de Paracétamol (Raisonnier, 2004).	7
4	La réaction de Méthylation de Nicotine (Raisonnier, 2004).	7
5	La réaction d'acétylation d'isoniazide (Raisonnier, 2004).	8
6	La réaction de conjugaison de sulfoparacétamol (Raisonnier, 2004).	8
7	La structure chimique du glutathion (Pastore et al., 2003).	9
8	Représentation des différents lobes hépatiques et vascularisation chez le rat (Gandillet, 2004).	10
9a	- Organisation structurale du foie (Marchall et Bangert, 2004).	11
9b	- Organisation structurale schématique du foie (Marchall et Bangert, 2004).	12
10	La structure chimique de l'homocystéine (Luciene de Souza et al., 2010).	14
11	Formules chimiques de l'homocystéine, de ses formes circulantes et de ses dérivés (Miner et al., 1997).	15
12	Métabolisme de l'homocystéine (Uthus et al., 2002).	18
13	Structure moléculaire du lycopène (Rao et al., 2006).	23
14	Schéma représentatif du métabolisme du lycopène (Supidita, 2008).	25
15	Rat mâle <i>Rattus norvegicus</i> (Photo originale, 2013).	29
16	DL-Méthionine (Photo originale, 2013).	30
17	Lycopène (lyc-o-mato 10mg) (Photo originale, 2013).	31
18	Évolution pondérale (g) des rats des différents lots.	42
19	Évolution de l'ASAT plasmatique (UI).	43
20	Évolution de l'ALAT plasmatique (UI).	44
21	Évolution de l'homocystéinémie ($\mu\text{mol/L}$) des rats.	45
22	Structure du parenchyme hépatique des rats reçoivent d'huile d'olive, coloré par trichrome de Masson (photos originales, 2013).	47
23	Structure du parenchyme hépatique des rats reçoivent de l'eau physiologique (Lot Te.), pendant 3 mois, coloré par trichrome de Masson (Photos originales, 2013).	49

24	Structure du parenchyme hépatique des rats reçoivent de la méthionine (Lot Met.), pendant 3 mois, coloré par e trichrome de Masson (Photos originales, 2013).	51
25	Structure du parenchyme hépatique des rats reçoivent du lycopène seul (Lot Lyc.), pendant 3 mois, coloré par e trichrome de Masson (Photos originales, 2013).	53
26	Structure du parenchyme hépatique des rats reçoivent de la méthionine avec du lycopène (Lot Met. + Lyc.) , pendant 3 mois, coloré par e trichrome de Masson (Photos originales, 2013).	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	page
1	Les types d' homotoxines (Wilkinson, 2005).	2
2	Fonctions principales du foie (Marchall et Bangert, 2004).	12
3	Classification des hyperhomocystéinémies (Mouchabac, 2008).	20
4	Propriétés du lycopène (Shie et Le Maguer, 2000)	23
5	Quantité de lycopène (nmol/g) dans les tissus humains (Agarwal et Rao, 2000).	26
6	Composition (%) du régime alimentaire des rats (granulés provenant de l'ONAB de Bejaïa) (d'après une fiche technique du CRD-Saïdal).	30
7	Évolution pondérale (g) des rats des différents lots.	42
8	Évolution de l'ASAT plasmatique (UI) des rats des différents lots.	43
9	Évolution de l'ALAT plasmatique (UI) des rats des différents lots.	44
10	Évolution de l'homocystéinémie ($\mu\text{mol/L}$) des rats des différents lots.	45

Résumé

De nombreuses études épidémiologiques ont démontré que le foie joue un rôle primordial dans l'élimination des homotoxines de l'organisme, dont l'accumulation est particulièrement dangereuse.

L'homocystéine est un indicateur fonctionnel d'un type de réaction indispensable à notre vie, qui est la méthylation, cette dernière est une réaction chimique très importante pour la dégradation de l'homocystéine au niveau du foie, et plus exactement dans la phase 2 de la détoxification hépatique.

Il est à noter que l'homocystéine est un acide aminé soufré apporté par les protéines de l'alimentation et que son accumulation dans le foie devient nocif, l'augmentation de ce dernier constitue un facteur de risque de plusieurs maladies dégénératives et hépatiques tel que la fibrose.

Au niveau de notre étude, une **hyperhomocystéinémie** expérimentale a été induite par une administration per os de la **méthionine** (500mg/kg /j), et nous avons étudié, l'effet du prétraitement au **lycopène**, administré par gavage (5mg/kg /j) sur cette état.

L'hyperhomocystéinémie a été analysé au niveau pondéral, plasmatique par le dosage de certains paramètres biochimiques à savoir (ASAT, ALAT, homocystéine) et au niveau tissulaire par une étude histopathologique des biopsies hépatiques.

Il consiste en l'analyse des répercussions d'une hyperhomocystéinémie sur la biochimie plasmatique et l'histologie de foie de *Rattus norvegicus* d'une part et de montrer que le lycopène administré de façon préventive, est susceptible de réduire ou prévenir l'apparition de dérégulations métaboliques causées par une hyperhomocystéinémie d'autre part.

Nos résultats révèlent que l'hyperhomocystéinémie engendre une augmentation du poids corporel, des perturbations des paramètres biochimiques plasmatiques, alors que le prétraitement par le lycopène a un effet bénéfique, sur le bon déroulement du mécanisme de détoxification hépatique et l'élimination des altérations causées par une hyperhomocystéinémie, chez le rat *Wistar* mâle traité pendant 03 mois.

Nos résultats montrent également qu'au niveau tissulaire, les altérations observées touchent essentiellement la modulation de la composition de la matrice extracellulaire, les hépatocytes et la vascularisation hépatique mettant en exergue un remodelage hépatique.

Mots clés : Hyperhomocystéinémie, détoxification, Lycopène, Méthionine, foie.

Abstract

Numerous epidemiological studies have shown that the liver plays a vital role in eliminating homotoxins of the body, whose accumulation is particularly dangerous.

Homocysteine is a functional indicator of a type of reaction necessary to our life, which is methylation; the latter is a very important chemical reaction for the degradation of homocysteine in the liver, and more exactly in phase 2 liver detoxification.

Note that homocysteine is a sulfur amino acid provided by the protein in the diet and its accumulation in the liver becomes harmful, increasing the latter constitutes a risk factor of several degenerative diseases such as liver and fibrosis.

At our study, an experimental hyperhomocysteinemia was induced by oral administration of methionine (500mg/kg/ day), and we studied the effect of pretreatment with lycopene, administered by gavage (05mg/kg/ day) to this state.

Hyperhomocysteinemia was analyzed weight, plasma level by the determination of certain biochemical parameters namely (AST, ALT, homocysteine) and at the tissue level by a histopathological study of liver biopsies.

It consists of analyzing the impact of hyperhomocysteinemia on plasma biochemistry and histology of liver *Rattus norvegicus* on the one hand and to show that lycopene administered preventively, may reduce or prevent the onset of metabolic dysregulation caused by hyperhomocysteinemia other.

Our results show that hyperhomocysteinemia causes an increase in body weight, disturbances in plasma biochemical parameters, then that pretreatment with lycopene has a beneficial effect on the smooth running of the mechanism of liver detoxification and elimination alterations caused by hyperhomocysteinemia, male Wistar rats treated for 03 months.

Our results also show that the tissue level , the alterations observed mainly affect the modulation of the composition of the extracellular matrix , hepatocytes and liver vasculature highlighting liver remodeling.

Keywords: Hyperhomocysteinemia, detoxification, Lycopene, Methionine, liver.

:

أظهرت العديد من الدراسات و الوبائية أن الكبد يلعب دورا جوهريا في غاية الخطورة .

الأوموسيستيين هو مؤشر وظيفي لنوع من التفاعلات المهمة لحياتنا , هذه الأخيرة هي تفاعلات كيميائية ذو أهمية بالغة لتفكيك الأوموسيستيين على مستوى الكبد وتحديدًا في المرحلة الثانية من عملية ازالة .

أن الأوموسيستيين هو حمض أميني كبريتي , يجلب من بروتينات التغذية و تجمعه في الكبد يصبح , حيث أن ارتفاع هذا الأخير هو مؤشر خطر للعديد من الأمراض الكبدية مثل التليف الكبدي.

الأوموسيستيين التجريبية , طعام مادة الميثيونين عن طريق التأثير العلاجي لمادة الليكوبان على هذا المرض , طعامه عن طريق التزقيم .

ارتفاع الأوموسيستيين قد حلل على المستوى , عن طريق معرفة نسبة بعض القياسات الكيميائية وعلى المستوى النسيجي عن طريق دراسة تشريحية .

وجدنا من خلال التحليل ان ارتفاع الأوموسيستيين يؤثر على الكيمياء الحيوية للبلازما و النسيج الكبدى للفئران من جهة و أن الليكوبان المقدم كعلاج قادر على منع ظهور الاختلال الأيضي الناتج عن هذا المرض من جهة اخرى .

تشير نتائجنا وموسيستيين يسبب ارتفاع في الوزن الجسمي و اضطرابات في القياسات بيوكيميائية البلازمية , في حين ن العلاج بالليكوبان له تأثير مفيد على السير الجيد لعملية التغييرات الناتجة عن ارتفاع ا وموسيستيين عند ذكور الفئران المعالجه لمدة ثلاثة اشهر.

تظهر نتائجنا أيضا أن التغييرات الملاحظة على المستوى النسيجي , تلمس خاصة تعديل القالب خارج الخلوي والخلايا الكبدية و الأوعية الكبدية وذلك بإعادة تكوين الكبد .

الكلمات الجوهريّة : ارتفاع الأوموسيستيين , , الليكوبان , الميثيونين , .

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Dans notre environnement comme dans notre assiette, difficile d'échapper aux toxiques qui nous entourent. En excès, ces toxiques vont avoir un effet délétère sur notre santé. Ils fragilisent nos cellules, accélèrent leur vieillissement et peuvent diminuer nos défenses immunitaires (**Didier, 2006**). Le foie joue un rôle crucial dans la détoxification des substances qui sont nuisibles pour le corps, notamment les produits chimiques, peuvent s'accumuler dans le sang et entraîner une altération des fonctions mentales, un changement de comportement et (dans les cas les plus graves) le coma. Les personnes souffrant d'une atteinte hépatique de longue durée peuvent aussi être victime d'un cancer du foie (**Robert, 2004**).

Pour favoriser la détoxification, il est nécessaire de stimuler l'élimination des toxiques par le foie, lutter contre le stress oxydatif et l'inflammation, renforcer l'équilibre de l'écosystème intestinal et favoriser l'élimination rénale : autant de "missions" pour lesquelles le choix de nos aliments et un apport éventuel en micronutriments ou en extraits de plantes spécifiques pourra être utile (**Didier, 2006**).

Les travaux effectués consistent en l'analyse des répercussions d'une hyperhomocystéinémie induite par une surcharge en méthionine sur la biochimie plasmatique et l'histologie hépatique de *Rattus norvegicus*. Toujours dans le même contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets spécifiques du lycopène antioxydant naturel extrait de la tomate (**Eustache, 2011**)

Cet antioxydant, renfermant des composés bioactifs, servant à renforcer les défenses anti oxydantes de l'organisme pour préserver la santé et donc capable de contrer les altérations et la modulation de la composition de la matrice extracellulaire provoquées par cette surcharge en méthionine à savoir l'installation d'une fibrose hépatique.

Dans le cadre de ce présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'impact d'une hyperhomocystéinémie expérimentale, induite chez le rat *Wistar* par l'administration de la méthionine *per os*, à raison de 500 mg/kg/jour durant 3 mois d'une part et aux effets du lycopène administré à raison de 5mg/kg/jour, de façon préventive.

Pour réaliser ce travail, nous avons procédé à :

-Une étude biochimique pour la détermination de certains paramètres plasmatiques et hépatiques comme l'homocystéine, et les transaminases sériques (ASAT, ALAT),

-Une étude histologique du parenchyme hépatique, pour analyser les répercussions causées par l'installation d'un état d'hyperhomocystéinémie sur ce dernier d'une part et d'autre part l'effet préventif du lycopène sur ces altérations matricielles.

RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

I. Détoxification hépatique

I.1. Définition

L'organisme humain comme celui des autres espèces animales est fréquemment exposé à des composés potentiellement toxiques et il est capable de métaboliser activement de nombreuses substances étrangères à l'organisme, polluants chimiques, médicaments et autres xénobiotiques. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, dont les cytochromes p540, jouent un rôle central dans la biotransformation, le métabolisme et/ou la détoxification de composés étrangers à l'organisme (**Gueguen et al., 2006**). Les réactions de détoxification se déroulent le plus souvent dans le foie et en deux temps : la phase I permet l'inactivation des substrats, la phase II rend le composé plus hydrosoluble, pour être mieux excrété (bile, urines) (**Raisonnier, 2004**).

I.2. Homotoxine

Nous définissons une homotoxine comme n'importe quelle substance qui est toxique pour l'organisme humain. La toxicité peut être due aux caractéristiques chimiques de la toxine, aux réactions biochimiques ou métaboliques qu'elle crée, ce qui influence le fonctionnement correct de la cellule (**Wilkinson, 2005**).

Tableau 1: Les types d' homotoxines (**Wilkinson, 2005**).

Homotoxines exogènes	Homotoxines endogènes
<ul style="list-style-type: none">• Mercure, plomb et autres métaux lourds• Alcool• Tabac• Café• Gaz industriels et du trafic• Evaporation de matériel toxique à la maison exemple : colle des tapis, peintures, détachants, produits de nettoyage et d'entretien ...• Colorants alimentaires, aromatisants,	<ul style="list-style-type: none">• CO₂• Acide lactique• Urée• Oxalate de calcium• Ammoniac• Dérèglement hormonal...

Il y a des siècles, Paracelse mentionnait déjà l'importance de la dose pour appeler une substance toxique.

On connaît généralement l'arsenic comme étant une substance très toxique. Les doses plus élevées sont des doses mortelles, des micros doses d'une toxine peuvent même être avantageuses pour l'organisme. D'autres substances que nous qualifions sans aucun doute comme saines peuvent devenir extrêmement toxiques dans des doses élevées (boire plus de 30% de notre poids en eau en 24 heures est mortel) (Wilkinson, 2005).

I.3. Toxicité

La toxicité est un caractère des substances chimiques qui, au contact ou après pénétration dans un organisme, ont la propriété de causer un dysfonctionnement à l'échelle moléculaire, cellulaire ou organique (Fillatre, 2011).

↳ **Toxicité aiguë** : la toxicité aiguë est un effet résultant de l'administration d'une dose unique de la substance étudiée, pendant une courte durée (généralement, quatorze jours) (Fillatre, 2011).

↳ **Toxicité chronique** : la toxicité chronique est un effet résultant de l'administration répétée d'une dose ou de l'exposition prolongée, quotidienne ou périodique, à une concentration de la substance étudiée pendant une longue durée, couvrant une partie appréciable de la vie de l'organisme soumis à l'essai (des mois et même des années) (Fillatre, 2011). Dans notre cas nous avons utilisé de la méthionine, un acide aminé soufré, administrée aux rats par voie orale pendant trois mois.

↳ **Toxicité subaiguë** : la toxicité subaiguë est un effet résultant de l'administration répétée d'une dose ou de l'exposition quotidienne à une concentration de la substance étudiée pendant une courte durée, pouvant aller jusqu'à un mois (Fillatre, 2011).

↳ **Toxicité subchronique** : la toxicité subchronique est un effet résultant de l'administration répétée d'une dose ou de l'exposition quotidienne à une concentration de la substance étudiée pendant une durée moyenne (de un à trois mois) (Fillatre, 2011).

I.4. Organe clé de la détoxification hépatique

Le foie joue un rôle primordial dans l'élimination des toxines de l'organisme dont l'accumulation est particulièrement néfaste. Il est donc important d'apporter des nutriments antioxydants comme la vitamine C et des autres nutriments qui le protègent et stimulent la synthèse interne de glutathion (l'antioxydant hépatique crucial appartenant aux enzymes de défense de l'organisme). Il faut aussi stimuler les fonctions hépatiques et renforcer les différents mécanismes de détoxification. (**Kamboj et al., 2006**).

Le foie joue un rôle clé dans les processus de détoxification de l'organisme.

- Il élimine du sang les substances néfastes (comme l'ammoniaque), puis les dégrade ou les transforme en des composants moins dangereux.
- Il métabolise la plupart des hormones et les médicaments ingérés en d'autres produits plus ou moins actifs.
- Le foie synthétise et sécrète la bile pour éliminer les toxines liposolubles et le cholestérol. Lorsque l'excrétion biliaire est inhibée, les toxines stagnent plus longtemps dans le foie où elles peuvent exercer leurs effets néfastes.
- La chélation des métaux lourds complète la panoplie des actions de détoxification hépatique, elle consiste à utiliser une substance organique ou un agent chélateur qui se lie à des métaux lourds, tels le plomb, le cadmium ou le mercure, pour former un complexe stable, inactif et soluble qui peut aisément être éliminé par les voies naturelles.

Lorsque les systèmes de détoxification du foie sont débordés, les toxines s'accumulent dans l'organisme et favorisent l'apparition de problèmes chroniques de santé. Elles sont en effet capables d'endommager de nombreuses fonctions, notamment le système immunitaire, ouvrant la porte à de nombreuses pathologies parmi lesquelles les cancers tiennent une place importante (**Aza, 2001**).

I.5. Mécanisme de détoxification

D'abord, le foie filtre le sang pour en éliminer les toxines les plus importantes. Le sang est en effet chargé de bactéries, d'endotoxines et de complexes antigènes anticorps ainsi que de différentes substances toxiques provenant des intestins. Un foie en bonne santé élimine pratiquement 100 % des bactéries et toxines du sang avant qu'elles ne rejoignent la circulation générale (Suh et al., 2004).

Le foie utilise ensuite la voie enzymatique pour décomposer les produits chimiques indésirables, tels que les médicaments, les pesticides, les entérotoxines provenant de l'intestin, ainsi que des hormones stéroïdes ou des produits du métabolisme qui deviendraient toxiques s'ils s'accumulaient. Ce processus enzymatique s'effectue généralement en deux types de réactions :

I.5.1. Réactions de la phase I ou phase de dégradation

On regroupe sous ce terme toutes les réactions qui impliquent une modification de la molécule active soit par oxydation, hydrolyse ou réduction (Manahan, 2003).

↳ Oxydation

Le cytochrome 4A1 permet l'oxygénation spécifique du carbone terminal des chaînes aliphatiques, en transférant un des atomes d'oxygène sur le méthyl terminal conduisant à une fonction alcool (Fig.1), cette réaction permet le métabolisme des carbures aliphatiques naturels qui sont transformés en alcools gras puis oxydés et conjugués en acétyl-CoA (Raisonnier, 2004).

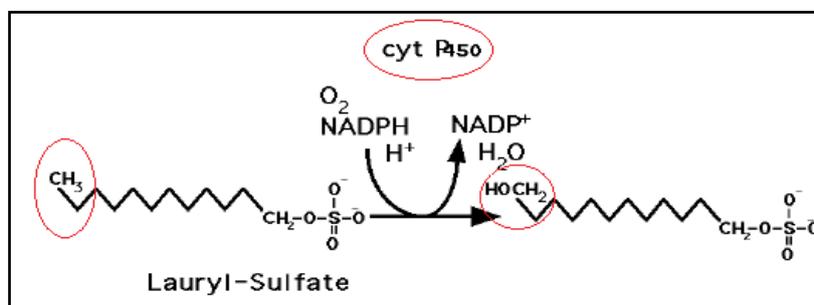


Figure 1: La réaction d'oxydation de Lauryl-Sulfate (Raisonnier, 2004).

↳ Hydrolyse

Les hydrolases sont très nombreuses dans toutes les voies métaboliques : (lipases, peptidases, nucléases...) .De nombreux médicaments ou xénobiotiques sont des esters ou des amides dont l'hydrolyse aboutit à la perte de l'activité ou de la toxicité.

↳ Réduction

Bien que beaucoup plus rares que les réactions d'oxydation, il existe dans les réactions de phase I des réactions de réduction. Elles sont souvent catalysées par des réductases à NADPH ou à glutathion. Ainsi l'acide picrique est réduit en acide picramique (**Fig.2**), par une réductase à NADPH (**Raisonnier, 2004**).

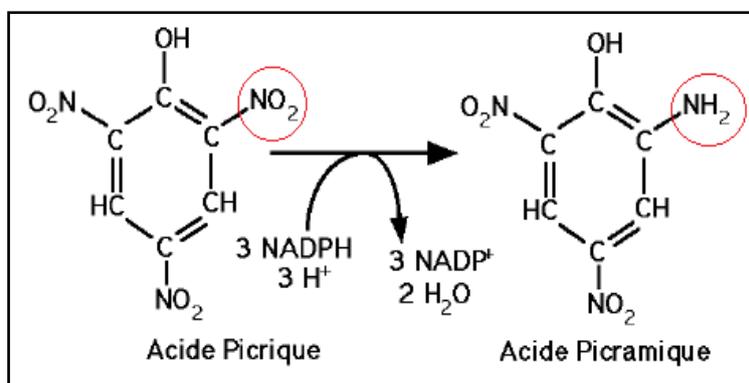


Figure 2: La réaction de réduction de l'Acide picrique (**Raisonnier, 2004**).

I.5.2. Réactions de la phase II ou phase de conjugaison

Les conjugués en général sont plus hydrosolubles donc facilement excrétables que la substance mère. Elles englobent des réactions de glucuroconjugaison, sulfoconjugaison, méthylation, acétylation et conjugaison au glutathion (**Manahan, 2003**).

↳ Glucuroconjugaison

La conjugaison des xénobiotiques avec l'acide β-glucuronique est la plus fréquente des réactions de la phase II.

L'acide β-glucuronique est un dérivé du glucose. La glucuroconjugaison intervient dans le métabolisme de la bilirubine (UDP-glucuronosyltransférases). La bilirubine libre, insoluble,

doit être transportée dans le *plasma* par la sérumalbumine. Une fois conjuguée par le glucuronate elle devient soluble et peut être éliminée par les reins.

↳ Sulfoconjugaison

La sulfatation est une réaction de conjugaison que nous avons rencontrée dans le métabolisme des acides biliaires et dans celui des androgènes surrénaliens.

Le paracétamol est sulfaté sur la fonction phénol (**Fig. 3**), comme les stéroïdes. Ce sulfate peut être, ensuite substitué par un glutathion.

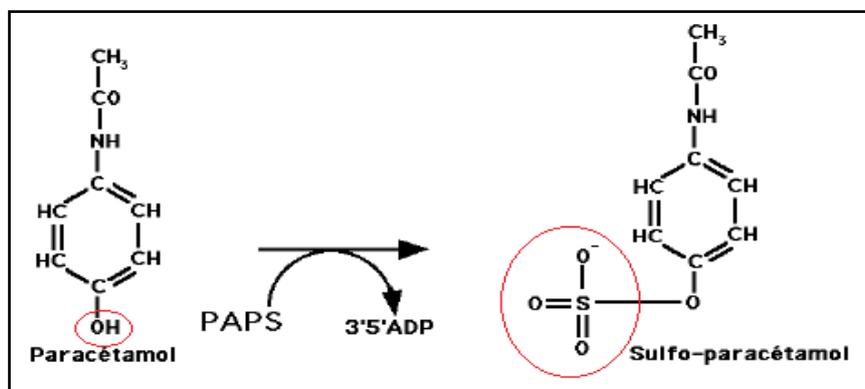


Figure 3 : La réaction de sulfoconjugaison du Paracétamol (**Raisonnier, 2004**).

↳ Méthylation

Les réactions de méthylation sont des réactions de détoxification qu'on rencontre dans certaines voies métaboliques. Le coenzyme qui permet le transfert du radical méthyl est la S-adénosylméthionine, qui suit le métabolisme des radicaux monocarbonés. La méthylation de la nicotine (**Fig.4**), est une des voies de détoxification de cet alcaloïde du tabac (**Raisonnier, 2004**).

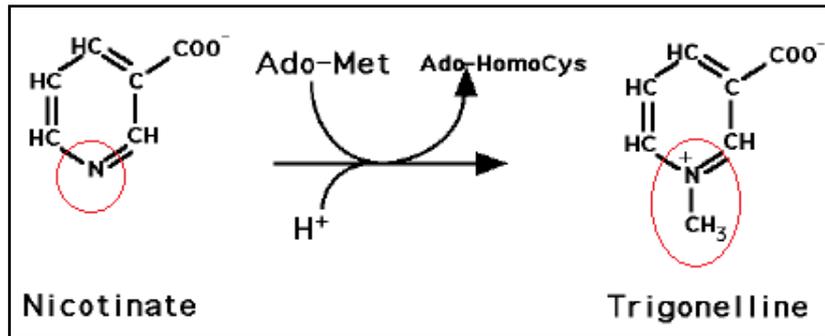


Figure 4: la réaction de Méthylation de Nicotine (Raisonnier, 2004).

↳ Acétylation

Des réactions d'acétylation se rencontrent dans le métabolisme : synthèse de la N-acétylglutamine pour la régulation du cycle de l'urée.

L'isoniazide est acétylée par une acétyl-transférase hépatique dont l'activité est génétiquement déterminée(Fig.5).

L'acétyl se substitue à un des hydrogènes d'une fonction amine.

Les sulfamides sont aussi éliminés par acétylation (Raisonnier, 2004).

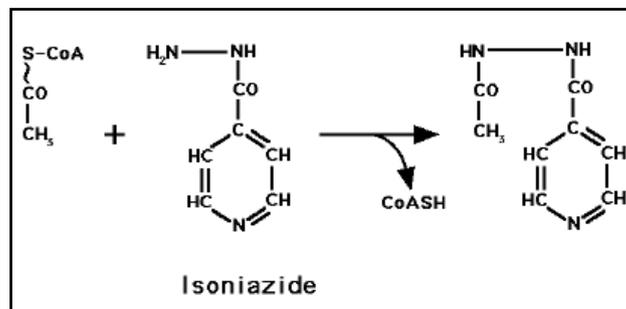


Figure 5: La réaction d'acétylation d'isoniazide (Raisonnier, 2004).

↳ Conjugaison au glutathion

La glutathion transférase est une enzyme inductible du cytoplasme du foie qui catalyse la liaison de certaines molécules avec un peptide(le glutathion), afin de favoriser leur diffusion dans le plasma. Certains xénobiotiques peuvent être transférés sur le glutathion au cours de la phase II de leur détoxification. C'est le cas du paracétamol à fortes doses (Fig.6). Dans

l'alcoolisme chronique le taux de glutathion étant profondément diminué, ces réactions sont beaucoup plus difficiles (Raisonnier, 2004).

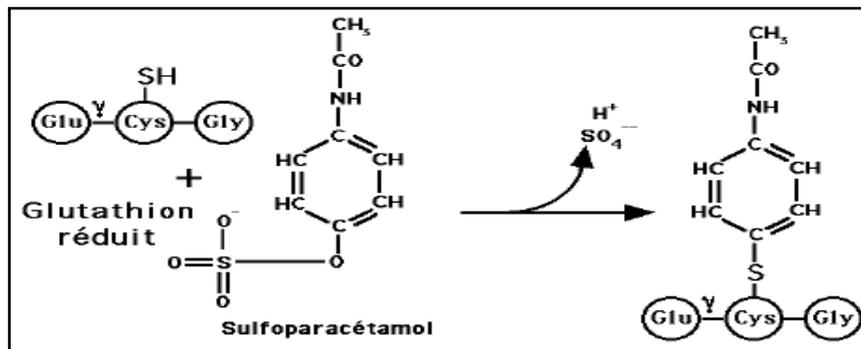


Figure 6 : La réaction de conjugaison de sulfoparacétamol (Raisonnier, 2004).

I.6. Glutathion

I.6.1. Définition

Le glutathion (g-glutamylcysteinylglycine, GSH) est un tripeptide hydrosoluble composé d'acides aminés de glutamate, de cystéine et de glycine (Fig.7). Présent dans toutes les cellules des mammifères, il est largement répandu dans les royaumes des animaux et des plantes, soulignant son importance fondamentale biologique.

Le GSH est un antioxydant endogène de grande importance, ainsi qu'un détoxiquant des composés exogènes et endogènes toxiques. De plus, il joue un rôle vital au sein de plusieurs activités du cycle cellulaire, y compris la synthèse des protéines et l'expression génétique. (Pastore *et al.*, 2003).

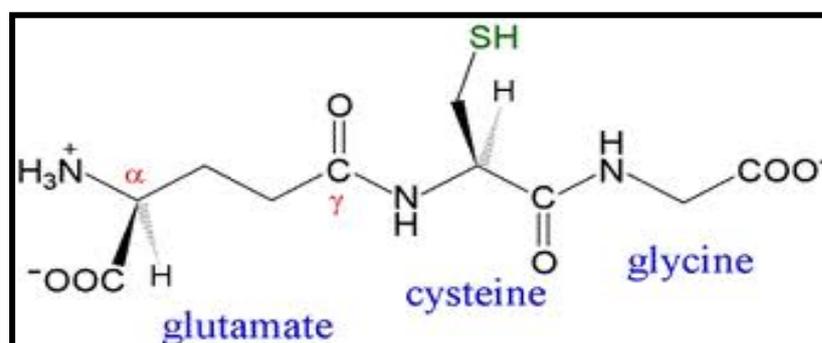


Figure 7: Structure chimique du glutathion (Pastore *et al.*, 2003).

I.6.2. Glutathion et détoxification hépatique

La voie enzymatique de détoxification produit des quantités importantes de radicaux libres qu'il est important de neutraliser par un apport d'antioxydants sous forme hydro et liposolubles. Dans le foie, l'antioxydant le plus important est le glutathion, indispensable au bon déroulement des phases I et II de la détoxification. Lorsque les toxines arrivent en quantité trop élevée dans le foie, la production de radicaux libres est tellement importante que la totalité du glutathion disponible est consommée au cours de la phase I pour les neutraliser.

Si ses niveaux ne sont pas rapidement reconstitués, les processus de détoxification de la phase II vont s'arrêter avec pour conséquences de graves réactions toxiques provoquées par les substances toxiques issues de la phase I (Suh, 2004).

I.7. Foie

I.7.1. Organisation anatomique du foie

Chez les rongeurs, le foie est anatomiquement plurilobé et constitué de cinq lobes : le lobe gauche (LG) ; le lobe médian (LM) ; le lobe droit (LD) et les deux lobes caudaux (LC).

La vascularisation de chacun de ces lobes est majoritairement assurée par une branche de la veine porte et minoritairement par une branche de l'artère hépatique, apportant du sang oxygéné (Gandillet, 2004) (Fig.8).

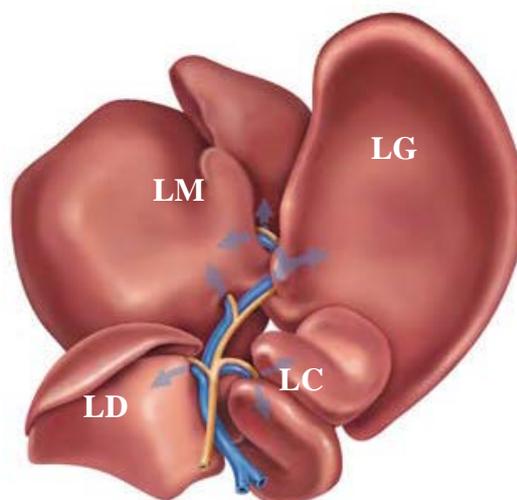


Figure 8 : Représentation des différents lobes hépatiques et vascularisation chez le rat (Gandillet, 2004).

I.7.2. Histologie du foie

Du point de vue histologique, le foie est constitué de cellules hépatiques (hépatocytes) organisées en travées autours des sinusoides. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique, de forme hexagonale et centré par une veine centro-lobulaire. Le lobule est entouré d'espaces portes, où sont groupées les branches de l'artère hépatique, de la veine porte et des canaux biliaires. Le sang circule à travers les hépatocytes des espaces portes vers les veines centro-lobulaires. A l'inverse, les canalicules biliaires sont constitués de sillons ménagés entre les faces accolées d'hépatocytes adjacents. Ses échanges avec le reste du corps se font pour la plupart à travers sa double irrigation sanguine (veine porte et artère hépatique), qui se termine par une multitude de capillaires jusqu'à l'intérieur du foie (Lüllmann *et al.*, 1998) (Figure 9 a et b). 80% des cellules du foie sont des hépatocytes mais il existe d'autres types cellulaires, on note la présence des lymphocytes hépatocytaires, cellules biliaires et endothéliale, cellules de *Küppfer*, cellules *Ito* (fonction métabolique de la vitamine A et des lipides, et synthèse de la matrice extracellulaire autours de cellules endothéliales) (Lüllmann *et al.*, 1998).

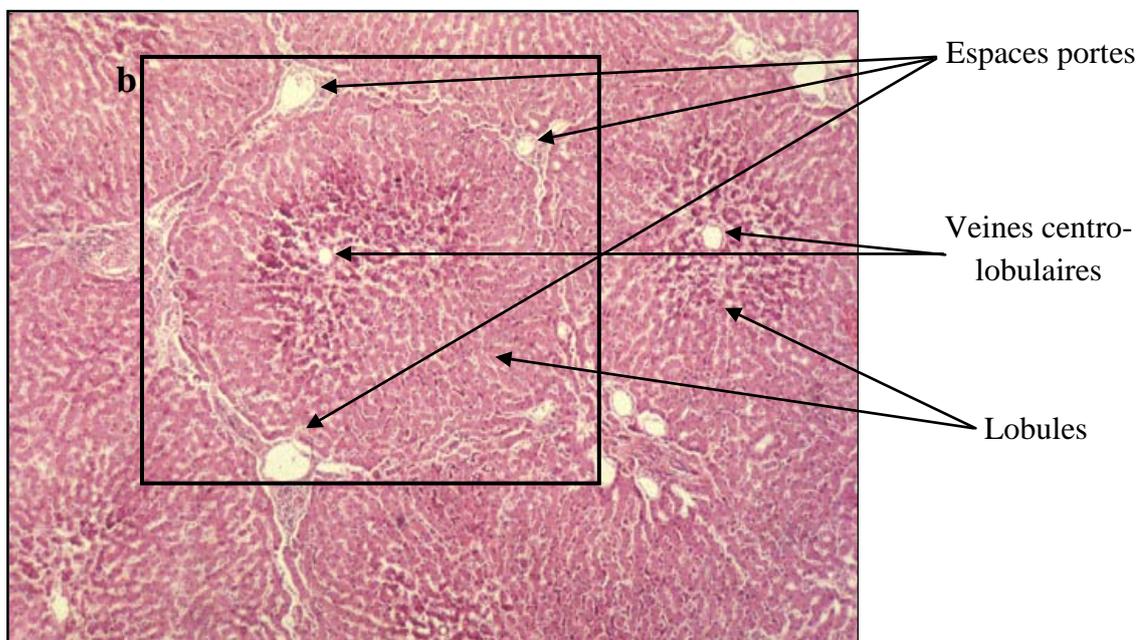


Figure 9a: Organisation structurale du foie (Marchall et Bangert, 2004).

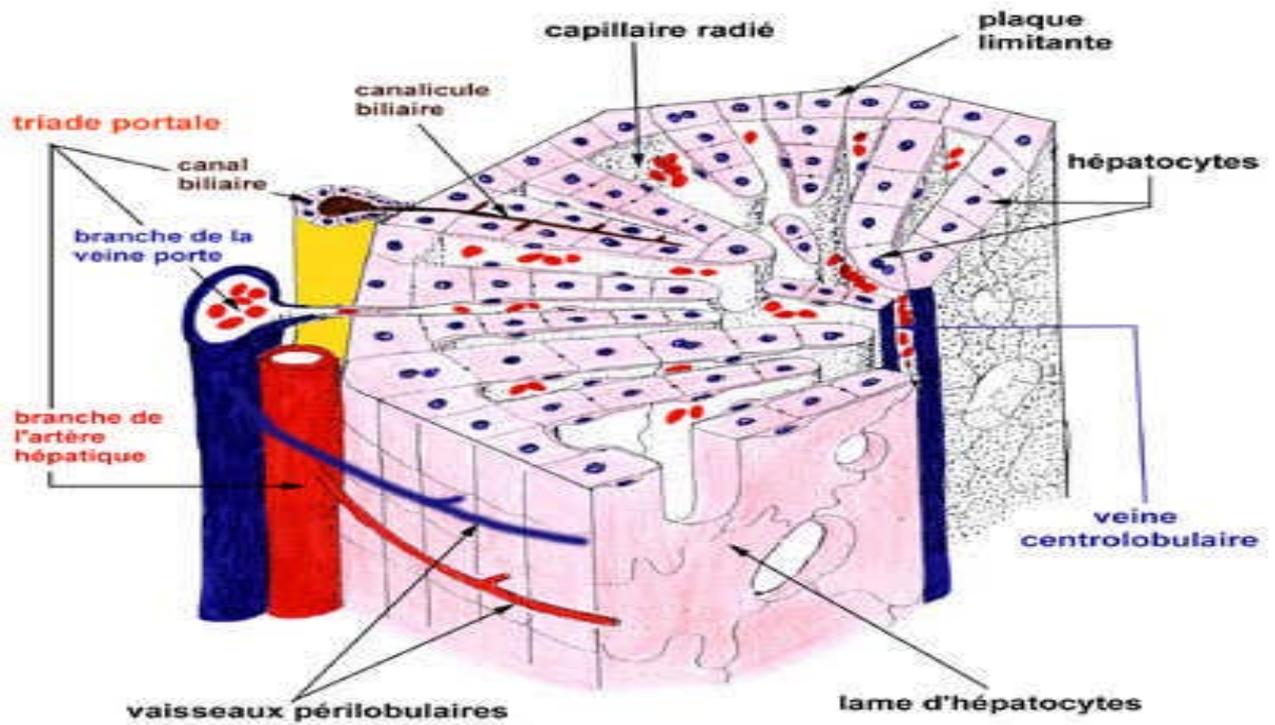


Figure 9b: Organisation structurale schématique du foie (Marchall et Bangert, 2004).

I.7.3. Fonctions du foie

Le foie assure plusieurs fonctions biologiques, métaboliques et excrétrices, qui sont récapitulées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2: Fonctions principales du foie (Marchall et Bangert, 2004).

<i>Fonctions du foie</i>
<i>Métabolisme glucidique</i> <i>Néoglucogenèse</i> <i>Synthèse et catabolisme du glucose</i>
<i>Métabolisme lipidique</i> <i>Synthèse des acides gras et des lipoprotéines</i> <i>Synthèse et excrétion du cholestérol</i> <i>Synthèse des acides biliaires</i> <i>Cétogenèse</i> <i>25- Hydroxylation de la vitamine D</i>
<i>Métabolisme protidique</i> <i>Synthèse des protéines plasmatiques (Albumine et facteurs de coagulation)</i> <i>Synthèse de l'urée</i>
<i>Métabolisme hormonal</i> <i>Métabolisme et excrétion des hormones stéroïdiennes</i> <i>Métabolisme des hormones polypeptiques</i>
<i>Stockage</i> <i>Glycogène</i> <i>Vitamine A, B₁₂</i> <i>Fer</i>
<i>Métabolisme et excrétion de la bilirubine</i>
<i>Fonctions défensives</i> <i>Détoxification des déchets métaboliques et toxiques</i> <i>Défense antitumorale et antivirale.</i>

I.7.4. Evaluation d'une hépatotoxicité

Pour évaluer l'état du foie, un examen approfondi doit être mis en place, il comporte des tests biochimiques (enzymatiques et protéines plasmatiques) et histologique (**Rajender et Faust, 2006**).

Les enzymes utilisées dans l'évaluation de la fonction hépatique sont l'Aspartate Amino-Transférase (ASAT) anciennement appelée GOT (glutamate oxaloacétate transaminase). Essentiellement localisée dans le cœur, les reins, les muscles et le foie (90% dans les mitochondries), l'Alanine Amino-Transférase (ALAT) anciennement appelée GPT (glutamate pyruvate transaminase). Elle est essentiellement localisée dans le foie et uniquement dans le cytoplasme. En général, ces enzymes ne constituent pas des marqueurs spécifiques du dysfonctionnement hépatique.

Par ailleurs nous avons aussi jugée utile de doser la phosphatase alcaline, qui fait partie des enzymes de cholestase dont l'activité sérique augmente en cas de (stase biliaire). La phosphatase alcaline est localisée dans le foie et les voies biliaires surtout. Elle nous renseigne sur les affections hépatiques (hépatite, cirrhose et cancer).

Le dosage de l'homocystéine est utilisé comme pour approuver le phénotype de ces rats ainsi donc l'installation d'un état d'Hyperhomocystéinémie.

II. Homocystéine (Hcy)

II.1. Histoire et définition

L'homocystéine (Hcy) découvert en 1932 par **De Vigneaud**, qui constitue un intermédiaire important dans la fonction de donneur de méthyle de la méthionine et dans le métabolisme de celle-ci vers les autres acides aminés soufrés comme la cystéine. Les études épidémiologiques et expérimentales ont montré que, l'ingestion de méthionine conduit à une synthèse accrue d'homocystéine. Chez les sujets normaux, l'élévation de l'homocystéine plasmatique est très modérée et la valeur de base est retrouvée en quelques heures (**Sardharwalla et al., 1974**).

Dans des conditions physiologiques normales, les concentrations plasmatiques d'homocystéine chez des sujets sains à jeun sont comprises entre 5 et 15 $\mu\text{mol/l}$ (**Mudd et al., 2000**), et entre 6 et 12 $\mu\text{mol/l}$ (**Bostom et al., 2000**).

L'Hcy se trouve à la jonction de deux voies métaboliques, reméthylation et trans-sulfuration. Multiples enzymes interviennent dans ces voies de régulation et fonctionnent avec des cofacteurs vitaminiques (Vitamine B6, B9 ou acide folique et B12 ou cobalamine), proposés en thérapeutiques. Sa concentration plasmatique est considérée comme le reflet de son métabolisme intracellulaire, il est présent dans le plasma sous forme libre (20 à 30 %) et

liée aux protéines (70 à 80 %). C'est l'ensemble de ces formes c'est-à-dire Hcy totale qui est quantifié par les différentes techniques d'analyse. Le taux normal plasmatique à jeun est de 5 à 15 $\mu\text{mol/L}$. L'Hcy est considérée comme modérée entre 15 et 30 $\mu\text{mol/L}$, intermédiaire entre 30 et 100 $\mu\text{mol/L}$ et sévère $> 100 \mu\text{mol/L}$ (Caussé, 2008).

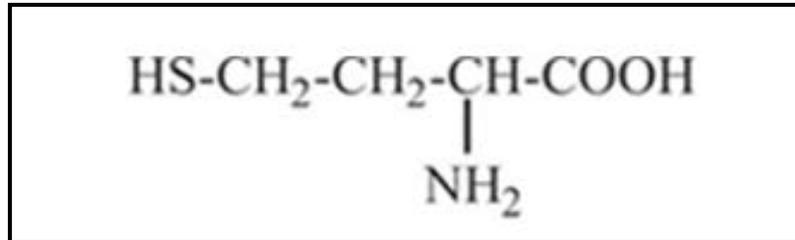


Figure 10: Structure chimique de l'homocystéine (Luciene de Souza *et al.*, 2010).

II.2. Différentes formes physicochimiques d'homocystéine

Dans le plasma humain, l'homocystéine est retrouvée sous trois formes différentes (Fig.11):

- **Forme réduite libre :** En très petite quantité (1 à 2 %) (Ueland *et al.*, 1995).
- **Forme oxydée (Hcy-Hcy) :** En plus grande quantité (25-30%) de disulfure mixte avec la cystéine, et cyclisée en thiolactone (Demuth *et al.*, 2000).
- **Forme liée :** Majoritairement (70 à 75 %) sous forme de disulfures conjugués aux groupes thiols des protéines (Refsum *et al.*, 1985).

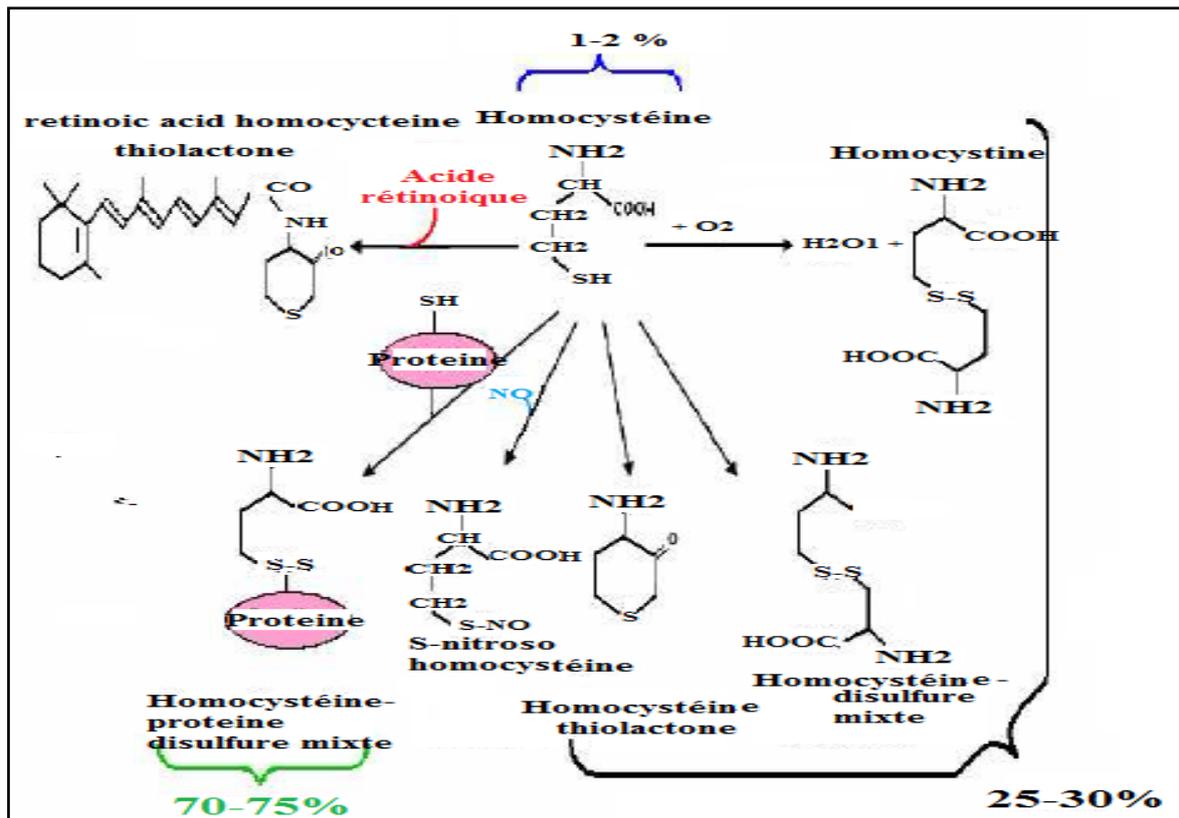


Figure 11 : Formules chimiques de l'homocystéine, de ses formes circulantes et de ses dérivés (Miner *et al.*, 1997).

II.3. Métabolisme de l'homocystéine

Sur le plan physiologique, l'homocystéine occupe une place centrale dans le métabolisme des acides aminés soufrés. Elle est produite par la déméthylation ou transméthylation de la méthionine (Finkelstein, 2000).

L'activation de la méthionine en S-adenosyl-méthionine (SAM) se fait sous l'influence de la méthionine-adenosyl transférase (MAT).

La SAM est un très important donneur de méthyle (Stead *et al.*, 2001) aux différents accepteurs importants comme les acides nucléiques (Bailey *et al.*, 2001). La synthèse de créatine dépend en grande partie de SAM. Celle-ci, en donnant son méthyle, se transforme en S-adenosyl-homocystéine (SAH), qui est hydrolysée en homocystéine et en adénosine par la SAHH ou S-adenosyl-homocystéine hydrolase (Welch *et al.*, 1998). L'homocystéine formée est soit catabolisée en cystathionine (voie de la transsulfuration) soit reméthylée en méthionine (voie de la reméthylation) (Guilland *et al.*, 2003). La reméthylation de

l'homocystéine est catalysée par la méthionine synthase (MS) qui requiert le 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) comme donneur de méthyle (**Yamada et al., 2006**) et la vitamine B12 (méthylcobalamine forme active de la vitamine B12) comme cofacteur (**Marsh, 1999**).

La formation du 5-MTHF dépend de la N⁵,10 méthylénetétrahydrofolate réductase (MTHFR) qui catalyse la réduction du 5,10-METHF formé à partir du tétrahydrofolate (THF).

Une voie parallèle de reméthylation indépendante des folates et de la cobalamine utilise la conversion de la bétaine en N, N-diméthylglycine sous l'action de la bétaine homocystéine méthyl-transférase (BHMT), principalement dans le foie et le rein (**Brosnan et al., 2004**).

Cette voie permet de maintenir la concentration tissulaire en méthionine à un niveau suffisant pour assurer la synthèse de la SAM en cas de déficit en folates.

La S- adénosyl-homocystéine formée dans les réactions de méthylation, est ensuite hydrolysée en homocystéine, qui devient disponible pour démarrer un nouveau cycle de transfert de méthyle.

L'hydrolyse de la SAH est une réaction réversible, préférentiellement orientée vers la synthèse de SAH et des concentrations cellulaires élevées de SAH précèdent et accompagnent toutes les formes d'hyperhomocystéinémie.

Dans la voie de transsulfuration, l'homocystéine se condense avec la sérine pour donner la cystathionine sous l'action de la cystathionine γ -synthase, dépendant du pyridoxal 5'-phosphate (PLP), la forme active de la vitamine B6. La cystathionine est ensuite hydrolysée en cystéine et γ -cétobutyrate par une enzyme dépendant du PLP, la γ -cystathionase (**Guilland et al., 2003**).

Cette voie est très importante puisque la cystéine est à l'origine d'un acide aminé soufré antioxydant majeur le glutathion (**Anderson, 1998**) ; et d'autres acides aminés utiles, notamment la taurine ; ou elle est convertie en sulfates qui sont excrétés dans les urines. Les carbones restants de l'Hcy rejoindront le cycle de Krebs (**Wolters et al., 2004**) (**Fig.12**).

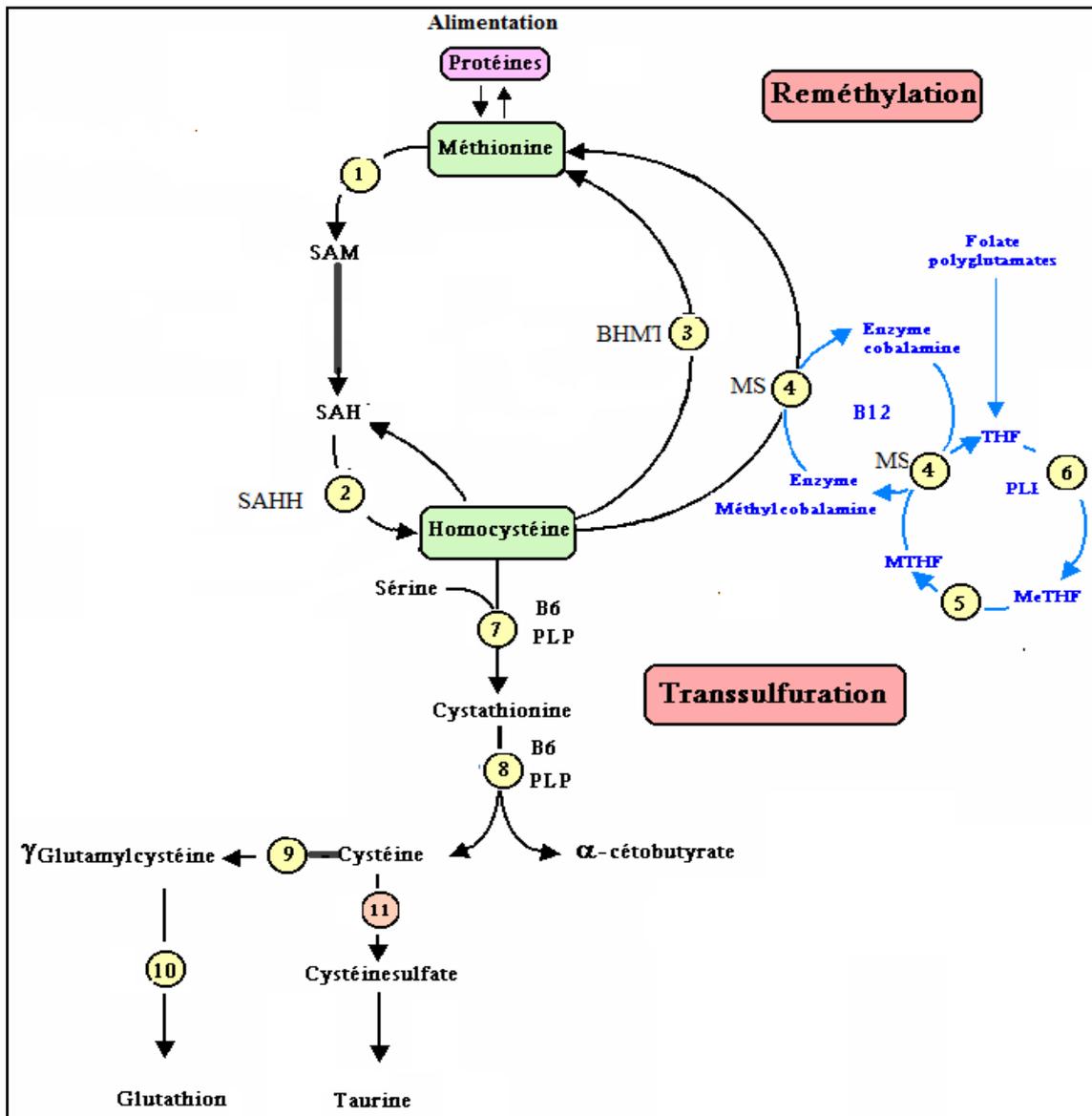


Figure 12: Métabolisme de l'homocystéine (Uthus *et al.*, 2002).

- 1: Méthionine-adénosyl transférase (MAT)
- 2 : S-Adénosyl Homocystéine Hydrolase ou SAHH
- 3 : Méthyle Transférase ou MT,
- 4 : Méthionine Synthase ou MS,
- 5 : METHF Réductase ou METHFR,
- 6 : Sérine Hydroxyméthyl Transférase ou SHT,
- 7 : γ Cystathionine β-Synthase ou CBS,
- 8 : γ Cystathionase,
- 9 : γ Glutamylcystéine Synthétase ou γ GS,
- 10 : Glutathione Synthétase ou GS,
- 11 : Cystéine Dioxygénase ou CD.

II.4. Causes d'élévation de l'homocystéine plasmatique

- Altération génétique des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. La plus fréquente est une variante thermolabile de la MTHFR avec activité enzymatique réduite, résultat d'une substitution d'une base en position 677 de son gène. La mutation homozygote est présente chez 5-15% de la population et cause une élévation modérée, d'environ 25% de l'homocystéine plasmatique.
- **Déficit en vitamine :** B6, B12 ou en folates (B9).
- **Certains médicaments:** fibrates hypocholestérolémiants, antiépileptiques, méthotrexate, théophilline, metformine.
- **Certaines substances:** acide nicotinique (fumée).
- **Certaines conditions médicales:** insuffisance rénale chronique, diabète, hypothyroïdie (**Fernane, 2009**).

II.5. Hyperhomocystéinémie

II.5.1. Définition

L'hyperhomocystéinémie sévère est un désordre génétique rare dû à l'absence d'activité de l'enzyme cystathion- β -synthase. Elle est caractérisée par des valeurs très élevées d'homocystéine plasmatique ($>100 \mu\text{mol/L}$) et urinaire avec retard de développement, ostéoporose, maladie thromboembolique, artériosclérose précoce. Une élévation plus modérée de l'homocystéine plasmatique se rencontre plus fréquemment dans la population (5-7%).

Différentes études suggèrent que cette perturbation constitue un facteur de risque indépendant pour la maladie thromboembolique veineuse, et pour les maladies athérosclérotiques cardiovasculaires (**Stalder et al., 2007**).

II.5.2. Classification des hyperhomocystéinémies

Notre organisme synthétise environ 20 mmoles par jour d'homocystéine, mais très peu comparativement se retrouve dans le sang. Le dosage de l'homocystéine après charge en méthionine est actuellement moins utilisé, notamment en raison de sa lourdeur.

Physiologiquement, la concentration plasmatique d'homocystéine est en moyenne de

10 $\mu\text{mol/l}$. Elle est plus élevée chez l'homme que chez la femme, et augmente avec l'âge et à la ménopause. La plupart des études retiennent pour seuil pathologique des valeurs de 15 $\mu\text{mol/l}$.

Dans les sociétés occidentales, 10 % de la population dépasseraient ce seuil (naissances), réalisant le tableau classique de l'homocystinurie, qui associe des atteintes ophtalmologiques, squelettiques, nerveuses et vasculaires. L'homocystéinémie dépasse en pareil cas 100 $\mu\text{mol/l}$. En l'absence de traitement, le pronostic est très sombre, puisque le risque de survenue d'un évènement cardiovasculaire avant l'âge de 30 ans serait de 75 %. (*Welch et al., 1998*).

Le tableau suivant nous donne la classification des différentes formes de l'hyperhomocystéinémie :

Tableau 3 : Classification des hyperhomocystéinémies (*Mouchabac, 2008*).

<u>Dosage moyen</u>	<u>10 $\mu\text{M/l}$ (seuil 15 $\mu\text{M/l}$)</u>
Hyperhomocystéinémie modérée	15 à 30 $\mu\text{M/l}$
Hyperhomocystéinémie intermédiaire	30 à 100 $\mu\text{M/l}$
Hyperhomocystéinémie sévère ou majeure	>100 $\mu\text{M/l}$

II.5.3. Facteurs favorisant l' hyperhomocystéinémie

II.5.3.1. Facteurs nutritionnels

- Apport alimentaire en méthionine.
- Déficit en folates (vit. B9 et B12) lié à un processus carenciel ou une malabsorption d'origine digestive.
- Carence prolongée en vitB6 qui conduit à une élévation majeure d'Hcy en cas d'apport alimentaire riche en méthionine (*Mouchabac, 2008*).

II.5.3.2. Facteurs génétiques

- Anomalie de voie de la transsulfuration mutation du gène de la C β S (**Smach et al., 2012**).

II.5.3.3. Facteurs non spécifiques

- **Pathologies somatiques :** insuffisance rénale, certains cancers, hyperthyroïdies, inflammation, diabète de type deux, le psoriasis.
- **Le sexe :** un taux légèrement élevé est observé chez les hommes (influence hormonale).
- **L'âge :** augmentation des atteintes de l'hyperhomocystéinémie avec l'âge mais qui ne conduit pas à des taux anormaux élevés (**Mouchabac, 2008**).

II.5.3.4. Les médicaments

- Les antagonistes des folates (méthotrexate).
- Les antagonistes de la vitamine B6 (niacine).

II.5.3.5. Autres substances

- Acide nicotinique (tabac), café, alcool

II.5.4. Hyperhomocystéinémie et Stress oxydatif

L'hyperhomocystéinémie est considérée comme un facteur pro-oxydant largement impliqué dans la genèse d'un stress oxydant (**khelil et al., 2010**). Le groupe thiol de l'homocystéine se lierait aux ions ferreux pour former des ROS (**Guilland et al., 2003**).

L'appauvrissement en acide folique et l'hyperhomocystéinémie sont secondaire à un stress oxydant (**Hoffman, 2011**). L'Hcy peut également sensibiliser les cellules au stress oxydatif en diminuant l'expression d'une large gamme d'enzymes anti-oxydantes.

II.5.5. Homocystéine et les maladies cardiovasculaires

Les patients souffrant d'homocystinurie développée ont une vaste plaque artérielle avec épaissement de l'intima. Les cellules musculaires lisses sont riches en collagène fibreux. Ces fibres présentent des lésions beaucoup plus nombreuses que les lésions provoquées par l'athérosclérose dans les grandes artères des patients homocystinuriques et,

combinée a une thrombose anormalement accélérée, peut conduire à un infarctus du tissu myocardique et la mort à un âge précoce .

La thrombose veineuse et, dans une moindre mesure, la thrombose artérielle sont communes à des patients souffrant d'homocystinurie. Induite par l'homocystéine, la thrombose semble résulter des perturbations potentielles des cellules endothéliales plutôt que des changements physiologie plaquettaire. Cela conduit à l'élaboration d'un phénotype prothrombotique compatible avec une lésion vasculaire (**Lawrence de Koning et al., 2003**).

II.5.6. Rôle du foie dans la régulation de l'homocystéinémie

Le foie est le site majeur du catabolisme de l'Hcy (80%) car il contient les différents enzymes nécessaires. Trois enzymes clés du métabolisme de l'homocystéine sont exclusivement hépatiques. C'est le cas de la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT) et de la méthionine adenosyltransférase (MAT). La voie de la transsulfuration est uniquement hépatique.

L'importance de la voie de transsulfuration dans la régulation des taux élevés d'homocystéine plasmatique a été démontrée chez des souris déficientes en C β S qui présentent des concentrations deux fois plus élevées en homocystéine par rapport aux témoins (**Lentz et al., 2001**) .

III. Lycopène

III.1. Historique et définition

L'histoire du lycopène est toute récente et trouve sa source dans l'art culinaire, il attira l'attention des chercheurs à la fin du siècle dernier, quand on remarque que les maladies de la prostate rencontrés chez les hommes étaient significativement moins présentes en Italie et en Grèce.

Ces contrées avaient pour caractéristique commune d'offrir une palette alimentaire incluant beaucoup de tomates et plus particulièrement des tomates cuites en diverses sauces.

Le lycopène, présent dans la tomate, devint dès lors un objet d'études multiples et aussi une denrée alimentaire de plus en plus consommée par les naturistes (**Claude, 2006**).

Le lycopène, une des « stars » de la nutrition préventive selon **Nicolas Guggenbühl**,

(2007). Il est synthétisé par les plantes et des micro-organismes. Contrairement au β -carotène ce n'est pas un précurseur de la vitamine A (Gibaut, 2006). C'est le pigment responsable de la couleur rouge, orange de certains végétaux ou il est utilisé comme un colorant naturel dans l'industrie alimentaire.

Le lycopène est une substance caroténoïde acyclique de couleur rouge contrairement à la majorité des substances caroténoïdes qui ont une forme moléculaire cyclique (Clinton, 1998).

Cet antioxydant est très puissant, protège également la peau du soleil, aide à réduire la pression artérielle chez les hypertendus et prévient le cancer, notamment le cancer de la prostate et les maladies cardiovasculaires (Eustache, 2011).

III.2. Structure chimique

Le lycopène est de formule $C_{40}H_{56}$ (Fig. 13), est un pigment naturel appartenant à la famille des caroténoïdes acycliques (Sabio et al., 2003). À ce jour, plus de 600 substances caroténoïdes ont été reconnues existent sous la forme cis ou trans. Le lycopène se présente sous la configuration trans, comporte 13 doubles liaisons conjuguées, la structure moléculaire particulière du lycopène, présente une influence sur sa biodisponibilité, son absorption, son transport, sa distribution dans les tissus et ses propriétés antioxydante. (Shi et Le Maguer, 2000).

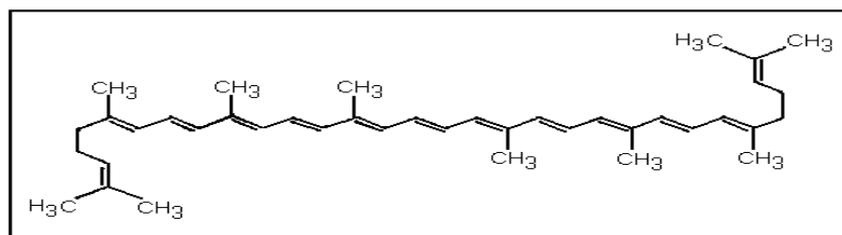


Figure 13 : Structure moléculaire du lycopène (Rao et al., 2006).

III.3. Propriétés physico-chimiques

Les plus importantes propriétés physico-chimiques du lycopène sont résumées dans le **tableau 4**.

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

Paramètres	
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.

III.4. Sources alimentaires de lycopène

Plus de 80% du lycopène consommé provient de la tomate (Sahin *et al.*, 2006).

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

Quelques autres aliments de consommation courante contiennent également du lycopène comme : les abricots, les pamplemousses, le melon d'eau (Sahin *et al.*, 2006).

III.5. Apports conseillés

Nous ne disposons pas d'apports recommandés mais les études épidémiologiques réalisées chez de grands consommateurs de fruits et légumes suggèrent un effet préventif protecteur d'apports nutritionnels compris entre 4 et 10mg/j (Gupta, 2002).

III.6. Absorption et métabolisme du lycopène

Le lycopène, une fois ingéré, va être intégré dans les micelles mixtes et absorbé dans les anthérocytes par diffusion passive mais également *via* un processus actif.

En effet, **Moussa et al.** ont montré en **2008** que le récepteur *scavenger receptor B1* (SRB1) était impliqué dans l'absorption du lycopène par les cellules intestinales humaines mais aussi chez la souris. Il est ensuite incorporé dans les chylomicrons qui vont gagner le système lymphatique pour être transportés dans le foie. Le lycopène est ensuite transporté par des lipoprotéines (VLDL) dans le *plasma* pour être redistribué vers les organes utilisateurs et/ou de stockage. Parmi ces organes, les testicules accumulent une grande quantité de lycopène.

Récemment, il a été montré que le tissu adipeux est également parmi les organes qui accumulent une grande quantité de lycopène (**Fig.14**).

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 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 sujets sains de même âge en bonne santé.

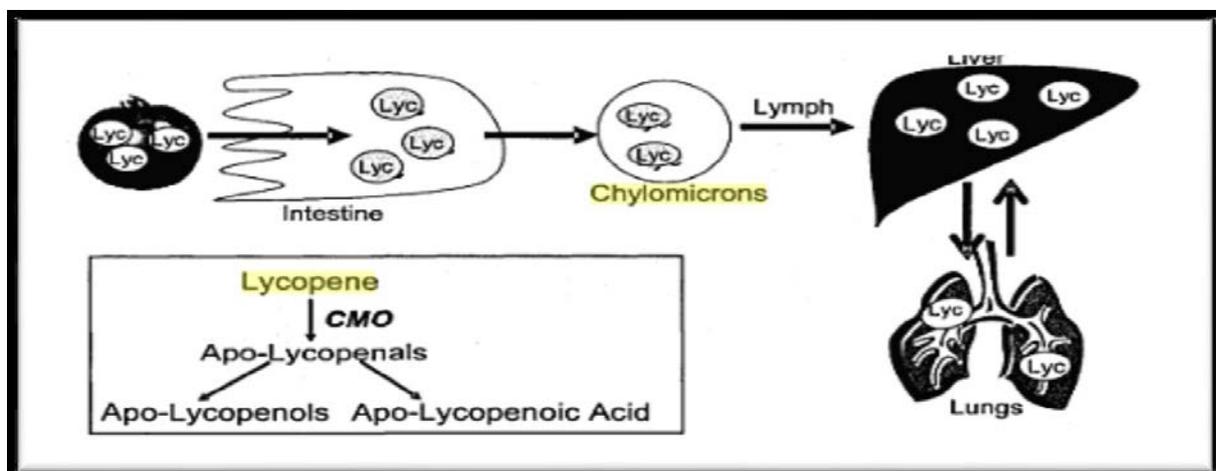


Figure 14 : Schéma représentatif du métabolisme du lycopène (**Supidita, 2008**).

III.7. Concentrations tissulaires en lycopène

Les teneurs en lycopène varient selon les tissus. Le tissu hépatique peut contenir jusqu'à 10 mg/g (soit 18 µmol/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 µg/g (soit environ 2 nmol/g) chez l'homme (Chen et al., 2001).

Tableau 5 : Quantité de lycopène (nmol/g) dans les tissus humains (Agarwal et Rao, 2000).

La concentration moyenne de lycopène de différents tissus chez l'humain et le rat		
Tissus	Humain	Rat
Testicules	4,34 à 21,36	NA
Rate	NA	21,21(2,22)
Glandes surrénales	1,90 à 21,60	NA
Foie	1,28 à 5,72	20,30
Prostate	0,80	0,32(0,06)
Seins	0,78	NA
Pancréas	0,70	NA
Poumon	0,22à0, 57	0,115(0,015)
Cœur	NA	0,08(0,03)
Rein	0,15 à0, 62	NA
Colon	0,31	0,046(0,006)
Peau	0,42	NA
Ovaire	0,30	NA
Estomac	0,20	NA
Cerveau	ND	0,017(0,006)

SD : déviation standard; **NA** : non disponible et **ND** : non détectable.

III.8. Effets du lycopène

Les effets bénéfiques du lycopène ont été rapportés vis-à-vis de plusieurs pathologies, principalement les maladies cardiovasculaires ainsi que sur plusieurs types de cancers, soit par

l'intermédiaire d'études épidémiologiques, soit par l'intermédiaire d'études *in vivo* et/ou *in vitro*.

III.8.1. Maladies cardiovasculaires

Le lycopène est étudié dans le cadre de la prévention des maladies cardiovasculaires. Il existe une relation inverse entre le taux de lycopène plasmatique et la mortalité par maladie cardiovasculaire. Ses apports à doses nutritionnelles et, en conséquences, son statut plasmatique sont un facteur de protection significatif de l'infarctus du myocarde alors que le Béta carotène, dans la même étude, associant 10 pays européens, ne l'est pas (**Rao, 2000**)

III.8.2. Cancer de prostate

Il ressort de nombreuses études épidémiologiques que les apports en lycopène contribueraient à réduire le risque de cancer de la prostate (**Kucuk, 2002**). Plusieurs mécanismes liés au taux circulant de lycopène coopèrent pour réduire la prolifération des cellules épithéliales de la prostate ainsi que les dommages à l'ADN (**Wertz, 2004**). Ceci explique son impact en prévention de l'hyperplasie bénigne de la prostate et son rôle possible dans la prévention du cancer de cet organe.

III.8.3. Effets antioxydants du lycopène

Le lycopène a des effets antioxydants qui réduisent les dommages des lipides, des protéines et de l'ADN. Plusieurs études ont déterminées que le lycopène a un important effet préventif contre les maladies chroniques associées à un stress oxydant (**Paran et al., 2001 et Rao et al., 2006**) et montrent aussi qu'une supplémentation en lycopène diminue l'Hcy et les marqueurs du stress oxydant chez des patients hypertendus.

Plusieurs études expérimentales ont montré que l'administration quotidienne de lycopène à raison de 25mg/kg par jour pendant 14 jours réduit les lésions hépatiques exprimées par la diminution d'ASAT et d'ALAT. Il a été aussi rapporté que la consommation de lycopène diminue les taux de MDA dans le foie chez les rats ischémiques et réduit aussi le taux des cytokines pro-inflammatoires (**Sevtap et al., 2012**).

MATERIEL
ET
METHODES

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

Le modèle animal utilisé dans cette étude est le rat albinos (*Rattus norvegicus*) de souche Wistar et de sexe mâle (**Figure 15**).

↪ **Systématique du rat Wistar :**

- ↪ **Règne :** Animal
- ↪ **Embranchement :** Vertébrés
- ↪ **Classe :** Mammifères
- ↪ **Ordre :** Rongeurs
- ↪ **Genre :** *Rattus*
- ↪ **Espèce :** *Rattus norvegicus*
- ↪ **Souche :** *Wistar*
- ↪ **Nom commun :** Rat blanc (Albinos).
(Berkenhout, 1769).



Figure 15: Rat mâle *Rattus norvegicus* (Photo originale, 2013).

Les rats utilisés dans cette étude sont issus de l'élevage de l'animalerie du centre de recherche et de développement(CRD) -Saïdal d'El-Harrach.

Les animaux sont élevés dans des cages en plastiques transparentes, dans des conditions de température ambiante allant de 20 à 25°C avec une hygrométrie stable (50 ± 10 %) et un éclairage naturel maintenu 12 heures sur 24 heures.

Ils reçoivent un régime alimentaire standard et équilibré sous forme de granules (provenant de l'ONAB : Office Nationale des Aliments de Bétail ; El-Kseur Bejaïa) et de l'eau du robinet ad-libitum. La composition des granulés est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Composition (%) du régime alimentaire des rats (granulés provenant de l'ONAB de Bejaïa) (d'après une fiche technique du CRD-Saïdal).

Composition des granules		
Nutriments	Quantité (%)	
Glucides	49,80	
Protéines	23,50	
➤ Acides aminés :		
Méthionine	0,43	
Lipides	05,00	
Compléments minéraux et vitamines	Calcium	1,1
	Phosphore	0,8
	Cellulose brute	5,5
	Cendres brutes	6,5
	Vitamine A (UL/Kg)	22 000
	Vitamine D3 (UL/Kg)	2 200
	Vitamine E (UL/Kg)	100

I.2. Matériel non biologique

Le produit utilisé dans cette étude est un acide aminé soufré : la **méthionine**, utilisé en domaines pharmacologiques et comme additif pour l'alimentation du bétail . Son nom commercial est **DL-METHIONINE**, commercialisé sous forme d'une poudre en cristal soluble dans l'eau (**Fig.16**).



Figure 16: DL-Méthionine (photo originale, 2013).

Le deuxième produit utilisé est un antioxydant de la famille des caroténoïdes: le **lycopène**, utilisé comme colorant alimentaire pour donner une couleur rouge à certains aliments(*E160*). Son nom commercial est lyc-o-mato, commercialisé sous forme de pastilles liposolubles (10 mg de **lycopène**) (**Fig.17**).



Figure 17: Lycopène (lyc-o-mato 10mg) (**photo originale, 2013**).

II. Méthodes

II.1. Préparation des lots de rats

L'expérience a été conduite sur 30 rats *Wistar* mâles, de poids corporel moyen **247,87g ± 5,45** en début d'expérimentation c'est-à-dire à T0, sélectionnés de façon à constituer des lots de poids homogènes.

Les rats ont été répartis en cinq lots :

- **Lot 1:** Huile d'olive
- **Lot 2:** NaCl
- **Lot 3 :** Méthionine
- **Lot 4 :** Lycopène
- **Lot 5 :** Méthionine + lycopène

Avant l'expérimentation, les rats sont répartis de façon individuelle c'est-à-dire chaque rat dans une cage en plastique équipées d'une litière en sciure et d'un couvercle métallique, et sont soumis à une période d'acclimatation d'une semaine, afin qu'ils s'adaptent au manipulateur et à la manipulation, pour éviter les facteurs de variation des résultats dues au stress de l'animal.

II.2. Procédure d'évaluation de l'expérience

☞ Principe de l'essai

L'hyperhomocystéinémie facteurs de risque des maladies hépatiques, a été induite par une administration *per os* de la méthionine à raison de 500mg/kg/jour, et le lycopène administré par gavage à raison de 5mg/kg/jour, a été utilisé pour atténuer cette maladie, et cela pendant une période de 3 mois (12 semaines).

☞ Expérimentation

La méthionine et le lycopène sont administrées quotidiennement (sept jours sur sept) aux rats.

La solution aqueuse de méthionine est administrée aux rats par voie orale (dans les biberons), par contre la solution de lycopène est administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique, à raison de 1ml/ rat/jour.

- **Le lot1** gavé par 1 ml d'huile olive
- **Le lot2** reçoit de l'eau physiologique par voie orale, dans les biberons (lot témoin).
- **Le lot3** reçoit de la méthionine à raison de 500mg/kg / jour comme solution dans les biberons.
- **Le lot4** est gavé par 1ml de lycopène, solution finale à raison de 5mg/kg/ jour.
- **Le lot5** reçoit de la méthionine à raison de 500mg/kg/jour et en même temps, du lycopène à raison de 05mg/kg/ jour.

Notons que tous les rats ont reçu un régime standard durant la durée l'expérimentation et ont eu un accès libre à l'eau et à la nourriture.

Pendant la période d'administration des substances, les biberons des rats sont observés attentivement afin d'assurer la consommation complète de la dose de méthionine.

Des pesées hebdomadaires sont effectuées afin d'évaluer les variations du poids corporel, ainsi que des prélèvements sanguins sont réalisés mensuellement afin d'effectuer certains dosages biochimiques. Au terme de l'essai, les animaux sont sacrifiés en vue d'un examen histologique du foie.

II.3. Prélèvement sanguin

Les rats des cinq lots sont mis à jeun depuis la veille, et sont anesthésiés avant de pratiquer les prélèvements par le diéthyléther.

Le sinus veineux est ponctionné à l'aide d'une pipette capillaire introduite dans l'angle latéral de l'œil, et par une légère rotation de la pipette, la fragile paroi des vaisseaux est perforée, le sang monte par capillarité et est recueilli dans des tubes (citrates et secs). Le volume collecté est de 1 à 1,5 ml pour chaque tube.

Les prélèvements sanguins sont immédiatement centrifugés à 35000 tours/mn pendant 15mn à 4°C au niveau d'une centrifugeuse réfrigérée, le *plasma* obtenu est récupéré dans des tubes éppendorfs, conservé à -80°C pour le dosage des paramètres biochimiques plasmatiques et transporté dans une glacière au laboratoire d'analyses médicales.

N.B : Pendant toute la période expérimentale ; quatre prélèvements sanguins ont été réalisés chaque mois : T0 (avant traitement), T1 (1^{er} mois), T2 (2^{ème} mois), T3 (3ème mois).

II.4. Analyses biochimiques

Les prélèvements sanguins sont destinés au dosage de quelques paramètres biochimiques, à savoir : Aspartate amino-transférase (ASAT) ; Alanine amino-transférase (ALAT), Homocystéine.

Les dosages ont été effectués avec l'automate « COBAS INTEGRA».

II. 4.1 Les transaminases sériques ou amino transférases

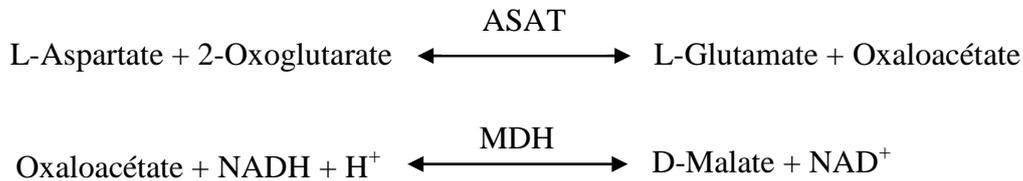
Le dosage des transaminases présente un intérêt clinique dans le diagnostic des atteintes hépatiques.

Deux enzymes présentent un intérêt particulier : ASAT ou TGO et ALAT ou GPT.

Elles catalysent l'inter conversion d'un groupement aminé à partir d'un acide aminé donneur vers un acide α -cétoglutarique accepteur.

II.4.1.1. Dosage de l'Aspartate Amino-Transférase (ASAT)

Principe : La détermination de l'activité de l'Aspartate Amino-Transférase est réalisée par la méthode cinétique (**Bergmeyer et Gagern, 1978**), selon les réactions suivantes:

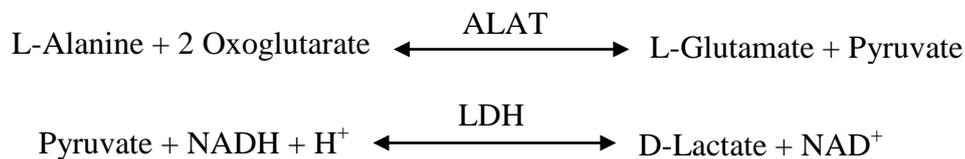


MDH : Malate déshydrogénase

La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺, mesurée pendant un temps donné à 340 nm, est proportionnelle à la concentration en ASAT dans le spécimen.

II.4.1.2. Dosage de l'Alanine Amino-Transférase (ALAT)

Principe : l'activité de l'Alanine Amino-Transférase est déterminée par la méthode cinétique (**Bergmeyer et Gawehn, 1978**), selon les réactions suivantes:



LDH : Lactate déshydrogénase

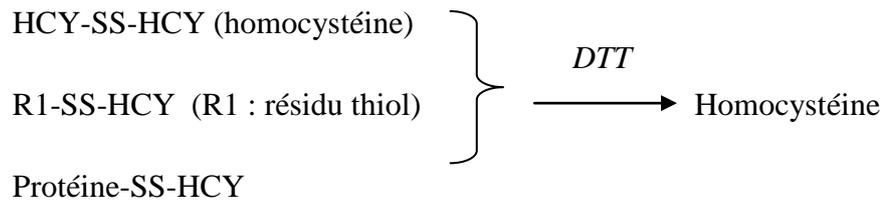
La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺, mesurée pendant un temps donné à 340 nm, est proportionnelle à la concentration en ALAT dans le spécimen.

II.4.2. Dosage de l'homocystéine

L'homocystéine totale est dosée par la méthode de fluorescence polarisation immunoassay (FPIA), méthode quantitative automatisée sur analyseur AXSYM.

Principe : L'homocystéine (Hcy), ses formes disulfures ainsi que les formes mixtes (protéine-Hcy) présentes dans l'échantillon sont réduites en homocystéine libre sous l'action du

Dithiothréitol(DTT).



L'homocystéine totale libre est convertie en S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) par la S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase (SAHase) en présence de d'adénosine.

La SAH et le traceur marqué de fluorescéine concurrencent pour les sites sur la molécule monoclonale d'anticorps. L'intensité de la lumière fluorescente polarisée est mesurée par la FPIA optique.



II.5. Sacrifice des animaux et prélèvement d'organe

A la fin de la période de traitement (3mois), tous les animaux ont été maintenus à jeun depuis la veille en vue de leur sacrifice au lendemain.

Les rats ont été sacrifiés par le diéthyéther rapidement.

Après dissection, le foie est immédiatement prélevé, débarrassés soigneusement de leurs tissus adipeux et coupées en petits fragments.

Sans avoir tardé, ces fragments ont été mis dans des piluliers contenant un liquide fixateur : le formol à 10%, en vue d'une étude histologique.

II.6. Etude histologique

Les fragments de foie prélevés ont été soumis aux techniques histologiques courantes (Martoja et Martoja-Pierson, 1967).

↳ **Fixation**

Les organes ont été fixés dans le formol dilué à 10% et dans pendant trois jours. Cette fixation est indispensable, elle permet de préserver les structures tissulaires dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

↳ **Déshydratation**

Les fragments de foie fixées sont placées dans des cassettes qui sont numérotées par rapport aux rats, rincées dans l'eau courante pendant deux jours (48 heures), afin d'éliminer l'excès de fixateur et prolongées successivement dans un automate pour la déshydratation.

Celle-ci se fait successivement dans des bains d'alcool de concentrations croissantes et d'une durée d'une heure et 30 minutes dans chaque bain:

- 2bains d'alcool 70°
- 2bains d'alcool 90°
- 2bains d'alcool 100°

↳ **Eclaircissement**

Après la déshydrations, l'éclaircissement des pièces se fait par passage dans un solvant intermédiaire : le xylène à raison de 4 bains de 30 mn chacun.

↳ **Imprégnation à la paraffine**

Constitue l'étape finale de la circulation. La paraffine doit être au préalable chauffée à 56°C pour se liquéfier puis, faire séjourner les cassettes d'organes successivement dans deux bains de paraffine fondue maintenue à 56°C pendant deux heures chacun. Cette opération permet l'élimination du xylène et l'imprégnation des tissus par la paraffine.

↳ **Inclusion (enrobage) et confection des blocs**

On procède à l'inclusion des tissus dans la paraffine, qui va donner la résistance mécanique nécessaire à la réalisation des coupes au microtome. La confection des blocs se fait par l'écoulement de la paraffine fondue dans des moules métalliques, puis les fragments sont orientés dans cette paraffine, les cassettes sont placées là-dessus et vont servir de supports

pour le microtome, et on rajoute la paraffine à travers les grilles des cassettes jusqu'au remplissage.

Les blocs ne sont démoulés qu'après refroidissement total.

Après refroidissement de 15 à 20 minutes et on obtient un bloc de forme d'une forme selon le moule utilisé.

↳ Confection des coupes

Les blocs obtenus sont coupés à laide d'un microtome (type *Leica*) permettant de réaliser des coupes de 5 μm d'épaisseur. Les rubans des coupes sont étalés sur la surface d'un bain marie d'eau distillée de 42°, puis récupérés et collés sur des lames qui possèdent de la gélatine à la surface.

↳ Préparation des lames pour la coloration

Les lames sont séchées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

Avant d'être colorées, les coupes sont d'abord soumises au déparaffinage qui sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent y pénétrer, ceci se fait par passage dans le xylène pendant 30 minutes.

Les lames sont ensuite hydratées par trois bains successifs d'alcool éthylique à titrage décroissant 100°, 90°et 70° (3 mn/bain).

Rinçage à l'eau distillée pendant 01 minute.

↳ Coloration de trichrome de Masson

Le but de la coloration est d'établir le contraste naturel des coupes et de rendre les différents constituants cellulaires bien clairs.

Nous avons procédé à la coloration de trichrome de Masson, cette coloration met en évidence les fibres de collagènes dont leur dépôts causes une des altérations majeure de la matrice extracellulaire, causant ainsi l'installation d'un état d'hyperhomocystéïnémie, elle consiste à colorer :

- noyaux, chromatine et nucléole: en bleu foncé à noir (Hématoxyline de Groat).
- cytoplasme: en rouge (Fuschine-ponceau et orangé G).
- collagène: en bleu (Bleu d'aniline)

☞ **Etapes de coloration**

- Hématoxyline pendant 2minutes.
- rinçage à l'eau courante pendant 5minutes.
- Fuchsine Ponceau pendant 30 secondes.
- rinçage pour quelque secondes pour éliminer l'excès .
- acide phosphomolipdique à 10 % pendant 15 minutes.
- bleu d'aniline pendant 30 à 40 minutes.
- rinçage à l'eau acétifiée (eau distillée +acide acétique 1%).
- déshydratation par l'alcool 100° pendant 5 secondes.

☞ **Montage et lecture**

Le montage est la dernière étape de la préparation des lames pour la lecture en microscopie. Il s'agit de recouvrir l'étalement avec une lamelle en utilisant un milieu de montage idéal l'*EUKITT* (résine synthétique ayant l'avantage de sécher rapidement à l'air). Il a pour but la protection des coupes contre la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent facilement à l'air ; et l'obtention d'un degré de transparence et d'un indice de réfraction élevé.

Après le montage, les lames sont séchées sur papier absorbant et nettoyées au xylène.

Elles sont alors prêtes à l'observation microscopique.

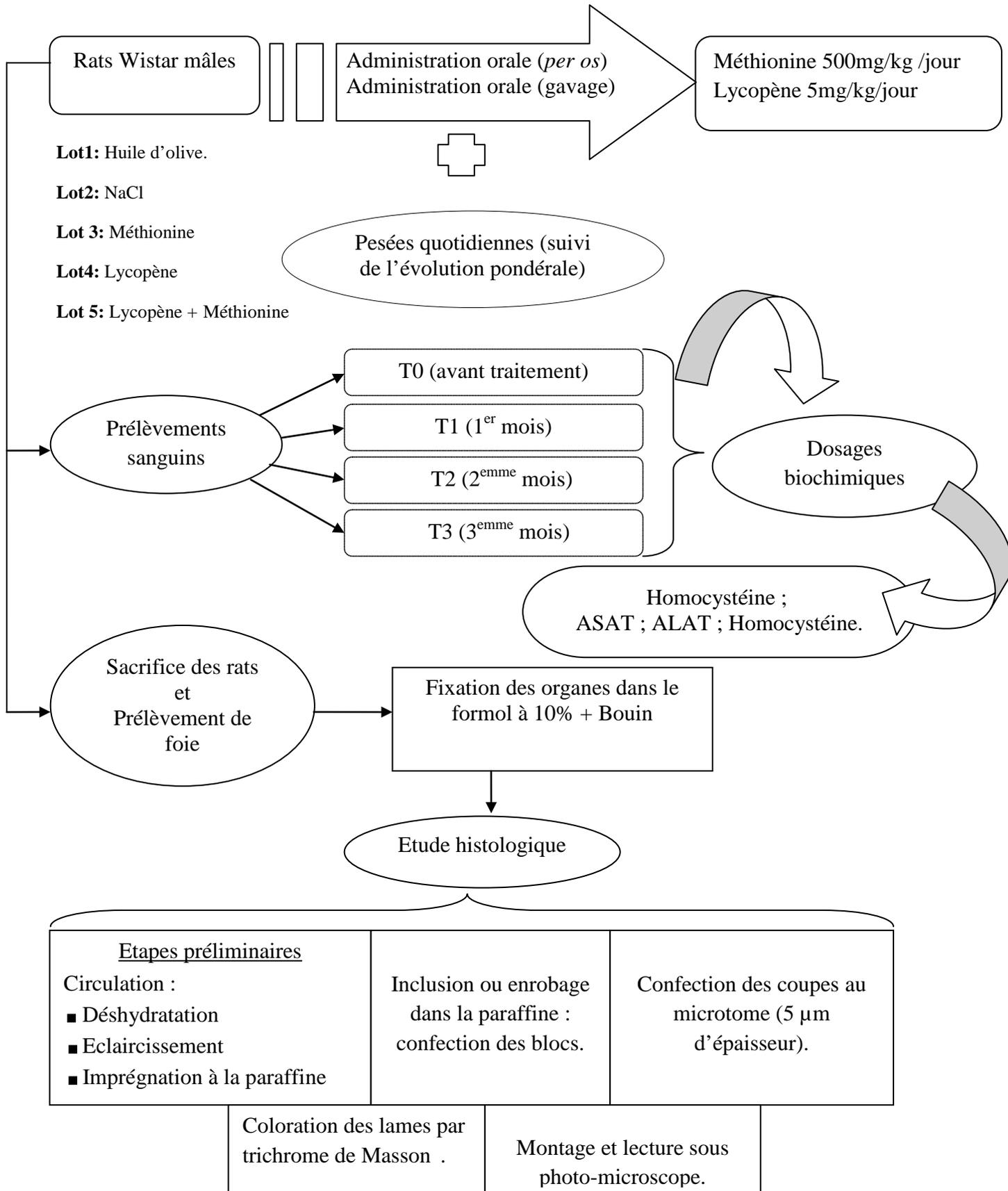
La lecture a été réalisée sous photo-microscope de type « *Leica DME* » doté d'un appareil photo, à différents grossissements.

II.7. Etude statistique

Les résultats biochimiques (ASAT, ALAT, Homocystéine) sont exprimés par la moyenne affectée de son écart type.

La comparaison des moyennes est réalisée par le test de Student (utilisation d'Excel 2007). * $p < 0.05$ (peu significative) ; ** $p < 0.01$ (signifiative); *** $p < 0.001$ (très signifiative) ; **** $p < 0.0001$ (hautement signifiative).

L'expérimentation réalisée est résumée dans le diagramme suivant :



RESULTATS

II. RESULTATS

1. Poids des animaux

Les pesées hebdomadaires effectuées pendant 3 mois ont permis le suivi du poids des rats témoins (Te) Lot 1, et ceux qui sont soumis à une administration *per os* de méthionine (Met) à raison de 500 mg/kg/jour, (Lot 3 et 5), ainsi que ceux, prétraités au lycopène 5mg/kg/jour, (lot 4 et 5).

Tableau 7 : Évolution pondérale (g) des rats des différents lots.

Lots	Temps (mois)			
	T0	T1	T2	T3
Lot 1 (H.O)	241,1 ± 2,85	242,1 ± 10,25	250,22 ± 9,96	307,17 ± 2,98**
Lot 2 (Te)	245,83 ± 6,72	243,18 ± 15,64	271,08 ± 16,06**	310,5 ± 14,05
Lo 3 (Met)	253,67 ± 11,79	250,63 ± 35,95	275,18 ± 16,02	307,23 ± 16,18*
Lot 4 (Lyc)	253,31 ± 11,79	245,3 ± 2,28	252,96 ± 5,24*	285,85 ± 18,11
Lot 5 (Met-Lyc)	245,47 ± 2,36	237,71 ± 6,38	256,74 ± 5,38	288,6 ± 12,26 ***

Ces valeurs correspondent aux moyennes du poids affectées de l'écart type.

T1, T2, T3 vs. T0 pour chaque Lot : * p<0.05 ; ** P<0.01 ; *** P<0.001 ;

**** P<0.0001.

Lot 3, Lot 4, Lot 5 vs. Lot (Te) * P<0.05.

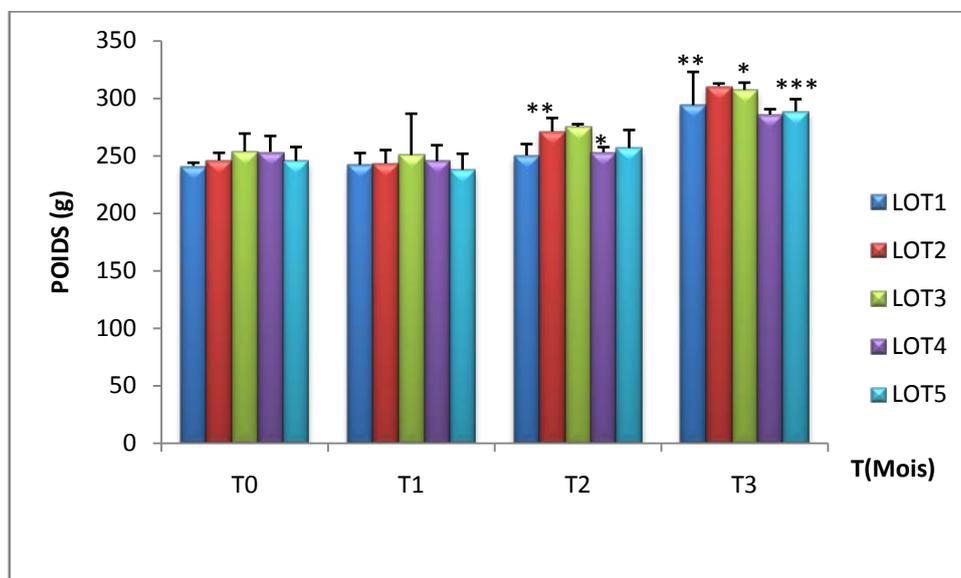


Figure 18: Evolution pondérale (g) des rats .

Les résultats consignés dans le tableau 7 et figure 18, montrent une augmentation du poids corporel chez les rats de tous les lots.

Cette augmentation est de 17% et 14% chez les animaux soumis à la méthionine (lot 3 et 5) respectivement. Par contre les témoins ont enregistré un pourcentage plus important, de l'ordre de 20 %, ce gain de poids à T3 par rapport à T0.

2. Evolution des paramètres biochimiques

2.1. Transaminases sériques

2.1.1. ASAT plasmatique

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 8 et la figure 19.

Tableau 8 : Évolution de l'ASAT plasmatique (UI) des rats des différents lots.

Lots	Temps (mois)			
	T0	T1	T2	T3
Lot 1 (H.O)	172,16 ± 17,42	168,35 ± 11,27	130,71 ± 13,25	176,83 ± 19,25
Lot 2 (Te)	180,17 ± 21,56	173 ± 23,29	132,17 ± 35,53	177 ± 28,47
Lo 3 (Met)	183 ± 8,94	188,5 ± 31,11	211,08 ± 19,35***	258 ± 31,95***
Lot 4 (Lyc)	180 ± 6,83	174 ± 34,66	182,25 ± 22,63	177,8 ± 11,50
Lot 5 (Met-Lyc)	181,2 ± 8,38	192,71 ± 42,41	189,36 ± 26,69	177,4 ± 52,81§§

Ces valeurs correspondent aux moyennes du poids affectées de l'écart type.

Lot3, 4 et 5 vs. Lot (Te) : ***P< 0,001.

Lot 3 (T1, T2, T3) vs. Lot 5 (T1, T2, T3) ; §§ P<0,01

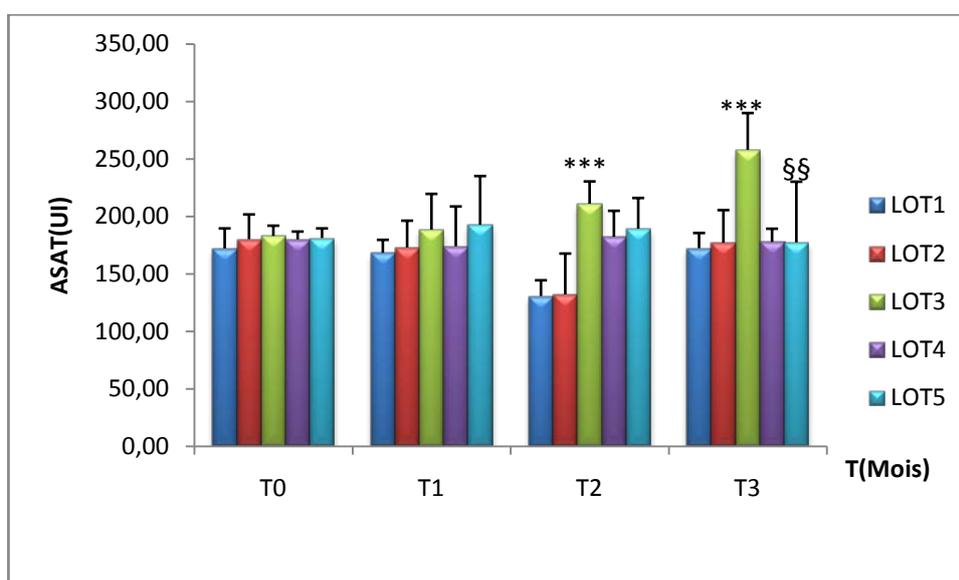


Figure 19 : Évolution de l'ASAT plasmatique (UI).

A la lumière de ces résultats, il apparaît qu'au 1er mois de l'expérimentation, nous remarquons une augmentation très significative ($p < 0,001$) et constante de cette enzyme sérique chez les rats du lot 3. A la fin de l'expérimentation cette augmentation atteint 29% (Tab. 9, Fig. 19). Les rats du lot 5 ont subi une augmentation significative ($p < 0,01$) à T1, mais à la fin d'expérimentation le taux d'ASAT a significativement diminué ($p < 0,0001$) d'un pourcentage de 2% correspondant à une valeur de ($181,2 \pm 8,38$ à T0 et $177,4 \pm 52,81$) à T3.

2.1.2 ALAT plasmatique

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 9 et la figure 20.

Tableau 9: Évolution de l'ALAT plasmatique (UI) des rats des différents lots.

Lots	Temps (mois)			
	T0	T1	T2	T3
Lot 1 (H.O)	43,16 ± 1,76	59,13 ± 21,84	50,94 ± 14,23	47,3 ± 22,33
Lot 2 (Te)	62,83 ± 2,57	62,33 ± 7,88	62,4 ± 15,02	63,13 ± 10,5
Lo 3 (Met)	66,17 ± 4,48	68,5 ± 7,79	71 ± 3,03*	79,83 ± 14,15§§§
Lot 4 (Lyc)	63,10 ± 4,85	54 ± 7,55	45,63 ± 15,22	38,33 ± 5,39**
Lot 5 (Met-Lyc)	64,10 ± 9,29	75,4 ± 12,02	68,5 ± 11,29	51,1 ± 4,79§§§

Les valeurs représentent la moyenne affectée de son écart-type

Lot 3, 4 et 5 vs. Lot 2 * P < 0, 05; ** P < 0, 01

La comparaison est faite entre les rats du lot 3 et les rats du lot 5 ; §§§ P < 0,001.

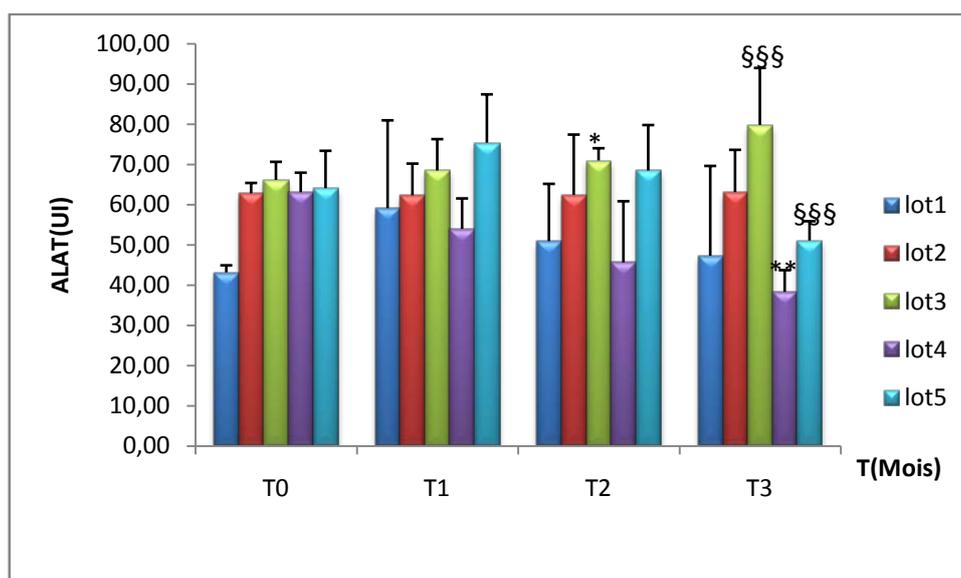


Figure 20: Évolution de l'ALAT plasmatique (UI).

Nous avons observé une augmentation progressive de l'activité de l'ALAT plasmatique sous l'effet de l'administration de la Met , mais qui reste peu significative jusqu'à la fin du traitement chez les rats du lot 3 (**tab.10, fig.20**) avec un gain de 17% contrairement au lot 5 ou on a une diminution de 25% a partir de T2 le taux de l'ALAT chez les rats de lot5 a diminué légèrement jusqu'à la fin de traitement (résultat peu significatif) mais reste très significatif en comparant avec le lot 3.

2.2. Homocystéinémie

L'homocystéinémie exprimée en $\mu\text{mol/L}$ a été évaluée chaque mois (**Tab. 10 ; Fig. 21**) pour les rats des lots 1, 2, 3, 4 et 5.

Tableau 10: Evolution de l'homocystéinémie ($\mu\text{mol/L}$) des rats des différents lots.

Lots	Temps (mois)			
	T0	T1	T2	T3
Lot 1 (H.O)	5,28 \pm 0,56	5,70 \pm 0,42	5,87 \pm 0,36	6,13 \pm 0,66
Lot 2 (Te)	5,48 \pm 0,09	5,61 \pm 0,25	5,91 \pm 0,25	6,69 \pm 0,91
Lo 3 (Met)	5,67 \pm 0,3	6,46 \pm 0,84	11,53 \pm 1,02 §§	13,82 \pm 1,14
Lot 4 (Lyc)	5,79 \pm 0,48	6,01 \pm 0,40	6,59 \pm 0,93****	7,38 \pm 1,06
Lot 5 (Met-Lyc)	5,7 \pm 0,31	8,26 \pm 0,58	9,12 \pm 0,8	9,7 \pm 0,8§

Les valeurs représentent la moyenne affectée de son écart-type.

Lot 3,4 et 5 vs Témoin ** P< 0.01 ; ****p<0,0001

Lot 3 (T1, T2, T3) vs lot 5(T1 T2, T3) ; § <0,05 ; §§ p<0,001

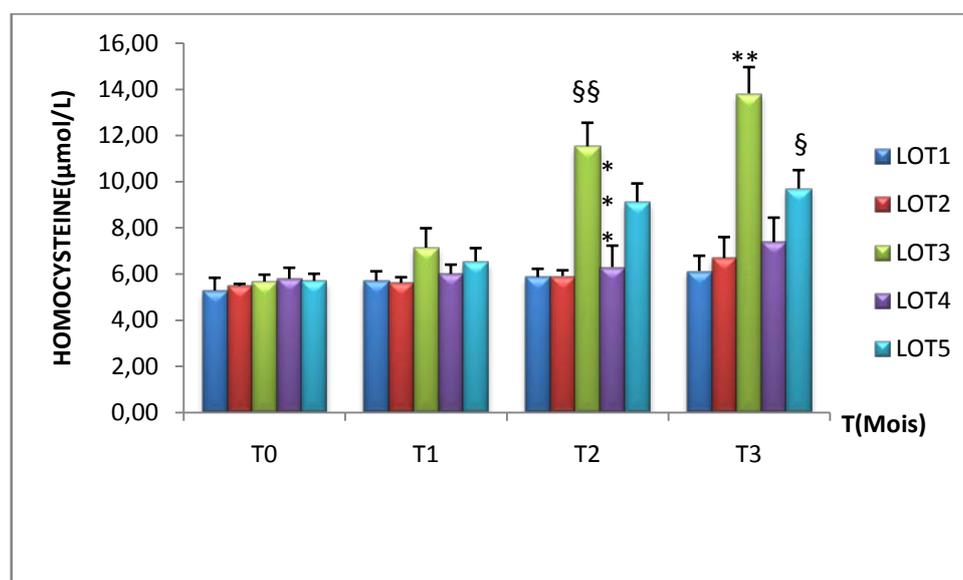


Figure 21: Évolution de l'homocystéinémie ($\mu\text{mol/L}$) des rats.

Les valeurs obtenues montrent que l'administration de la méthionine engendre une augmentation de l'homocystéinémie, résultat attendu par notre expérimentation.

Au temps T1, nous avons observé une augmentation peu significative ($P < 0,05$) chez les rats du lot 3 et 5. Il en est de même pour le temps T2 ($p < 0,0001$ pour les lots 3 et 4 vs. Te).

En fin d'expérimentation, à savoir 3 mois, la plus importante augmentation est notée chez les animaux du lot 3 avec un gain de 58%. Nous notons par contre une diminution significative de 41% ($p < 0,0001$ vs. lot2) chez les animaux du lot 5, mettant en évidence l'effet préventif du lycopène sur l'hyperhomocystéinémie.

3. Etude histologique du foie

Planche I

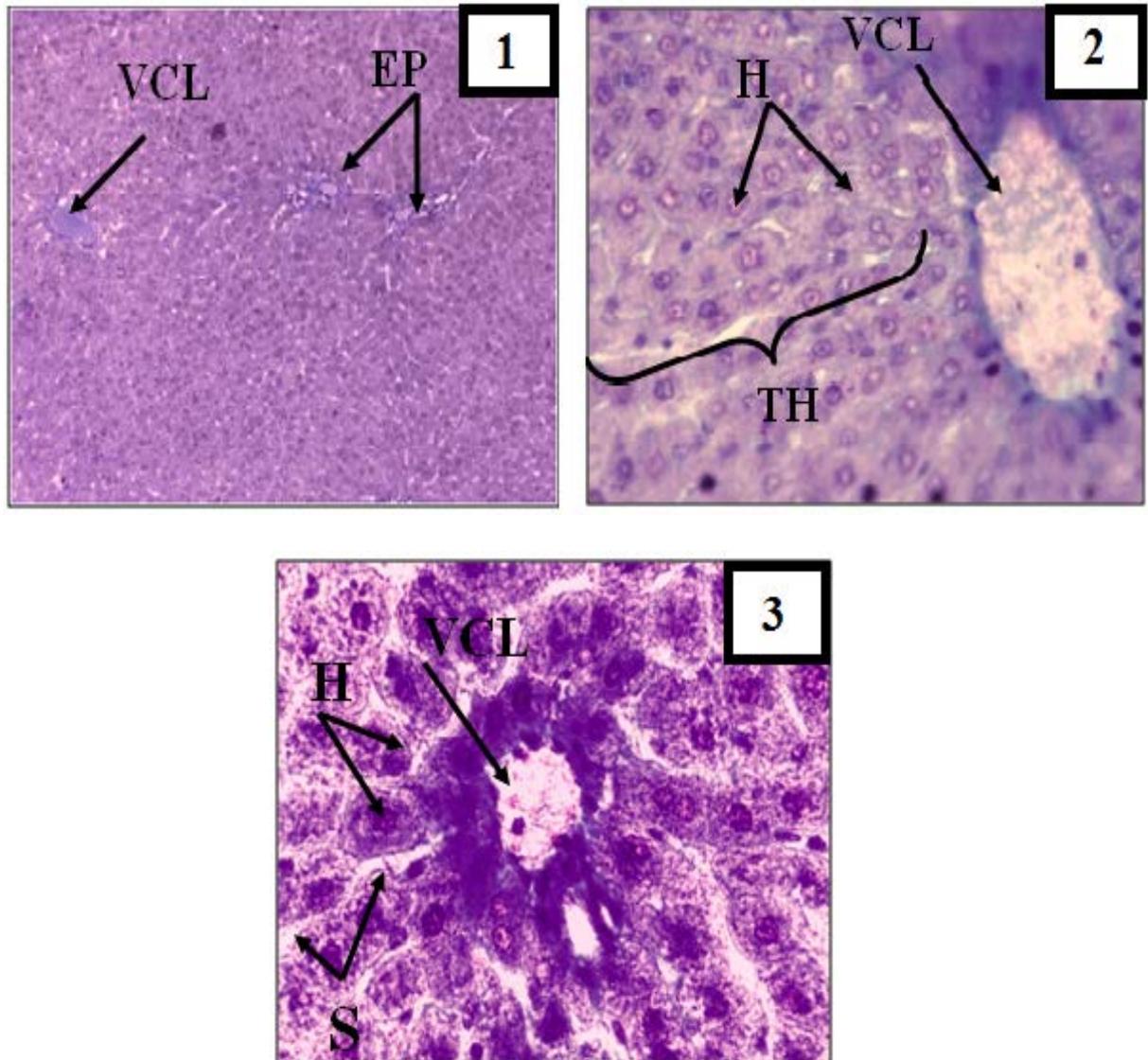


Figure 22(1 ; 2 ; 3) : Structure du parenchyme hépatique des rats reçoivent d'huile d'olive, coloré par trichrome de Masson (**photos originales, 2013**).
Structure du parenchyme hépatique des rats ayant reçu de l'huile d'olive (LH), Gx 10 coloration trichrome de Masson.

Planche I

Coupes histologiques du foie de rats *Wistar* ayant rats ayant reçu de l'huile d'olive.

(1 ml) pendant 3 mois.

Coloration: Trichrome de Masson.

➤ **Fig. 1** Gx 10 ; **fig. 2** Gx40

➤ **Fig. 3** Gx100

Ces figures montrent l'aspect histologique du parenchyme hépatique normal, des rats reçoivent d'huile d'olive, vu avec des différents grossissements.

VCL : veine centre lobulaire

EP: espace porte

S: capillaire sinusoidal

H: hépatocytes

TH : travées hépatocytaires

Planche II

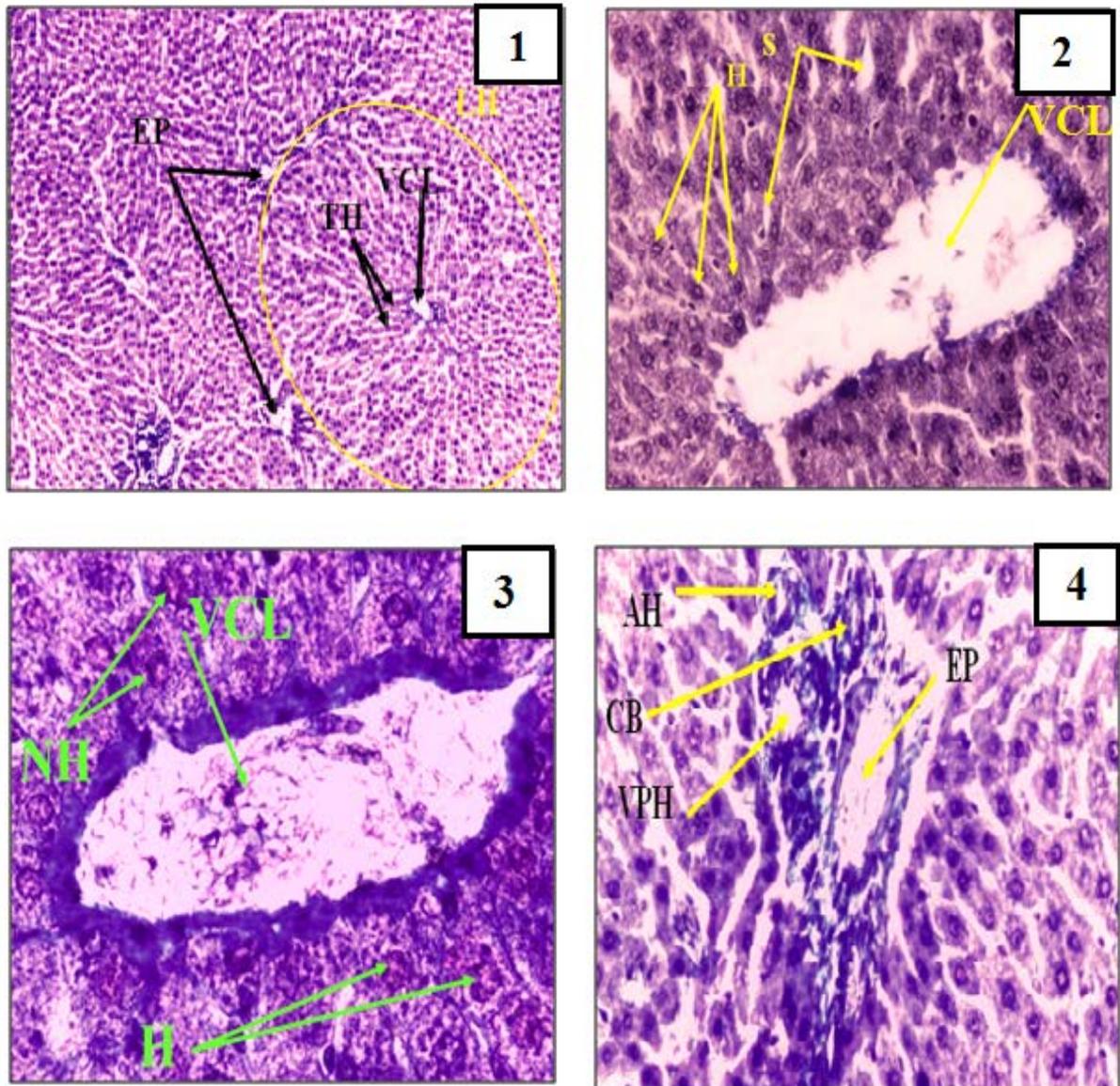


Figure 23(1 ; 2 ; 3 ; 4) : Structure du parenchyme hépatique des rats ayant reçu de l'eau physiologique (Lot Te.), pendant 3 mois
Coloration trichrome de Masson.

Planche II

Coupes histologiques du foie des rats *Wistar* (Témoins), ayant reçu de l'eau physiologique pendant 3 mois.

Coloration: Trichrome de Masson.

- **Fig. 1** Gx 10 ; **fig. 2** Gx40
- **Fig. 3** Gx100; **fig. 4** Gx40

Ces figures montrent l'aspect histologique d'un parenchyme hépatique des rats témoins avec des différents grossissements, semble normal.

VCL : veine centre lobulaire

EP: espace porte

LH : lobule hépatique

S: capillaire sinusoidal

H: hépatocytes

NH : noyaux des hépatocytes

AH : artère hépatique

CB : canal biliaire

TH : travées hépatocytaires

VPH : veine porte hépatique

Planche III

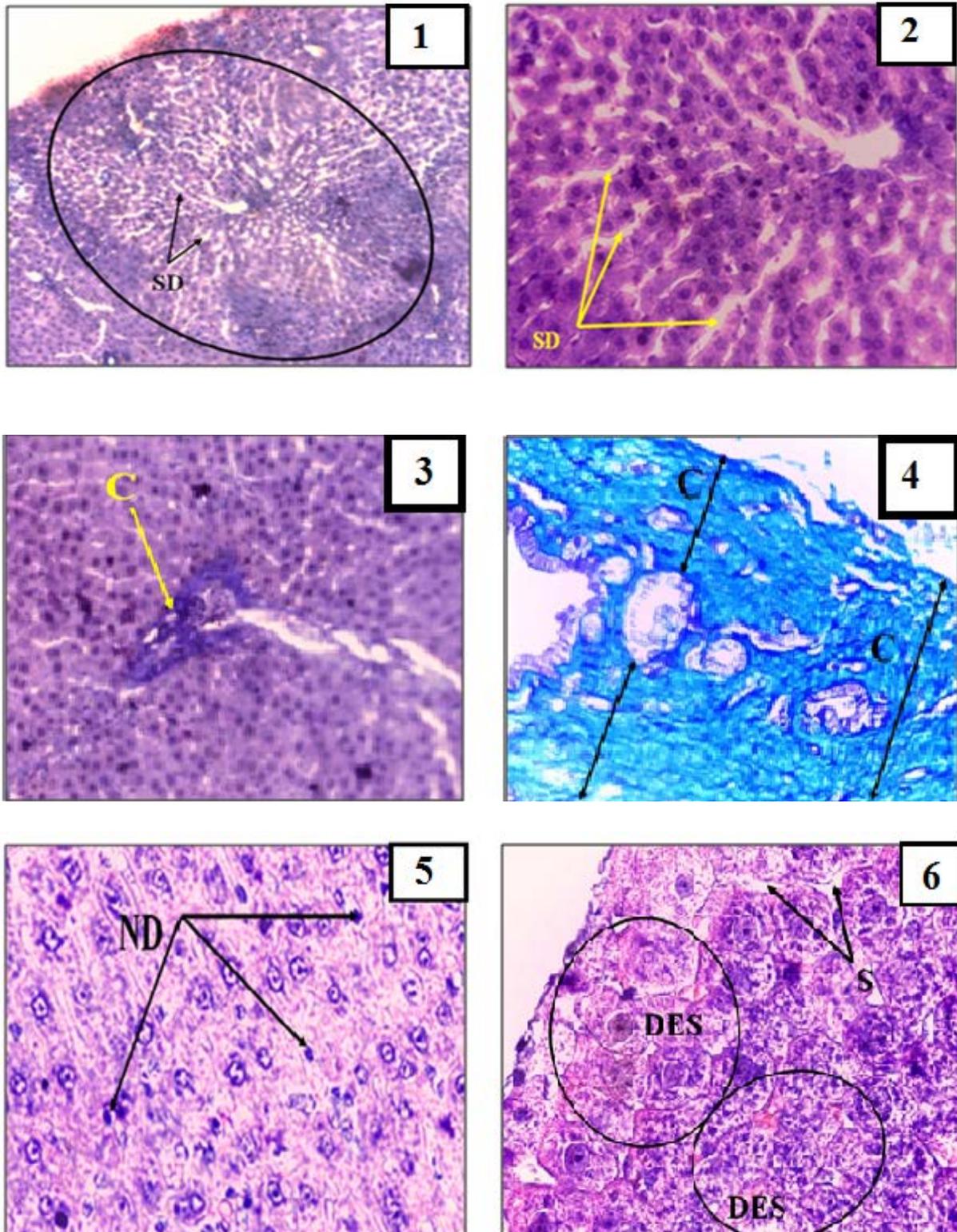


Figure 24(1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6) : Structure du parenchyme hépatique des ayant reçu de la méthionine (Lot Met.), pendant 3 mois, coloré par e trichrome de Masson (Photos originales, 2013).

Planche III

Coupes histologiques du foie des rats *Wistar* du (lot Met) ayant reçu de la méthionine (500mg /kg / jour) pendant 3 mois.

Coloration: Trichrome de Masson.

- **Fig. 1** Gx 10; **fig. 2** Gx40
- **Fig. 3** Gx10, **fig. 4** Gx40
- **Fig. 5** Gx100, **fig. 6** Gx100

Ces figures montrent une vasodilatation des capillaires sinusoidaux (**Fig. 1 ; 2**), ainsi que des dépôts de collagènes autour des espaces portes (**Fig. 3 ; 4**). Elles montrent aussi l'apparition de quelques noyaux denses (**Fig. 5**). La dernière figure montre une désorganisation structurale (**Fig. 6**).

SD : capillaire sinusoidal dilaté

C: collagène

ND: noyau dense

DES : désorganisation structurale

Planche IV

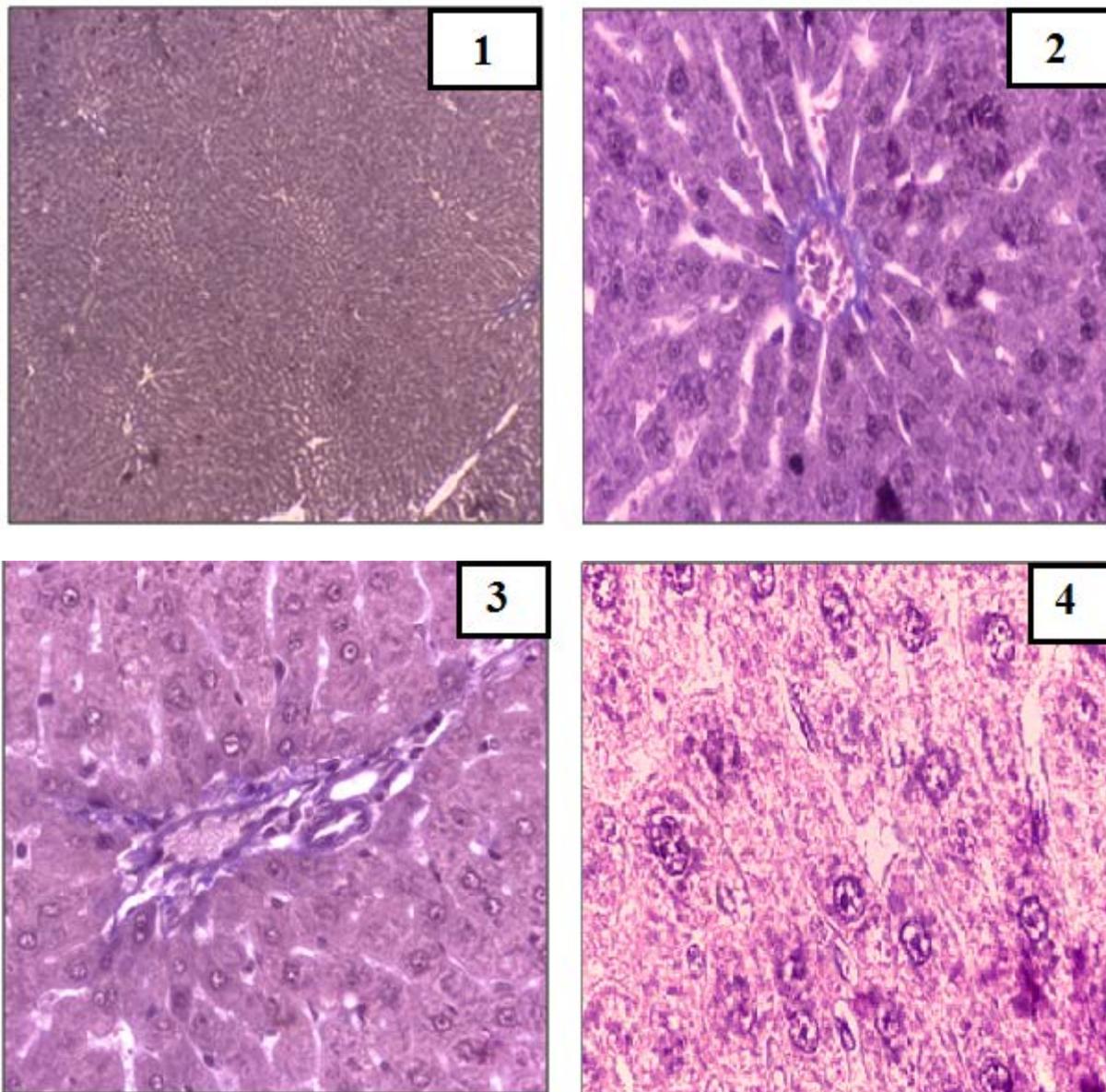


Figure 25 (1 ; 2 ; 3 ; 4) : Structure du parenchyme hépatique des rats ayant reçu de lycopène seul (Lot Lyc.), pendant 3 mois, coloré par e trichrome de Masson
(Photos originales, 2013).

Planche IV

Coupes histologiques du foie des rats *Wistar* rats ayant de lycopène (5mg /kg / jour) dans une solution de l'huile d'olive pendant 3 mois (Lot Lyc. seul).

Coloration: Trichrome de Masson.

- **Fig. 1** Gx10; **fig. 2** Gx40
- **Fig. 3** Gx 40, **fig. 4** Gx100

Ces micrographies nous montrent une structure similaire à celle observée chez les rats témoins, la structure du parenchyme hépatique est normale (veines centre lobulaires, espaces portes, sinusoides, travées hépatiques normaux).

Planche V

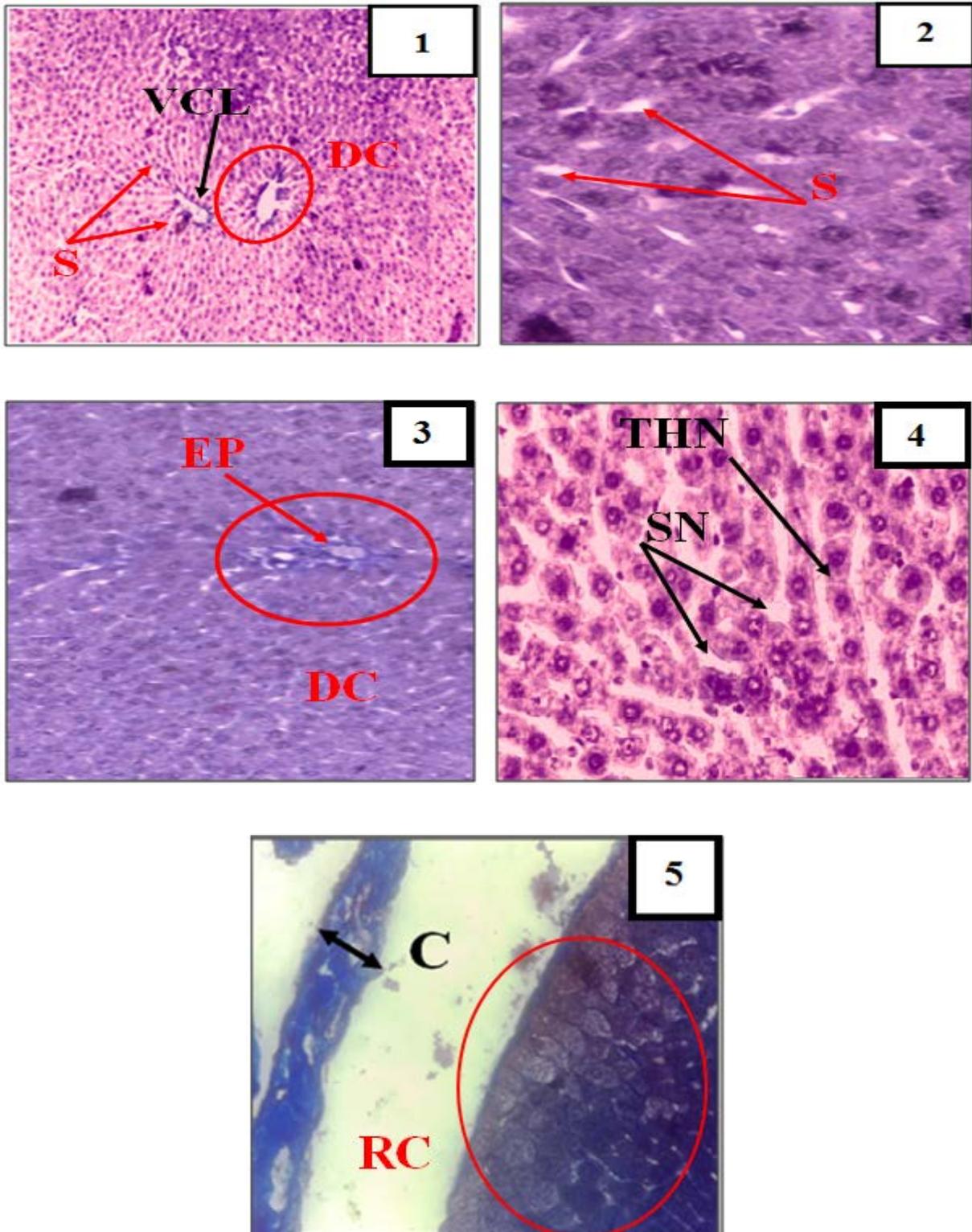


Figure 26 (1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5) : Structure du parenchyme hépatique des rats ayant reçu de la méthionine avec du lycopène (Lot Met. + Lyc.) , pendant 3 mois, coloré par e trichrome de Masson. **(Photos originales, 2013).**

Planche V

Coupes histologiques du foie des rats *Wistar* ayant reçu de la méthionine et de lycopène pendant 3 mois (Lot méthionine + lycopène).

Coloration: Trichrome de Masson.

- **Fig. 1** Gx10; **fig. 2** Gx40
- **Fig. 3** Gx 40, **fig. 4** Gx40
- **Fig.5** Gx40

Ces figures montrent une diminution des dilatation des capillaires sinusoides (**Fig. 1 ; 2**), et une diminution du collagène autour des espaces portes (**Fig. 3 ;5**), aussi une organisation tissulaire normale des travées hépatocytaires avec ses noyaux (absence des noyaux denses et pycnotiques) (**Fig. 4 ;5**). Le tissu hépatique est entrain de récupérer sa structure normale (régénération ou remodelage du parenchyme)

DC : diminution de collagène autour de la V.C.L.

SN : sinusoides normales

EP : espace porte

THN : travée hépatique normale

RC : réorganisation cellulaire

DISCUSSION

III. Discussion

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une hyperhomocystéinémie expérimentale et à l'effet du lycopène sur cette dernière, en analysant certains paramètres plasmatiques, ainsi qu'une étude histologique du parenchyme hépatique. Pour ce faire, une hyperhomocystéinémie a été induite chez des rats *Wistar*, par une administration *per os* de la méthionine à raison de 500mg/kg/jour et pour ce qui est du lycopène nous avons utilisé une dose de 5mg /kg/jour administrée par gavage.

Une hyperhomocystéinémie peut se produire par :

- ✓ Une altération du métabolisme de l'homocystéine due à une carence vitaminique : déficit en vitamine B12 (**Lentz et al., 1997 ; Wright et al., 2004 ; Hickie et al., 2005**), en vitamine B6 (**Martinez et al., 2000**) ou en acide folique (**Durand et al., 1996 ; Huang et al., 2001 ; Wang et al., 2005**)
- ✓ Une supplémentation par l'homocystéine (**Miller et al., 2000 ; Doshi et al., 2005 ; Akasaka et al., 2005**)
- ✓ Une supplémentation à l'aide de la D-L méthionine (**Yagisawa et al., 2004**) , (utilisée dans notre expérience)

Dans un précédent travail (**Raaf, 2003**), trois formes d'administration de la méthionine ont été testées à savoir par gavage, par injection ou par l'incorporation dans le régime alimentaire. Des autres études ont administrées la méthionine par voie orale *per os*, mélangée avec une boisson (**Smolders et al., 2004**), et même par les membres de l'équipe de laboratoire biochimie et remodelage de la Matrice extracellulaire USTHB (**Othmani, 2007 ; Taghliit, 2010 ; Ghoul, 2009 ; Hamdis, 2011**), pour notre part, nous avons opté pour une administration de méthionine, cette dernière voie (voie orale *per os*).

Au terme de l'expérimentation, nous avons noté une augmentation ou un gain important du poids corporel.

Cette augmentation est de 20 % chez les rats témoins (lot 2) par rapport à celui enregistré chez les rats des autres lots soumis à une surcharge de méthionine à savoir, le lot 3 et le lot 5 qui est de 17% et 14% respectivement.

Un résultat similaire a été rapporté par **Othmani (2007)** sur des lapines non-gestantes.

Des expérimentations réalisées sur des rats des sables *Psammomys obesus* par **Zhou et al. (2001)**, **Toren et al (2003)**, **Zerrouk (2007)** ont noté une diminution du poids corporel.

Par contre, certains auteurs dont **Rolland et al. (1995)** ; **Raaf (2003)** et **Hidiroglou et al. (2004)** ont noté que l'ingestion d'un excès de méthionine n'a pas d'effet sur l'évolution pondérale.

La méthionine est considérée comme étant un acide aminé indispensable aux rats en croissance (**Adamson et Fisher, 1971**). En effets, un régime, contenant moins de 0,45% d'acides aminés soufrés, supplémenté en DL-méthionine améliore fortement la performance de la croissance des rats. De plus, l'addition de la méthionine améliore très sensiblement la vitesse de croissance des rats de 26% entre 5 et 7 semaines (**Prudhon et al., 1977**)

Le plus faible gain de poids a été enregistré chez les rats du lot 4, rats ayant reçu quotidiennement une dose de lycopène à raison de 5mg/kg/jour. Le même résultat a été trouvé par **Sevtap et al. (2012)** , ou il a enregistré une évolution non significative du poids corporel des rats a des différentes dose de lycopéne.

Par ailleurs, nous avons noté une augmentation du taux d'ASAT plasmatique chez les rats du lot 3 qui ont reçu de la méthionine seule. Ce qui confirme les résultats obtenus par **Augier et al. (1997)**, **Ungvari et al. (1999)**, et **Gong et al. (2008)**. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de **Babcok (1968)** qui a noté une diminution d'activité de l'ASAT chez les rats présentant une déficience en vitamine B6. Par contre **Song et al. (2009)** et **Khelil et al. (2010)** rapportent que l'activité de l'ASAT n'est pas altérée par l'hyperhomocystéinémie.

Une élévation de l'ASAT indiquant habituellement l'existence de lésions fibreuses (**Ipekci, 2003**).

Dans notre étude nous avons observé une augmentation chez les rat du lot 5 et qui ont reçu de la méthionine et prétraité par le lycopène, cette augmentation est décelable à T1 mais à T2 et T3, nous avons enregistré une diminution significative ($p < 0.01$) de l'activité de cette enzyme sérique.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de (**Yefsah, 2007**) et **Bahcecioglu et al. (2010)** qui ont enregistré une diminution de l'activité sérique des ASAT chez les rats du groupe lycopène à une dose de 5 et 2mg/kg de poids corporel. **Jamshidzadeh et al. (2008)** a suggéré que le lycopène pourrait être efficace contre les dommages du stress oxydatifs induit

par des produits chimiques ou des drogues. Selon **Kim (1995)** la supplémentation par le lycopène supprime la peroxydation lipidique au niveau des hépatocytes intoxiquées. 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. La supplémentation par le lycopène par voie orale pendant 4 semaines augmente le niveau de SOD, GSH-Px et diminue le niveau de MDA (Malondialdéhyde). De ce fait, il conclue que le lycopène peut diminuer la peroxydation lipidique.

Les transaminases ALAT analysées présentent une augmentation en relation avec la dose de méthionine administrée. En effet, elles augmentent d'une manière significative chez tous les rats du lot 3, ce qui rejoint les résultats obtenus par **Gong et al. (2008)**. De plus, plusieurs travaux, chez les rats et les souris ont montré une nette augmentation de la concentration sérique d'ALAT après administration de différentes doses de méthionine (**Kashireddy et Rao, 2004 ; Assy et Grotowski, 2006**). ALAT a longtemps été utilisé comme l'un des indicateurs sensibles de la maladie du foie chez les humains et est considérées comme étant pratiquement spécifique du foie (**Wills, 1985**).

Le dosage des transaminases ALAT du lot5 (Met-Lyc) donne le même résultat des ASAT à T1, T2, et T3 (augmentation à T1, diminution à T2 et T3), et les valeurs restent toujours supérieures à celle Témoins. Le même résultat est enregistré par **Supidita (2008)**.

Dans cette situation, **Zamora et al. (1991)** ont rapporté que le lycopène pourrait réduire de façon significative le taux sérique d'ALAT. Le lycopène a été considéré pour ses propriétés antioxydantes et phytochimiques avantageuse dans le traitement de diverses maladies hépatiques chroniques (**Rao, 2007**).

Nous avons enfin réalisé le dosage de l'homocystéine, les résultats de ce dernier montre que l'administration de la méthionine produit une augmentation de l'homocystéinémie conduisant à l'installation d'un état d'hyperhomocystéinémie perceptible après un mois de traitement, chez les rats du lot 3, cette augmentation croît jusqu'à la fin d'expérimentation. Nos résultats sont identiques à ceux du **Zhou et al. (2001) ; Sharma et al. (2007)**, qui ont utilisé des différentes doses de méthionine. Par contre le taux d'homocystéine a diminué à partir de T2 à T3 ($P < 0,0001$), ce qui est un résultat attendu. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Paran et Engelhard (2001)**. Pour ces auteurs la supplémentation en lycopène

prévient la réduction de l'homocystéine qui est l'un des marqueurs du stress oxydatif chez les patients hypertendus et à maladies cardiovasculaires.

Notre expérimentation a été complétée par une étude histologique du parenchyme hépatique, coloré par une coloration histochimique qui est le trichrome de Masson pour mettre en évidence toutes les modifications des enzymes sériques observées.

Les photos du parenchyme hépatique des rats qui ayant reçu de la méthionine seule (lot3) à raison de (500mg/kg/jour), nous montrent des dilatations des capillaires sinusoides, ces capillaires apparaissent remarquablement dilatés, et semblent présenter des ramifications. Un résultat similaire a été montré dans les travaux de **Boutbel et Messili (2003)** chez le lapin soumis à la méthionine.

La vasodilatation marquée chez ce lot 3 est due à la baisse de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) sous l'influence de la surcharge en méthionine. Cette baisse joue un rôle moteur dans la pathogénicité de la méthionine de par ses interactions multiples, soit indirectement par le stress oxydatif ou directement par inhibition de l'adhésion des neutrophiles et des monocytes à l'endothélium agissant comme un anti inflammatoire (**Luscher et Vanhoutte, 1990 ; Moncada et al., 1991**) ainsi que par son action synergique avec la prostacyline empêchant l'activation des plaquettes (**Vanhoutte, 1991**).

Une autres altération du foie chez les rats hyperhomocystéinémiques (lot 3- Met) a été enregistrée ; un dépôt important du matériel conjonctif, qui se présente sous forme d'un excès de fibres de collagènes est estimées par l'augmentation de l'intensité de la coloration au trichrome de Masson. Cette accumulation est remarquée autour des vaisseaux (les espaces portes), il s'agit d'une **fibrose**. Le même résultat a été observé aussi par **Hamlat (2004)** chez *Psammomys* soumis à un régime hyper lipidique et **Yefasah, (2007) chez le rat wistar. Bescond et al. (1999)** aussi a expliqué l'accumulation de ces fibres de collagènes par la synthèse des molécules de la matrice extra cellulaire.

La fibrose hépatique résulte de l'activation des cellules de Kupffer et des cellules étoilées. Après avoir phagocyté les corps apoptotiques (les cellules mortes), les deux types de cellules libèrent du TGF β (Facteur de croissance tissulaire bêta) qui active les cellules étoilées

lesquelles se transforment en cellules de type fibroblastique produisant du collagène (**Canbay et al., 2003**).

Par ailleurs, nous avons noté une manifestation du début de phénomène d'apoptose caractérisé par des noyaux hépatocytaires denses. **Seda et al. (2009)**, en utilisant un régime enrichi en méthionine chez le rat *Wistar*, ont montré que l'hyperhomocystéinémie peut causer l'apoptose au niveau hépatique.

Le foie des ces rats montre aussi des modifications et une désorganisation des cellules du parenchyme hépatique. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Boutbel et Messili (2003)** chez le lapin, **Rezkallah et Zellal (2003)**, **Benhmed et al. (2005)** chez les rats *Wistar*.

Par contre le foie des rats prétraités au lycopène (5mg/kg/jour) présente une architecture normale où les travées hépatocytaires et les sinusoides sont très distincts et ne présentent aucune anomalie, les espaces portes sont normaux. Nous pouvons conclure que le lycopène a maintenu l'architecture générale du foie en améliorant le statut antioxydant de ces rats.

L'observation des photos du lot 5 (Met-Lyc), nous montre que les altérations engendrées par la méthionine sont moins importantes, avec une réduction qui est essentiellement marquée par la reconstitution de la structure hépatique, la diminution des espaces sinusoidaux, associée à une diminution de l'accumulation des collagènes. Ces observations confirment l'effet protecteur de lycopène probablement par l'augmentation de capacité antioxydante et par le piégeage des radicaux libres. **Shivashangari et al. (2006)** ; **Sevtap et al. (2012)** ont confirmé qu'une supplémentation en lycopène (10mg/kg) assure une protection du foie. Le prétraitement au lycopène a conduit à la réduction des altérations structurales de la matrice extracellulaire, suggérant ses potentialités protectrices vis-à-vis des affections engendrées par la méthionine (500 mg/kg), tel que le montrent clairement nos observations.

Par ailleurs 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 (**Rao et Agarwal, 2000**).

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

A la fin de notre étude nous concluons que l'administration *per os* de la méthionine pendant trois mois à doses élevée de (500 mg/kg/jour), engendre une surcharge toxique d'homocystéine dans le foie, ce qui influe sur le bon déroulement du mécanisme de la détoxification hépatique. Cette influence provoque une hépato toxicité chez les rats *Wistar* sous forme d'une augmentation d'homocystéine dans l'organisme, c'est l'hyperhomocystéinémie.

Cette hyperhomocystéinémie est responsable :

- D'une augmentation du poids corporel
- Des modifications au niveau des transaminases (ALAT et ASAT).
- D'altérations tissulaires hépatiques aussi bien au niveau matriciel qu'au niveau cellulaire et vasculaire.

L'étude histopathologique a révélée que l'hyperhomocystéinémie est responsable à :

- Une accumulation du matériel conjonctif notamment les collagènes, au niveau du parenchyme hépatique et autour des vaisseaux (Espaces portes, veine centre lobulaire), provoquant ainsi une fibrose.
- Une dilatation des capillaires sinusoides.
- Un changement de forme des noyaux des hépatocytes, qui deviennent denses et irréguliers.

Puiseurs études épidémiologique ont montrées que les réactions de détoxification hépatique ne peuvent pas être réalisées sauf en présence des antioxydants, c'est ce que nous avons trouvé à la fin de notre expérimentation.

Nos résultats ont confirmé que le prétraitement au lycopène à raison de 5mg/kg.de poids corporel a permis d'atténuer toutes les altérations aussi bien au niveau biochimiques et plasmatiques qu'histologique à savoir :

- La réduction de l'homocystéine et les transaminases (ASAT et ALAT).
- La diminution des altérations histologiques hépatiques engendrées par la surcharge en méthionine.

Le lycopène qui est un antioxydant naturel, présente une capacité antioxydante inégalée. Il préserve les cellules et les tissus des radicaux libres (**Rao et al., 2006 ; Stahl et al., 2006**). La consommation du lycopène améliore le statut antioxydant et inhibe la peroxydation lipidique, prévient les dommages oxydatifs des biomolécules comme les lipides, le cholestérol, les protéines et l'ADN (**Marlois et al. 2009 ; Souchon, 2001**). Nos résultats sont conformes à la littérature.

Ce travail mériterait d'être complété par :

- ✓ L'étude du remodelage tissulaire par la quantification des MMPI par zymographie,
- ✓ La détermination de la balance oxydants/antioxydants (NO, Catalase et les Tabars)
- ✓ La détermination des statuts : Inflammatoire (IL-8), CRP et fibrinogène.
- ✓ La quantification de la troponine cardiaque.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- **Agarwal S and Rao A. V. (1998).** "Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study." *Lipids*; **33**(10): 981-4.
- **Akasaka K. , Akasaka N. , Di Luozzo G., Sasajima T et Sumpio B.E. (2005).** Homocysteine promotes p38-dependent chemotaxis in bovine aortic smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.*, **41**: 517-22.
- **Anderson M.E. (1998).** Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem.Biol. Int.*, 111–112, 1–14.
- **Assy N et Grozovski M. (2006).** Effect of insulin-sensitizing agents in combination with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* **12**(27):4369-4376.
- **Astrog P., Gradelet S., Berges R. et Suschetet M. (1997).** Dietary lycopene decreases initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in rat. *Nutr.Cancer*, **29**: 60-68.
- **Augier T., Chapirot P., Chareyre C., Remusat M., Rolland P et Garçon D. (1997).** Medial elastic structure alterations in atherosclerotic arteries in minipigs : plaque proximity and arterial site specificity. *Matrix Biol.*, **15**: 455 - 467.
- **Aza A. et al. (2001).** Effect of N-acetylcysteine and L-NAME on aluminium phosphide induced cardiovascular toxicity in rats, *Acta Pharmacol. Sin.*, **22**(4):298-304.
- **Babcock M J. (1958).** Serum glutamic-oxalacetic transaminase activity of vitamin B6-deficiency rats; *Jn.nutrition.org*.
- **Bahcecioglu I.H., Nalan Kuzu., Kerem Metin., Ibrahim Hanifi Ozercan., Bilal Ust'undag., Kazim Sahin. and Omer Kucuk. (2010).** Lycopene Prevents Development of Steatohepatitis in Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis Model Induced by High-Fat Diet; Article ID 262179:8.
- **Bailey L.B. ; Moyers S. ; Gregory J.F. (2001).** Foliates. In Bowman B.A. ; Russell R.M.(eds) : « Present Knowledge in Nutrition, » 8th ed. *Washington, DC : ILSI Press* : 214 .229.
- **Benahmed N.; Hadj –Ziane K et Rahim M. (2005).** Effet d'un excès de méthionine sur les paramètres et l'histomorphométrie du foie et du cœur. *DES en Biochimie. USTHB.Alger.*, P 34.
- **Bergmeyer H. U. et Gawehn K. (1978).** Principles of enzymatic analysis. *Verlag. Chem. Weinheim & New York.* 260p.
- **Berkenhout. (1769).** The Taxonomy and Karyology of *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae). *Tr. J. of Zoology.* Turkey. **22**: 203-212.

- **Bescond A. ; Augier T. ; Chareyre C. ; Garçon D. ; Hornebeck W. ; Charpiot P. (1999).** Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263** : 498–503.
- **Bostom A.G.; Gohh R.Y. ; Morrisey P. (2000).** Hyperhomocysteinemia in chronic renal transplant recipients. *Graft.*, **3** : 195 – 204.
- **Boutbel A. et Messili A. (2003).** Effets de la méthionine sur quelques paramètres biochimiques plasmatiques et sur le foie et l'aorte du lapin «*Oryctolagus cuniculus domestiques* ». *USTHB. Alger.* P 29.
- **Brosnan J.T. ; Jacobs R.L. ; Stead L.M. ; Brosman M.E. (2004).** Methylation demand : a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Polonica.*, **51** : 405 – 413.
- **Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Granbihler A, Brouk SF, Gores GJ. (2003).** Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 38 (5); 1188-98.
- **Caussé E. (2008).** Intérêt du dosage de l'homocystéine en médecine générale.
- **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.
- **Claude Gagnon. (2006).** Lycopène : le pigment antioxydant.
- **Clinton SK. (1998).** Lycopene Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.*; **56** (2): 35-51.
- **Demuth K. ; Drunat S. ; Paul J.L. ; Moati N. (2000).** Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. *m./s.*, **16** : 1081 - 90.
- **Doshi S. ; McDowell I. ; Goodfellow J. ; Stabler S. ; Boger R. ; Allen R. ; Newcombe R. ; Lewis M. ; Moat S. (2005).** Relationship between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia. *Met. Clin. Exp.*, **54** : 351– 360.
- **Durand, P., Prost, M., Loreau, N., Lussier-Cacan, S. and Blache, D. (2001).** Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease, *Lab Invest.*; **81**: 645-672.
- **Fillatre Y. (2011).** Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de doctorat, Université Angers, France.

- **Finkelstein J.D. ; Martin J.J. (2000).** Homocysteine. *Int. J. Bioch. Cel. Biol.*, **32** : 385 –389.
- **Ghoul A. (2009).** Hyperhomocystéinémie et remodelage de la matrice extracellulaire testiculaire, épидидymaire et vésiculaire chez le rat Wistar, *Rattus norvegicus*. Thèse de magister. USTHB. Alger. 94p.
- **Gibault T. (2006).** lycopène ? Peut être tomate ? sans aucun doute équation nutrition ; **55(5) :2.**
- **Gong Z., Yan S., Zhang P., Huang Y., Wang L. (2008).** Effects of Sadenosylmethionine on liver methionine metabolism and steatosis with ethanolinduced liver injury in rats. *Hepatol Int*; **2:346- 523.**
- **Gong Z., Yan S., Zhang P., Huang Y., Wang L. (2008).** Effects of Sadenosylmethionine on liver methionine metabolism and steatosis with ethanolinduced liver injury in rats. *Hepatol Int*; **2:346-523.**
- **Gueguen Y., Rendic S. (2006).** Summary of information on human CYP enzymes : human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev*; **34**: 83-448
- **Guilland J.C. ; Favier A. ; Potier de Courcy G. ; Galan P. ; Herberg S. (2003).** L'hyperhomocystéinémie : Facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? – Données fondamentales . *Path. Biol.*, **51** : 101 - 110.
- **Gupta SK, Halder N, Srivastava S, Trivedi D, Joshi S, Varma SD. (2002).** Green tea protects against selenite-induced oxidative stress in experimental cataractogenesis. *Ophthalmic Res* ;**34(4):258-63.**
- **Hamlat N. (2004).** Effets de régimes enrichis en lipides sur certains paramètres plasmatiques; tissulaires et cellulaires chez *Psammomys* et *Rattus norvegicus*. Magister en Biologie et Physiologie animale. *USTHB. Alger.* P 142.
- **Hamdis N. (2011).** Remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque induit par différentes doses de méthionine chez le Rat Wistar, *Rattus norvegicus*. Thèse de magister. USTHB. Alger. P 56.
- **Hickie I. ; Naismith S. ; Ward P.B. ; Scott E. ; Mitchell P. ; Wilhelm K. ; Parker G. (2005).** Vascular risk and low serum B12 predict white matter lesions in patients with major depression. *J. Aff. Dis.*, **85** : 327–332.
- **Hidiroglou N., Gilani G., Long L., Zhao X., Madere R., Cockell K., Belonge B., Ratnayake W., Peace R. (2004).** The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low

density lipoprotein in the gerbil *The Journal of Nutritional Biochemistry*; **15**(12) :730-740.

- **Huang R.S.; Hsu Y.; Lin H.; Yang F.L. (2001).** Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J. Nutr.*, **131** : 33 – 8.
- **Ipekci SH, Basaranoglu M, Sonsuz A.(2003).**The fluctuation of serum levels of aminotransferase in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:371.
- **Jamshidzadeh A, Baghban M, Azarpira N, et al.(2008).** Effects of tomato extract on oxidative stress induced toxicity in different organs of rats. *Food Chem Toxicol*; Epub ahead of print.
- **Kashireddy, p.v et M.S.Rao .(2004).** Lack of peroxisome proliferators-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. *Hepatol Res.* 30 (2);104-110.
- **Khelil S., Ferchichi S., Gammoudi I., Jaidane Z., Chahed H., Dandana A., Noichri A., Chalghoum A., Ernez S., Jeridi G. and Miled A. (2010).** Hyperhomocystéinémie et stress oxydant chez les insuffisants cardiaques. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* ; **25** :191-196.
- **Kim H. (1995).** Carotenoids protect cultured rat hepatocytes from injury caused by carbon tetrachloride. *Int. J. Biochem . Cell Biol*; **27**: 1303-1309.
- **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.
- **Kucuk O, Sarkar FH, Djuric Z, Sakr w, Pollak MN, Khachik F, Banerjee M, Bertram JS, Wood DP(2002).** Effects of lycopene supplementation in patients with localized prostate cancer; *exp Biol Med*, **227**(10):881-5.
- **Lawrence de Koning A.B., Geoff H. Werstuck, Ji Zhou, Richard C. Austin.(2003).**Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis *Clinical Biochemistry*; **36**: 431–441.
- **Lentz, S. R. and Haynes, W. G.(2004).**Homocysteine: is it a clinically important.
- **Luciene de Souza Venâncio .; Roberto Carlos Burini .; Winston Bonetti Yoshida Sharma.(2010).** Le traitement diététique de l'hyperhomocystéinémie dans la maladie artérielle périphérique ; **9**(1).
- **Lüllmann H., Mohr K. et Ziegler A. (1998).** Atlas de poche de pharmacologie. *Médecine-Sciences: Flammarion, 2^{ème} édition.* Paris. 32-42.
- **Lussher TF, Vanhoutte PM. (1990)** the endothelium: modulator of cardiovascular function. *Boca. Ratom: CRC press.*

- **Manahan S.E. (2003).** Biochemistry, toxicological chemistry. *Library of Congress Cataloging-in-Publication Data Lewis Publisher. 3^{ème} édition.* 160-180.
- **Marchall W.J. et Bangert S.K. (2004).** Biochimie médicale: physiopathologie et diagnostic. 5^{ème} édition Française Elsevier. France. 59-87.
- **Marsh E.N. (1999).** Coenzyme B12 (cobalamin)-dependent enzymes. *Essays Biochem.*, **34** : 139 – 54.
- **Martoja R. et Martoja-Pierson M. (1967).** Initiation aux techniques de l'histologie animale. *Edition Masson et C^{ie}*, Paris-VI.
- **Martinez M.; Cuskelly G.; Williamson J.; Toth J.P.; Gregory J.F. (2000).** Vitamin B6 Deficiency in Rats Reduces Hepatic Serine Hydromethyltransferase and Cystathionine \square Synthase Activities and Rates of In Vivo Protein Turnover, Homocysteine Remethylation and Transsulfuration. *J. Nutr.*, **130** : 111 – 23.
- **Miller A.; Mujumdar V.; Shek E.; Guillot J.; Angelo M.; Palmer L.; Tyagi S.C. (2000).** Hyperhomocyst(e)inemia induces multiorgan damage. *Heart vessels.*, **15** : 135 –43.
- **Miner S.E.S.; Evroski J. ; Cole D.E.C. (1997).** Clinical chemistry and molecular Biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin. Biochem.*, **30** : 189–201.
- **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. (1991).** Nitric oxide : physiology, thophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*; **43**: 109-42.
- **Mouchabac S. (2008).** Homocystéine, hyperhomocystéinémie et dépression ;**32** : 9 – 18.
- **Moussa M., Landrier J., Reboul E., Coméra C., Collet X., Fröhlich K., Volker B. and Borel P. (2008).** Lycopene Absorption in Human Intestinal Cells and in Mice Involves Scavenger Receptor Class B Type I but Not Niemann-Pick C1-Like 1. *Nutr.* **138**(8):1432-1436.
- **Mudd S.H. ; Finkelstein J.D. ; Refsum H. ; Ueland P.M. ; Malinow M.R. ; Lentz S.R. ; Jacobsen D.W. ; Brattström L. ; Wilcken B. ; Wilcken D.E.L. ; Blom H.J. ; Stabler S.P. ; Allen R.H. ; Selhub J. ; Rosenberg I.H. (2000).** Homocysteine and its disulfide derivatives. A suggested consensus terminology. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.*, **20** : 1704 - 07.
- **Othmani K. (2007).** Remodelage de la matrice extracellulaire induit par une hyperhomocystéinémie et par la gestation chez le lapin. Caractérisation et suivi de marqueurs de la gravidité. Thèse de Doctorat es Sciences. USTHB. Alger.194p.

- **Paran E and Engelhard Y.(2001)**. Effect of tomato's lycopene on blood pressure, serum lipoproteins, plasma homocysteine and oxidative stress markers in grade I hypertensive patients. *AJH*; **14**(4): 333.
- **Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. (2003)**. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* **333**:19-39.
- **Prudhon M, Colin M, Lebas F. (1977)**. Effet de l'addition de méthionine au régime sur les caractéristiques du comportement alimentaire du lapin en croissance. *Ann. Zootech.*, **26** (3), 421-428.
- **Raaf L. (2003)**. Effet de l'hyperhomocystéinémie sur la matrice extracellulaire de la paroi artérielle. Thèse de magister. USTHB. Alger.113p.
- **Raisonnier A. (2004)**. Digestion – Détoxification. Thèse. Université Pierre et Marie Curie. France.
- **Rao VA. and PhD et Agarwal S. (2000)**. J. Am. Coll. Nutr; **19** (5): 563-569. Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease.
- **Rao A.V., Agarwal S. (2000)**. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. J. Am.Coll. Nutr; **19**: 563-569.
- **Rao AV, Rao LG (2007)**. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res.* **55**: 207-216.
- **Rajender K. et Faust T. (2006)**. Liver Disease. *SLACK Incorporated*. USA. 321-332.
- **Refsum H.; Helland S. ; Ueland P.M. (1985)**. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin. Chem.*, **31** : 624 – 628.
- **Rezkallah N et Zellal W. (2003)**. Effet d'un régime riche en cholestérol et de la méthionine sur le foie de rat *wistar* « *Rattus norvegicus* ». *DES en biologie et physiologie animale*. USTHB. Alger. P29.
- **Rolland P.H, Friggi A., Barlatier A., Piquet P, Latrille V., Faye M.M., Guillou J.,Charpiot P., Bodard H., Ghiringhelli O., Calaf R, Luccioni R, Garçon D.(1995)**.Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig. *Circulation* ;**91**:1161-1174.
- **Sabio E. ; Lozano M. ; DeEspinosa VM. ; Mendes RL. ; Prereira AP.; Palavra AF. and Coelho JA. (2003)** .Lycopene and β - Caroten extraction from tomato pasta using supercritical CO₂. *Ind. Eng. Res.*; **42**:6641-6646.

- **Sahin K., Onderci M., Sahin N., Gursu M., Khachik. and Kucuk O.(2006).** Effet of lycopene supplementation on antioxidant status oxidative stress, performance and carcass characteristics in heat-stressed Japanese quail. *Journal of Thermal Biology*; **31**: 307-312.
- **Sevtap A., Tokaç M., Taner G., Ata Turker Arikok., Halit Zaya D., Alper BO., Mine YT., Mehmet K., Arif AB. and Nursana B. (2012).** Antioxidant and antigenotoxic effects of lycopène in obstructive jaundice. *Departement of toxicology*. EI-EII.
- **Sharma M, Rai S.K, Tiwari M, Chandra R. (2007).** Effect of homocysteinemia on cardiovascular risk factors and initiation of atherosclerosis in Wistar rats. *Eur. J.Pharmacol.*, **574** : 49-60.
- **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.
- **Smach MA., Naffeti S., Charafeddine B., Benabdallah J., Othmen LB., Lataef A and Limen K. (2012).** Homocystéine , vitamine B12 et acide folique dans le déclin cognitive chez les personnes âgées .*Pathologies Biologie*.
- **Smolders, K. de Meer, P. Kenemans, T. Teerlink, C. Jakobs, MJ van der Mooren. (2004).** Hormonal substitutif influe sur les niveaux d'homocystéine dans le test de charge en méthionine : un essai contre placebo randomisé chez les femmes ménopausées ;55-59.
- **Song. Y., Cho. M., Cho. C., Rosenfled.M.E. (2009).** Methionine-induced hyperhomocystéinémie modulates lipoprotein profile and oxidative stress but not progression of atherosclerosis in aged apolipoprotein E knockout mice. *J Med Food* ;**12**(1):137-44.
- **Stalder M., P.-Y. Lovey, E. Dayer .(2007).** Homocystéine et maladie thromboembolique ;**9** (3).
- **Supidita V. (2008).** Interactions between Escalating Doses of Lycopene Supplementation and Exposure to Alcohol/smoke and Carcinogen in Vivo. *Thèse de doctorat*. P 181.
- **Taghlit A. (2010).** Les altérations plasmatiques et hépatiques induites par l'hyperhomocystéinémie chez le lapin domestique mâle. Thèse de magistère USTHB. Alger. P84.
- **Toren AM. ; Lutgens E. ; Smith DE. ; Rosenberg IH. ; Selhub J. (2003).** The atherogenic effect of excess methionine intake. *PNAS.*, **100** : 15089–94.

- **Ueland P.M. (1995).** Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin. Chem.*, **41** : 340-2.
- **Uthus E.O. ; Yokoi K. ; Davis C.D. (2002).** Selenium Deficiency in Fisher-344 Rats Decreases Plasma and Tissue Homocysteine Concentrations and Alters Plasma Homocysteine and Cysteine Redox Status. *J. Nutr.*, **132** : 1122–28.
- **Ungvari Z, Pacher P, Rischak K, Szollar L, Koller A. (1999).** Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet induced.
- **Vanhoutte PM. (1991).** Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factors by aggregating platelets. *Eur Heart J*; **12** (suppl. E) : E3-12.
- **Wang G. ; Dai J. ; Mao J. ; Zeng X. ; Yang X. ; Wang X. (2005).** Folic acid reverses hyper-responsiveness of LPS-induced chemokine secretion from monocytes in patients with hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis.*, **179** : 395–402.
- **Welch G.N. ; Loscalzo J. (1998).** Homocysteine and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.*, **338** : 1042 - 50.
- **Wertz K et Siler U, Goralczyk R. (2004).** Lycopene: mode of action to promote prostate health. *Arch Biochem Biophys.* **1:430(1):127-34.**
- **Wills ED . (1985).** Biochemical diagnosis. In biochemical basis of medicine (Wills D ed.), wright, pristol England, pp. 489-999.
- **Wilkinson GR. (2005)** .Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engel J Med* ; **352** : 2211-21.
- **Wolters M., Hermann S et Hahn A. (2003).** B vitamins, homocysteine, and methylmalonic acid in erderly German woman. *Am. J. Clin. Nutr.*, **78** : 765 - 72.
- **Wright C.B., Lee H.S., Paik M.C., Stabler S.P., Allen R.H et Sacco R.L. (2004).** Total homocysteine and cognition in a tri-ethnic cohort: The Northern Manhattan Study. *Neurology.*, **63** (2): 254–260.
- **Yagisawa M., Okawa N., Shigematsu N., Nakata R. (2004).** Effects of intravenous betaine on methionine-loading-induced plasma homocysteine elevation in rats. *J. Nutr. Bio.*, **15** : 666 – 671.
- **Yefsah A. (2007).** Biodisponibilité et incidence physiologique du lycopène chez le rat wistar. Thèse de magister. INA. Alger. 105p

- **Zamora R, Hidalgo F, Tappel L. (1991).** Comparative antioxidant effectiveness of dietary β -carotene vitamin E selenium and coenzyme Q 10 in rat erythrocytes and plasma. *J. Nutr.* **121**: 50-56
- **Zerrouk F. (2007).** Modulation de la composition de la matrice extracellulaire vasculaire par une hyperhomocystéinémie chez *Psammomys obesus*. Thèse de magister. USTHB. Alger. 86p.
- **Zhou J., Moller J., Danielsen C.C, Bentzon J., Ravan H.B., Austin R.C et Falk E. (2001).** Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* ;**21** : 1470-76.

ANNEXES

Annexe1 : Résumé des résultats**Tableau 1 :** Evolution pondérale (g) des rats.

Moyenne	T0	T1	T2	T3
LOT1	241,1	242,1	250,22	293,97
LOT2	245,83	243,18	271,08	310,5
LOT3	253,67	250,63	275,18	307,23
LOT4	253,31	245,3	252,96	285,85
LOT5	245,47	237,71	256,74	288,6

Ecart type	T0	T1	T2	T3
LOT1	2,85	10,25	9,96	28,98
LOT2	6,72	11,79	11,79	2,36
LOT3	15,64	35,95	2,28	6,38
LOT4	13,9	13,87	4,53	4,66
LOT5	12,16	14,01	15,68	10,62

Tableau 2 : Evolution de l'ASAT (UI) plasmatiques des rats.

Moyenne	T0	T1	T2	T3
LOT1	172,16	168,35	130,71	172,33
LOT2	180,16	173,00	132,17	177,00
LOT3	183,00	188,50	211,08	258,00
LOT4	180,00	174,00	182,25	177,80
LOT5	181,20	192,71	189,36	177,40

Ecart type	T0	T1	T2	T3
LOT1	17,42	11,27	13,74	13,25
LOT2	21,56	23,29	35,53	28,47
LOT3	8,94	31,11	19,35	31,95
LOT4	6,83	34,66	22,63	11,50
LOT5	8,38	42,41	26,69	52,81

Tableau 3 : Evolution de l'ALAT (UI) plasmatiques des rats.

Moyenne	T0	T1	T2	T3
LOT1	43,17	59,13	50,94	47,30
LOT2	62,83	62,33	62,40	63,13
LOT3	66,17	68,50	71,00	79,83
LOT4	63,10	54,00	45,63	38,33
LOT5	64,10	75,40	68,50	51,10

Ecart type	T0	T1	T2	T3
LOT1	1,76	21,84	14,23	22,33
LOT2	2,57	7,88	15,02	10,50
LOT3	4,48	7,79	3,03	14,15
LOT4	4,85	7,55	15,22	5,39
LOT5	9,29	12,02	11,29	4,79

Tableau4 : Evolution de l'homocystéine plasmatique ($\mu\text{mol/L}$) des rats.

Moyenne	T0	T1	T2	T3
LOT1	5,28	5,70	5,87	6,13
LOT2	5,48	5,61	5,91	6,69
LOT3	5,67	7,14	11,53	13,82
LOT4	5,79	6,01	6,30	7,38
LOT5	5,7	6,54	9,12	9,7

Ecart type	T0	T1	T2	T3
LOT1	0,56	0,42	0,36	0,66
LOT2	0,09	0,25	0,25	0,91
LOT3	0,30	0,84	1,02	1,14
LOT4	0,48	0,40	0,93	1,06
LOT5	0,31	0,58	0,80	0,80

Annexe2 : Préparation de solution :

2.1. Préparation de solution de lycopène

On dissout une ou deux gélules de lycopène, dans un volume d'huile d'olive, calculé d'après la moyenne de poids des lots qui reçoivent de lycopène par des règles de trois

- Nous faisons un trou au niveau de la gélule à l'aide d'un ciseau (**Fig. A**).
- On met la /les gélule(s) trouée(s) de lycopène dans le mortier et on prend le volume calculé de la solution d'huile d'olive à l'aide d'une pipette graduée (**Fig. B**).
- On écrase la / les gélule(s) de lycopène pour faire sortir toute la solution de lycopène qui est à l'intérieur (**Fig. C**).
- On mélange les deux solutions jusqu'à la dissociation complète de lycopène dans l'huile d'olive (**Fig. D**).
- On met la solution finale dans un flacon fumé en verre, couvert par le papier aluminium pour éviter les réactions de la solution avec la lumière. (**Fig. E**)
- On étiquette le flacon (**Fig. F**).
- On fait mélanger la solution dans le flacon avant chaque gavage afin d'assurer l'homogénéité de la solution.

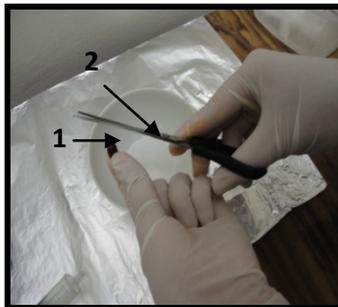


Figure A: Trouer la gélule



Figure B: Ajouter huile d'olive



Figure C: Faire sortir toute la solution de lycopène



Figure D: Mélanger les deux solutions.

Figure E: Mettre la solution finale dans un flacon fumé.

Figure F: Flacon étiqueté.

Figure 1: Préparation de solution de lycopène (Photos originales, 2013).

(1) : Gélule de lycopène, (2) : Ciseau, (3) : Pipette graduée, (4) : Solution d'huile d'olive, (5) : Bécher gradué, (6) : Mortier, (7) : Solution de lycopène, (8) : Flacon fumé, (9) : Etiquette, (10) : Papier aluminium .

2.2. Préparation de la solution de NaCl (Eau physiologique)

➤ On prépare une solution de NaCl 0.9% :

- On pèse 9g de NaCl (**Fig. B**) à l'aide d'une balance de précision (**Fig. A**).
- On le met dans 1litre d'eau distillée dans un *erlenmeyer* en verre contenant un *biomagnétique*.
- On ferme l'*erlenmeyer* par un papier aluminium + agitation à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à la dissociation complète de NaCl dans l'eau distillée (**Fig. C**)
- On met la solution obtenue dans un flacon d'1L et on l'étiquette (**Fig. D**) .



Figure A: Balance de précision.

Figure B: NaCl sous forme solide.

Figure C: Agitation de la solution.

Figure D: Flaçon de 1L de l'eau physiologique.

Figure 2 : Préparation de solution de NaCl (Photos originales, 2013).

(1) : Papier aluminium, (2) : Erlenmeyer, (3) : biomagnétique. (4) : Agitateur magnétique.

2.3. Préparation de la solution de méthionine

- On pèse 20g de méthionine (**Fig. A**) à l'aide d'une balance de précision.
- On ajoute la méthionine peu à peu dans 1L d'une solution de NaCl qui est sur l'agitateur, jusqu'à la dissociation complète dans la solution de NaCl (**Fig. B**)
- On met la solution obtenue dans un flaçon d'1L et on l'étiquette (**Fig. C**).



Figure A: DL-Méthionines

Figure B: Ajout de la méthionine

Figure C: Flaçon de 1L de la méthionine

Figure 3 : Préparation de solution de méthionine (Photos originales, 2013).

2.4. Préparation de l'alcool 90°

Eau distillée.....	13,25ml
Alcool 100°	100ml

2.5. Préparation de l'alcool 70°

Eau distillée.....	47,75ml
Alcool 100°	100ml

2.6. Préparation de l'eau gélatineuse :

Eau distillée.....	100ml
La gélatine	0,4g

2.7. Préparation de formole à 10%:

Eau distillée.....	100ml
Formole 36%	10ml

3. Préparation des réactifs**3.1. Hématoxyline de Groat : Préparation à froid**

➤ Solution A :

Acide sulfurique concentré.....	0,8 ml
Alun de Fer.....	1g
Eau distillée.....	50ml

➤ Solution B :

Hématoxyline.....	0,5g
Alcool 95°.....	50ml

Après dissolution, mélanger les deux solutions, laisser reposer pendant 1 heure et filtré. Se conserve pendant 3mois environ.

3.2. Fushine-ponceau : Préparation à froid

Fushine acide.....	0,1g
Ponceau.....	0,2g
Eau distillée.....	300ml

Après dissolution, ajouter :

Acide acétique.....0, 6ml

Conservation illimitée.

3.3. Acide phosphomolybdique à 5%

Eau distillée.....100ml

Acide phosphomolybdique.....5g

3.4. Vert lumière (solution acétique) :

Vert lumière.....0, 1 g

Eau distillée.....100 ml

Ajouté :

Acide acétique.....2ml

Conservation illimitée.

3.5. Bleu d'aniline :

Solution mère :

Bleu d'aniline.....0,5g

Eau distillé.....100ml

Porter a ébullition, laissé, refroidir, filtré, ajouté

Acide acétique8ml

Solution de travail :

Au moment de l'emploi, diluer :

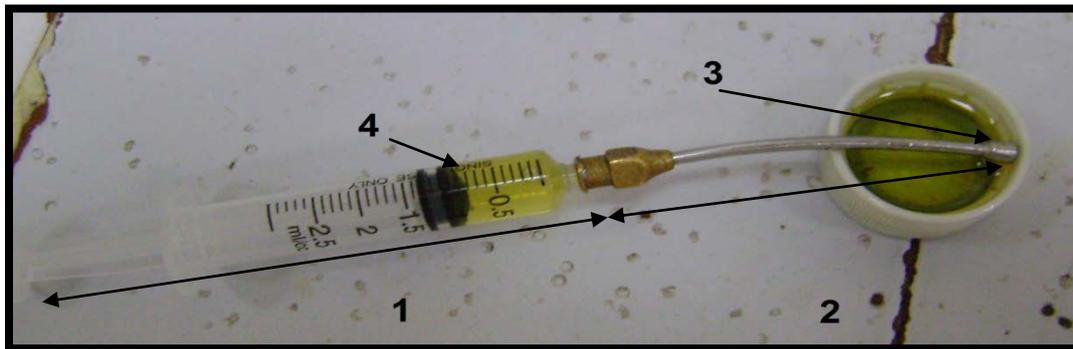
Solution mère.....1 volume

Eau distillé..... 2volume

Annexe3 : Méthodes opératoires

3.1. Le gavage :

Les composés liquides peuvent être administrés directement dans l'estomac de la souris et les rats via une technique appelée gavage oral. Dans cette procédure une ampoule fait pencher l'aiguille gastrique gavage est attachée à une seringue et utilisé pour délivrer le composé dans l'estomac (**Fig. 4**).



(1) : Une seringue, (2) : L'aiguille gastrique gavage, (3) : La pointe ampoule, (4) : Solution d'huile d'olive.

Figure 4: La sonde de gavage (Photo originale, 2013).

L'animal doit être fermement retenu (saisir l'animal par la peau lâche du cou et du dos) pour immobiliser la tête (**Fig. 5**). Maintenir l'animal dans une position verticale (verticale) et passer sonde de gavage à travers le côté de la bouche (**Fig. 6**). Après le toit de la bouche, de faire avancer l'aiguille dans l'œsophage et vers l'estomac. Si la résistance est rencontrée, vous pouvez tenter de pénétrer dans la trachée et vous devriez changer votre position de l'aiguille. Après que l'aiguille est passée à la longueur correcte, le composé peut être injecté.



Figure 5: Saisir l'animal par la peau

(Photo originale, 2013).



Figure 6: Maintenir l'animal dans une position verticale

(Photo originale, 2013).

3.2. Prélèvement sanguin

Pour le suivi des paramètres plasmatiques, des ponctions sont effectuées au niveau du sinus rétro-orbitaire de l'œil à l'aide des capillaires pour hémocrite. Le sang aussitôt prélevé sur tubes (citratés et secs) est centrifugé à 35000 tr/mn pendant 10 minutes à 4°C au niveau d'une centrifugeuse réfrigérée (Fig.7).

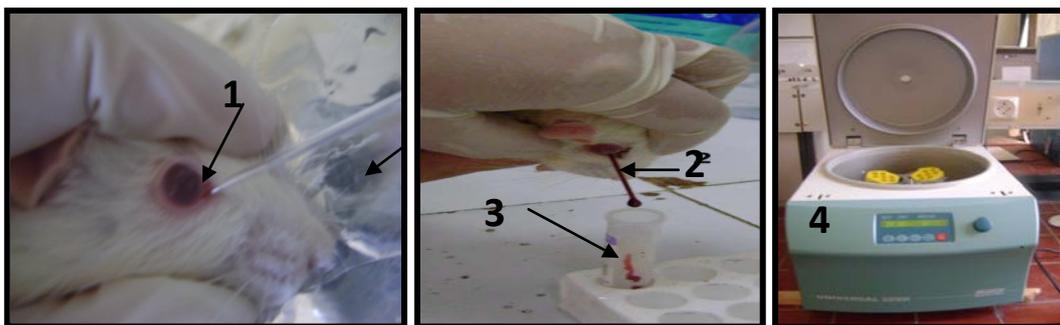


Figure 7: La technique du prélèvement sanguin chez le rat (Photos originales, 2013).

(1) : Le sinus rétro-orbitaire, (2) : Capillaire pour hémocrite, (3) : Tube sec, (4) : Centrifugeuse réfrigérée.

Après la centrifugation des échantillons sanguins (Fig.8), les éléments les plus massifs du sang vont sédimenter et former un *culot* au fond du tube et le *plasma* surnage le *culot*(Fig.9).

On doit aliquoter le plasma obtenu rapidement à l'aide d'une micropipette réglable, réglée à 150 μ L (**Fig.10**) et le mettre dans des petits tubes appelé tubes Eppendorfs (**Fig.11**).

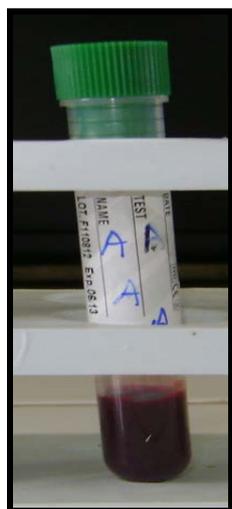


Figure 8: Echantillon sanguin



Figure 9: Tube après la centrifugation

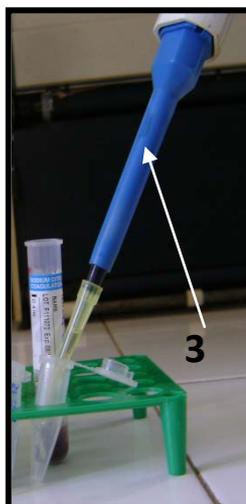


Figure 10: Aliquoter le plasma



Figure 11: Eppendorfs Contenant du plasma

(1) : Plasma, (2) : culot, (3) : Micropipette réglable, (4) : Eppendorfs.

(Photo originale, 2013).

Le plasma récupéré est conservé à -80°C pour le dosage des paramètres biochimiques plasmatiques (homocystéine, les transaminases, ASAT et ALAT).

3.3. Prélèvement des organes

Au terme de l'expérimentation (03 mois), les animaux sont sacrifiés, après anesthésie par inhalation d'éther(**Fig.13**). Le foie, l'objet de cette étude est prélevé.



Figure 13 : Sacrifice par inhalation d'éther (Photo originale, 2013).

3.4. Technique de dissection

Fixer l'animal sur le dos à l'aide de 4 épingles enfoncées dans les pattes sur la planche de fixation (**Fig.14**).

A l'aide de la pince et de ciseau, faire une boutonnière dans la peau de l'abdomen, un peu en avant de l'orifice urinaire(**Fig.15**)

Inciser la peau suivant la ligne médiane jusqu'au voisinage de la bouche et suivant l'axe des membres (**Fig.16**)

Avec les doigts, tirer fortement et retirer la peau et la placer dans les cotés , la faire tenir avec des aiguilles piquées

Couper avec le ciseau, les muscles minces de ventre et de la poitrine (**Fig.17**) et latéralement au centre, rabattre les muscles minces vers l'extérieur et fixer l'ensemble à l'aide d'épingles en suivant les indications(**Fig.18**)

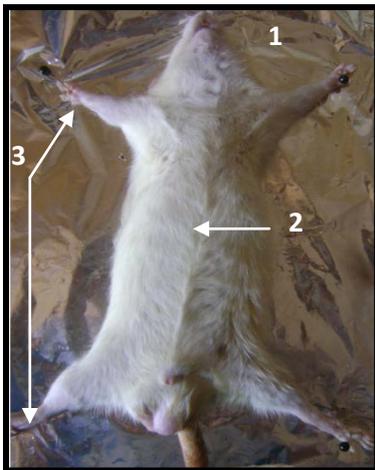


Figure 14: Fixation de rat

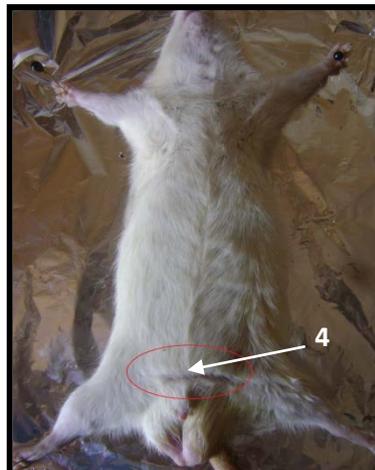


Figure 15: Boutonnière dans la peau de l'abdomen



Figure 16: Incision de la peau

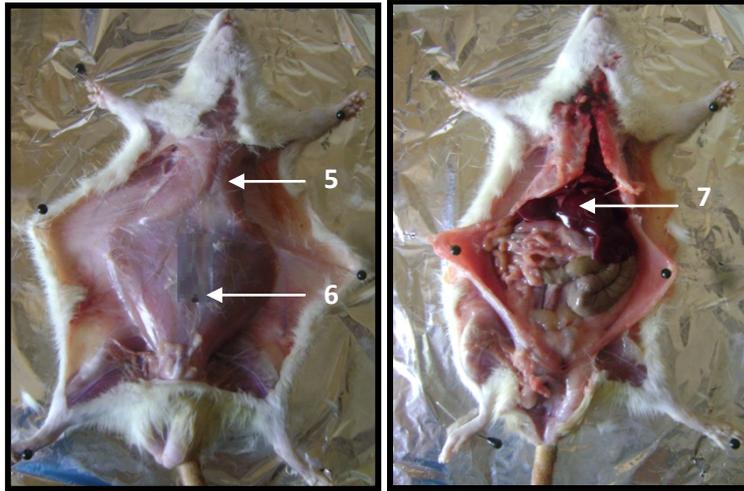


Figure 17: Retirer la peau

Figure 18: Couper, les muscles minces de ventre et de la poitrine.

(1) : Planche de fixation, (2) : La peau, (3) : Les membres, (4) : Orifice urinaire, (5) : Muscles minces de la poitrine, (6) : Muscles minces de ventre, (7) : Le foie.

Figure 19 : Etapes de dissection d'un rat (Photo originale, 2013).

A l'aide de la pince et de ciseau on fait sortir le foie de la cavité abdominale, on le met directement dans l'eau physiologique afin d'éliminer le sang (Fig.20).

On coupe le foie à des petits fragments (Fig.21), on les met directement dans les piluliers contenant de fixateurs : le formole à 10%.



Figure 20 : Laver le foie par l'eau physiologique (Photo originale, 2013).

Figure 21 : Couper le foie à des petits fragments (Photo originale, 2013).

3.5. Méthodes Histologiques

A. Fixation :



Figure A: La fixation dans le formole à 10%

(Photo originale, 2013).

(1) : Pilulier, (2) : Fragment de foie.

B. Déshydratation

Les fragments de foie fixé sont placés dans des cassettes qui sont numérotés par rapport aux rats (**Fig.21**). Rincées dans l'eau courante pendant 24 heures afin d'éliminer l'excès de fixateurs (**Fig.22**). Et prolongées successivement dans un automate pour la déshydratation (**Fig.23**).

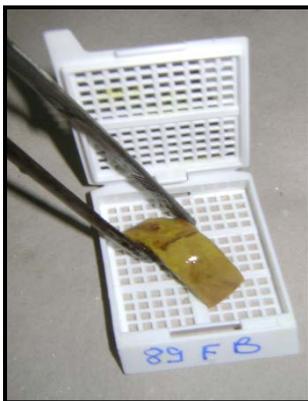


Figure 21 : Fragment de foie placé dans des cassettes
(Photo originale, 2013).



Figure 22 : Rincées les fragments dans l'eau courante
(Photo originale, 2013).



Figure 23 : Déshydratation à l'aide d'un Automate de type : Myr Stp 120.
(Photo originale, 2013).

L'automate contient des bains d'alcool de concentrations croissantes, les organes sont soumis à une déshydratation au niveau d'une durée d'une heure et 30 minutes dans chaque bain.

C. Inclusion à la paraffine et confection des blocs

Les cassettes sont plongées dans deux bains de paraffine deux heures pour le premier bain et la nuit pour le deuxième bain.

La confection des blocs est réalisée grâce à des moules spéciaux : *les barres de Leuckart (Fig.25)*

On met un petit volume de la paraffine fondue et chaude dans le moule, on place l'organe au centre de ce moule, on refroidit la paraffine rapidement au niveau de la plaque froide de l'automate d'inclusion (Fig.24) afin d'assurer la bonne fixation de l'organe au centre de moule.

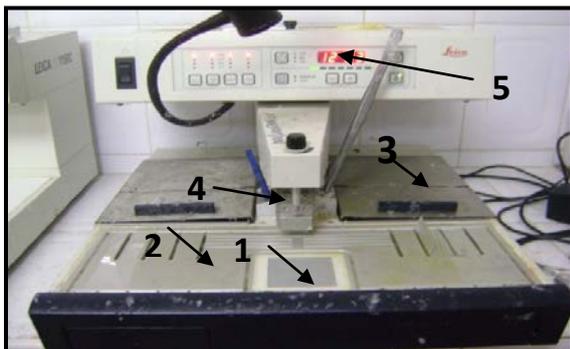


Figure 24: Automate d'inclusion type : *Leica EG 1160* (Photo originale, 2013).



Figure 25: Le moule (*la barre de Leuckart*) (Photo originale, 2013).

(1): Plaque froide, (2) : Plaque chaude, (3) : Réservoir de paraffine, (4) : Distributeur de paraffine, (5) : Platine du contrôle.

On ferme le moule par la cassette (Fig.26). , on met la paraffine à partir le distributeur de la paraffine de l'automate (Fig.27). , on dépose les moules fermés par les cassettes sur le refroidisseur (Fig. 28). on les laisse refroidir 15 à 20 minutes et se solidifier pour obtenir un bloc de forme d'un rectangle selon le moule utilisé (Fig. 29).



Figure 26:
Fermeture de moule
par la cassette

Figure27: mettre
la paraffine à
partir le
distributeur de
la paraffine

Figure28 : déposer
les moules
sur le
refroidisseur

Figure 29: Un bloc
Contenant
l'échantillon.

Figure 30 : Etapes de confection des blocs (**Photos originales, 2013**).

D. Confection des coupes :

Pour la réalisation des coupes histologiques, nous utilisons le microtome (**Fig. 31**). Qui effectue des coupes de section de $2\mu\text{m}$ d'épaisseur. Les coupes sont récupérées sous forme d'un ruban (**Fig. 32**).

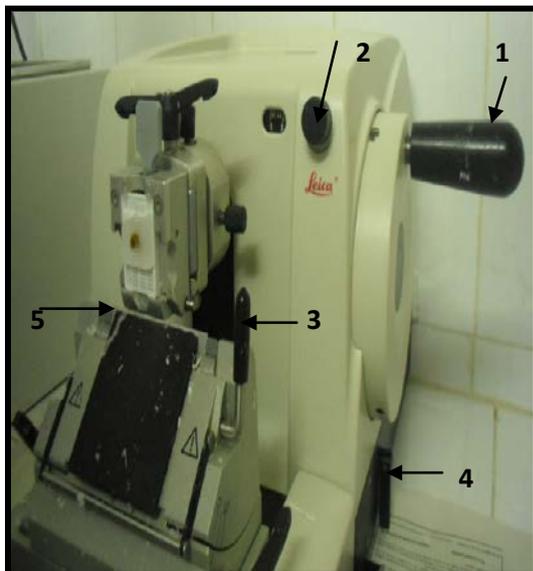


Figure 31: *Microtome Leica RM2125RT*

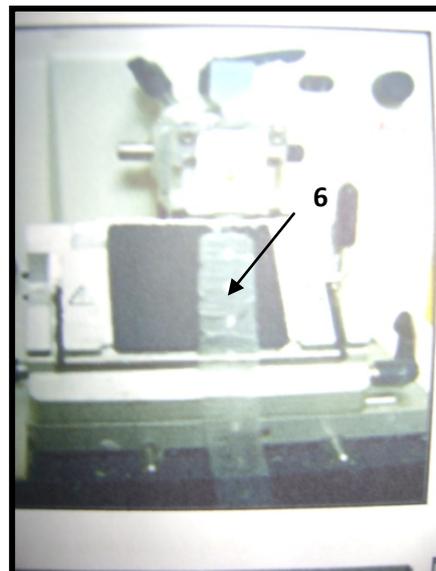


Figure 32: Le ruban

(1) : Roue de déplacement vertical du porte bloc , (2) : Molette de réglage d'épaisseur de la coupe , (3) : Molette de déplacement horizontale du porte lame ,(4) : levier de blocage du bloc de paraffine , (5) : Porte lame, (6) :Le ruban .

III.5. Etalement des coupes :

Le ruban recueilli à l'aide d'un pinceau et placées dans le bain marri (**Fig.34**),

Sur des lames bordées et étiquetées, on étale de l'eau gélifiée. Chaque fois une lame est introduite dans le bain marie afin de récupérer quelques coupes (**Fig.35**), pour les étaler sur une platine chauffante à 37 ° c, les lames étalées sont placées dans l'étuve pendant 48heurs (**Fig. 36**), avant la coloration.



Figure34: Rubans dans le bain marie



Figure 35: Récupération des coupes



Figure 36: Etuve de conservation des lames

Figure 37 : Etapes d'étalement des coupes (**Photos originales, 2013**).

3.6. Coloration topographique :(Trichrome de Masson)



Figure38: Hématoxyline (Photo originale, 2013).



Figure39: Fuchsine Ponceau (Photo originale, 2013).



Figure40: bleu d'aniline (Photo originale, 2013).



Figure41: Alcool 100° (Photos originales, 2013).

3.7. Montage



Figure 42: Immersion de la lame dans xylène (Photo originale, 2013).



Figure 43: Le Montage (Photo originale. 2013).



Figure 44: Lame pour observation (Photo originale, 2013).



Figure 45: Microscope photonique : « Leica DME », avec un appareil photo numérique de marque : Canon PowerShot A80 (Photo originale, 2013).

Remarque :

**Le nombre d'échantillons n'est pas représentatif
suite à un manque de moyens.**