

N° Ordre.....FSI/UMBB/2016

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES



Faculté des Sciences de l'Ingénieur

Thèse de DOCTORAT

Présentée par :

Sofiane ZIDANI

En Vue de l'obtention de diplôme de **DOCTORAT** en :

Filière : Génie des procédés

Option : Technologie Alimentaire

THEME :

**Évaluation de la capacité des pelures de tomate à contrecarrer ou à
corriger la stéatose hépatique non alcoolique induite par un régime
hyperlipidique et hypercholestérolémique chez la souris**

Devant le jury composé de :

M ^r . Salem BENAMARA	Professeur	UMBB	Président
M ^r . Ali AMMOUCHE	Professeur	ENSA	Directeur de thèse
M ^r . Elhadj Ahmed KOCEIR	Professeur	USTHB	Examineur
M ^r . Arezki BITAM	Professeur	ENSA	Examineur
M ^r . Abdelouahab NOUANI	MC /A	UMBB	Examineur
M ^r . Amar BENAKMOUM	MC/A	UMBB	Invité
M ^{me} . Souheila ABBEDDOU	PhD	ETH, Zürich	Invitée

Année universitaire : 2016 /2017

ملخص

الحماية الغذائية لمرض الكبد غير الكحولي، الناتج عن الإفراط في استهلاك الأطعمة الدهنية والسكرية ، إلى جانب وجود انخفاض كبير في استهلاك الطاقة يمثل مسألة مهمة للصحة العامة. الاكتشاف الأخير للعلاقة الوثيقة بين مقاومة الأنسولين، العلامة المهمة لمرض الكبد غير الكحولي وإجهاد الأكسدة أدى بنا إلى اعتبار العناصر الغذائية المضادة للأكسدة، كعوامل غذائية مهمة في سياسة الحماية من مرض الكبد غير الكحولي.

لقد أظهرت العديد من الدراسات أثر الطماطم الإيجابي في الجسم الحي، ولكن لم تقم أي دراسة بتحديد تأثير تركيز بودرة قشور الطماطم على أمراض الكبد و التمثيل الغذائي للسكريات. الهدف من هذه الدراسة يتوقف على استبيان دور بودرة قشور الطماطم في تحويل التوازن الدهني - السكري ، تحسين مقاومة الانسولين و الحماية من تكمل الدهون في الكبد، و ذلك باستعمال نظام غذائي غني بالدهون المشبعة والكوليسترول في الفئران.

اربعون فارة (BALB/c) في الأسبوع الثامن من العمر، تم تقسيمها إلى أربع مجموعات: **(1) (Ctrl)** (15%) زيت عباد الشمس (ن = 7-10). **(2) (HSF/HC)** حمية غنية بالدهون المشبعة (5% زيت جوز الهند) والكوليسترول (1.25% من الكوليسترول)، (ن = 7-10). **(3) (HSF/HC TP1)** حمية غنية بالدهون المشبعة (5% زيت جوز الهند) والكوليسترول (1.25% من الكوليسترول) تستكمل مع 9% من بودرة قشور الطماطم (ن = 7-10). **(4) (HSF/HC TP2)** حمية غنية بالدهون المشبعة (5% زيت جوز الهند) والكوليسترول (1.25% من الكوليسترول) تستكمل مع 17% من بودرة قشور الطماطم (ن = 7-10).

ان بودرة قشور الطماطم، ، الغنية بالكاروتينات، لا سيما الليكوبين، زيادة على دورها كمضاد للأكسدة على بيروكسيد الدهون، تعتبر كعامل قوي لتوازن التمثيل الغذائي للدهون و الكربوهيدرات، وهذا ما قد يفسر التحسن في نسبة سكر الدم في نموذج امراض الكبد غير الكحولية. كذلك، تعديل مقاومة الانسولين يؤكد فعالية بودرة قشور الطماطم ضد تصلب الشرايين. هذه النتائج التجريبية الاولية تبين أهمية الاستخدام المباشر لبودرة قشور الطماطم، مصدر للعناصر المضادة للأكسدة، في الوقاية من مرض مقاومة الانسولين و امراض الكبد غير الكحولية. مع ذلك، فإن العديد من القيود بسبب الظروف التجريبية، تلزم علينا متابعة هذا العمل بدراسات مباشرة على الانسان تستعمل فيها خلطة من المكملات، بودرة قشور الطماطم، ومستخلصات الطماطم (عصير، الخل).

الكلمات المفتاحية : مكمل، بودرة قشور الطماطم، الليكوبين، حمية غنية بالدهون المشبعة و الكوليسترول، مرض الكبد غير الكحولي، مقاومة الانسولين، مضاد للأكسدة، فارة.

Résumé

La prévention nutritionnelle de la stéatose hépatique non alcoolique (NASH), due à une surconsommation d'aliments gras et sucrés, couplée à une diminution drastique de la dépense énergétique, apparaît comme un enjeu important de Santé publique. La découverte récente des relations étroites entre l'insulinorésistance, signe majeur de la NASH et le stress oxydant, nous a conduit à considérer les nutriments antioxydants, comme des facteurs nutritionnels de choix dans la stratégie de prévention de la NASH.

Plusieurs études ont mis en évidence l'effet bénéfique de la tomate *in vivo*, mais aucune étude n'a déterminé l'effet-dose de la poudre des pelures de la tomate (PPT) sur la stéatose hépatique et le métabolisme glucidique. Le but de ce travail consistait à étudier le rôle de la poudre de pelure de tomate (PPT) dans la modulation de l'homéostasie lipido-glucidique, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et la prévention de la stéatose, induite par un régime riche en lipides saturés et en cholestérol (HSF/HC) chez la souris. 40 souris BALB/c (18 ± 2 g), âgées de huit semaines ont été divisées en quatre groupes : **1**) Régime contrôle avec 15 % d'huile de tournesol (Ctrl ; n = 7 à 10), **2**) Régime riche en lipides saturés et en cholestérol avec 5 % de l'huile de coprah et 1.25 % de cholestérol (HSF/HC ; n = 7 à 10), **3**) Régime riche en lipides saturés et en cholestérol, supplémenté avec 9% de poudre de pelures de tomate (HSF/HC TP1 ; n = 7 à 10), **4**) Régime riche en lipides saturés et en cholestérol, supplémenté avec 17 % de poudre de pelures de tomate (HSF/HC TP2 ; n = 7 à 10).

La PPT, riche en caroténoïdes, principalement le lycopène, non seulement exerce une protection antioxydante sur la peroxydation lipidique mais, est également de puissant modulateur des métabolismes glucidiques et lipidiques, ce qui pourrait expliquer l'amélioration de la glycémie sur notre modèle de NASH. La modulation de l'insulinorésistance confirme l'effet anti-athérogène de la PPT.

Ces premiers résultats expérimentaux démontrent la pertinence de l'utilisation directe de la PPT source de nutriments antioxydants dans la prévention de l'insulinorésistance et la NASH. Cependant, les nombreuses limites dues aux conditions expérimentales imposent de poursuivre ce travail par des études d'intervention chez l'homme, associant dans une supplémentation combinée, PPT et les extraits de tomates (jus, vinaigre).

Mots-clés : Supplémentation - PPT - lycopène - régime HSF/HC - NASH - insulinorésistance - antioxydants - souris.

Summary

The incidence of the hepatic steatosis is increasing in world. The reasons for this are numerous but remain incompletely understood. The evolution of our lifestyles, especially our eating habits with the overconsumption of fatty and sugary foods, coupled with a drastic decrease in energy expenditure undoubtedly plays a major role. Considering the relationship between insulin resistance and oxidative stress, which are present in NASH, we hypothesized that microconstituants, potentially antioxidant, could be of interest in nutritional prevention of the NASH.

Many studies have investigated the effect of crude tomato *in vivo*, but no studies have determined the dose-effect of dry tomato peel (PPT) on hepatic steatosis and glucose metabolism *in vivo*. The aim of this study was to investigate the role of dry tomato peel to improves lipid and glucose homeostasis, insulin sensitivity and hepatic steatosis in mice fed a high-saturated-fat and cholesterol-rich diet for 12 weeks. BALB/c male mice (n=40) (8 weeks old, weighing 22.2 ± 1.0 g) were divided into 4 treatment groups (10 mice/group): 1) high-fat control diet (HF Ctrl), which contains sunflower oil as a sole source of fat, 2) high-saturated-fat/high-cholesterol diet, 3) high-saturated-fat/high-cholesterol diet supplemented with 9% PPT, and 4) high-saturated-fat/high-cholesterol diet supplemented with 17% PPT.

Dry tomato peel, rich in caroténoïde, principalment le lycopène, act as antioxidant in protecting lipid peroxydation, and modulate glucose and lipid metabolism. Among mice fed the HSF/HC diet, PPT supplementation appears to have a beneficial effect on insulin resistance, which confirms the anti-atherogenic effect of PPT.

These experimental data strongly suggest the interest of directly utilization of PPT, rich in antioxidant nutrients, in the prevention of insulin resistance and hepatic steatosis. However, with respect to the numerous experimental limits, further interventional trial in man, associating PPT and tomato extract (juice and vinegar) are needed.

Key-words : Supplementation - PPT - lycopene - HSF/HC diet - NASH - insulin resistance - antioxidant- mice.

REMERCIEMENTS

*Mes tous premiers remerciements, iront à mon directeur de thèse, **le professeur AMMOUCHE Ali** pour m'avoir proposé le sujet, pour l'autonomie qu'il m'a laissée, pour ses conseils, sa disponibilité et surtout sa patience...*

*J'adresse mes sincères remerciements au **Professeur Salem BENAMARA**, Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Je le remercie pour sa disponibilité et ses remarques constructives.*

*Je remercie vivement le **Professeur Elhadj Ahmed KOCEIR**, pour sa participation à mon jury de thèse et pour avoir accepté de consacrer du temps, examiner et juger ce travail comme rapporteur, et pour siéger dans ce jury en y apportant sa compétence et son expertise.*

*Mes remerciements sincères et respectueux vont également au **Professeur Arezki BITAM** pour sa participation à mon jury de thèse et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail, qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.*

*Je tiens à remercier le Docteur **Abdelouaheb NOUANI**, qui a accepté d'être examinateur de ma thèse et qui a sacrifié de son temps pour juger ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements au **Docteur BENAKMOUM Amar** pour avoir co-encadré cette thèse. Je le remercie pour sa disponibilité et ses remarques constructives...*

*Je remercie particulièrement **Madame BELKADI Asma**, Docteur du CRD-Saidal Algérie, pour son aide et ses compétences techniques, sa très grande disponibilité, et sa gentillesse.*

*Mes vives remerciements au Docteur **BENALI Yassmina** et toute l'équipe du laboratoire Bio-pathologie de l'Institut Pasteur Algérie, pour l'accueil, la disponibilité et l'assistance.*

*Je remercie infiniment le **Docteur Abdelhak MANSOURI** pour sa précieuse collaboration dans ce travail. Qu'il me soit permis de lui exprimer dans ces lignes toute ma reconnaissance et mon profond respect.*

*Je voudrais témoigner ma reconnaissance à **Souheila ABBEDDOU**, pour son aide précieuse lors de la rédaction de la publication. Je la remercie particulièrement pour son exigence, sa disponibilité, ses encouragements, et ses conseils très précieux, je suis très reconnaissant de la confiance qu'elle m'a témoignée.*

*Enfin que toutes les personnes du laboratoire LRTA, et particulièrement le directeur de laboratoire le **Professeur LOUHAB Krim**, trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.*

....Spéciale dédicace à celle qui a tout supporté durant la réalisation de ce travail, mon épouse BACHIRA, ...et nos adorables bambins, Inam, Khadidja et RezkALLAH.... !

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

PREMIERE PARTIE : ETAT DES CONNAISSANCES

Chapitre I : Pathogénèse de la stéatose hépatique non alcoolique (NASH)

I.1. Stéatose hépatite non alcoolique 6

I.2. First hit: De l'insulinorésistance à la stéatose hépatique 6

I.2.1. Principes du métabolisme lipidique hépatique 8

I.2.2. Lipoprotéines, acides gras libres et stéatose hépatique 8

I.2.3. β -oxydation et stéatose hépatique 10

I.3. Second hit: De la stéatose hépatique à la NASH 13

I.3.1. Stress oxydant et insulinorésistance 16

I.3.2. Alimentation et stress oxydant 17

I.3.3. Antioxydants alimentaires et métabolisme du glucose 19

I.4. Références bibliographiques 21

Chapitre II : Effets protecteurs du lycopène de la tomate

II.1. Tomate et lycopène 25

II.1.1. Description du lycopène de la tomate 26

II.1.2. Absorption, transport du lycopène 27

II.1.3. Métabolisation du lycopène, ses métabolites 32

II.2. Effets bénéfiques du lycopène sur les maladies du foie et autres pathologie 32

II.2.1. Lycopène et la stéatose hépatique non alcoolique 32

II.2.2. Lycopène et inflammation 32

II.2.3. Effets du lycopène sur le tissu adipeux 33

II.2.4. Prévenir les dommages oxydatifs 33

II.2.5. Répartition tissulaire 34

II.3. Synthèses des travaux sur le mécanisme d'action du lycopène	34
II.4. Références bibliographiques.....	37

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III : Matériel et méthodes

III.1. Modèle animal et régime alimentaire de la stéatose hépatique non alcoolique...41	41
III.1.1. Introduction	41
III.1.2. Composition des régimes alimentaires.....	42
III.1.3. Animaux et conditions d'élevage	44
III.1.4. Problèmes rencontrés	44
III.2. Les analyses biologiques	45
III.2.1. Evaluation de la résistance à l'insuline	45
III.2.2. Sacrifice et prélèvements biologiques	46
III.2.3. Analyses et dosages sériques.....	47
III.2.4. Dosage des marqueurs hépatiques.....	47
III.2.5. Marqueurs de peroxydation lipidique (Mesure des TBARS) (Thiols Barbituric Acide Reactive Species).....	47
III.2.6. Extraction et dosage du lycopène sérique	48
III.2.7. Etude histologique du foie.....	48
III.2.8. Analyses statistiques	50
III.3. Références bibliographiques	51

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1. Effet de la supplémentation en poudre de pelures de tomate sur la prise alimentaire, poids des souris, poids du foie et du tissu adipeux	52
IV.2. Effet de la supplémentation en PPT sur la teneur en lycopène sérique.....	54
IV.3. Effet de la supplémentation en PPT sur la tolérance au glucose et l'insulinorésistance	55
IV.4. Impact des différents régimes sur la glycémie, l'insulinémie et le taux des triglycérides plasmatiques des souris après 12 semaines d'élevage	60
IV.5. Profil lipidique plasmatique	63
IV.6. Evaluation des TBARS (Thiols Barbituric Acide Reactive Species).....	66
IV.7. Etude hépatique.....	67
IV.7.1. Bilan hépatique	67

IV.7.2. Analyse histologique.....	70
IV.7.3. Effets de la PPT dans le foie	73
IV.8. Discussion générale et perspectives.....	74
IV.8.1. Principaux résultats	74
IV.8.2. Avantages et limites du modèle animal	80
IV.8.3. Limites des paramètres mesurés	80
IV.9. Références bibliographiques	81
Conclusion	86

PRESENTATION DE LA PUBLICATION

ANNEXES

RESUME

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Sources des triglycérides hépatiques	7
Figure 2 : Principales molécules impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines qui peuvent causer une stéatose hépatique	9
Figure 3 : Importance de la relation CPT1A/Malonyl-CoA dans la régulation de la β -oxydation mitochondriale des AGCL.....	11
Figure 4 : Rôle possible du stress oxydant dans la progression d'une simple stéatose à une NASH	14
Figure 5 : Schéma simplifié des voies d'induction du stress oxydant par les acides gras dans des hépatocytes.....	15
Figure 6 : Facteurs environnementaux et génétiques favorisant la stéatose et le stress oxydant et mécanismes impliqués dans l'induction de la NASH, l'insulinorésistance et du diabète de type 2 par le stress oxydant	18
Figure 7 : Structure du lycopène	26
Figure 8 : Schéma de la possible voie métabolique du lycopène	31
Figure 9 : Régimes expérimentaux : (a) Régime Ctrl, (b) Régime HL/HC, (c) Régime HL/HC TP1, (d) Régime HL/HC TP2, préparés au niveau des laboratoires de département technologie alimentaire, université de Boumerdes, Algérie.....	43
Figure 10 : Teneur en lycopène sérique des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe	55
Figure 11 : Impact des différents régimes sur l'OGTT des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe	56
Figure 12 : Présentation des aires sous les courbes de l'OGTT des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne, n=10/groupe	57
Figure 13 : Impact des différents régimes sur l'IST des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe	58
Figure 14 : Impact des différents régimes sur la glycémie (a) et l'insulinémie (b) des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. <i>Les lettres différentes sont significativement différentes, ($p < 0,05$)</i>	61

Figure 15 : Indice HOMA_IR calculé à partir de plasma des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe (HOMA_IR = Taux d'insuline à jeun (μ U/ml) x glycémie à jeun (mmol /L)/22.5)	62
Figure 16 : Impact des différents régimes sur la triglycéridémie des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. <i>Les lettres différentes sont significativement différentes, (p < 0,05)</i>	62
Figure 17 : Impact des différents régimes sur le cholestérol total (a) et les lipoprotéines sériques LDL-C (b) et HDL-C (c) glycémie des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. <i>Les lettres différentes sont significativement différentes, (p < 0,05)</i>	64
Figure 18 : Impact des différents régimes sur les concentrations plasmatiques d'acides gras non estérifiés des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. <i>Les lettres différentes sont significativement différentes, (p < 0,05)</i>	65
Figure 19 : Impact des différents régimes sur les concentrations plasmatiques en peroxydes lipidiques des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. <i>Les lettres différentes sont significativement différentes, (p < 0,05)</i>	66
Figure 20 : Impact des différents régimes sur l'activité des aminotransférases (ALAT (a) et ASAT (b) des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. <i>Les lettres différentes sont significativement différentes, (p < 0,05)</i>	68
Figure 21: Impact des différents régimes sur l'activité de l'alkaline phosphatase (ALK) des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. <i>Les lettres différentes sont significativement différentes</i>	69
Figure 22: Impact des différents régimes sur la bilirubine libre (ALK) des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. <i>Les lettres différentes sont significativement différentes</i>	70
Figure 23 : Observation macroscopique et microscopique des foies des souris Ctrl (a), HSF/HC (b), HSF/HC TP1 (c) et HSF/HC TP2 (d) après 12 semaines d'élevage. Les échantillons de foie sont marqués avec de l'hématoxyline et de l'éosine (Grossissement X10). Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. <i>Les lettres différentes sont significativement différentes, (p < 0,05)</i>	71
Figure 24 : Rôles possibles de la PPT dans l'inhibition de la progression d'une simple stéatose à une NASH au niveau des hépatocytes. (a) Etat post-prandial, (b) Effet de la PPT sur l'oxydation mitochondriale.....	73

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tomate : composition et nutriments.....	25
Tableau 2 : Teneur des fruits et légumes en lycopène	27
Tableau 3 : Teneur en lycopène de produits issus de la transformation des tomates.....	27
Tableau 4 : Quantité de lycopène en fonction des tissus.....	28
Tableau 5 : Composition, valeurs nutritionnelle et énergétique des différents régimes alimentaires (% matière sèche).....	42
Tableau 6 : Caractéristiques physiologiques des souris supplémentées par les différents régimes expérimentaux après 12 semaines d'élevage	52
Tableau 7 : Caractéristiques plasmatiques des souris supplémentées par les différents régimes expérimentaux après 12 semaines d'élevage	60

Liste des Abréviations

- ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- AGNE** : Acides gras non estérifiés
- AGS** : Acides gras saturés
- AGCL** : Acides gras à chaîne longue
- ALAT** : Alanine aminotransférase
- ALK** : Phosphatase alcaline
- AMPc** : Adénosine 5' monophosphate cyclique
- ARNm** : Acide ribonucléique messenger
- ASAT** : Aspartate aminotransférase
- ApoC-II** : Apolipoprotéine (est impliquée dans la conversion des VLDL en LDL en activant la LPL)
- ACC** : Acétyl-CoA carboxylase
- BCMO** : Béta-carotene 15,15'-monooxygenase
- BHT** : Butylated hydroxytoluene
- CAT** : Catalase
- CD36** : Fatty acid transporter
- CREB** : cAMP-response element-binding protein
- CPT1** : Carnitine palmitoyltransférase 1 hépatique
- CoA** : Coenzyme A
- ChREBP** : Carbohydrate responsive element-binding protein
- CYP** : Nitrophenol hydroxylase
- Da** : Dalton
- FAS** : Fatty acid synthase
- HDL** : Lipoprotéines de haute densité
- H.E** : Hématéine-Eosine
- HL-60** : Human leukemia
- HMG-CoA** : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase
- HNF** : Hepatocyte nuclear factor
- HNE** : Hydroxynonéal
- HOMA**: Homeostasis Model Assessment
- HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance
- HSF/HC** : High Saturated Fat / High Cholesterol

IHS : Indice hépato-somatique

IL : Interleukine

IST : Test de sensibilité à l'insuline

GPX : Glutathion peroxydase

LDL : Lipoprotéines de basse densité

LPL : Lipoprotéine lipase

LPS : Lipopolysaccharide

MDA : Malondialdéhyde

MMP : Matrix metalloproteinase

NASH: Non-alcoholic steatohepatitis (stéatose hépatique non alcoolique)

NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease (maladie du foie stéatosé non alcoolique)

NF- κ B : Nuclear factor-kappaB

Nrf2 : NF-E2-related factor 2

O GTT : Test oral de tolérance au glucose

PPT : Poudre de pelures de tomate

PPAR : Peroxisome-proliferator activated-receptor

PGC-1 : Peroxisome-proliferator activated-receptor 1

PDE : Phosphodièstérase

PKA : Protéine kinase A

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RAR : Récepteur aux acides rétinoïques

SCD : Acyl-CoA desaturase

SREBP-1c : Sterol regulatory element-binding protein 1c

SOD : Superoxyde dismutase

SRB1 : Scavenger receptor B1

TBA : Acide 2- Thiobarbiturique 4.6-Dihydroxypyrimidine 2-thiol

TBARS : Thiols Barbituric Acide Reactive Species

TCA : Acide trichloroacétique

TG : Triglycérides

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

VLDL: Very low density lipoprotein.

INTRODUCTION

Introduction générale

Au cours des dernières décennies, les maladies chroniques liées à l'alimentation sont devenues plus fréquentes dans le monde entier chez les personnes à tous les âges. En effet, l'ingestion calorique est restée constante durant ce dernier siècle alors que notre activité physique ne fait que diminuer. De plus notre alimentation est devenue trop riche en terme calorique, trop riche en acides gras saturés et en sucres tel le saccharose ou le fructose. La balance énergétique, c'est-à-dire l'équilibre entre l'ingestion calorique et la dépense énergétique, est devenue positive, résultant en une augmentation de la masse grasse chez les individus [1].

Ce surpoids entraîne une augmentation des risques de plusieurs pathologies, principalement les maladies du foie. Plusieurs études ont démontré que les personnes en surcharge pondérale, ou atteintes d'obésité, peuvent développer une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation de lipides, sous forme de triglycérides, au niveau du foie. Il a été estimé en Amérique du nord que 60 à 95% des obèses et 21 à 55% des diabétiques présentent une stéatose hépatique [2-5], alors que la prévalence de celle-ci n'est que de 15 à 25% dans la population générale [6]. Il est également important de noter que la stéatose touche aussi un grand nombre d'enfants obèses (jusqu'à 55% d'après certaines études) [1, 7]. Mais la stéatose n'est qu'une seule des composantes observée lors d'atteintes hépatiques chez les patients obèses et diabétiques. L'ensemble de ces désordres hépatiques sont regroupés sous le terme de "Non Alcoholic Fatty Liver Disease» (maladie du foie stéatosé non alcoolique) (NAFLD) [8].

La caractéristique physiopathologique classiquement observée dans la stéatose hépatique non alcoolique est l'insulino-résistance [9], cause du déclenchement du diabète type 2. En 2008, la prévalence normalisée selon l'âge du diabète était 9,8 % chez les hommes et 9,2 % chez les femmes, contre 8,3 % et 7,5 % en 1980 [10]. Le diabète de type 2, qui est lié au régime alimentaire, représente 90% des diabètes rencontrés dans le monde [11]. Le stress oxydant est considéré parmi les facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel le diabète, et il a été longtemps suggéré comme mécanisme unificateur liant l'apport alimentaire excessif, la résistance à l'insuline, le syndrome métabolique et le diabète [12, 13]. Les causes du diabète de type 2 sont nombreuses et, dans bien des cas, c'est la combinaison de plusieurs facteurs qui déclenche l'apparition de la maladie, principalement, les habitudes alimentaires, le niveau de l'activité physique [12].

La découverte récente des relations étroites entre l'insulinorésistance, signe majeur de la NASH, et le stress oxydant (déséquilibre de la balance des produits pro-oxydants/antioxydants) devrait conduire à considérer les nutriments, à la fois antioxydants et potentiellement insulinosensibilisateurs, comme des facteurs nutritionnels de choix dans la stratégie de prévention de la NASH [14].

Les fruits et légumes constituent une source importante de phytonutriments tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les caroténoïdes, dotés d'une forte activité antioxydante *in vitro* [15-19]. Ces phytonutriments ont attiré l'attention des chercheurs depuis de nombreuses années en raison de leur fonction de protection potentielle contre les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) [20, 21].

Parmi les nutriments à prendre en compte, les caroténoïdes, principalement le lycopène, occupent une place de choix. Le lycopène est transporté par les lipoprotéines de basse densité (LDL), où il agit comme un antioxydant *in vivo*, ce qui indique peut-être son importance biologique potentielle dans le système de défense antioxydant humain [22]. Cependant, des essais *in vivo* montrent que la poudre de tomate a un effet bénéfique sur la peroxydation lipidique et les triglycérides hépatiques plus important par rapport à celui de l'extrait du lycopène [23, 24]. Il a été émise l'hypothèse que la tomate contient une pléthore de nutriments et de composés phytochimiques, y compris l'acide folique, la vitamine C, les caroténoïdes et les composés polyphénoliques, dotés des propriétés antioxydantes et, en combinaison avec le lycopène, leur efficacité augmente contre le stress oxydatif.

Les antioxydants d'origine alimentaire sont donc, dans la NASH, et de façon générale, des facteurs importants de lutte et de prévention. Compte tenu de la diminution de la sensibilité à l'insuline qui se développe également dans cette pathologie, les facteurs nutritionnels qui améliorent la sensibilité à l'insuline et ont, de surcroît, un fort pouvoir antioxydant, devraient agir efficacement et réduire les altérations métaboliques et l'incidence du diabète et des maladies NAFLD. Si cette hypothèse se confirmait, une stratégie simple d'identification de tels facteurs nutritionnels et de prévention nutritionnelle de la NASH pourrait être mise en œuvre, et répondre ainsi à un problème important de santé publique.

Les caroténoïdes de la tomate font partie des nutriments les plus étudiés ces dernières années, en raison de leur pouvoir antioxydant [25] et leur effets bénéfiques sur le cancer de prostate [26]. Cependant, malgré l'évidence de leur intérêt potentiel dans la prévention du syndrome métabolique, peu de travaux à ce jour se sont intéressés à vérifier l'effet de leur

consommation à la fois sur la modulation de l'intolérance au glucose, sur la sensibilité à l'insuline et sur les marqueurs hépatiques dans la maladie du foie stéatosé non alcoolique (NASH).

Parmi les approches étudiées pour contrecarrer le développement de la stéatose hépatique, on peut citer celle qui a étudié l'effet d'un régime hyperlipidique/hypercholestérolémique sur le métabolisme hépatique des souris supplémentées par le lycopène de jus de tomate, en mesurant les marqueurs antioxydants classiques [27].

Mais, à notre connaissance, aucune étude n'a traité l'effet-dose de la poudre des pelures de tomate sur l'insulinorésistance, caractéristique physiopathologique classique observée dans la stéatose hépatique non alcoolique NASH, et sur la dyslipidémie. Par conséquent, il serait intéressant de voir quel est le rôle possible de la poudre des pelures de tomates dans la prévention ou la diminution de la NASH.

Compte tenu de la forte consommation de lipides saturés dans la société moderne, notre objectif est de simuler un environnement oxydatif élevé chez la souris en utilisant un régime riche en lipides saturés et en cholestérol, ensuite, de mettre en évidence les effets de différentes doses de la poudre de pelures de tomate (PPT) dans un modèle expérimental de NASH sur la tolérance au glucose, la résistance à l'insuline, et la stéatose hépatique.

Références bibliographiques

1. Caroline R: Stéatohépatite et adaptations métaboliques: Effets d'un régime enrichi en lipides saturés, ou carencé en choline et méthionine, sur la bioénergétique et le métabolisme hépatique de rat. *UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1* 2007.
2. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW: The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990, 11:74-80.
3. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA: Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994, 107:1103-1109.
4. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD: Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999, 30:1356-1362.
5. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ: Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999, 116:1413-1419.
6. Browning JD, Horton JD: Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004, 114:147-152.
7. Angulo P: Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002, 346:1221-1231.
8. Diehl AM: Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 1999, 19:221-229.
9. Comert B, Mas MR, Erdem H, Dinc A, Saglamkaya U, Cigerim M, Kuzhan O, Unal T, Kocabalkan F: Insulin resistance in non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Liver Dis* 2001, 33:353-358.
10. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, et al: National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 2011, 378:31-40.
11. Organization WH: Ten facts about diabetes. 2014 [18 September 2014]; Available from: http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/01_en.html.
12. Avignon A, Hokayem M, Bisbal C, Lambert K: Dietary antioxidants: Do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism? *Nutrition* 2012, 28:715-721.
13. Bloch-Damti A, Bashan N: Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005, 7:1553-1567.
14. Postic C, Girard J: The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* 2008, 34:643-648.
15. Flourie F, Arab K, Rossary A, Steghens JP: Effets de différents antioxydants sur la lipoperoxydation in vitro initiée par le radical °OH. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2006, 21:229-233.
16. Kong KW, Khoo HE, Prasad KN, Ismail A, Tan CP, Rajab NF: Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules* 2010, 15:959-987.
17. Shixian Q, Dai Y, Kakuda Y, Shi J, Mittal G, Yeung D, Jiang Y: Synergistic Anti-Oxidative Effects of Lycopene with Other Bioactive Compounds. *Food Reviews International* 2005, 21:295-311.
18. Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang J: Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, Are Powerful Antioxidants Using an in Vitro Oxidation Model for Heart Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995, 43:2800-2802.

19. Kato Y, Nagao A, Terao J, Osawa T: Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003, 67:1136-1139.
20. Margetts B: FAO/WHO launch expert report on diet, nutrition and prevention of chronic diseases. *Public Health Nutr* 2003, 6:323-325.
21. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA: A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007, 18:567-579.
22. Agarwal S, Rao AV: Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids* 1998, 33:981-984.
23. Alshatwi AA, Al Obaaid MA, Al Sedairy SA, Al-Assaf AH, Zhang JJ, Lei KY: Tomato powder is more protective than lycopene supplement against lipid peroxidation in rats. *Nutr Res* 2010, 30:66-73.
24. Basu A, Imrhan V: Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials. *Eur J Clin Nutr* 2007, 61:295-303.
25. Véronique Bernier DP, et Daniel Lavoie, Dt.P., M.Sc: Le lycopène : un antioxydant très puissant. *le clinicien novembre 2001* 2001.
26. Campbell JK, Canene-Adams K, Lindshield BL, Boileau TW, Clinton SK, Erdman JW, Jr.: Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. *J Nutr* 2004, 134:3486S-3492S.
27. Bernal C, Martin-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, Garcia-Alonso J, Canovas M, Periago MJ: Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J Nutr Biochem* 2013, 24:1870-1881.

PREMIERE PARTIE :
Etat des connaissances

Chapitre I
Pathogénèse de la stéatose hépatique non
alcoolique (NASH)

PREMIERE PARTIE : Etat des connaissances

Chapitre I : Pathogénèse de la stéatose hépatique non alcoolique (NASH)

I.1. Stéatose hépatique non alcoolique

La stéatose hépatique consiste en une accumulation de lipides dans le foie, à la fois dans les hépatocytes et dans les cellules de Kupffer. Généralement accompagné d'un dérèglement de la voie de signalisation de l'insuline, ce trouble métabolique peut se transformer en NASH (*Non alcoholic steatohepatitis*) ou en fibrose du foie, favorisant l'apparition de certains cancers. Plusieurs mécanismes peuvent mener à la stéatose hépatique, dont une diminution de l'exportation ou de la dégradation des lipides, une augmentation de l'assimilation des acides gras ou une augmentation de la lipogénèse. Le tissu adipeux a également une forte influence sur le métabolisme lipidique hépatique. Autant l'obésité que la lipodystrophie (absence totale ou partielle de tissus adipeux) peuvent mener à une stéatose hépatique. Ceux-ci sont caractérisés par une augmentation des lipides en circulation. Ces lipides sont facilement captés et accumulés dans le foie, d'où l'apparition d'une stéatose [1].

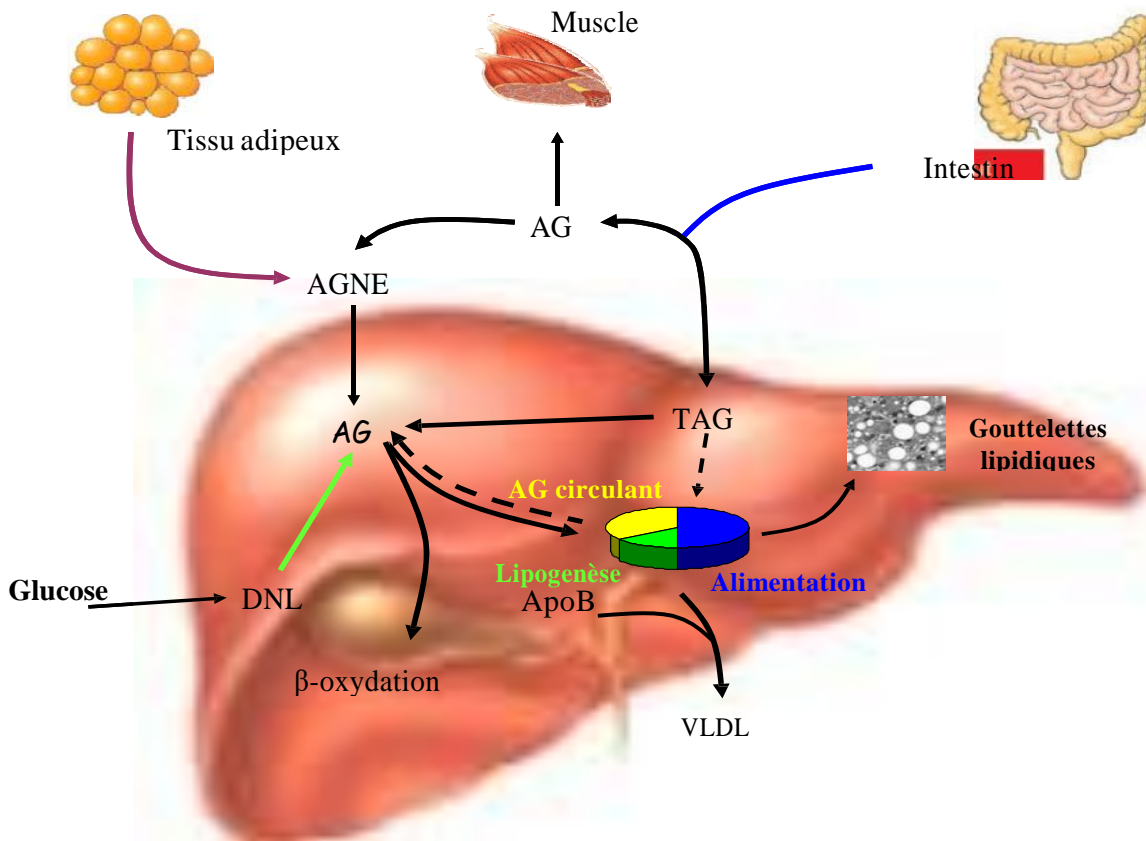
A ce jour, la pathogénèse de la NASH n'est pas encore complètement établie. En 1998, Day et James [2], ont proposé une théorie afin d'expliquer celle-ci, la théorie des deux atteintes ou « two hit hypothesis ». D'après ces auteurs, la première atteinte ou « first hit » correspond à une accumulation de lipides au niveau du foie, plus particulièrement des acides gras et des triglycérides. Une fois la stéatose établie, des adaptations cellulaires se mettent en place. A ce stade, la cellule est devenue plus vulnérable face à son environnement. Une exposition chronique croissante de la cellule à un stress oxydant constitue le « second hit ». Cette deuxième atteinte peut être d'origine environnementale et/ou génétique, et entraîne un phénomène d'apoptose ou de nécrose cellulaire accompagnée d'inflammation qui aboutit au développement d'une stéatohépatite [3].

I.2. First hit: De l'insulinorésistance à la stéatose hépatique

Comme l'ont suggéré Day et James [2], la première étape de la pathogénèse de la NASH serait l'apparition d'une stéatose, suite à une modification de l'homéostasie lipidique au sein de l'organisme due au développement d'une insulinorésistance. En temps normal, en condition « nourri », les acides gras observés au niveau du foie, proviennent à 25-40% de l'absorption intestinale, 50% de la lipolyse adipocytaire, 10-13% de la lipogénèse hépatique (**Figure 1**). Les triglycérides hépatiques ont plusieurs sources, les triglycérides

alimentaires, qui sont transportés, via des chylomicrons, de l'intestin vers le tissu adipeux ou le foie, ou les triglycérides synthétisés à partir d'acides gras libres et de glycérol présents au niveau du foie. Les acides gras nécessaires à la synthèse de triglycérides proviennent des acides gras non estérifiés plasmatiques et des acides gras néosynthétisés au niveau du foie (lipogénèse de novo). Les triglycérides ainsi formés peuvent être stockés sous forme de vésicules lipidiques au niveau du foie, ou sécrétés dans la circulation sanguine sous forme de VLDL. Ils peuvent également entrer dans la voie d'oxydation des lipides.

Les triglycérides, synthétisés à partir de ces acides gras, sont ensuite exportés du foie vers les tissus périphériques sous forme de VLDL (very low density lipoprotein).



AG: acides gras; AGNE: acide gras non estérifiés; ApoB: apolipoprotéine B; DNL: lipogénèse de novo; TAG: triacylglycérol; VLDL : very low density lipoprotein.

Figure 1: Sources des triglycérides hépatiques [2].

Une modification de l'équilibre entre les acides gras délivrés au foie, la synthèse de triglycérides, l'exportation de ceux-ci ou leur oxydation, pourrait donc contribuer au développement d'une stéatose. Plusieurs études ont montré qu'une alimentation riche en

graisse pouvait entraîner une accumulation lipidique au niveau du foie, tant chez l'animal [4] que chez l'homme [5]. En plus des effets directs de l'alimentation sur l'accumulation de lipides au niveau du foie, l'augmentation de l'ingestion calorique peut provoquer une obésité associée à une insulino-résistance. Lors d'une insulino-résistance, l'action inhibitrice de l'insuline sur la lipolyse adipo-cytaire n'est plus observée, aboutissant à une augmentation de l'apport d'acides gras libres au foie. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une absence d'inhibition de la lipolyse par l'insuline, ainsi qu'une concentration élevée d'acides gras circulants ont été observées sur des patients atteints de NAFLD [6]. Une étude menée sur des patients ayant une NAFLD, recevant une alimentation contrôlée, dont 30% des calories provenaient de lipides, a démontré qu'environ 60% des triglycérides hépatiques provenaient des acides gras circulants, 26% de la lipogénèse *de novo* et 15% de l'alimentation. Ces résultats laissent suggérer, qu'en absence de régime hyper-lipidique, la production excessive d'acides gras due à l'insulino-résistance du tissu adipeux serait la source des triglycérides hépatiques. De plus, cette insulino-résistance pourrait également induire une augmentation de la lipogénèse *de novo* [7].

I.2.1. Principes du métabolisme lipidique hépatique

Afin de bien comprendre les mécanismes mis en jeu lors du développement d'une stéatose, il faut tout d'abord ressituer les principes du métabolisme lipidique hépatique en condition contrôle. Les acides gras libres (AGL) qui arrivent au niveau du foie ont plusieurs origines (**Figure 1**). Ils peuvent provenir de l'hydrolyse des lipides alimentaires, être issus de la lipolyse adipo-cytaire ou être directement synthétisés au niveau des hépatocytes par lipogénèse *de novo*. Leur orientation au sein de la cellule hépatique dépend ensuite du statut nutritionnel et hormonal. Les AGL vont soit i) entrer dans la mitochondrie et être β -oxydés pour fournir de l'énergie, soit ii) être estérifiés en triglycérides (TG) (la forme de stockage des AGL). Ces TG vont à leur tour soit être stockés au niveau du cytoplasme des hépatocytes et former des gouttelettes lipidiques, soit être sécrétés sous forme de VLDL, qui sont constitués par un groupement de triglycérides, entouré de phospholipides et d'une protéine appelée apolipoprotéine B (apo B) [6].

I.2.2. Lipoprotéines, acides gras libres et stéatose hépatique

Toutes les cellules ont besoin de lipides pour leur bon fonctionnement. Leur approvisionnement en lipides peut se faire via l'alimentation ou via les AG présents dans la circulation sanguine. En effet, lorsque le contenu en lipide est trop élevé dans un tissu,

l'excès est envoyé sous forme de lipoprotéines dans la circulation sanguine (**Figure 2**). Ces lipoprotéines pourront ensuite fournir les lipides nécessaires aux autres tissus. Les quatre principaux types de lipoprotéines sont les chylomicrons, les VLDL, les LDL et les HDL. Toutes les lipoprotéines ont la même structure de base, c'est-à-dire un cœur riche en triglycérides (TG) et en esters de cholestérol, entouré d'une monocouche de phospholipides, d'apolipoprotéines (apo) et de cholestérol non estérifié [8].

La capacité des hépatocytes à capter des AG dépend de deux facteurs : la disponibilité des AG et la possibilité de les faire entrer dans la cellule (disponibilité des transporteurs d'AG) (**Figure 2**) [9].

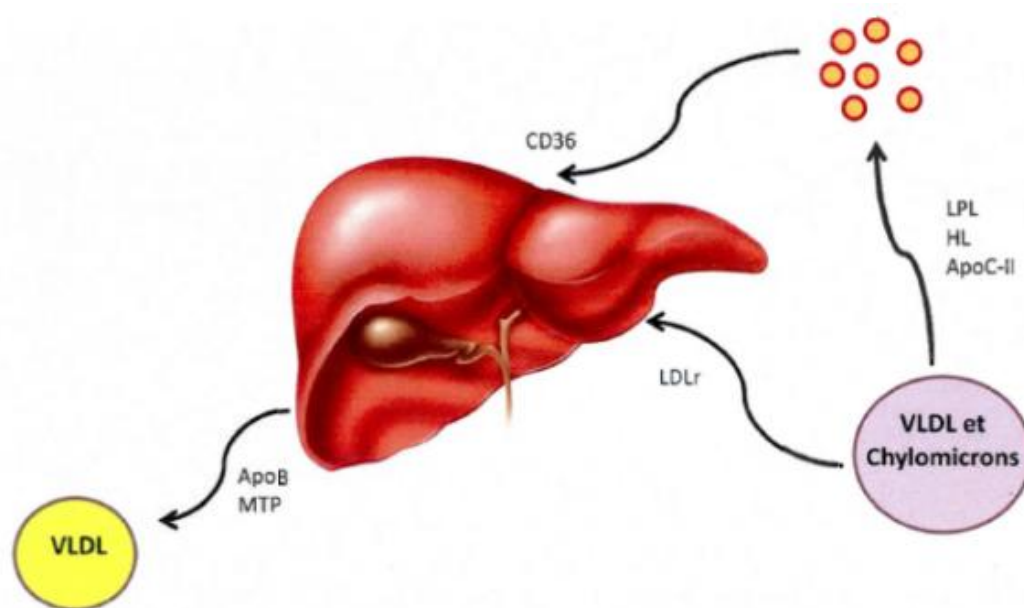


Figure 2 : Principales molécules impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines qui peuvent causer une stéatose hépatique [9].

Les AG alimentaires sont la plus grande source d'AG libres. Puisque le rôle du tissu adipeux est de stocker les lipides, il s'agit du premier tissu à être affecté par une augmentation de la quantité d'AG ou de sucre alimentaires, d'où l'apparition de l'obésité chez des souris déficientes en leptine ou nourries avec une diète riche en gras ou en sucre [10, 11]. Pour ce qui est du foie, il y a une plus grande assimilation d'AG et de sucre tout au long de ce mécanisme, puisqu'une partie des AG alimentaires vont directement au foie et que les chylomicrons non métabolisés retourneront eux aussi au foie. Il y aura donc l'apparition d'une stéatose hépatique [10, 11].

Un autre dérèglement qui peut causer une augmentation de l'assimilation des AG au niveau hépatique concerne les lipases et les transporteurs d'AG. Une diminution de

l'activité des lipases, causée par une mutation dans le gène de la LPL (lipoprotéine lipase) ou dans le gène de l'ApoC-II (Apolipoprotéine), son coactivateur, peut entraîner une chylomicronémie.

Ce syndrome est caractérisé par une forte concentration plasmatique de lipoprotéines riches en TG (VLDL et chylomicrons) et une faible concentration de HDL et de LDL [12]. Puisque les chylomicrons ne sont pas dégradés par les lipases, ils seront éventuellement captés par le foie. Cette forte accumulation de TG hépatique amène donc une stéatose hépatique.

À l'opposé, une augmentation de l'activité des lipases perturbe aussi les niveaux lipidiques sériques. L'hydrolyse accélérée des lipoprotéines riches en TG cause une augmentation des AG libres qui seront captés par les différents tissus, dont le foie. Une surexpression ou une activation de la LPL ou de la HL, localisée au niveau du foie, peut assurément causer la stéatose hépatique, puisque les AG libérés seront plus rapidement assimilés par le foie [13].

Pour ce qui est du transport des AG, CD36 (fatty acid transporter), qui est responsable de la captation des AG au niveau hépatique, semble avoir une grande importance dans la régulation du métabolisme des lipides. En effet, une augmentation de son niveau d'expression peut entraîner l'apparition de troubles métaboliques, telles que la stéatose hépatique, l'obésité, la résistance à l'insuline et l'inflammation [14]. Une diminution de son expression, quant à elle, peut causer d'autres troubles métaboliques telles qu'une hypertriglycéridémie et une hyperglycémie [14-16]. Une surexpression de CD36 au niveau hépatique aura un effet local. Une plus grande assimilation d'AG libres circulants provoquera une accumulation de TG et éventuellement une stéatose hépatique.

Finalement, la formation des VLDL est très importante pour le foie puisqu'elle permet d'exporter les lipides synthétisés de nouveau dans la circulation sanguine. Une diminution du taux d'expression de l'apoB ou de la MTP provoque une diminution du taux de formation et de sécrétion de VLDL, pouvant ainsi causer une stéatose hépatique, puisque les AG ne seront pas éliminés assez rapidement et donc s'accumuleront [17].

I.2.3. β -oxydation et stéatose hépatique

La β -oxydation est un mécanisme indispensable pour les hépatocytes. En plus de son rôle primaire qui est de fournir de l'énergie aux cellules, elle permet de diminuer la quantité de lipides stockés en surplus dans le foie, lorsque l'apport en AG est trop important.

Plusieurs facteurs peuvent mener à une diminution de l'oxydation des AG et causer une stéatose hépatique. La cause la plus fréquente provient d'une augmentation de la quantité de malonyl-CoA au niveau de la mitochondrie, ayant pour effet d'inhiber CPT1 (Carnitine palmitoyltransférase 1 hépatique) et donc de causer un ralentissement de l'entrée des AG dans la mitochondrie [18, 19]. Une diminution du niveau d'expression ou de l'activité d'enzymes impliqués dans l'oxydation des AG peut également mener à la stéatose hépatique. C'est ce qui a été rapporté par Ibdah *et al* [20] lorsqu'ils ont étudié des souris hétérozygotes pour une perte de fonction de la protéine mitochondriale trifonctionnelle, qui est impliquée dans l'oxydation mitochondriale des AG.

La β -oxydation a lieu dans la matrice mitochondriale. L'entrée des AGL à l'intérieur de celle-ci se fait de deux manières. Lorsque les AGL ont une chaîne carbonée de courte ou moyenne taille ($C < 10-12$), ils passent directement à travers la membrane [21]. Par contre lorsque les AGL ont une chaîne longue ($C > 12$), ils nécessitent un transporteur pour pénétrer à l'intérieur de la mitochondrie. La protéine permettant ce transport est la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1). Elle se situe sur la membrane externe mitochondriale, et son activité est inhibée par le malonyl-CoA (**Figure 3**).

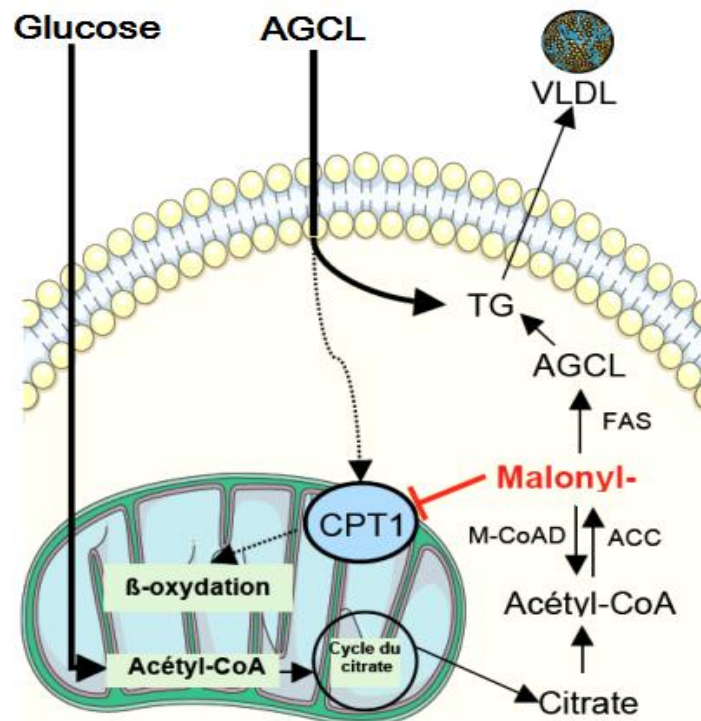


Figure 3 : Importance de la relation CPT1/Malonyl-CoA dans la régulation de la β -oxydation mitochondriale des AGCL [22].

Le malonyl-CoA est formé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et constitue la première étape de la voie de synthèse des acides gras. Ce mécanisme de régulation permet au foie d'utiliser le glucose ou les AGCL (acide gras à chaîne longue) en fonction de leur disponibilité : en période postprandiale le foie utilise préférentiellement le glucose et stocke les AGCL, mais lors d'un jeûne les quantités de glucose disponible diminuent et les AGCL servent alors de substrats énergétiques [6].

L'augmentation de la β -oxydation hépatique ainsi que de la cétogenèse résulte également en partie de l'activation d'un facteur de transcription par les AGL, le peroxysome proliferator-activated receptor α (PPAR- α) (Peroxisome-proliferator activated-receptor). L'activation de PPAR α augmente la transcription de nombreux gènes d'enzymes mitochondriales, comme la CPT-1, l'acyl-CoA déshydrogénase (impliquées dans la β -oxydation) et la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA) (impliquée dans la cétogenèse) [23, 24]. En plus de l'activation de PPAR α , l'augmentation de la sécrétion de glucagon pendant le jeûne joue également un rôle important dans l'activation de la β -oxydation. En effet, en inhibant la phosphodiésterase (PDE), le glucagon augmente la concentration d'AMPc cytoplasmique, ce qui active la protéine kinase A (PKA). Cette PKA va à son tour phosphoryler et activer un facteur de transcription, le cAMP-response element-binding protein (CREB), qui en combinaison avec deux autres facteurs de transcription, l'hépatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) et PPAR- γ coactivator 1 (PGC-1) [25], va augmenter l'expression de la CPT-1.

A l'opposé, en situation postprandiale, la forte concentration de glucose plasmatique et d'insuline oriente plutôt le métabolisme vers une synthèse lipidique [26]. Le glucose capté est oxydé et forme du pyruvate (glycolyse), qui sera transformé en acétyl-CoA et en citrate par la mitochondrie. Ce dernier est ensuite régénéré en acétyl-CoA au niveau du cytosol, puis utilisé pour la synthèse de malonyl-CoA et d'AG par la fatty acid synthase (FAS). Ce haut niveau de malonyl-CoA induit une inhibition de la CPT-1, et donc diminue l'entrée des acides gras dans les mitochondries et les capacités de β -oxydation hépatiques [26]. Les AGL néo-synthétisés ne sont pas dégradés et sont orientés vers la formation de triglycérides qui seront sécrétés sous forme de VLDL [26]. De plus, la stimulation de la glycolyse et de la synthèse lipidique hépatique par le glucose et l'insuline est médiée par l'action synergique de deux facteurs de transcription : sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) et carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP) [27, 28]. En effet, la transcription de ces deux facteurs augmente l'expression d'enzymes clés

de la glycolyse comme la glucokinase, la pyruvate kinase, et de la lipogenèse comme l'acétyl-CoA carboxylase et la FAS.

En résumé, l'insuline tient une place prépondérante dans la régulation du métabolisme lipidique. Il a donc été suggéré que le développement d'une insulino-résistance, notamment au niveau du tissu adipeux, induirait un apport excessif d'acides gras au niveau du foie, provoquant ainsi une stéatose hépatique. La première étape dans la pathogenèse de la NASH serait donc le développement d'une résistance à l'insuline des tissus périphériques. Bien que les mécanismes responsables de la stéatose ne soient pas encore complètement élucidés, l'augmentation de l'arrivée des AGNE au niveau du foie, ainsi que l'augmentation de la synthèse hépatique d'acides gras semblent jouer un rôle primordial.

I.3. Second hit: De la stéatose hépatique à la NASH

Certaines conditions physiologiques ou pathologiques conduisent à une accumulation anormale et excessive de TG dans le foie : stéatose hépatique. Ainsi, l'augmentation de la lipolyse du tissu adipeux, l'augmentation d'apports alimentaires en lipides, la diminution de l'oxydation des acides gras libres et/ou l'augmentation de la lipogenèse hépatique constituent des facteurs susceptibles d'induire une stéatose hépatique [29] (**Figure 4**).

La stéatose (« premier *hit* ») en elle-même n'est pas délétère mais c'est la persistance de cet état qui sensibilise le foie à des facteurs secondaires (« deuxième *hit* ») dont les peroxydes lipidiques, le stress oxydant. Ce « deuxième *hit* » conduit au développement de l'inflammation du foie et aboutit à la stéatohépatite non alcoolique (NASH) (**Figure 4**). La stéatose et la NASH sont communément regroupées sous un terme plus général appelé : maladie du foie stéatosé non alcoolique (NAFLD).

Le stress oxydant en tant que « deuxième *hit* » dans le développement de la NASH est supporté par plusieurs études [30]. En effet, il a été démontré dans des études cliniques chez des patients ayant un foie stéatosé une augmentation de CYP2e1 et CYP4a (oxydases microsomales, facteurs pro-oxydants) et une diminution de l'expression des gènes de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) : enzymes anti-oxydantes impliquées dans la défense cellulaire contre les radicaux libres [31].

Le stress oxydant apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro oxydantes et anti-oxydantes est rompu en faveur de l'état pro-oxydant. Dans les systèmes vivants, une production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de ces espèces réactives est possible. Les défenses

antioxydantes, dont une partie est dépendante de l'alimentation, peuvent être insuffisantes pour empêcher les dégâts cellulaires que peuvent causer les radicaux libres oxygénés [32].

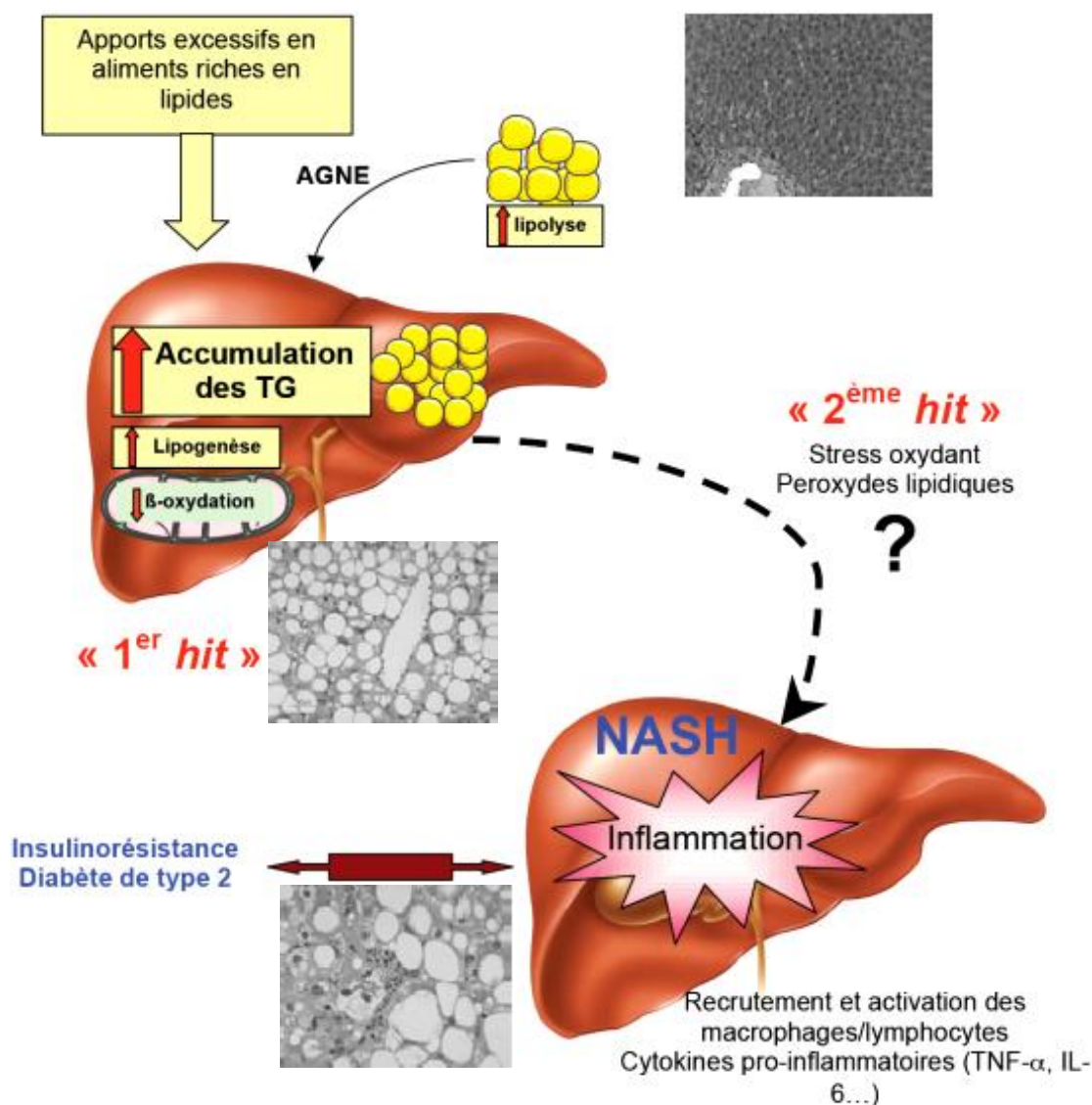


Figure 4 : Rôle possible du stress oxydant dans la progression d'une simple stéatose à une NASH [22]

AGNE : Acides gras non estérifiés
 NASH : Stéatohépatite non-alcoolique
 IL-6 : Interleukine 6
 TNF-α : *Tumor necrosis factor-α*
 TG : Triglycérides

Les conséquences d'un stress oxydant sur une cellule sont multiples. Il induit une peroxydation des lipides de la membrane cellulaire, une dégénérescence cellulaire et une nécrose, ainsi qu'une mort cellulaire par apoptose. Mais si les conséquences d'un stress oxydant sont multiples, les facteurs le déclenchant ne le sont pas moins.

Le facteur le plus important impliqué dans les dysfonctions mitochondriales observé lors de NASH est une production accrue de radicaux libres de l'oxygène (ROS) par les mitochondries. Des études antérieures ont en effet montré que la production de ROS pouvait être augmentée lorsque l'apport d'électrons à la chaîne respiratoire était lui aussi augmenté, pendant l'oxydation de lipides ou de glucose, ou lorsque le flux d'électrons était partiellement bloqué au niveau de la chaîne respiratoire [6].

Les mécanismes impliqués dans l'induction d'un stress oxydant sont multiples. Ils résultent principalement des différentes voies d'oxydation des lipides (mitochondrie, peroxysome, micrososome), qui sont stimulées lors de la NASH. La stimulation de ces voies d'oxydation induit une augmentation de la production de radicaux libres de l'oxygène (ROS). Ces ROS vont interagir avec les acides gras présents en grande quantité au niveau du foie et provoquer la formation d'aldéhydes très réactifs (MDA et 4-HNE) par un processus de peroxydation lipidique (Figure 5).

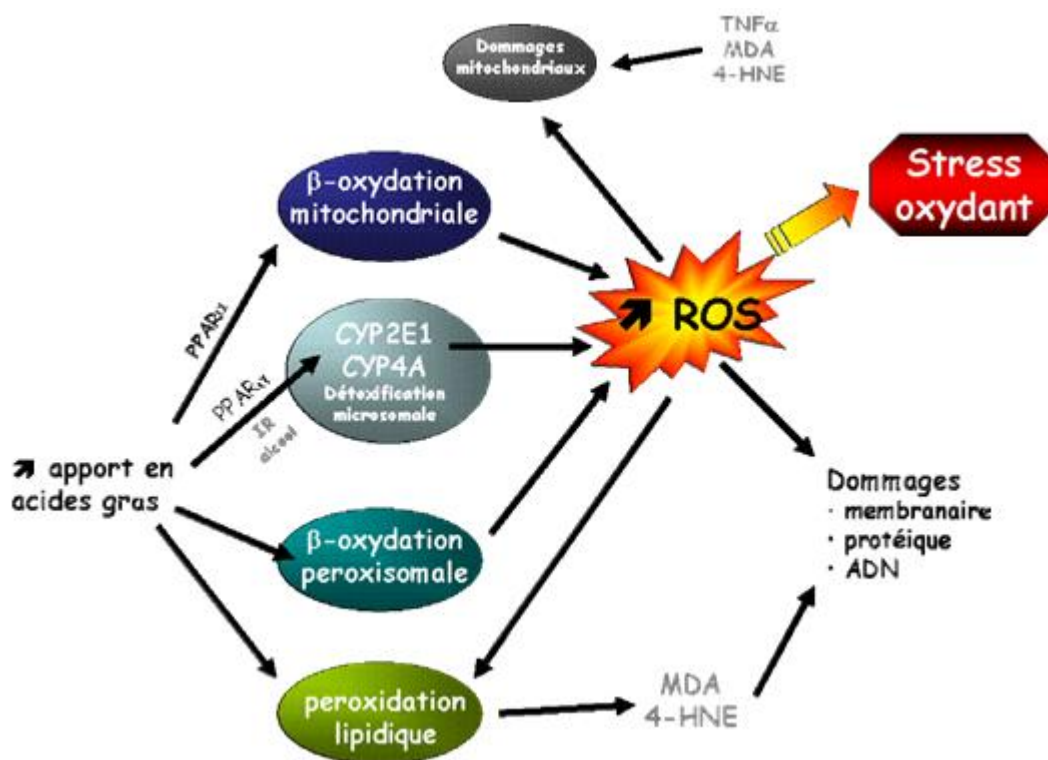


Figure 5 : Schéma simplifié des voies d'induction du stress oxydant par les acides gras dans des hépatocytes [33].

Ainsi, l'augmentation de la production de ROS et de composés peroxydés est responsable de l'induction d'un stress oxydant au niveau hépatique, provoquant les lésions

caractéristiques observées chez des patients atteints de NASH. La production accrue de ROS, associée à une insulino-résistance et à un taux de TNF- α élevé, sont les composantes majeures du stress oxydant déclenchant le « second hit » entraînant l'évolution de la stéatose en stéatohépatite.

En augmentant la production de ROS les mitochondries hépatiques contribuent à l'induction de lésions associées à une NASH. En effet, les ROS stimulent l'expression de plusieurs cytokines comme les TNF- α . Les ROS participent également à l'induction de la peroxydation lipidique qui libère des composés aldéhydes biologiquement très réactifs, comme le MDA. L'association des cytokines et des produits de la peroxydation lipidique pourrait donc déclencher les diverses lésions observées dans les cas de NASH.

I.3.1. Stress oxydant et insulino-résistance

Les espèces réactives oxygénées (ERO), ou radicaux libres (RL), sont des atomes ou molécules possédant un ou plusieurs électrons célibataires, ce qui les rend très instables. Elles tendent, ainsi, à réagir avec de nombreux composés, et notamment les macromolécules situées à proximité de leur site de génération. Les RL sont générés au sein de la cellule, *via* des mécanismes multiples et variés, la source principale d'anions superoxyde étant la mitochondrie à travers la chaîne de transport des électrons [34]. Les facteurs pro-oxydants sont neutralisés par des systèmes antioxydants endogènes enzymatiques, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (Gpx), ou des systèmes non-enzymatiques, comme le glutathion, l'acide urique, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite) (NADPH), le coenzyme Q, l'albumine et la bilirubine. A ces antioxydants endogènes, s'ajoutent des molécules réductrices exogènes provenant de l'alimentation et englobant les vitamines C et E, les caroténoïdes et les polyphénols [35].

- **Le stress oxydant** provient d'un déséquilibre entre la production de RL et les capacités antioxydantes cellulaires. Produits en excès, les RL vont altérer les macromolécules, favorisant ainsi la fragmentation de l'ADN, la peroxydation lipidique ou la carbonylation des protéines. Cependant, les RL, bien connus pour leur implication dans le stress oxydant, sont également des molécules indispensables pour de nombreuses réactions biologiques, au nombre desquelles on compte la transduction du signal de l'insuline. Ils ne doivent donc pas être uniquement perçus comme des molécules toxiques, et l'on entrevoit toute la

difficulté qui peut exister à essayer de les moduler, un excès de neutralisation pouvant conduire à des effets délétères pour la santé [35].

- **L'insulinorésistance (IR)** est définie comme une diminution de l'action de l'insuline, d'une part sur la capture cellulaire du glucose par le muscle et le tissu adipeux et, d'autre part, sur l'inhibition de la production hépatique du glucose. De déterminisme génétique, elle est très largement favorisée par la prise de poids et l'obésité ; elle est au cœur de la physiopathologie du syndrome métabolique et du diabète type 2 (DT2) [36] (**Figure 6**), mais elle est également rencontrée dans des situations aussi diverses que le stress aigu, la grossesse, l'hépatite C, l'acromégalie, les traitements antirétroviraux de type inhibiteur de protéase, les traitements corticoïdes ou anti-inflammatoires non stéroïdiens. Ces mécanismes restent, à ce jour, très incomplètement compris. La voie de signalisation de l'insuline est hautement complexe, constituant un véritable réseau, chaque étape étant interconnectée avec une autre. L'interruption d'une voie peut être compensée par une autre, permettant ainsi la propagation du signal à l'étape suivante. Par conséquent, l'atteinte de plusieurs voies est nécessaire avant que l'IR ne devienne cliniquement manifeste [35].

Le stress oxydant est un dénominateur commun rencontré dans les multiples formes d'IR. Il a fait l'objet de beaucoup d'intérêt ces dernières années [37, 38] et des études suggèrent que la production mitochondriale d'anions superoxyde pourrait constituer un mécanisme central dans la physiopathologie de l'IR et faire le lien entre surconsommation alimentaire et l'IR [39].

I.3.2. Alimentation et stress oxydant

Chez l'homme, le stress oxydant est augmenté en présence d'une obésité, surtout en cas de répartition androïde des graisses (obésité abdominale), et il diminue en cas de perte de poids [35]. La surcharge énergétique, l'augmentation de l'oxydation mitochondriale, l'inflammation de bas grade, le stress du réticulum endoplasmique et les perturbations endocriniennes (dont, notamment, l'hyperinsulinémie), sont en cause dans l'augmentation du stress oxydant associé à l'obésité. Les perturbations métaboliques observées en phase postprandiale pourraient jouer un rôle particulièrement important, les marqueurs de stress oxydant étant augmentés après la consommation d'un seul repas hyperlipidique, hyperglucidique [40]. Ainsi, le contrôle de la glycémie post-prandiale, mais également de la lipémie, par l'exénatide, analogue du *glucagon-like peptide- 1* (GLP-1), induit une

amélioration des marqueurs de stress oxydant après un an de traitement chez des DT2, en comparaison à l'insuline glargine dont les effets sont plus marqués sur la glycémie plasmatique à jeun [41].

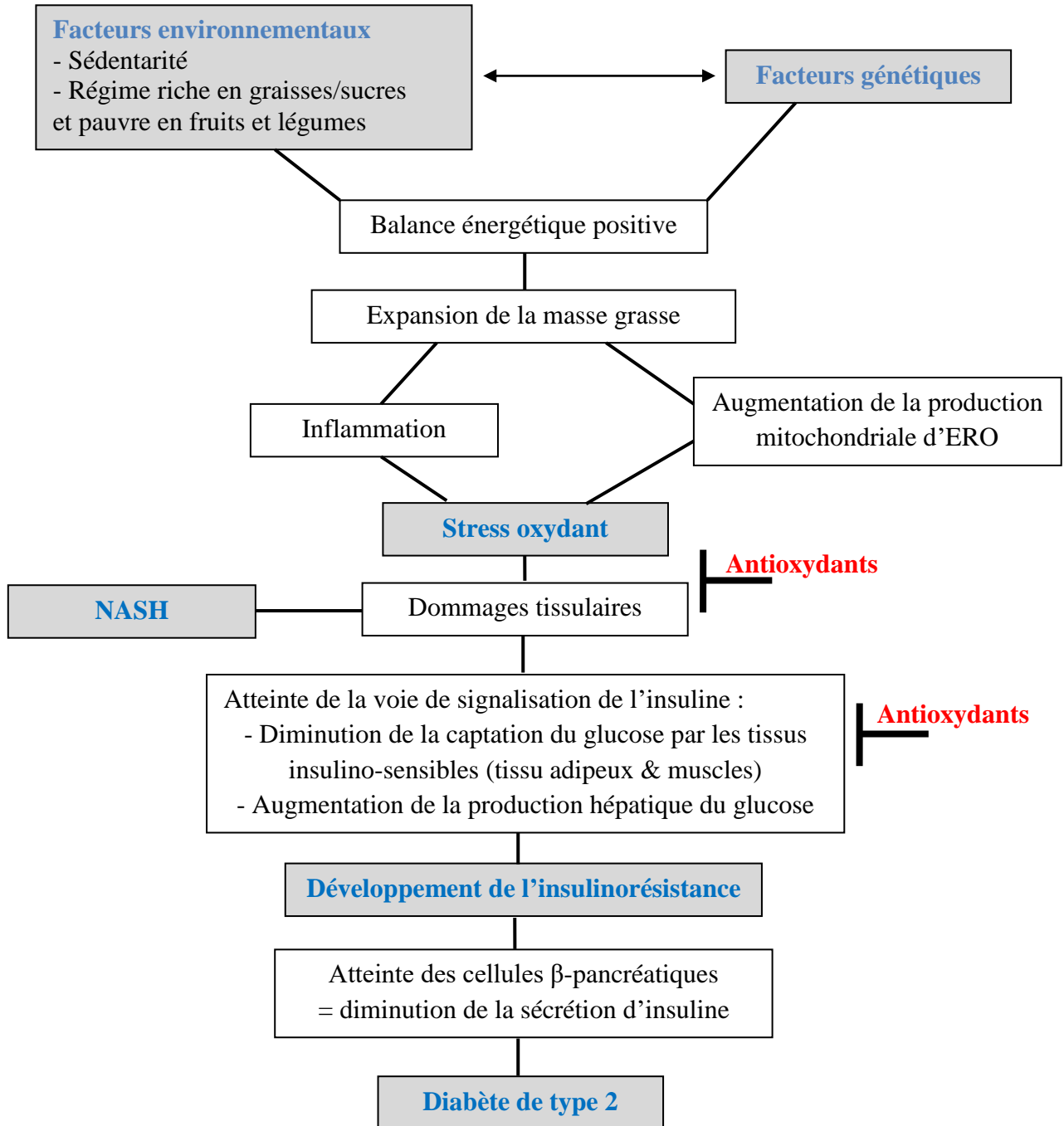


Figure 6 : Facteurs environnementaux et génétiques favorisant la stéatose et le stress oxydant et mécanismes impliqués dans l'induction de la NASH, l'insulinorésistance et du diabète de type 2 par le stress oxydant [36](avec qlq modifications).

Tous les macronutriments, lorsqu'ils sont apportés en excès, sont capables d'activer la production de radicaux libres et, éventuellement, de conduire à un stress oxydant. Les études expérimentales montrent, cependant, que les acides gras (AG) saturés jouent un rôle particulièrement délétère à ce niveau, alors que les AG insaturés, et notamment les AG mono-insaturés, comme l'acide oléique, ont un effet beaucoup plus neutre [42].

I.3.3. Antioxydants alimentaires et métabolisme du glucose

Bien qu'une consommation énergétique excessive puisse être source de stress oxydant, l'alimentation peut également être une importante source d'antioxydants naturels. Les aliments d'origine végétale sont particulièrement riches en composés phytochimiques aux propriétés antioxydantes, comme l'acide ascorbique, les tocophérols, les caroténoïdes, les acides phénoliques et les flavonoïdes.

- Des études réalisées *in vitro* et chez l'animal, montrent qu'un large spectre d'antioxydants alimentaires, pris sous forme d'extraits ou en tant qu'aliment, ont des effets bénéfiques sur le métabolisme du glucose et la prévention du DT2 :

Les polyphénols, comme la quercétine ou l'hespéridine, faisant partie des antioxydants les plus étudiés, ont donné de nombreux résultats intéressants. Ces composés limitent l'inflammation due au *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) et améliorent la sensibilité à l'insuline ;

Le resvératrol, un composé phénolique de la famille des stilbènes, améliore la balance énergétique et augmente l'activité mitochondriale, tout en protégeant les souris contre l'obésité et l'IR induits par l'alimentation. Ses effets bénéfiques sur le métabolisme du glucose ne sont pas simplement dus à ses propriétés antioxydantes, mais également à sa régulation d'histones déacétylases, comme sirtuine 1 (Sirt1), et donc à son activité de régulation de l'expression des gènes [43, 44].

- Les études chez l'homme sont beaucoup plus rares. Elles utilisent peu souvent le clamp hyperinsulinémique euglycémique, technique de référence pour mesurer l'insulinosensibilité. Des suppléments en acide α -lipoïque, en vitamine C et en vitamine E, seules ou en association à d'autres antioxydants, ont été étudiées par cette technique, et ont pu montrer des effets positifs sur la sensibilité à l'insuline [45]. Ces résultats positifs doivent, cependant, être pondérés par d'autres études moins favorables :

- Yfanti *et al.* n'ont retrouvé aucun effet complémentaire d'une supplémentation par une association d'antioxydants, sous forme d'un mélange de vitamines C (500 mg/jour) et E

(400 UI/jour), sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline en réponse à un entraînement en endurance [46];

- Ces observations sont renforcées par celles de Ristow *et al.*, démontrant qu'une supplémentation par une combinaison de ces mêmes vitamines à doses élevées (1 000 mg et 400 UI/jour, respectivement) pourrait limiter les bienfaits de l'exercice physique sur la sensibilité à l'insuline [47].

Quant aux polyphénols, une étude a montré qu'une consommation de cacao, pendant 2 semaines, n'avait aucun impact sur la sensibilité à l'insuline de patients hypertendus [48].

Récemment, les effets métaboliques du resvératrol ont été confirmés chez l'homme, dans une population de sujets obèses [49]. Dans cette étude, une amélioration de la sensibilité à l'insuline évaluée par la méthode du *Homeostasis model assessment* (HOMA) a été retrouvée. Pour notre part, nous avons pu montrer que des extraits naturels de raisins rouges, pris pour une durée de 8 semaines à la dose de 2 grammes par jour, permettent de protéger contre une insulino-résistance induite par une suralimentation en fructose [50].

I.4. Références bibliographiques

1. Labrie M: **Rôle de l' apolipoprotéine dans le métabolisme des lipides.** *Université du québec à montréal* 2012:125.
2. Day CP, James OF: **Steatohepatitis: a tale of two "hits"?** *Gastroenterology* 1998, 114:842-845.
3. Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S: **Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium.** *Am J Gastroenterol* 2002, 97:2714-2724.
4. Kim SP, Ellmerer M, Van Citters GW, Bergman RN: **Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog.** *Diabetes* 2003, 52:2453-2460.
5. Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, Yki-Jarvinen H: **Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects.** *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90:2804-2809.
6. Caroline R: **Stéatohépatite et adaptations métaboliques: Effets d'un régime enrichi en lipides saturés, ou carencé en choline et méthionine, sur la bioénergétique et le métabolisme hépatique de rat.** *UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I* 2007.
7. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ: **Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease.** *J Clin Invest* 2005, 115:1343-1351.
8. Tian L, Fu M: **The relationship between high density lipoprotein subclass profile and plasma lipids concentrations.** *Lipids Health Dis* 2010, 9:118.
9. Bradbury MW: **Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, 290:G194-198.
10. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffe-Scrive M: **Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice.** *Metabolism* 1995, 44:645-651.
11. Bowles L, Kopelman P: **Leptin: of mice and men?** *J Clin Pathol* 2001, 54:1-3.
12. Brunzell JD, Fujimoto WY: **Body fat distribution and dyslipidemia.** *Am J Med* 1995, 99:457-458.
13. Pardina E, Baena-Fustegueras JA, Llamas R, Catalan R, Galard R, Lecube A, Fort JM, Llobera M, Allende H, Vargas V, Peinado-Onsurbe J: **Lipoprotein lipase expression in livers of morbidly obese patients could be responsible for liver steatosis.** *Obes Surg* 2009, 19:608-616.
14. Hajri T, Abumrad NA: **Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology.** *Annu Rev Nutr* 2002, 22:383-415.
15. Hirano K, Kuwasako T, Nakagawa-Toyama Y, Janabi M, Yamashita S, Matsuzawa Y: **Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency.** *Trends Cardiovasc Med* 2003, 13:136-141.
16. Love-Gregory L, Sherva R, Sun L, Wasson J, Schappe T, Doria A, Rao DC, Hunt SC, Klein S, Neuman RJ, et al: **Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol.** *Hum Mol Genet* 2008, 17:1695-1704.
17. Pereira IV, Stefano JT, Oliveira CP: **Microsomal triglyceride transfer protein and nonalcoholic fatty liver disease.** *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011, 5:245-251.

18. Ha J, Lee JK, Kim KS, Witters LA, Kim KH: **Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-beta and its unique features.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:11466-11470.
19. McGarry JD, Brown NF: **The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis.** *Eur J Biochem* 1997, 244:1-14.
20. Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y, Angdisen J, Borgerink H, Shadoan MK, Wagner JD, Matern D, Rinaldo P, Cline JM: **Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance.** *Gastroenterology* 2005, 128:1381-1390.
21. Fromenty B, Pessayre D: **Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity.** *Pharmacol Ther* 1995, 67:101-154.
22. LEGRAND P: **Conséquence de l'expression d'une CPT1 insensible au malonyl-CoA sur l'évolution d'une stéatose hépatique induite par un régime déficient en méthionine et choline chez la souris.** *Institut Cochin* 2009:41.
23. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J: **The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation.** *Biochim Biophys Acta* 1996, 1302:93-109.
24. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W: **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting.** *J Clin Invest* 1999, 103:1489-1498.
25. Louet JF, Hayhurst G, Gonzalez FJ, Girard J, Decaux JF: **The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB).** *J Biol Chem* 2002, 277:37991-38000.
26. McGarry JD, Foster DW: **Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production.** *Annu Rev Biochem* 1980, 49:395-420.
27. Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Foufelle F, Ferre P, Fauveau V, Magnuson MA, Girard J, Postic C: **Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression.** *J Biol Chem* 2004, 279:20314-20326.
28. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K: **Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:7281-7286.
29. Anderson N, Borlak J: **Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis.** *Pharmacol Rev* 2008, 60:311-357.
30. Albano E, Mottaran E, Occhino G, Reale E, Vidali M: **Review article: role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis.** *Aliment Pharmacol Ther* 2005, 22 Suppl 2:71-73.
31. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A, et al: **Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients.** *Clin Sci (Lond)* 2004, 106:261-268.
32. BENARABA R: **Insulinorésistance et stress oxydant dans le syndrome métabolique : Etude expérimentale des effets protecteurs de microconstituants nutritionnels (polyphénols du thé, de la cannelle et chrome III).** *UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1* 2007:246.
33. Te Slighte K, Bourass I, Sels JP, Driessen A, Stockbrugger RW, Koek GH: **Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem.** *Eur J Intern Med* 2004, 15:10-21.

34. Avignon A, Hokayem M, Bisbal C, Lambert K: **Dietary antioxidants: Do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism?** *Nutrition* 2012, 28:715-721.
35. Hokayem M, Bisbal C, Lambert K, Avignon A: **Quelle place pour les antioxydants dans la prévention du diabète de type 2 ?** *Médecine des Maladies Métaboliques* 2012, 6:327-331.
36. Gallagher EJ, LeRoith D, Karnieli E: **The metabolic syndrome--from insulin resistance to obesity and diabetes.** *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008, 37:559-579, vii.
37. Samocha-Bonet D, Heilbronn LK, Lichtenberg D, Campbell LV: **Does skeletal muscle oxidative stress initiate insulin resistance in genetically predisposed individuals?** *Trends Endocrinol Metab* 2010, 21:83-88.
38. Hoehn KL, Salmon AB, Hohnen-Behrens C, Turner N, Hoy AJ, Maghzal GJ, Stocker R, Van Remmen H, Kraegen EW, Cooney GJ, et al: **Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:17787-17792.
39. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J: **Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice.** *J Clin Invest* 2008, 118:789-800.
40. Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW, 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, et al: **Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans.** *J Clin Invest* 2009, 119:573-581.
41. Bunck MC, Corner A, Eliasson B, Heine RJ, Shaginian RM, Wu Y, Yan P, Smith U, Yki-Jarvinen H, Diamant M, Taskinen MR: **One-year treatment with exenatide vs. insulin glargine: effects on postprandial glycemia, lipid profiles, and oxidative stress.** *Atherosclerosis* 2010, 212:223-229.
42. Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, Tasset-Cuevas I, Tunez I, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Marin C, Perez-Jimenez F, Roche HM, Lopez-Miranda J: **Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study.** *Clin Sci (Lond)* 2010, 119:251-261.
43. Brasnyo P, Molnar GA, Mohas M, Marko L, Laczy B, Cseh J, Mikolas E, Szijarto IA, Merei A, Halmai R, et al: **Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients.** *Br J Nutr* 2011, 106:383-389.
44. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, et al: **SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function.** *Cell Metab* 2012, 15:675-690.
45. Bisbal C, Lambert K, Avignon A: **Antioxidants and glucose metabolism disorders.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010, 13:439-446.
46. Yfanti C, Nielsen AR, Akerstrom T, Nielsen S, Rose AJ, Richter EA, Lykkesfeldt J, Fischer CP, Pedersen BK: **Effect of antioxidant supplementation on insulin sensitivity in response to endurance exercise training.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011, 300:E761-770.
47. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehnopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Bluher M: **Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:8665-8670.

48. Muniyappa R, Hall G, Kolodziej TL, Karne RJ, Crandon SK, Quon MJ: **Cocoa consumption for 2 wk enhances insulin-mediated vasodilatation without improving blood pressure or insulin resistance in essential hypertension.** *Am J Clin Nutr* 2008, 88:1685-1696.
49. Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, Hoeks J, van der Krieken S, Ryu D, Kersten S, et al: **Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans.** *Cell Metab* 2011, 14:612-622.
50. MARIE HOKAYEM EB, HUBERT VIDAL, KAREN LAMBERT, EMMANUELLE MEUGNIER, ANTOINE AVIGNON: **Grape Polyphenols Prevent Fructose-Induced Oxidative Stress and Insulin Resistance in First-Degree Relatives of Type 2 Diabetic Patients.** *Diabetes Care* 2013, 36:1454–1461.

Chapitre II
Effets protecteurs du lycopène de la
tomate

Chapitre II : Effets protecteurs du lycopène de la tomate

II.1. Tomate et lycopène

Comme la plupart des légumes, la tomate est un aliment très peu énergétique, puisqu'elle apporte crue environ 22 Kcalories/100 g et cuite 26 Kcalories/100 g (**Tableau 1**). On dit qu'elle a une très basse densité énergétique, ce qui est un élément majeur dans le contrôle du poids, puisque pour un poids et un volume élevés grâce à sa forte teneur en eau, elle apporte très peu de calories, ce qui joue indéniablement un rôle favorable dans le rassasiement. En effet, notre prise alimentaire quantitative correspond à un poids ingéré fixe [1] .

Tableau 1 : Tomate : composition et nutriments [1] .

Constituant	Tomate crue (Teneur /100 g)	Tomate cuite (Teneur /100 g)
Eau (g)	93.5	92.4
Calories (Kcal)	22	26
Protéines (g)	1.1	1.3
Lipides (g)	0.2	0.2
Glucides (g)	4.2	4.9
Fibre totales (g)	1.5	0.9
Calcium (mg)	13	15
Sodium (mg)	3	4
Magnésium (mg)	14	12
Potassium (mg)	297	186
Cuivre (mg)	0.1 à 0.9	
Zinc (mg)	1 à 2.4	
Manganèse (mg)	1 à 1.5	
Vitamine C (mg)	11 à 36	-
Vitamine E (mg)	5 à 20	-
Vitamine B9 (µg)	20	-

A l'inverse, la tomate comme la plupart des légumes, a une très bonne densité nutritionnelle (quantité d'un nutriment non énergétique fourni par 100 Kcalories de cet aliment). C'est le cas notamment de la vitamine C et de la vitamine E puisqu'elle peut fournir respectivement pour ces deux vitamines respectivement 50 à 160 mg de vitamine C pour 100 Kcalories et 22,5 à 90 mg de vitamine E pour 100 Kcalories [1].

C'est aussi une source non négligeable de fibres puisque 100 Kcalories de tomate peuvent fournir 7 g de fibres, soit le quart des apports nutritionnels conseillés. Elle contient aussi de nombreux minéraux et oligoéléments et, comme la plupart des fruits et légumes, elle

apporte beaucoup de potassium dont on connaît le rôle dans la prévention de l'élévation de la pression artérielle [2].

Parmi les phytoconstituants qu'elle contient, il faut retenir les polyphénols et les caroténoïdes, en particulier le lycopène. Les polyphénols de la tomate comprennent des acides phénoliques tels que l'acide férulique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique et des flavonoïdes tels que la quercitine, le kaempferol, la rutine, la naringénine [2].

II.1.1. Description du lycopène de la tomate

Fontaine de Jouvence? Jeunesse éternelle? Les antioxydants peuvent-ils tenir toutes ces promesses? Surement pas, mais ils valent certainement la peine qu'on s'y intéresse, car leur effet préventif contre certaines maladies dégénératives chroniques se confirme au fur et à mesure que la recherche sur le sujet progresse.

Le lycopène, membre de la famille des caroténoïdes, est le petit dernier de la famille. Le petit dernier, mais certainement pas le moindre, puisqu'il est l'un des plus puissants antioxydants naturels connus à ce jour [3-5].

Le lycopène appartient à la famille des caroténoïdes non pro-vitaminiques A. C'est le pigment responsable de la couleur rouge, orange de certains végétaux. Il est synthétisé par les plantes et des micro-organismes mais pas par l'homme ou les animaux. Il possède une structure non cyclique dont la formule moléculaire est $C_{40}H_{56}$ et de poids moléculaire de 536,85 Da. Sa structure est linéaire et comprend 11 doubles liaisons conjuguées et 2 non conjuguées [4] (Figure 7).

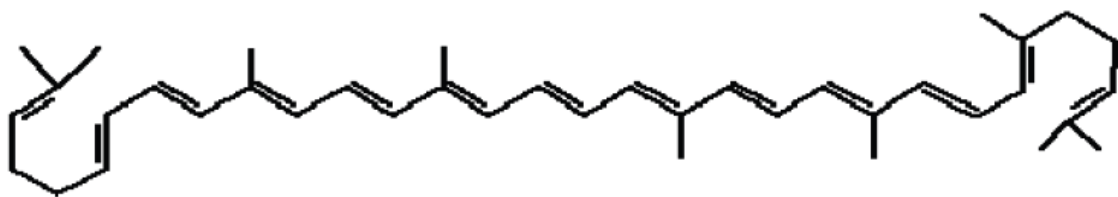


Figure 7 : Structure du lycopène [4].

Le lycopène est un composé lipophile donc insoluble dans l'eau. Il existe plusieurs isomères dont les deux formes majoritaires sont le *all-trans* et le *5-cis* lycopène. Le *all-trans* est la forme majoritaire présente dans les végétaux. Le *5-cis* est quant à lui la forme majoritaire retrouvée dans le plasma et dans certains tissus cibles [6].

Le lycopène est présent dans certains fruits et légumes dont les teneurs pour quelques exemples sont représentées sur les **tableaux 2 et 3** [7].

Tableau 2 : Teneur des fruits et légumes en lycopène [7].

Fruits et légumes	Lycopène (µg/ g de matière fraîche)
Tomate crue	8,7-42,0
Pastèque	23,0-72,0
Papaye	20,0-53,0
Abricot	<0,1
Goyave	54,0
Pamplemousse	33.6

Tableau 3 : Teneur en lycopène de produits issus de la transformation des tomates [7].

Aliments	Teneur en lycopène (mg/100g de matière fraîche)
Purée de tomate	16.7
Sauce de tomate	15.9
Soupe de tomate	10.9
Jus de tomate	9.3
Tomate cuite	4.4

II.1.2. Absorption, transport du lycopène

Le lycopène, une fois ingéré, va être intégré dans les micelles mixtes et absorbé dans les entérocytes par diffusion passive mais également *via* un processus actif. En effet, Moussa et al ont montré que le récepteur *scavenger receptor B1* (SRB1) était impliqué dans l'absorption du lycopène par les cellules intestinales humaines mais aussi chez la souris [8]. 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 (**Tableau 4**). Récemment, il a été montré que le tissu adipeux est également un organe qui accumule une grande quantité de lycopène [9].

L'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du lycopène diffèrent beaucoup selon les substances caroténoïdes. La plupart des connaissances actuelles dans ce domaine

dériverent des recherches effectuées avec la bêta-carotène. Les substances caroténoïdes sont fortement liées aux macromolécules dans les aliments.

Tableau 4 : Quantité de lycopène en fonction des tissus [9].

Tissus	Moyenne de lycopène (en nmol/g)
Testicules	4,34-21,36
Foie	1,28-5,72
Prostate	0,8
Glande surrénale	1,9-21,6
Pancréas	0,7
Rein	0,15-0,62
Colon	0,31
Peau	0,42

Plusieurs facteurs inhérents aux substances caroténoïdes peuvent rendre difficile leur dissolution dans les gouttelettes de lipide à partir des aliments, dans l'estomac et le duodénum. Les lipides alimentaires jouent un rôle important dans la dissolution des substances caroténoïdes et leur absorption subséquente [10]. Les chylomicrons sont responsables du transport des substances caroténoïdes, de la muqueuse intestinale vers le sang, par le système lymphatique. Dans le plasma, les substances caroténoïdes sont transportées exclusivement par les lipoprotéines. Le lycopène, substance caroténoïde dominante dans le plasma humain, possède une demi-vie de deux à trois jours dans l'organisme. Dans le plasma humain, le lycopène est présent sous forme d'un mélange contenant 50 % de forme cis et 50 % de forme trans [11]. L'isomère cis présente une meilleure biodisponibilité que le trans, probablement parce qu'il est plus facilement solubilisé par les sels biliaires et ainsi plus facilement incorporé aux chylomicrons [12].

Le lycopène naturellement présent dans la tomate sous la forme trans est peu absorbé. De récentes études ont démontré que la cuisson et la transformation de la tomate induisaient l'isomérisation du lycopène sous sa forme cis, ce qui augmente sa biodisponibilité. La biodisponibilité du lycopène des tomates est augmentée significativement avec une ingestion concomitante d'huile. L'ingestion de jus de tomate cuit avec de l'huile provoque une augmentation de lycopène sérique de deux à trois fois, tandis que la consommation de la même quantité de jus de tomate sans cuisson avec de l'huile ne cause aucune augmentation [11]. Les fibres alimentaires diminuent la biodisponibilité du lycopène [13]. L'absorption du lycopène semble plus importante lorsqu'il est ingéré à petite dose,

toutefois la présence de bêta carotène augmente son absorption [14]. Le contenu en lycopène des aliments constitue un renseignement utile, mais encore faut-il bien connaître sa biodisponibilité et son absorption chez l'humain. L'absorption du lycopène peut être affectée par plusieurs facteurs et propriétés des aliments. Parmi ces facteurs, mentionnons le lien avec d'autres molécules, la quantité de lycopène ingérée dans un repas, le type d'aliment dans lequel se trouve le lycopène, l'ingestion simultanée de fibres alimentaires, l'interaction du lycopène avec d'autres substances caroténoïdes ou nutriments, la présence de protéines ou de lipides, la grosseur des particules alimentaires et les facteurs génétiques [12].

La concentration sérique du lycopène varie de 50 nmol/L à 900 nmol/L. La concentration chez un individu et une population à l'autre varie beaucoup. La concentration sérique moyenne d'une population reflète la consommation de tomates ou de produits à base de tomates [10]. Les déterminants qui influencent la concentration sérique du lycopène ont été peu étudiés par rapport à bêta-carotène. Les données limitées suggèrent que les déterminants du lycopène sont différents de ceux de la bêta-carotène. Par exemple, plusieurs études ont rapporté que les fumeurs avaient des concentrations sériques de bêta-carotène inférieures à celle des non-fumeurs, ce qui ne semble pas être le cas pour le lycopène [15]. Par contre, une autre étude indique que l'exposition du plasma à la fumée de cigarette mène à une déplétion de plusieurs antioxydants et il semble que ce soit le lycopène le plus sensible [10]. D'après certaines études, la consommation d'alcool est inversement associée au taux sérique de bêta-carotène [15]. Les femmes ont généralement une plus grande concentration de plusieurs substances caroténoïdes, notamment les carotènes alpha et bêta, mais cette relation n'est pas constamment observée avec le lycopène. Plusieurs études ont suggéré que la concentration de lycopène est inversement proportionnelle à l'âge et qu'elle est positivement associée au cholestérol sanguin [15]. Mayne et ses collaborateurs ont trouvé que le taux de cholestérol, l'état civil et l'apport en lycopène sont les déterminants les plus importants du taux de lycopène [15]. Comme on le présumait, l'apport alimentaire est significativement associé à la concentration du lycopène dans le plasma. Plusieurs études rapportent une forte association du lycopène avec le cholestérol sanguin ce qui est probablement dû au fait que le lycopène est principalement transporté dans les lipoprotéines de basse densité, celles-ci étant le transporteur principal du cholestérol [15].

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 [12]. Cependant, certains indices laissent croire que l'isomérisation peut avoir lieu 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 *trans* puisse se faire *in vivo* au niveau des tissus. Il a été récemment démontré que la concentration du lycopène au niveau du sérum et des tissus de la prostate était significativement plus basse chez les patients atteints de cancer de la prostate que chez des patients de même âge en santé. Les auteurs suggéraient donc que les patients souffrant d'un cancer de la prostate ont un trouble d'isomérisation du lycopène alimentaire, ce qui diminue son absorption [5].

II.1.3. Métabolisation du lycopène, ses métabolites

Deux enzymes semblent impliquées dans la métabolisation *in vitro* et *in vivo* du lycopène, la bêta-carotène 15,15'-monooxygénase 1 (BCMO1) et la bêta-carotène 15,15'-monooxygénase 2 (BCMO2). La contribution relative de chacune et leur activité respective sur le lycopène restent cependant à préciser. Ces deux enzymes sont surtout bien connues pour cliver respectivement de façon symétrique et asymétrique le β -carotène, aboutissant à la formation d'acide rétinoïque et d'apo-caroténals [16].

Il existe très peu de données à ce jour concernant BCMO1 et son activité sur le lycopène semble très réduite. Il a été montré chez *E. Coli* qu'une expression de BCMO1 (ou de BCMO2) conduisait à une perte de la coloration du lycopène, suggérant sa dégradation, mais que ce changement était beaucoup moins important qu'en présence de β -carotène [17]. Lindqvist et Andersson ont mis en évidence que cette enzyme catalysait le clivage du β -carotène et de la β -cryptoxanthine au niveau de la double liaison centrale 15, 15' mais que cette activité n'a pas été du tout reproduite avec le lycopène, remettant ainsi fortement en cause la contribution de BCMO1. Des études plus approfondies révèlent l'existence d'une activité catalytique sur le lycopène par BCMO2 [18]. Ainsi, Hu *et al* ont montré qu'une surexpression de BCMO2 chez le furet permettait la détection de métabolites dont l'apo 10' lycopenal et du 13 *cis* apo 10' lycopenal après incubation avec le 5-*cis* lycopène mais pas avec le *all-trans* lycopène [19]. Sur la base de ces résultats, les auteurs ont proposé une voie métabolique possible du lycopène (**Figure 8**). Les résultats sur la conversion du 5-*cis* lycopène en apo-lycopenal ont été confirmés *in vivo* chez le furet, un animal chez qui le métabolisme des caroténoïdes est proche de celui de l'Homme.

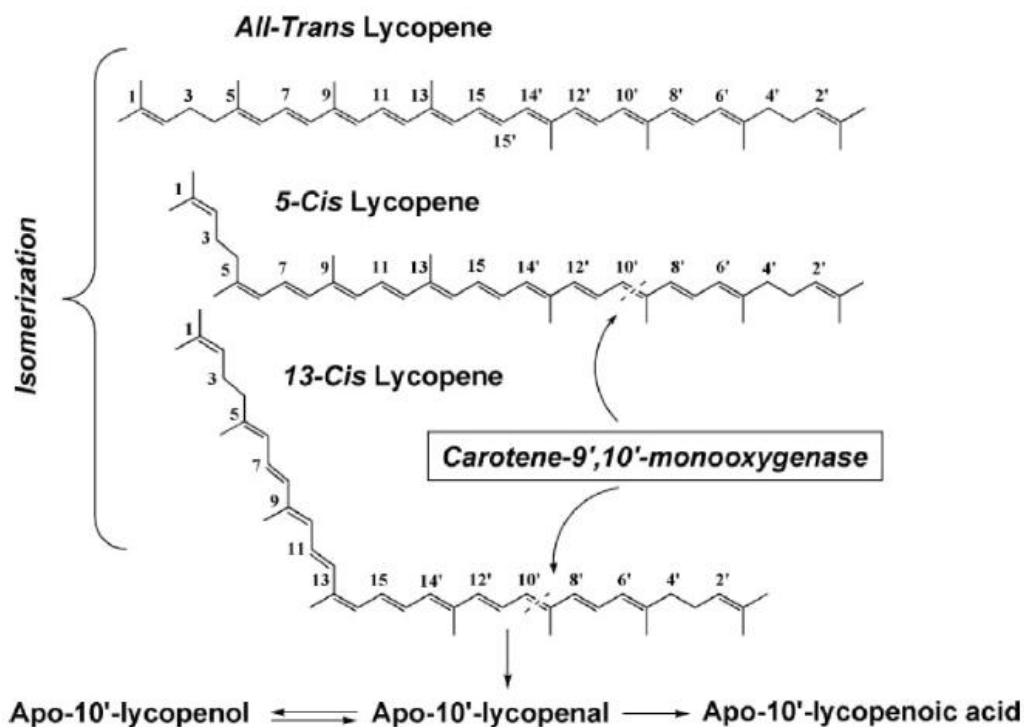


Figure 8 : Schéma de la possible voie métabolique du lycopène [19].

La présence d'autres métabolites, l'apo-8'-lycopenal et l'apo-12'-lycopenal, a été démontrée dans le foie de rat suite à un régime riche en lycopène [20].

L'identification de ces métabolites a ensuite débouché sur des études portant sur leurs effets biologiques. Parmi celles-ci, l'étude de Lian et Wang a montré que l'acide apo 10' lycopenoïque permet l'accumulation du facteur de transcription *NF-E2-related factor-2* (Nrf2) dans le noyau de façon dose et temps dépendants, aboutissant à l'induction de la phase II de détoxification [21]. Ces effets sur Nrf2 suggèrent des fonctions anticarcinogènes de ce métabolite. Précédemment, la même équipe en 2007 avait mis en évidence des effets inhibiteurs de ce composé sur la croissance de cellules cancéreuses de poumon *in vitro* mais aussi une diminution de la tumorigenèse dans un modèle de souris *in vivo* [22]. Ces effets sont médiés par une inhibition du cycle cellulaire mais aussi d'une transactivation du récepteur aux acides rétinoïques (RAR). Enfin, un autre métabolite du lycopène, le (E,E,E)-4-méthyl-8-oxo-2,4,6-nonatrienal peut induire l'apoptose de cellules HL- 60 [23].

Ainsi, si la voie de la métabolisation du lycopène n'est pas encore complètement connue, ces études ont montré qu'il existait de nombreux métabolites actifs. Ces derniers sont capables d'influencer plusieurs processus cellulaires et présentent des effets bénéfiques sur certaines pathologies.

II.2. Effets bénéfiques du lycopène sur les maladies du foie et autres pathologie

Les effets bénéfiques du lycopène ont été rapportés vis-à-vis de plusieurs pathologies, principalement les maladies du foie (NAFLD), soit par l'intermédiaire d'études épidémiologiques, soit par l'intermédiaire d'études *in vivo* et/ou *in vitro*.

II.2.1. Lycopène et la stéatose hépatique non alcoolique

Plusieurs études épidémiologiques ont suggéré qu'un régime riche en variété de fruits et légumes, source d'antioxydants, permettait une diminution des maladies du foie (NAFLD) [24]. Plus précisément, il existe un lien entre une forte consommation de tomates (ou en produit dérivés de la tomate) et une réduction significative de l'intensité de la stéatose hépatique non alcoolique [25]. Ces résultats ont servi de base à d'autres études cherchant à expliquer ce lien. Ainsi, des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes. Kim et al ont montré en 2012 que l'alcool de la tomate riche en lycopène a diminué la stéatose hépatique par l'augmentation de la β -oxydation hépatique [25]. Il a également été montré que le lycopène du jus de tomate et son accumulation dans le foie semble avoir un effet protecteur sur la stéatose hépatique induite par un régime hypercholestérolémique et hyperlipidique chez les rats [26, 27].

D'autres auteurs, ont montré que l'administration du vinaigre de la tomate a diminué d'une manière significative le taux des triglycérides et du cholestérol chez les rats avec un régime hyperlipidique [28]. Aussi, le vinaigre de la tomate a diminué l'accumulation des gouttelettes lipidiques hépatiques chez les mêmes rats. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés chez des rats supplémentés par la poudre de tomate [29].

D'autres études sur des modèles cellulaires, ont permis la mise en évidence d'une voie d'action du lycopène, ne reposant pas sur son pouvoir anti-oxydant, mais sur sa capacité à réguler l'expression génique. Ce caroténoïde est capable de diminuer l'expression des métalloprotéinase 2 et 9 (MMP-2, MMP-9), des protéines jouant un rôle dans la dissémination métastatique dans un modèle de carcinome hépatique ou encore d'augmenter l'expression du gène suppresseur de tumeur Nm23-H1 [30, 31]. Aucune étude n'a vraiment expliqué les mécanismes mis en cause en relation avec ces effets.

II.2.2. Lycopène et inflammation

L'impact du lycopène sur ces pathologies a permis d'élargir le champ d'investigation. Ainsi, outre sa capacité à réguler un certain nombre de gènes, récemment, des études ont mis en évidence la capacité du lycopène à prévenir le phénomène inflammatoire. Ces effets

ont été mis en évidence dans plusieurs types cellulaires, aussi bien *in vitro* [32] qu'*in vivo* [33, 34]. Il est intéressant de noter que les macrophages, qui sont des contributeurs majeurs au processus inflammatoire, voient leurs capacités sécrétoires modulées par ce caroténoïde en condition de stress inflammatoire. En effet, l'augmentation de marqueurs de l'inflammation comme l'Il-6 après une incubation de LPS est diminuée par un traitement au lycopène [35].

Dans cette même étude, les auteurs ont démontré que certaines voies de signalisation majeures de l'inflammation dont NF- κ B étaient impliquées dans cet effet. Une autre étude sur des cellules endothéliales stimulées par du TNF- α a montré un effet similaire sur la voie NF- κ B [36]. Cette capacité anti inflammatoire a permis d'ouvrir d'autres pistes explicatives en rapport avec les effets connus du lycopène.

II.2.3. Effets du lycopène sur le tissu adipeux

A ce jour, très peu d'études ont été menées sur l'effet du lycopène sur le tissu adipeux. Il s'agit pourtant du caroténoïde quantitativement le plus important dans le tissu adipeux humain [37]. Seules quelques études épidémiologiques évaluant l'effet de la concentration en lycopène dans ce tissu sur différents paramètres ou pathologie ont été décrites dans la littérature, parmi lesquelles une étude a montré qu'il existait une corrélation inverse entre la concentration en lycopène et le risque de maladie cardiovasculaire [38]. Récemment, il a été montré que la quantité de lycopène était associée avec un plus faible tour de taille mais aussi avec une plus faible masse grasse viscérale et sous cutanée [39].

Ces résultats suggèrent que le lycopène pourrait avoir un impact non négligeable sur le métabolisme du tissu adipeux. Cependant, toutes ces études n'en sont restées qu'au niveau de l'observation. Aucune étude n'a vraiment expliqué les mécanismes mis en cause en relation avec ces effets.

II.2.4. Prévenir les dommages oxydatifs

Plusieurs effets biologiques imputés aux substances caroténoïdes se rapportent à leurs capacités de protéger contre les dommages oxydatifs. Tout au long de l'évolution, les mammifères ont acquis des mécanismes de défense contre l'oxydation, la plupart étant génétiquement programmés, comme la production d'enzymes SOD et glutathionperoxydase (GPX). Par contre, d'autres mécanismes proviennent de composés alimentaires comme la vitamine C, la vitamine E et le sélénium et probablement de substances caroténoïdes [10]. La capacité du lycopène à neutraliser les radicaux libres

provenant de l'oxygène moléculaire se fait physiquement et chimiquement. Le transfert de l'énergie d'excitation de l'ion d'oxygène vers la molécule de lycopène produit une molécule d'oxygène plus stable et une molécule de lycopène en état d'excitation qui dissipera son excédent d'énergie sous forme de chaleur. Le lycopène est hautement hydrophobique et est principalement situé dans les membranes; pour cette raison, les réactions du lycopène avec les radicaux libres sont probablement limitées à cet endroit, sauf s'il est associé à des protéines spécifiques, ce qui lui permettrait d'interagir avec le milieu aqueux [10].

II.2.5. Répartition tissulaire

La capacité du lycopène à neutraliser des radicaux libres est le double de celle de bêta-carotène et elle est de 10 fois supérieure à celle de l'alpha-tocophérol, ce qui rend sa présence très désirable dans la diète [12].

Les radicaux-oxygène libres et les processus oxydatifs sont impliqués dans la physiopathologie de plusieurs maladies chroniques. Le lycopène serait l'un des antioxydants les plus puissants parmi toutes les substances caroténoïdes, lui conférant ainsi un rôle dans la prévention des cancers et de l'athérosclérose en diminuant les dommages causés par l'oxydation tant au niveau des lipides et des lipoprotéines que des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Il serait également la substance caroténoïde prédominante dans le plasma humain. Le lycopène étant liposoluble, il se retrouve généralement à l'intérieur des membranes cellulaires et dans diverses composantes lipidiques telles que les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Il serait donc logique de penser que son pouvoir de captation des radicaux libres est optimal dans un environnement lipidique [2].

Ces différentes études expliquent quelques effets bénéfiques du lycopène sur différents types cellulaires ou organes, mais les mécanismes expliquant ces effets restent à décryptés.

II.3. Synthèses des travaux sur le mécanisme d'action du lycopène

Les caroténoïdes sont des antioxydants qui captent et neutralisent l'oxygène singulet et radicaux peroxy par transfert direct de l'énergie entre ces molécules [40]. Cette énergie peut être absorbée dans le milieu sous forme de chaleur ou par autodestruction de la molécule de caroténoïde elle-même. Pour se faire, leurs concentrations et leurs orientations, doivent être appropriées et spécifiques à l'endroit des radicaux libres où ils sont produits [40]. Plusieurs études épidémiologiques ont suggéré, qu'une consommation

accrue de lycopène via les produits de tomates, engendre une élévation des taux sériques en lycopène. Celle-ci est inversement liée à l'incidence des maladies cardiovasculaires et cancer de prostate [9, 41, 42].

En ce qui concerne l'effet antioxydant du lycopène, Il y a un certain nombre d'études *in vivo* qui démontrent un retard du temps de latence de l'oxydation de LDL, chimiquement induite dans le sang obtenu des sujets humains alimentés par les produits et extraits de tomate [43]. Une supplémentation en lycopène, à des taux de 10, 15, et 30 mg, n'a pas eu d'effet sur la peroxydation des lipides du sérum ni une protection des LDL encore moins sur le marqueur MDA. Il s'avère donc, qu'une interaction avec d'autres composés de la tomate peut se produire. Par exemple, la combinaison synergique du lycopène, autres caroténoïdes et les polyphénols de tomate, qui semble améliorer le statut antioxydant [44]. Beaucoup d'extraits de lycopène, utilisés dans les études (souvent de tomates), qui peuvent contenir d'autres composés, ont été comparés à l'utilisation du lycopène pur. Le lycopène donné en supplément chez des femmes post ménopausées n'a pas empêché les dommages dans l'ADN, même s'il a diminué les dommages des lymphocytes [45].

Il y a accord presque universel que le lycopène est un excellent antioxydant *in vitro*, particulièrement face à l'oxygène singulet, et peut être la meilleure molécule diététique à cet égard. Il demeure tout de même une question relative à la concentration optimale qui peut réellement avoir un impact sur l'incidence des pathologies étudiées. On sait que les caroténoïdes, même s'ils sont présents à forte concentration dans plusieurs aliments, ils ne sont pas tous absorbés et ne s'accumulent qu'à des concentrations faibles (entre 0.01 et 0.05 micro molle/m/dL) dans le sang et les tissus [46]. Ceci apparaît dans une étude, où il a été trouvé 11,6 molécules d' α -tocophérol par molécule de LDL, mais seulement 0,9 et 0,5 molécules de lycopène, et de β carotène, respectivement [47]. Il semble donc, peu probable qu'une molécule de lycopène dans la particule de LDL aurait un impact sur l'oxydation de LDL [48]. Bien que le lycopène soit le caroténoïde majeur (80%) dans le sérum et les différents tissus chez l'homme [49], il n'en demeure pas moins que la concentration en α -tocophérol est bien plus importante que la concentration en lycopène dans la prostate humaine [50].

Un autre mécanisme d'action du lycopène, celui d'induire et de favoriser l'action des enzymes de détoxification. Les conclusions des différentes études sont partagées entre des résultats qui suggèrent que le lycopène favorise l'activité des enzymes hépatiques de la

phase II chez le rat [51], et d'autres conclusions sur l'inexistence d'un effet du lycopène sur les enzymes de détoxication [52]. Entre autres, le fait de la diminution de l'absorption des autres caroténoïdes, suite au métabolisme préférentiel, il ne faudrait pas perdre de vue l'effet pro-oxydant à forte dose [53].

Il a été également suggéré, que le lycopène peut empêcher l'athérosclérose, en diminuant l'expression des molécules d'adhérence à la surface de cellules et dans l'intima [54]. Aussi, sur l'effet hypocholestérolémiant du lycopène, seule une étude humaine a révélé une diminution du taux de cholestérol sérique en présence de lycopène [55], une autre étude n'indiquait aucun effet sur les LDL et HDL cholestérol du sérum [56]. En conclusion, il y a peu d'évidence *in vivo* pour affirmer que le lycopène diminue les risques de maladie cardiovasculaire en améliorant le profil du cholestérol dans le sérum. Il ne faudrait pas perdre de vue, l'effet dose, car il y a risque de saturation des mécanismes absorbants. Cet état de fait, peut avoir une implication pour les épreuves cliniques.

II.4. Références bibliographiques

1. Lecerf JM: **Tomate, lycopène et prévention cardiovasculaire.** *Phytothérapie* 2006, **4**:hs34-hs39.
2. Véronique Bernier DP, et Daniel Lavoie, Dt.P., M.Sc: **Le lycopène : un antioxydant très puissant.** *le clinicien novembre 2001* 2001.
3. Shixian Q, Dai Y, Kakuda Y, Shi J, Mittal G, Yeung D, Jiang Y: **Synergistic Anti-Oxidative Effects of Lycopene with Other Bioactive Compounds.** *Food Reviews International* 2005, **21**:295-311.
4. Kong KW, Khoo HE, Prasad KN, Ismail A, Tan CP, Rajab NF: **Revealing the power of the natural red pigment lycopene.** *Molecules* 2010, **15**:959-987.
5. Rao AV, Agarwal S: **Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease.** *J Am Coll Nutr* 2000, **19**:563-569.
6. Rao AV, Agarwal S: **Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer.** *Nutr Cancer* 1998, **31**:199-203.
7. Krinsky NI, Johnson EJ: **Carotenoid actions and their relation to health and disease.** *Mol Aspects Med* 2005, **26**:459-516.
8. Moussa M LJ, Reboul E, Ghiringhelli O, Comera C, Collet X, Frohlich K, Bohm V, Borel P: **Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1.** *J Nutr* 2008, **138**:1432-1436.
9. Agarwal S, Rao AV: **Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases.** *CMAJ* 2000, **163**:739-744.
10. Clinton SK: **Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease.** *Nutr Rev* 1998, **56**:35-51.
11. Stahl W, Schwarz W, Sundquist AR, Sies H: **cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues.** *Arch Biochem Biophys* 1992, **294**:173-177.
12. Shi J, Le Maguer M: **Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing.** *Crit Rev Biotechnol* 2000, **20**:293-334.
13. Erdman JW, Jr., Fahey GC, Jr., White CB: **Effects of purified dietary fiber sources on beta-carotene utilization by the chick.** *J Nutr* 1986, **116**:2415-2423.
14. Jackson MJ: **The assessment of bioavailability of micronutrients: introduction.** *Eur J Clin Nutr* 1997, **51 Suppl 1**:S1-2.
15. Mayne ST, Cartmel B, Silva F, Kim CS, Fallon BG, Briskin K, Zheng T, Baum M, Shor-Posner G, Goodwin WJ, Jr.: **Plasma lycopene concentrations in humans are determined by lycopene intake, plasma cholesterol concentrations and selected demographic factors.** *J Nutr* 1999, **129**:849-854.
16. Gouranton E: **Effets du lycopène et du -carotène sur la physiologie du tissu adipeux : Un impact globalement positif sur les désordres physiopathologiques associés à l'obésité ?** *FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE* 2010.
17. Boulanger A, McLemore P, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Yu SS, Gentleman S, Redmond TM: **Identification of beta-carotene 15, 15'-monooxygenase as a peroxisome proliferator-activated receptor target gene.** *FASEB J* 2003, **17**:1304-1306.
18. Lindqvist A, Andersson S: **Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase.** *J Biol Chem* 2002, **277**:23942-23948.

19. Hu KQ, Liu C, Ernst H, Krinsky NI, Russell RM, Wang XD: **The biochemical characterization of ferret carotene-9',10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids in vitro and in vivo.** *J Biol Chem* 2006, **281**:19327-19338.
20. Gajic M, Zaripheh S, Sun F, Erdman JW, Jr.: **Apo-8'-lycopenal and apo-12'-lycopenal are metabolic products of lycopene in rat liver.** *J Nutr* 2006, **136**:1552-1557.
21. Lian F, Wang XD: **Enzymatic metabolites of lycopene induce Nrf2-mediated expression of phase II detoxifying/antioxidant enzymes in human bronchial epithelial cells.** *Int J Cancer* 2008, **123**:1262-1268.
22. Lian F, Smith DE, Ernst H, Russell RM, Wang XD: **Apo-10'-lycopenoic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro, and suppresses lung tumorigenesis in the A/J mouse model in vivo.** *Carcinogenesis* 2007, **28**:1567-1574.
23. Zhang H, Kotake-Nara E, Ono H, Nagao A: **A novel cleavage product formed by autoxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells.** *Free Radic Biol Med* 2003, **35**:1653-1663.
24. Morisco F, Vitaglione P, Amoruso D, Russo B, Fogliano V, Caporaso N: **Foods and liver health.** *Mol Aspects Med* 2008, **29**:144-150.
25. Kim AY, Jeong Y-J, Park YB, Lee M-K, Jeon S-M, McGregor RA, Choi M-S: **Dose dependent effects of lycopene enriched tomato-wine on liver and adipose tissue in high-fat diet fed rats.** *Food Chem* 2012, **130**:42-48.
26. Bernal C, Martin-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, Garcia-Alonso J, Canovas M, Periago MJ: **Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis.** *J Nutr Biochem* 2013, **24**:1870-1881.
27. Tsitsimpikou C, Tsarouhas K, Kioukia-Fougia N, Skondra C, Fragkiadaki P, Papalexis P, Stamatopoulos P, Kaplanis I, Hayes AW, Tsatsakis A, Rentoukas E: **Dietary supplementation with tomato-juice in patients with metabolic syndrome: A suggestion to alleviate detrimental clinical factors.** *Food Chem Toxicol* 2014, **74**:9-13.
28. Lee JH, Cho HD, Jeong JH, Lee MK, Jeong YK, Shim KH, Seo KI: **New vinegar produced by tomato suppresses adipocyte differentiation and fat accumulation in 3T3-L1 cells and obese rat model.** *Food Chem* 2013, **141**:3241-3249.
29. Alshatwi AA, Al Obaaid MA, Al Sedairy SA, Al-Assaf AH, Zhang JJ, Lei KY: **Tomato powder is more protective than lycopene supplement against lipid peroxidation in rats.** *Nutr Res* 2010, **30**:66-73.
30. Huang CS, Shih MK, Chuang CH, Hu ML: **Lycopene inhibits cell migration and invasion and upregulates Nm23-H1 in a highly invasive hepatocarcinoma, SK-Hep-1 cells.** *J Nutr* 2005, **135**:2119-2123.
31. Chalabi N, Satih S, Delort L, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ: **Expression profiling by whole-genome microarray hybridization reveals differential gene expression in breast cancer cell lines after lycopene exposure.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1769**:124-130.
32. Saedisomeolia A, Wood LG, Garg ML, Gibson PG, Wark PA: **Lycopene enrichment of cultured airway epithelial cells decreases the inflammation induced by rhinovirus infection and lipopolysaccharide.** *J Nutr Biochem* 2009, **20**:577-585.
33. Joo YE, Karrasch T, Muhlbauer M, Allard B, Narula A, Herfarth HH, Jobin C: **Tomato lycopene extract prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signaling but worsens dextran sulfate sodium-induced colitis in NF-kappaBEGFP mice.** *PLoS One* 2009, **4**:e4562.

34. Bignotto L, Rocha J, Sepodes B, Eduardo-Figueira M, Pinto R, Chaud M, de Carvalho J, Moreno H, Jr., Mota-Filipe H: **Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat.** *Br J Nutr* 2009, **102**:126-133.
35. Feng D, Ling WH, Duan RD: **Lycopene suppresses LPS-induced NO and IL-6 production by inhibiting the activation of ERK, p38MAPK, and NF-kappaB in macrophages.** *Inflamm Res* 2010, **59**:115-121.
36. Hung CF, Huang TF, Chen BH, Shieh JM, Wu PH, Wu WB: **Lycopene inhibits TNF-alpha-induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion.** *Eur J Pharmacol* 2008, **586**:275-282.
37. Chung HY, Ferreira AL, Epstein S, Paiva SA, Castaneda-Sceppa C, Johnson EJ: **Site-specific concentrations of carotenoids in adipose tissue: relations with dietary and serum carotenoid concentrations in healthy adults.** *Am J Clin Nutr* 2009, **90**:533-539.
38. Kohlmeier L, Kark JD, Gomez-Gracia E, Martin BC, Steck SE, Kardinaal AF, Ringstad J, Thamm M, Masaev V, Riemersma R, et al: **Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study.** *Am J Epidemiol* 1997, **146**:618-626.
39. Sluijs I, Beulens JW, Grobbee DE, van der Schouw YT: **Dietary carotenoid intake is associated with lower prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and elderly men.** *J Nutr* 2009, **139**:987-992.
40. Gitenay D, Lyan B, Rambeau M, Mazur A, Rock E: **Comparison of lycopene and tomato effects on biomarkers of oxidative stress in vitamin E deficient rats.** *Eur J Nutr* 2007, **46**:468-475.
41. Borel P, Drai J, Faure H, Fayol V, Galabert C, Laromiguiere M, Le Moel G: **[Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids].** *Ann Biol Clin (Paris)* 2005, **63**:165-177.
42. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH: **Carotenoids and cardiovascular health.** *Am J Clin Nutr* 2006, **83**:1265-1271.
43. Bartley BK I a G E: **CAROTENOIDS : Chemistry, Sources and Physiology.** *Published by Elsevier Ltd* 2005.
44. Hadley CW, Clinton SK, Schwartz SJ: **The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage.** *J Nutr* 2003, **133**:727-732.
45. Khachik F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY, Katz NB: **Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2002, **227**:845-851.
46. Boileau AC, Merchen NR, Wasson K, Atkinson CA, Erdman JW, Jr.: **Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets.** *J Nutr* 1999, **129**:1176-1181.
47. Kravchenko LV, Morozov SV, Beketova NA, Deryagina VP, Avren'eva LI, Tutel'yan VA: **Antioxidant status of rats receiving lycopene in different doses.** *Bull Exp Biol Med* 2003, **135**:353-357.
48. Cases N, Sureda A, Maestre I, Tauler P, Aguilo A, Cordova A, Roche E, Tur JA, Pons A: **Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes.** *Eur J Appl Physiol* 2006, **98**:263-269.
49. Ishida BK, Roberts JS, Chapman MH, Burri BJ: **Processing tangerine tomatoes: effects on lycopene-isomer concentrations and profile.** *J Food Sci* 2007, **72**:C307-312.

50. Frohlich K, Conrad J, Schmid A, Breithaupt DE, Bohm V: **Isolation and structural elucidation of different geometrical isomers of lycopene.** *Int J Vitam Nutr Res* 2007, **77**:369-375.
51. Hackett MM, Lee JH, Francis D, Schwartz SJ: **Thermal Stability and Isomerization of Lycopene in Tomato Oleoresins from Different Varieties.** *Journal of Food Science* 2006, **69**:536-541.
52. Shih CK, Chang JH, Yang SH, Chou TW, Cheng HH: **beta-Carotene and canthaxanthin alter the pro-oxidation and antioxidation balance in rats fed a high-cholesterol and high-fat diet.** *Br J Nutr* 2008, **99**:59-66.
53. Huang CS, Chuang CH, Hu ML: **Effects of lycopene supplementation on plasma and tissue lycopene levels in various rodent strains.** *Int J Vitam Nutr Res* 2006, **76**:377-384.
54. Bohm V, Bitsch R: **Intestinal absorption of lycopene from different matrices and interactions to other carotenoids, the lipid status, and the antioxidant capacity of human plasma.** *Eur J Nutr* 1999, **38**:118-125.
55. Aviram M, Fuhrman B: **LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the oxidative status in the lipoprotein and in the cells: role of prooxidants vs. antioxidants.** *Mol Cell Biochem* 1998, **188**:149-159.
56. Johnson JD: **Do carotenoids serve as transmembrane radical channels?** *Free Radic Biol Med* 2009, **47**:321-323.

DEUXIEME PARTIE :
Partie expérimentale

Chapitre III

Matériel et méthodes

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III : Matériel et méthodes

III.1. Modèle animal et régime alimentaire

III.1.1. Introduction

Certaines études laissent supposer que si l'incidence de la stéatohépatite non alcoolique (NASH : non alcoholic steatohepatitis) a augmenté au cours des dernières années, parallèlement à l'obésité et au diabète de type II, cela est dû à un changement de mœurs. En effet, avec la «modernisation» et la sédentarisation, l'homme a changé son mode de vie et d'alimentation. Il est devenu moins actif et à changé son alimentation riche en fruits et en légumes par une alimentation riche (trop) en lipides. Cela est appuyé par une étude menée sur l'alimentation de patients atteints de NASH (régime hyperlipidique riche en acides gras saturés (AGS)) [1].

A ce jour, l'étude de la NASH, que se soit au niveau des mécanismes de mise en place ou une fois la pathologie bien établie, reste relativement limitée de par la difficulté de détection de la maladie, même si d'énormes progrès ont été réalisés au cours des dernières années, et par un manque de modèles d'étude. Il est très difficile de se procurer du tissu hépatique frais humain en quantité suffisante pour réaliser des études approfondies. Les modèles animaux, et notamment murins, nous permettent donc d'avancer dans l'étude de la NASH. Cependant, beaucoup sont des modèles de la pathologie une fois celle-ci établie, mais peu, permet une étude de la pathogenèse de la NASH et donc des modifications impliquées dans le développement de celle-ci. Plusieurs équipes ont travaillé sur des régimes alimentaires enrichis en lipides de durées plus ou moins longues. Certains régimes induisent une stéatose sans autres complications, d'autres une NASH mais développent simultanément les autres caractéristiques du syndrome métabolique qui sont une obésité abdominale, une hyperlipidémie, une insulino-résistance etc.

Le premier objectif de cette étude a été de mettre au point un régime alimentaire enrichi en lipides saturés et en cholestérol, dans le but d'induire une NASH « physiologique » chez les souris BALB/C. Pour cela, deux types d'huiles ont été utilisées. L'huile de coco (86% AGS) et du cholestérol à 96% (produit par Alfa Aesar GMBH Allemagne).

Le deuxième objectif était d'étudier le rôle de la poudre de pelure de tomate (PPT) dans la modulation de l'homéostasie lipido-glucidique, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et la prévention de la stéatose.

III.1.2. Composition des régimes alimentaires

La NASH a été induite par un régime riche en acides gras saturés et en cholestérol. Ce régime a été déjà validé chez l'homme l'équipe de Musso [1]. Pour cela, nous avons élaboré quatre régimes alimentaires (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Composition, valeurs nutritionnelle et énergétique des différents régimes alimentaires (% matière sèche)

Contents (g / 100g)	Régime alimentaire			
	Ctrl ¹	HSF/HC ²	HSF/HC + TP1 ³	HSF/HC + TP2 ⁴
Poudre de lait dégraissée	46.5	46.6	42.3	38.8
Amidon de maïs	28.2	27.0	24.5	22.5
Huile de tournesol	15.0	5.2	4.7	4.3
Huile de Coprah	0	9.7	8.8	8.1
Cholestérol	0	1.2	1.1	1.0
Minéraux ⁵	4.0	4.0	3.6	3.3
Vitamines ⁶	1.0	1.0	0.9	0.8
Fibres (agar)	5.0	5.0	4.6	4.2
DL-Méthionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Poudre de pelures de tomate (PPT) ⁷	0	0	9.1	16.7
Valeur énergétique (Kcal / 100 g)	419.2	427.0	388.1	355.7

⁽¹⁾Ctrl: Régime contrôle

⁽²⁾HSF/HC: Régime Hyperlipidique/Hypercholestérolémique

⁽³⁾HSF/HC + TP1: Régime riche en lipides saturés et en cholestérol supplémenté avec 9.1% PPT

⁽⁴⁾HSF/HC + TP2: Régime riche en lipides saturés et en cholestérol supplémenté avec 16.7% PPT

⁽⁵⁾Par kg: Ca, 13.5 g; P, 9.5 g; Mg, 3.5 mg; K, 9.8 g; Na, 3.35 g; Fe, 154 mg; Al, 27.0 mg; Cu, 10.3 mg; Mn, 80 mg; Co, 2.0 mg; I, 1.0 mg; Zn, 75.7 mg.

⁽⁶⁾Par kg: vitamine A, 57200 IU; vitamine D3, 8135 IU; vitamin E, 236 mg; vitamin K3, 2.6 mg; inositol, 8.3 g; vitamin B1, 74.8 mg; vitamin B2, 45.0 mg; vitamin C, 150 mg; , vitamin B6, 18.1 mg; vitamin B12, 150 mg; biotine, 242 mg; niacine, 207.4 mg; choline, 0.55 g; acide folique, 4.5 mg.

⁽⁷⁾Sachant que notre poudre de pelure de tomate (PPT) contient en moyen 0.5 mg lycopène /g de poudre de pelures de tomate, les régimes supplémentés avec le poudre de pelures de tomate fournissent 46 et 84 mg de lycopène/ Kg d'aliment pour le régime HL/HC TP1 et le régime HL/HC TP2 respectivement [2, 3].

Les pelures de tomate fraîches sont séparées de la pulpe et des graines, pour être emballées dans des sachets alimentaires et placées au congélateur (-18° C). Par la suite nous avons procédé à la lyophilisation des pelures de tomate dans un lyophilisateur (type Croyodos avec une pression du vide de 0.33 mbar et une température de - 49°C). Les pelures de tomate sont immédiatement broyées dans un mixeur, solubilisées dans l'huile de tournesol et enfin stockées dans des flacons aseptiques hermétiquement fermés à 4°C [4].

La confection des régimes hyperlipidiques consiste en une solubilisation du cholestérol (à 96% produit par Alfa Aesar GMBH Allemagne), dans de l'huile de tournesol (à 1.25% ou 1.25 g de cholestérol/100 g d'aliment, ce qui fait 12.5 g de cholestérol/Kg d'aliment) [5], ensuite le tout est mélangé avec l'huile de coprah. Ainsi, les autres ingrédients (**Tableau 5**) sont mixés dans un broyeur pendant 30 minutes, avant d'être mélangés avec la PPT et le cholestérol (**Figure 9**).

Les régimes (HSF/HC) ont été préparés en substituant 2/3 de l'huile de tournesol par l'huile de coprah (9.7, 8.8, et 8.1 g/100 g pour les régimes HSF/HC, HSF/HC TP1, et HSF/HC TP2, respectivement) et par le cholestérol (1.2, 1.1 et 1.0 g/100 g pour les régimes HSF/HC, HSF/HC TP1, et HSF/HC TP2, respectivement). Les diètes préparées sont stockées à 4°C.



Figure 9 : Régimes expérimentaux : (a) Régime Ctrl, (b) Régime HSF/HC, (c) Régime HSF/HC TP1, (d) Régime HSF/HC TP2, préparés au niveau des laboratoires de département technologie alimentaire, université de Boumerdes, Algérie.

III.1.3. Animaux et conditions d'élevage

Ces travaux ont été réalisés sur la souche de souris BALB/c (18 ± 2 g), âgées de huit semaines et élevées dans l'animalerie de laboratoires CRD-Saidal (Elharrach, Algérie) à partir de géniteurs provenant de la société Charles Rivers France. Afin d'éviter la variabilité inter sexe, nous n'avons utilisé que des souris mâles. Les souris sont séparés en 4 lots expérimentaux et stabulés en cage polystyrène thermoformée, en accord avec les standards accrédités par les laboratoires Charles Rivers (Les Oncins, France), dans une pièce éclairée 12/24. La température est contrôlée à 21 ± 1 °C avec une humidité relative de 60 %. Les animaux ont accès à volonté à la nourriture et à l'eau.

Les souris (8 semaines d'âge avec une semaine d'adaptation sur le régime contrôle) sont mises sur un régime contrôle (Ctrl), un régime riche en lipides saturés et en cholestérol (HSF/HC) ou un régime (HSF/HC) supplémenté par la poudre de pelures de tomates (PPT) (HSF/HC TP) pour une durée de 12 semaines.

Ainsi, 4 groupes de souris sont constitués pour chaque durée de mise sur régime :

1) Régime contrôle avec 15 % d'huile de tournesol (Ctrl ; n = 7 à 10), **2)** Régime hyperlipidique/hypercholestérolémique avec 5 % de l'huile de coprah et 1.25 % de cholestérol (HSF/HC : n = 7 à 10), **3)** Régime hyperlipidique/hypercholestérolémique supplémenté avec 9% de poudre de pelures de tomate (HSF/HC TP1 ; n = 7 à 10), **4)** Régime hyperlipidique/hypercholestérolémique supplémenté avec 17% de poudre de pelures de tomate (HSF/HC TP2 ; n = 7 à 10).

III.1.4. Problèmes rencontrés

Plusieurs problèmes ont été rencontrés au cours de cette étude, notamment au niveau de la préparation et de la stabilité des régimes, mais également vis-à-vis de l'appétence de ces aliments pour les souris. Le premier problème auquel nous nous sommes heurtés a été la température de liquéfaction de notre huile de coco (23°C). Au dessus de cette température l'huile devenait liquide et les granules se répandaient dans la cage. Nous avons donc du réaliser toute notre étude à une température de 22-23°C.

Le deuxième problème rencontré se situait au niveau de l'état de conservation de la nourriture une fois déposée dans la cage, en particulier pour le régime enrichi en lipides. Nous avons remarqué une oxydation des lipides après deux jours passés dans les cages avec dégagement d'une odeur âpre ayant pour conséquence une diminution de la prise

alimentaire de nos souris. Pour pallier à tout cela, nos deux régimes étaient préparés chaque début de semaine, emballés dans des boîtes hermétiquement fermés, et congelés afin d'avoir une forme, une taille et une texture dure identique à celles du contrôle. Les aliments étaient changés tous les jours à 18h juste avant l'extinction des lumières.

Enfin, le dernier problème auquel nous avons dû faire face a été un refus de s'alimenter de la part des rats lorsqu'on ne leur présentait que le régime enrichi en lipides. En effet, nous avons constaté la nécessité de maintenir une certaine quantité de granules standards dans nos cages, en plus de nos granules enrichies en lipides, sans quoi les souris ne se nourrissaient pas. Cependant nous avons observé une préférence croissante de nos animaux envers les régimes enrichis durant les 12 semaines de l'étude. Pour chaque groupe, la quantité de chaque régime ingéré est calculée par une pesée quotidienne de la nourriture.

L'évolution du poids corporel et la prise alimentaire des souris est relevée chaque semaine pendant 12 semaines. Le gain du poids (en gramme) est calculé par la différence entre le poids final (à 12 semaines) et le poids initial. La prise journalière alimentaire (en gramme) est calculée par la différence entre l'aliment non consommé et la quantité donnée au cours de la même semaine divisée par le nombre de jours et le nombre des souris par lot. Les résultats sont exprimés en grammes par jour et par rat (g/j/rat).

III.2. Les analyses biologiques

III.2.1. Evaluation de la résistance à l'insuline

Nous avons induit une stéatose hépatique non alcoolique chez les souris en leur administrant un régime riche en lipides et en cholestérol (1.25 %). Nous avons validé ce régime en mesurant un des marqueurs biologiques de la stéatose hépatique non alcoolique (Test oral de tolérance au glucose (O GTT), test de sensibilité à l'insuline (IST)) dans les quatre lots (Ctrl, HSF/HC, HSF/HC TP1 et HSF/HC TP2).

Pour cela, des prélèvements de sang sont effectués à partir de la queue des souris après 4, 8 et 12 semaines de mise sur les régimes expérimentaux.

III.2.1.1. Test oral de tolérance au glucose (O GTT)

Les souris sont mises à jeun la veille pendant toute la nuit (environ 15 h de jeûne). Il se fait en changeant les cages des souris, le retrait de la nourriture et en laissant l'accès à l'eau libre. Ensuite une solution de glucose (**0.2 g D-glucose/ml**) est administrée par gavage oral (**2 mg glucose/ g du poids corporel**) (à l'aide d'une seringue graduée de 1 ml munie d'une

canule) au milieu de la phase nocturne du cycle circadien des souris, pour une solution de glucose à **2 g de glucose /10 ml d'eau**, si on a **une souris de 20 g** et à raison de **2 mg glucose /g souris**, on préparera **une seringue avec 0,2 ml** à donner par **gavage**. Le test est effectué dans un endroit calme sans bruit pour ne pas stresser les souris et fausser les résultats de la glycémie.

La glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Germany) avant gavage du glucose à **0 mn** et après le gavage, à **15 min, 30 min, 60 min, 90 min** et **120 min** [6, 7].

III.2.1.2. Test de sensibilité à l'insuline (IST)

Les souris sont mises à jeun pendant quatre heures. Il se fait en changeant les cages des souris, le retrait de la nourriture et en laissant l'accès à l'eau libre. Ensuite une solution d'insuline (**0.05 UI /ml**) est injectée par voie intrapéritonéale (**0,5 µU d'insuline/g du poids corporel**) au milieu de la phase nocturne du cycle circadien des souris. Pour une solution d'insuline à **5 µU /10 ml**, si on a **une souris de 20 g** et à raison de **0,5 µU /g souris**, on préparera **une seringue avec 0,2 ml** à injecter par voie intrapéritonéale. Le test est effectué dans un endroit calme sans bruit pour ne pas stresser les souris et fausser les résultats de la glycémie.

La glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Germany) avant injection de l'insuline à **0 mn** et après injection, à **15 min, 30 min, 60 min, 90 min** et **120 min** [6, 7].

III.2.2. Sacrifice et prélèvements biologiques

À la fin de la durée de temps fixée, les souris sont mises à jeun pendant 12 h puis anesthésiées par inhalation (à l'éther) et sacrifiées. La technique de prélèvement du sang se fait par ponction du sinus rétro-orbitale en utilisant des micro-hématocrites. Le sang est récupéré dans des tubes héparines, après centrifugation (1200 g, 50 min à 4 °C) le plasma est récupéré dans des tubes eppendorf (à raison de 100 µL/tube) et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse biochimique. Le foie et le tissu adipeux sont prélevés immédiatement, lavés dans une solution de NaCl 9 ‰ et pesés. Le foie est enveloppé dans du papier aluminium puis plongé dans l'azote liquide puis conservé à - 80 °C. Deux fragments du foie (du lobe droit du foie pour toutes les souris) sont fixés dans une solution tampon neutre (Formaldéhyde à 4% (p/v), tampon phosphate 0.1M, pH 7.2) pour l'étude histologique.

III.2.3. Analyses et dosages sériques

Le dosage de l'insuline est réalisé par la technique Elisa (BioLis, Boeki Machinery, Tokyo, Japan). La concentration du glucose, des triglycérides (Tg), du cholestérol total (total-C), des lipoprotéines high-density cholestérol (HDL-C), des lipoprotéines low-density cholestérol (LDL-C) et des acides gras non estérifiés (AGNE) a été mesurée par méthode colorimétrique et enzymatique sur automate (Col. automate BioLis 24i, Boeki Machinery, Tokyo, Japan).

La méthode d'évaluation du modèle d'homéostasie de la résistance à l'insuline (HOMA-IR) a été utilisée pour évaluer la sensibilité à l'insuline (Taux d'insuline à jeun ($\mu\text{U/ml}$) x glycémie à jeun (mmol /L)/22.5) [8].

III.2.4. Dosage des marqueurs hépatiques

Le dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (ASAT) et de la phosphatase alcaline (ALP) est réalisé par une méthode enzymatique sur automate (BioLis, Boeki Machinery, Tokyo, Japan). Le rapport ALAT/ASAT reflète la cytolyse hépatocytaire.

III.2.5. Marqueurs de peroxydation lipidique (Mesure des TBARS) (Thiols Barbituric Acide Reactive Species)

Limites et intérêt de la méthode : Malgré sa non-spécificité, l'utilisation de la réactivité du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique reste encore aujourd'hui un des tests «classiques» dans l'évaluation du stress oxydant. Si le dosage des TBARS présente d'excellentes qualités sur le plan de la sensibilité, et si sa mise en œuvre est simple, son absence de spécificité analytique liée à la fois aux interférences de cette méthode et aux conditions drastiques nécessaires à la formation du dérivé MDA-(TBA)₂ coloré, limite cependant son intérêt. Cependant à ce jour, ce marqueur reste le plus utilisé pour déterminer le stress oxydant et la détermination des TBARS reste un test donnant un résultat global, permettant une première approche de la lipoperoxydation et du stress oxydant.

Dans notre travail, cette analyse est réalisée sur le plasma. Pour cela, 0.5 ml du plasma est combiné avec 2 ml d'un mélange (2/1 v:v) d'acide thiobarbiturique (TBA 0.67%) (Acide 2-Thiobarbiturique 4.6-Dihydroxypyrimidine 2-thiol ; Pureté : 98% ; C₄H₄N₂O₂S ; FW : 144.1 ; Produit : Sigma USA) et d'acide trichloroacétique (TCA 30%) en présence d du butylated

hydroxytoluene (BHT à 0.25%). Après agitation (vortexer vigoureusement pendant 2min), le mélange est incubé au bain marie à 95°C pendant 1 heure. Durant cette étape, les fonctions aldéhydiques du dialdéhyde malonique (MDA) sont libérées par l'hydrolyse acide à 95°C. Elles réagissent avec le TBA en formant un complexe coloré en rose (MDA-TBA). Pour arrêter la réaction, les tubes sont placés dans la glace. Le complexe ainsi formé est extrait par le butanol pendant 2 minutes. Après centrifugation, la quantification du complexe est effectuée sur un spectrophotomètre UV-Vis (Shimadzu Spectrophotometer 1880, Tokyo, Japan) à une longueur d'onde d'excitation de 535 nm. TBARS est quantifié en utilisant le coefficient d'extinction ($E_{535} = 1.53 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) et la concentration est exprimée en nmol de malondialdéhyde par ml plasma [9].

III.2.6. Extraction et dosage du lycopène sérique

Le lycopène sérique est extrait et analysé par HPLC selon Froescheis [10]. A cet effet, 0.8 ml d'eau pur, 1.6 ml éthanol, 3.2 ml d'hexane (0.025% BHT) sont mélangés à 0.8 ml du plasma. Le mélange ainsi obtenu est passé au vortex pendant 2 mn à une vitesse rapide suivi d'une centrifugation, à 1800 tr/mn, à température ambiante, pendant 10mn. La phase hexanique est transférée dans un erlenmeyer, la phase aqueuse est extraite une deuxième fois par 3.2 ml d'hexane comme mentionné précédemment. Les phases hexaniques sont évaporées à sec sous azote à 30 °C. Le résidu sec est repris dans 3 x 300 µl hexane-CH₂Cl₂ (1:1, v/v), après évaporation à sec sous azote, le résidu est récupéré dans 250 µl du méthanol-acétonitrile (1:1, v/v). L'extrait du lycopène sérique est injecté manuellement dans le chromatographe liquide à haute pression (HPLC) (Alliance 2695 Waters Corporation, Milford, MI, USA) équipé avec un mod. 2996 photodiode détecteur array (Waters) et une colonne (5 µm C18 Vydac 201TP54 (250x 18 4.6mm, i.d; Esperia, CA, USA). La phase mobile est constituée du mélange méthanol- acétonitrile (1:1, v/v) avec un débit de 1 mL/min. Le lycopène est identifié à une longueur d'onde de 472nm et quantifié par Empower workstation (Waters Corporation) en comparaison avec un étalon externe (LycοMato : 0 à 1.5 e⁻⁹ mg/ml) préparé et analysé dans les mêmes conditions.

III.2.7. Etude histologique du foie

Cette partie est réalisée au niveau du laboratoire de Biopathologie et génétique de l'Institut Pasteur Algérie (IPA).

III.2.7.1. Préparation du tissu hépatique

Les coupes des tissus hépatiques examinées par microscope optique sont le fruit de procédures techniques qui requièrent plusieurs étapes successives : fixation, inclusion, coupe, coloration, montage.

La fixation est utilisée pour la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle est réalisée immédiatement après le prélèvement, par immersion des fragments du foie dans un grand volume d'une solution tampon neutre (Formaldéhyde à 4% (p/v), tampon phosphate 0.1M, pH 7.2) pendant un mois. *L'inclusion* permet la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, les fragments du foie sont déshydratés (par immersion dans des bains d'éthanol de degré croissant (Alcool 75° : 1 bain de 20 à 30 mn, alcool 90° : 2 bains de 20 à 30 mn, alcool 100° : 3 bains de 20 à 30 mn) puis dans des bains de toluène) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide, qui infiltre alors toute la pièce (deux bains de paraffine de deux heures chacun). Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel le foie est inclus. *Les coupes* du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 2 à 5 µm d'épaisseur. Les coupes (4 µm d'épaisseur) sont recueillies sur des lames de verre. *Les colorations* réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments des tissus hépatiques. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes sont réhydratées. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de xylène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée. La coloration histologique est effectuée par l'Hématéine-Eosine (H.E.) qui associe l'hématéine qui colore les noyaux en violet et l'éosine les cytoplasmes en rose. Après avoir subi une déshydratation, les coupes colorées sont *montées* entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une « préparation microscopique » (simplement appelée « lame » dans le langage courant) prête à être observée au microscope optique (Axioscope, Germany).

La NASH est caractérisée par la présence d'une stéatose macrovésiculaire > 5% dans des hépatocytes. La définition histologique de la NASH est basée sur une combinaison de trois lésions (stéatose, inflammation, ballonnisation) dans une distribution topographique caractéristique (principalement centrolobulaire) [11].

Les lésions de la gravité de la NASH (stéatose, inflammation lobulaire et portale et la ballonnisation hépatocellulaire) étaient évaluées de façon semi-quantitative. Le score Brunt [12] représente la somme de valeurs attribuées: stéatose (0-3), inflammation lobulaire (0-3) et la ballonnisation (0-2); allant donc de 0 à 8.

III.2.8. Analyses statistiques

Les données sont analysées par ANOVA, en utilisant le modèle général linéaire (GLM) pour the outcomes at the endpoint, la procédure MIXED de SAS pour traiter des données répétées (BWG, OGTT, IST). Le traitement du groupe est considéré comme un effet fixe pour le GLM. Le temps, le traitement de groupe et l'intégration entre ces deux facteurs sont considérés comme des effets fixes pour le modèle mixte. Les résultats du tableau 2 sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type de la moyenne (SEM). L'analyse statistique est réalisée par le logiciel SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC). Les moyennes des différents groupes sont comparées post-hoc en utilisant le test de Tukey-Kramer. Les différences sont considérées comme significatives lorsque le niveau d'erreur est inférieur à 5 % ($p < 0,05$).

III.3. Références bibliographiques

1. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Faga E, Silli B, Pagano G: **Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2003, 37:909-916.
2. Gitenay D, Lyan B, Rambeau M, Mazur A, Rock E: **Comparison of lycopene and tomato effects on biomarkers of oxidative stress in vitamin E deficient rats.** *Eur J Nutr* 2007, 46:468-475.
3. Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang XD: **Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats.** *Int J Cancer* 2010, 126:1788-1796.
4. Benakmoum A, Abbeddou S, Ammouche A, Kefalas P, Gerasopoulos D: **Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste.** *Food Chem* 2008, 110:684-690.
5. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, et al: **Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet.** *Hepatology* 2007, 46:1392-1403.
6. Marib EFaA: **How to measure insulin sensitivity.** *Journal of Hypertension* 1998, 16:895-906.
7. Heikkinen S, Argmann CA, Champy MF, Auwerx J: **Evaluation of glucose homeostasis.** *Curr Protoc Mol Biol* 2007, Chapter 29:Unit 29B 23.
8. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA: **A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet.** *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 2010, 46:212.
9. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M: **A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials.** *Free Radic Biol Med* 1993, 15:353-363.
10. Froescheis O, Moalli S, Liechti H, Bausch J: **Determination of lycopene in tissues and plasma of rats by normal-phase high-performance liquid chromatography with photometric detection.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000, 739:291-299.
11. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, et al: **Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2005, 41:1313-1321.
12. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR: **Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions.** *Am J Gastroenterol* 1999, 94:2467-2474.

Chapitre IV

Résultats et discussion

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Effet de la supplémentation en poudre de pelures de tomate sur la prise alimentaire, poids des souris, poids du foie et du tissu adipeux

Les quatre groupes de souris présentent une augmentation de leur prise alimentaire au cours des trois premières semaines de régime. A partir de la quatrième semaine on observe que les souris contrôles stabilisent leur prise alimentaire à environ 3.0 g/j/souris alors que les groupes **HSF/HC**, **HSF/HC TP1**, **HSF/HC TP2**, présentent une diminution significative de la quantité de nourriture ingérée qui va se stabiliser à environ 2.5 g/j/souris et rester stable jusqu'à la fin de l'élevage (**Tableau 6**).

Tableau 6: Caractéristiques physiologiques des souris supplémentées par les différents régimes expérimentaux après 12 semaines d'élevage.

	Ctrl	HSF/HC	HSF/HC + TP1	HSF/HC + TP2	P-value
N (final/initiale)	7/10	7/10	7/10	7/10	-
Prise alimentaire (g/jour/souris)	3.1 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.1 ^b	2.5 ± 0.1 ^b	2.6 ± 0.1 ^b	<0.001
Poids final (g)	32.4 ± 1.0 ^b	43.0 ± 2.0 ^a	42.3 ± 0.5 ^a	37.9 ± 2.2 ^{ab}	<0.001
Gain du poids (g)	10.7 ± 0.9 ^b	21.0 ± 2.0 ^a	19.9 ± 0.7 ^a	15.4 ± 1.9 ^{ab}	<0.001
Poids du foie (g)	1.8 ± 0.3 ^b	2.7 ± 0.4 ^a	2.4 ± 0.3 ^{ab}	2.1 ± 0.4 ^b	0.001
IHS	0.06 ± 0.004	0.06 ± 0.002	0.06 ± 0.002	0.05 ± 0.003	0.290
Poids du tissu adipeux (g)/ poids corporel (g)	0.04 ± 0.003 ^b	0.06 ± 0.003 ^a	0.04 ± 0.002 ^b	0.04 ± 0.003 ^b	<0.001

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne ± SEM (l'erreur type de la moyenne), n=7. Les valeurs de la même ligne avec des lettres différentes sont significativement différentes. Les différences sont considérées comme significatives lorsque le niveau d'erreur est inférieur à 5 % ($p < 0,05$).

IHS : Indice hépato-somatique.

Nous pouvons supposer qu'en conditions « normales », la prise alimentaire des groupes HSF/HC serait restée stable aux environs de 3.0 g/j/souris. Il faut tout de même remarquer

que la prise alimentaire des souris Ctrl est significativement supérieure à celle des souris du groupe HSF/HC au cours des 4 dernières semaines ($p < 0,001$).

De manière générale, lorsque l'on compare les évolutions des prises alimentaires de chaque groupe, il apparaît que les souris du groupe contrôle ont une prise alimentaire supérieure aux souris recevant un régime enrichi en lipides.

Nous avons ensuite étudié les conséquences du régime HSF/HC sur l'organisme des souris. Un suivi de la masse corporelle des quatre groupes de souris a donc été effectué au cours des 12 semaines de régime. Au début de l'étude, les souris (même âge et même masse corporelle) sont réparties aléatoirement en quatre groupes, recevant chacun un régime alimentaire différent.

Au terme des 12 semaines de régime, les souris ont pris entre 32 et 42 g. D'après les résultats obtenus, la masse moyenne des quatre groupes de souris est significativement différente. On constate une forte augmentation du poids des souris du groupe HSF/HC ($43,0 \pm 2,0$ g), ce qui correspond à une augmentation de 96 % en comparaison avec les souris du groupe Ctrl ($32,4 \pm 1,0$ g). A noter tout de même, une tendance non significative, à l'augmentation chez les souris ayant reçu le régime enrichi en PPT. Cependant, il apparaît clairement que le régime HSF/HC induit une augmentation significative du poids corporel des souris à partir de la huitième semaine ($31,1 \pm 2,5$ g pour le groupe Ctrl contre $38,8 \pm 4,6$ g pour le groupe HSF/HC). Toutefois, le régime HSF/HC avec 9 % de poudre de pelures de tomate (PPT) n'a pas d'effet significatif sur le gain du poids après douze semaines de supplémentation. Par contre, le régime HSF/HC avec 17% de PPT induit une réduction significative du poids corporel des souris en comparaison avec le groupe Ctrl et le groupe HSF/HC ($15,4 \pm 1,9$ g pour le groupe HSF/HC TP2 contre $21,0 \pm 2,0$ g pour le groupe HSF/HC), cela peut être expliquer par l'effet de la densité du régime.

Lors de l'expérimentation, différents organes ont été prélevés et pesés. Les masses du foie, du tissu adipeux sont évaluées et exprimées par gramme de masse corporelle.

Une augmentation significative de la masse du tissu adipeux est observée chez le groupe HSF/HC en comparaison aux souris contrôles ($2,7 \pm 0,3$ g contre $1,4 \pm 0,1$ g dans le Ctrl, ($p < 0,05$). Les régimes enrichis en lipides et en cholestérol entraînent donc une augmentation de la masse des tissus de stockage des lipides chez les souris HSF/HC. Par contre, la supplémentation des souris avec 9 % et 17 % de PPT réduit significativement le

poids moyen du tissu adipeux (1.7 ± 0.1 g and 1.4 ± 0.1 g pour le groupe HSF/HC TP1 et HSF/HC TP2, respectivement).

En général, lorsqu'une masse adipeuse est augmentée en raison d'une accumulation de lipides, cela est dû soit à une augmentation du nombre de cellule (hyperplasie) soit à une augmentation de la taille des cellules (hypertrophie), soit les deux. Dans cette étude, l'augmentation du tissu adipeux des souris recevant un régime enrichi en huile de coprah et en cholestérol est due, au moins en partie, à une hypertrophie des adipocytes. Cela est en accord avec une étude menée sur trois espèces différentes, et qui a montré qu'une augmentation du tissu adipeux est due à une hypertrophie chez le rat et le hamster [1].

Le poids du foie des souris du groupe HL/HC est supérieur à celui des souris du groupe Ctrl ($> 28\%$) et du groupe HSF/HC TP2 ($> 29\%$). Cependant, le régime HSF/HC et la supplémentation avec la PPT n'ont pas d'effet significatif sur l'indice hépatosomatique (IHS, rapport du poids du foie au poids corporel) pour les souris des quatre groupes.

Ces modifications de répartition tissulaire en réponse à une alimentation enrichie en lipides ne sont pas surprenantes et sont en accord avec des études antérieures. En effet, il a été démontré une réaction immédiate des rongeurs en réponse à une alimentation enrichie en lipides, qui se traduit par une augmentation de l'ingestion calorique, de la dépense énergétique et de la répartition tissulaire [2, 3]. De nombreuses autres études ont également décrit une augmentation du tissu adipeux blanc de leurs animaux en réponse à un régime supplémenté avec diverses huiles (huile de coco, huile d'olive etc.) [4]. Cette augmentation du stockage des lipides a été associée à une augmentation des capacités d'exportation des lipides hépatiques vers le tissu adipeux. En effet, une étude menée avec des rongeurs nourris avec un régime contenant 20% d'huile de coco montre une augmentation des VLDL et des LDL de 44% chez la souris, cela est accompagné par une augmentation des Apo E et B au niveau plasmatique [5].

IV.2. Effet de la supplémentation en PPT sur la teneur en lycopène sérique

Le dosage du lycopène sérique par HPLC après douze semaines d'élevage montre que la supplémentation par la PPT augmente la teneur en lycopène chez les souris (0.01 ± 0.003 $\mu\text{g/mL}$ et 0.03 ± 0.006 $\mu\text{g/mL}$ pour le groupe HSF/HC TP1 et HSF/HC TP2, respectivement) (**Figure 10**), d'une façon dose-dépendante.

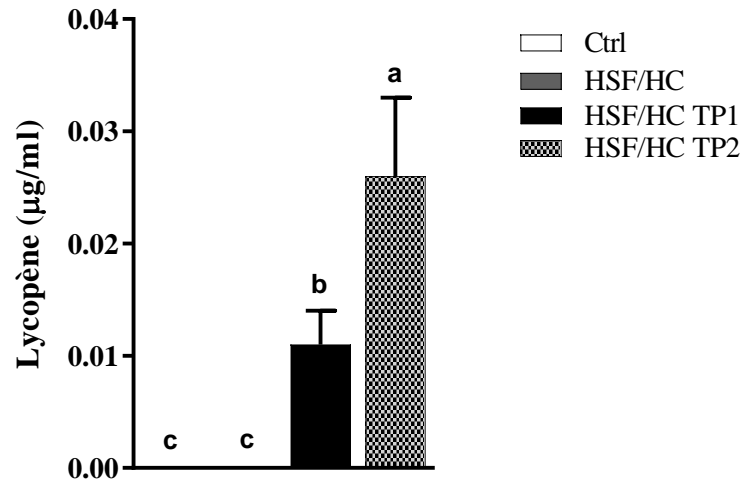


Figure 10: Teneur en lycopène sérique des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe.

Les valeurs trouvées sont faibles compte tenu de la quantité de PPT ingérée par les souris (9 % et 17 % de PPT, pour le groupe HSF/HC TP1 et HSF/HC TP2, respectivement). Cependant, l'analyse montre que la teneur en lycopène sérique des groupes Ctrl et HSF/HC est inférieure à la limite de détection de l'HPLC (0.3 ng /ml).

IV.3. Effet de la supplémentation en PPT sur la tolérance au glucose (OGTT) et la sensibilité à l'insuline (IST)

Ces tests sont réalisés par l'administration de différentes doses du glucose par voie orale chaque mois pendant trois mois pour les souris des quatre groupes (Ctrl, HSF/HC, HSF/HC TP1 avec 46 mg de lycopène/ 100 g d'aliment et le groupe HSF/HC TP2 avec 84 mg de lycopène/ 100 g d'aliment).

Pour cela la glycémie est mesurée à différents intervalles sur 120 mn. Les résultats montrent une augmentation de la glycémie après 15 mn à la quatrième, huitième et la douzième semaine pour les souris des quatre groupes (**Figure 11**). En revanche, après la quatrième semaine, cette augmentation est significativement plus importante chez les souris des groupes Ctrl et HSF/HC que les souris supplémentées par la poudre des pelures de tomate (HSF/HC TP1 et HSF/HC TP2), mais aucune différence significative n'est observée entre les souris Ctrl et HSF/HC à différents temps de l'analyse.

Après huit semaines d'élevage, les résultats du taux du glucose plasmatique à 15 mn montrent qu'il n'y a pas une différence significative entre les souris HSF/HC et les souris supplémentées par la PPT.

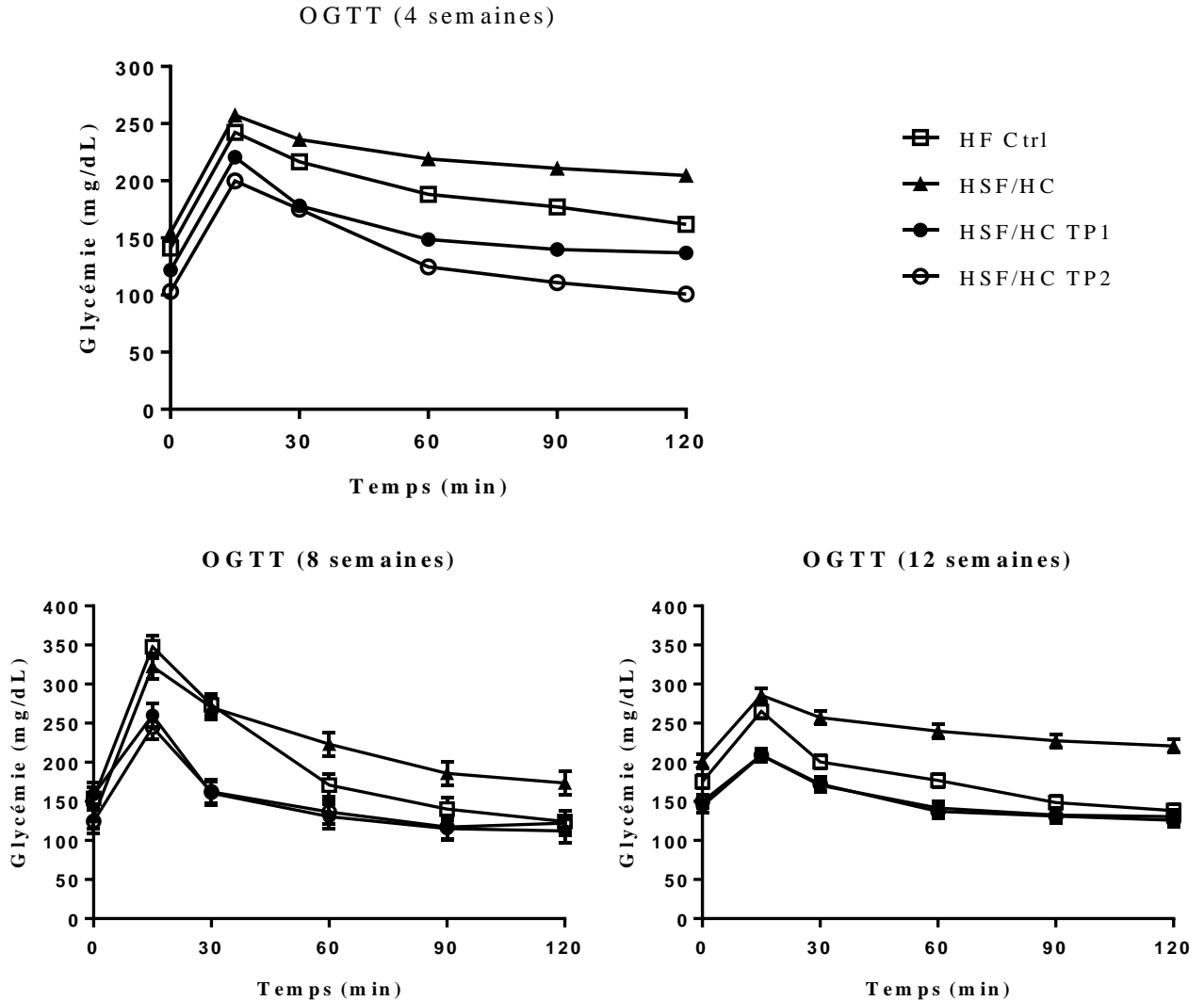


Figure 11 : Impact des différents régimes sur l'OGTT des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe.

L'abaissement de la glycémie au cours du temps est faible chez les souris Ctrl et HSF/HC en comparaison avec les souris supplémentées avec la PPT, mais celle-ci reste élevée jusqu'à la fin de l'analyse dans les groupes HSF/HC. Après 120 mn, le taux sanguin de glucose à est significativement plus élevé chez les souris HSF/HC que les souris Ctrl. Par la suite, l'abaissement de la glycémie des souris HSF/HC est retardé de 30 mn en comparaison avec les souris Ctrl.

A la fin de l'élevage (12 semaines), on constate que la glycémie a été rétablie chez les souris supplémentée par la PPT après 120 mn, mais elle reste très élevée chez les souris HSF/HC. Ces dernières présentent une glycémie orale de 220 g/dL après deux heures de prise du glucose. Cette valeur est supérieure à 150 g/dL et elle est associée à une hypertriglycéridémie : triglycérides $\geq 1,50$ 1,7 mmol/l.

Pour mieux évaluer l'intolérance au glucose des souris, on a calculé l'aire sous la courbe de l'OGTT, plus l'aire sous la courbe est importante plus la souris est intolérante au glucose. Les résultats montrent une différence significative de l'aire sous la courbe entre le groupe HSF/HC et les groupes Ctrl et HSF/HC TP (**Figure 12**).

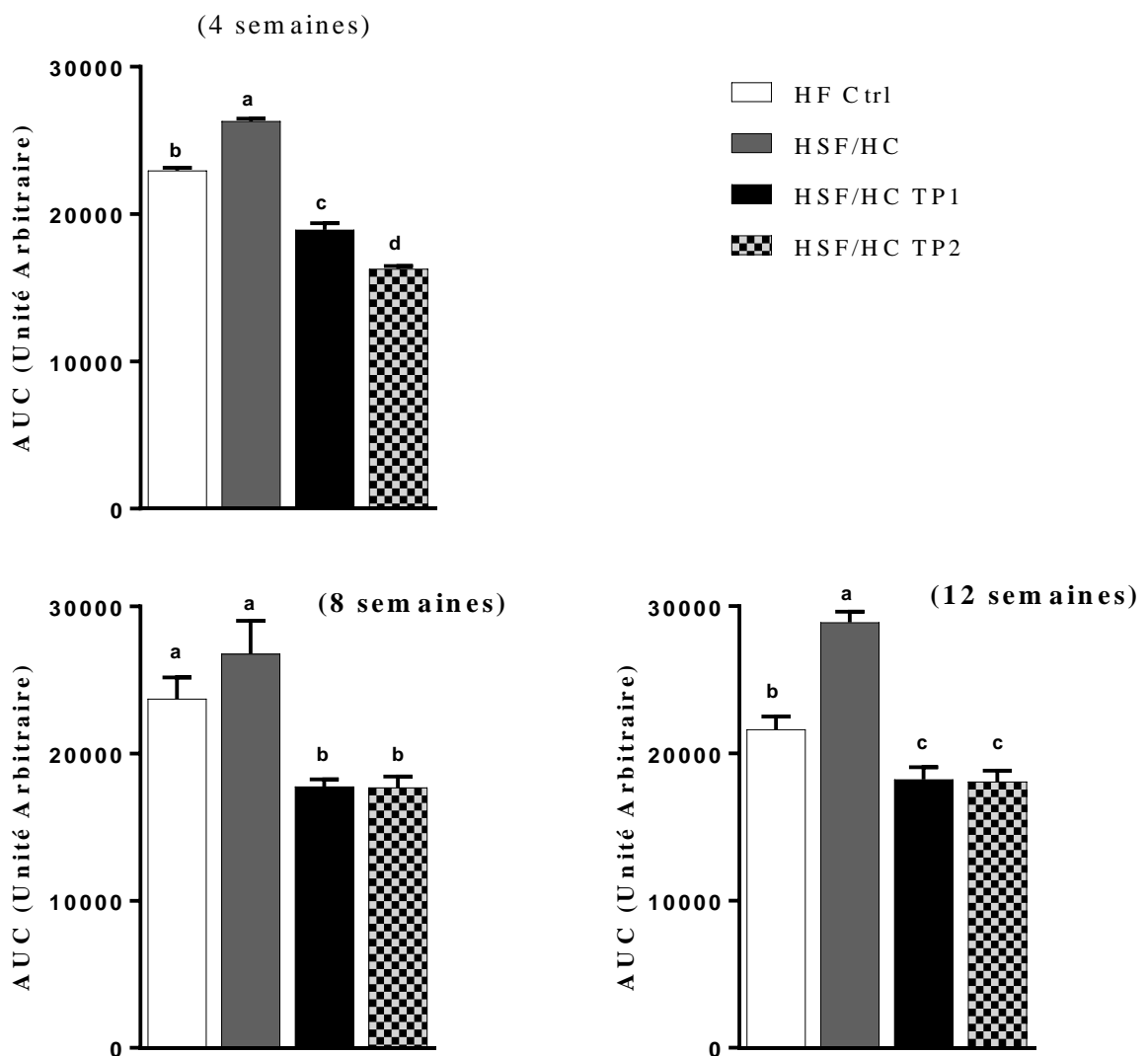


Figure 12 : Présentation des aires sous les courbes de l'OGTT des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne, n=10/groupe.

L'administration de régimes enrichis en lycopène de la PPT régule la glycémie et améliore la tolérance au glucose chez des souris dont l'intolérance est induite par un régime HSF/HC. Plusieurs auteurs ont démontré l'effet hypoglycémiant des produits de la tomate. Tsitsimpikou [6] a trouvé que la supplémentation des patients à syndrome métabolique par le jus de tomate rétablit le taux plasmatique du glucose. Chez le rat, un traitement chronique par le lycopène montre un effet hypoglycémiant [7]. Sur un modèle expérimental de diabète, différentes concentrations de lycopène régulent la glycémie des animaux [8]. En ce qui concerne l'IST, et après quatre semaines d'élevage, les résultats de ce test montrent que le taux du glucose plasmatique diminue rapidement à 15mn, après injection intrapéritonéale de l'insuline dans les quatre groupes (Figure 13).

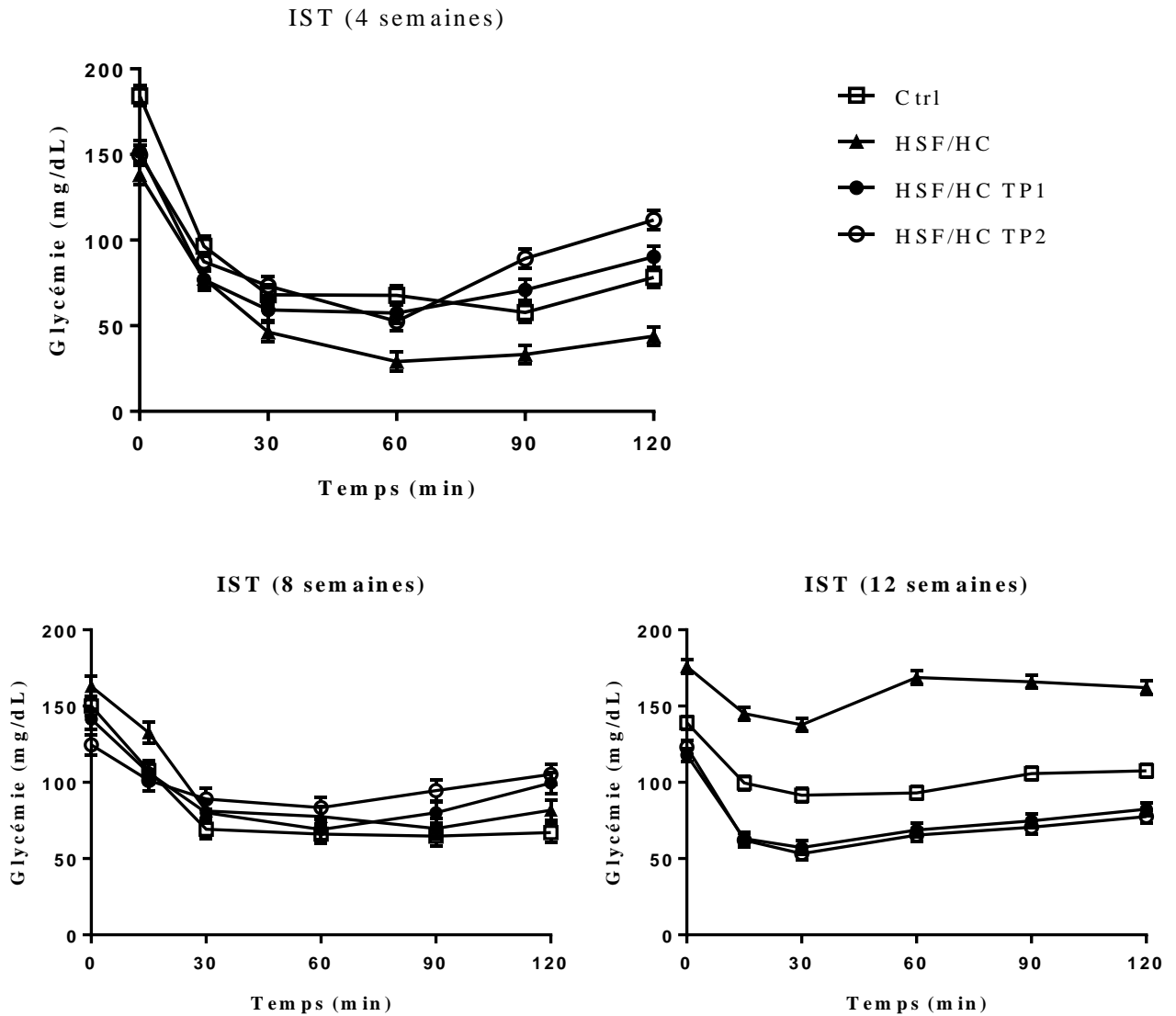


Figure 13: Impact des différents régimes sur l'IST des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe.

Après 120 mn, les résultats montrent que les taux plasmatiques de glucose diminuent de façon significative chez les souris HSF/HC ($p < 0.05$), par rapport au Ctrl. Par contre, les souris supplémentées par la PPT présentent une glycémie normale.

Après huit semaines, le test IST a démontré une diminution significative de la glycémie chez les souris HSF/HC après 30 mn et les souris HSF/HC TP2 après 60 mn.

Après douze semaines, on constate une forte augmentation de la glycémie des souris HFS/HC après 30 mn. Cette élévation persiste jusqu'à la fin de l'analyse (120 mn).

L'augmentation de la glycémie chez les souris HSF/HC même après injection de l'insuline indique un début de développement d'une résistance à l'insuline. Ainsi, chez nos souris HSF/HC, la forte concentration d'insuline plasmatique (voir ci-après) est due à la forte glycémie des animaux. Cela est confirmé par le fait que, dans le début de l'élevage et même après huit semaines sous le régime HSF/HC, le test IST montre que l'injection de l'insuline (augmentation de l'insuline) est accompagnée d'une diminution de glucose plasmatique des souris HSF/HC. Un défaut de sécrétion d'insuline n'est donc pas responsable de la forte glycémie observée chez les souris HSF/HC, puisque celle-ci est stimulable en présence du glucose « état post-prandiale » à la quatrième et la huitième semaine.

L'insulinorésistance est un état qui se caractérise par une réponse biologique diminuée des tissus périphériques à la sécrétion d'insuline. Bien que l'effet de l'insuline sur les cellules cibles soit multiple, le terme d'insulinorésistance se réfère presque exclusivement à l'effet de l'insuline sur le maintien de l'homéostasie du glucose. L'insulinorésistance qui caractérise le syndrome métabolique, précède le plus souvent le diabète de type 2. Il est maintenant admis que l'insulinorésistance a une composante génétique, mais qu'elle peut être acquise par des facteurs environnementaux. Au début, la résistance est compensée par un hyperinsulinisme, ce qui permet de préserver la tolérance au glucose. La détérioration de la tolérance au glucose intervient quand la résistance à l'insuline augmente, ou que la réponse compensatoire de la sécrétion diminue, ou bien quand les deux phénomènes se produisent simultanément. Une augmentation de la concentration en insuline et en glucides augmente la production des ERO, induit un stress oxydant, et active les voies métaboliques génératrices d'ERO, ce qui en retour aggrave à la fois l'action et la sécrétion d'insuline, et, de ce fait, accélère l'installation du diabète de type 2.

La supplémentation des souris HSF/HC par la PPT a permis le rétablissement de la glycémie des souris. Cela est expliqué par l'amélioration de la sensibilité à l'insuline des souris alimentées par un régime HSF/HC TP.

IV.4. Impact des différents régimes sur la glycémie, l'insulinémie et le taux des triglycérides plasmatiques des souris après 12 semaines d'élevage

Le sang provient des souris à jeun depuis 24 h. Cependant, l'heure de la dernière prise de nourriture n'a pas été déterminée avec exactitude. Les souris sont euthanasiées vers 9h du matin, elles sont donc dans un état entre le post-prandial et le post-absorptif sachant que la lumière de l'animalerie s'allume à 7h le matin.

Les souris HSF/HC ont une glycémie à jeun et une insulinémie élevée (8.6 ± 0.3 mM et 10.8 ± 0.3 μ U/ml, respectivement) en comparaison à 6.1 ± 0.1 mM et 5.6 μ U/ml pour les souris Ctrl (**Tableau 7, Figure 14 a et b**). Plusieurs facteurs pourraient être impliqués : i) une augmentation de la stimulation de la production de glucose (glucagon, catécholamines corticostéroïdes) ou ii) une augmentation de la néoglucogenèse hépatique.

Tableau 7 : Caractéristiques plasmatiques des souris supplémentées par les différents régimes expérimentaux après 12 semaines d'élevage.

	Ctrl	HSF/HC	HSF/HC + TP1	HSF/HC + TP2	P-value
N (final/initiale)	7/10	7/10	7/10	7/10	-
Triglycéridémie (mM/L)	1.3 ± 0.1^b	1.6 ± 0.1^a	1.0 ± 0.1^c	1.4 ± 0.1^b	
Glycémie (mM)	6.1 ± 0.1^b	8.6 ± 0.3^a	4.0 ± 0.1^c	5.0 ± 0.1^b	<0.001
Insulinémie (μU/mL)	6.0 ± 1.0^b	10.8 ± 2.0^a	3.0 ± 0.5^a	6.0 ± 2.2^{ab}	<0.001
HOMA_IR (a.u.)	1.8 ± 0.9^b	4.0 ± 2.0^a	0.5 ± 0.7^c	1.7 ± 1.9^b	<0.001

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM (l'erreur type de la moyenne), n=7. Les valeurs de la même ligne avec des lettres différentes sont significativement différentes. Les différences sont considérées comme significatives lorsque le niveau d'erreur est inférieur à 5 % ($p < 0,05$).

Cette augmentation de la glycémie chez les souris HSF/HC, même à une forte insulinémie, peut être expliquée par une diminution de la sensibilité à l'insuline. Cela est confirmé par

le fait que le principal facteur contrôlant la sécrétion d'insuline est la concentration plasmatique de glucose. Son augmentation, comme après un repas, agit sur les cellules- β des îlots de Langerhans pour stimuler la sécrétion d'insuline, alors que sa diminution lors du jeûne inhibe la sécrétion d'insuline.

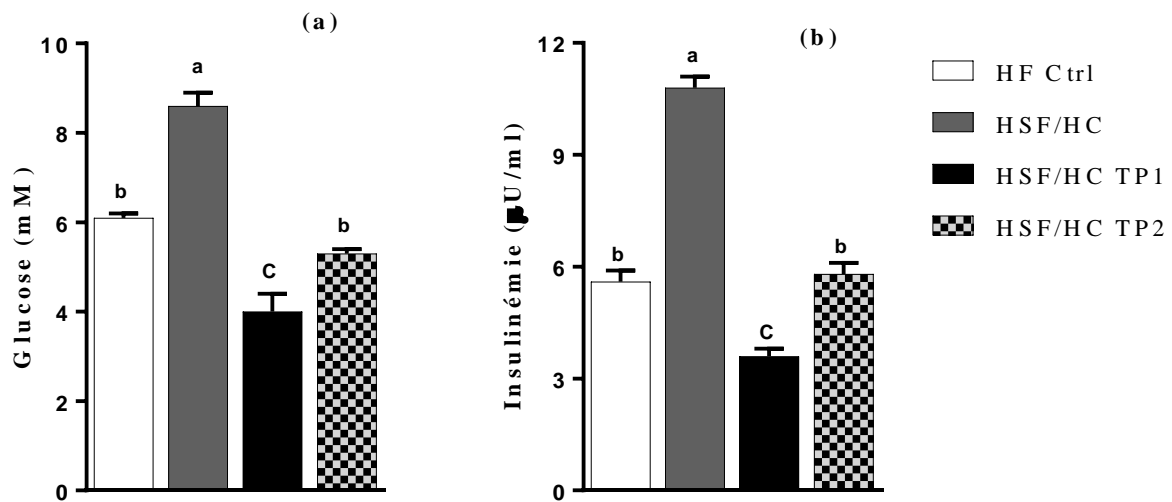


Figure 14: Impact des différents régimes sur la glycémie (a) et l'insulinémie (b) des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. Les lettres différentes sont significativement différentes, ($p < 0,05$).

L'index HOMA-IR (**Figure 15**), qui est le reflet de la résistance à l'insuline est nettement augmenté chez les souris HSF/HC en comparaison aux souris contrôles (4.12 ± 2.0 vs. $1.8 \pm 1,68$), indiquant un développement de la résistance à l'insuline de ces souris. Cela est en accord avec les données de la littérature. Des souris C57BL/6 nourris avec un régime hyperlipidique pendant 16 semaines ont développé une résistance à l'insuline [9].

La supplémentation par la PPT a amélioré d'une manière significative la sensibilité à l'insuline des souris (baisse de l'insulinémie de plus de 50 % et retour à des valeurs physiologiques comparables à celle des souris Ctrl), surtout celles du groupe HSF/HC TP1 qui présentent un HOMA-IR le plus faible ($p < 0.001$).

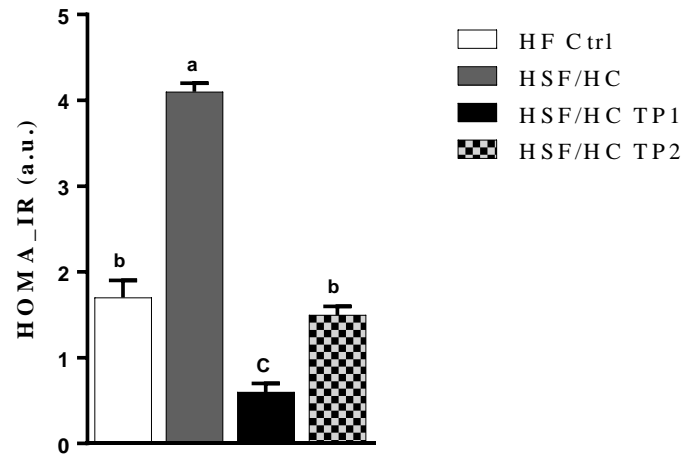


Figure 15: Indice HOMA_IR calculé à partir de plasma des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe (HOMA_IR = Taux d'insuline à jeun (μ U/ml) x glycémie à jeun (mmol /L)/22.5).

Aussi, l'alimentation HSF/HC induit une hypertriglycémie (**Figure 16**), conséquence d'une activation de la lipogénèse, d'une surproduction de VLDL, et de la diminution de la clearance des TG [9]. Nous avons vérifié que, conformément à la littérature [10, 11], le régime riche en lipides saturés et en cholestérol induisait une augmentation du taux des triglycérides, de la glycémie et de l'insuline à jeun.

Les deux doses de la PPT diminuent significativement le niveau des Tg plasmatiques en comparaison avec le régime HSF/HC, mais cet abaissement est plus marqué avec le régime HSF/HC TP (1.1 \pm 0.02 mMol/L pour HSF/HC TP1 vs. 1.6 \pm 0.02 mMol/L pour le groupe Ctrl) (**Figure 16**).

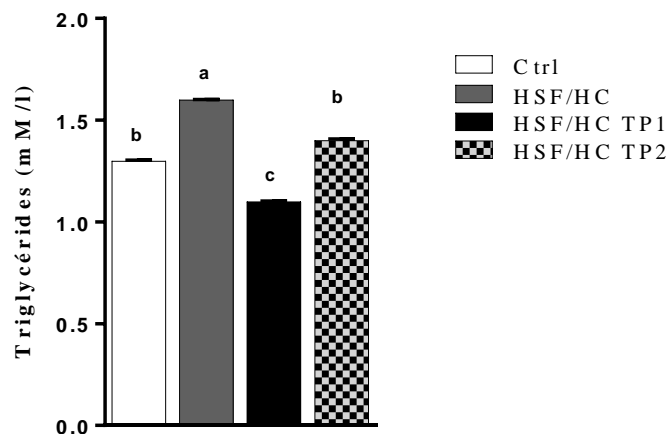


Figure 16 : Impact des différents régimes sur la triglycémie des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. Les lettres différentes sont significativement différentes, ($p < 0,05$).

Les régimes riches en PPT ont significativement modifié ces paramètres. Après 12 semaines de régime enrichi en PPT, nous observons une diminution significative des taux plasmatiques de glucose, de triglycérides, et d'insuline chez les souris (**Figures 14 et 16**).

En termes de prévention nutritionnelle, ces résultats permettent d'envisager un rôle bénéfique de la PPT dans la prévention des dyslipidémies et de l'insulinorésistance et démontrent l'effet insulinosensibilisateur de la PPT. Cependant, nous n'observons pas d'effet dose-dépendant de la teneur en PPT du régime sur ces métabolismes. Au contraire, il semble que le régime à 9 % de PPT ait un effet plus marqué que le régime à 17 % de PPT.

IV.5. Profil lipidique plasmatique

Le profil lipidique plasmatique a également été réalisé, avec le dosage du Total-C, LDL-C, HDL-C et des acides gras non estérifiés (AGNE).

L'effet des régimes ingérés s'est traduit par l'augmentation des concentrations du cholestérol-T (**Figure 17a**) et du LDL-C (**Figure 17b**), particulièrement chez les souris HSF/HC en comparaison avec les souris Ctrl et les souris HSF/HC TP. Les taux enregistrés sont de 2.8 – 4.1 – 3.1 et 3.2 mM/L pour le cholestérol et de 0.8 – 2.5 – 1.5 et 1.2 mM/L pour LDL-C pour les souris Ctrl, HSF/HC, HSF/HC TP1 et HSF/HC TP2 successivement. L'augmentation des taux de LDL-C, peut résulter d'un défaut de catabolisme, en raison d'une anomalie des récepteurs LDL-C, ou alors suite à la mutation de l'Apo B (une protéine qui entoure des groupements de triglycérides formant les VLDL), caractérisée par des hypercholestérolémies. En condition normale l'insuline diminue la synthèse et la stabilité d'ApoB, il est donc tout à fait possible que l'hyperinsulinémie observée chez les souris HSF/HC est impliquée dans la diminution d'ApoB qui sont essentielles à l'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides dans le foie.

Les taux des HDL-C enregistrés chez les souris HSF/HC sont relativement faibles comparativement à ceux des souris Ctrl. Par contre, les souris HSF/HC TP2 présentent des fortes concentrations, soit une augmentation de 15 % et de 39 % par rapport aux souris Ctrl et aux souris HSF/HC successivement (**Figure 17c**).

Il est connu que, le taux des HDL-C sériques est étroitement et inversement corrélé au risque cardiovasculaire. Les dosages permettent de calculer l'indice d'athérogénicité (rapports Total-C/HDL-C ou LDL-C/ HDL-C) constituent un indice révélateur du risque

artériel. Si le rapport Total-C/HDL-C est $>4,85$ et le rapport LDL/HDL $> 3,55$ le risque athérogène est statistiquement important.

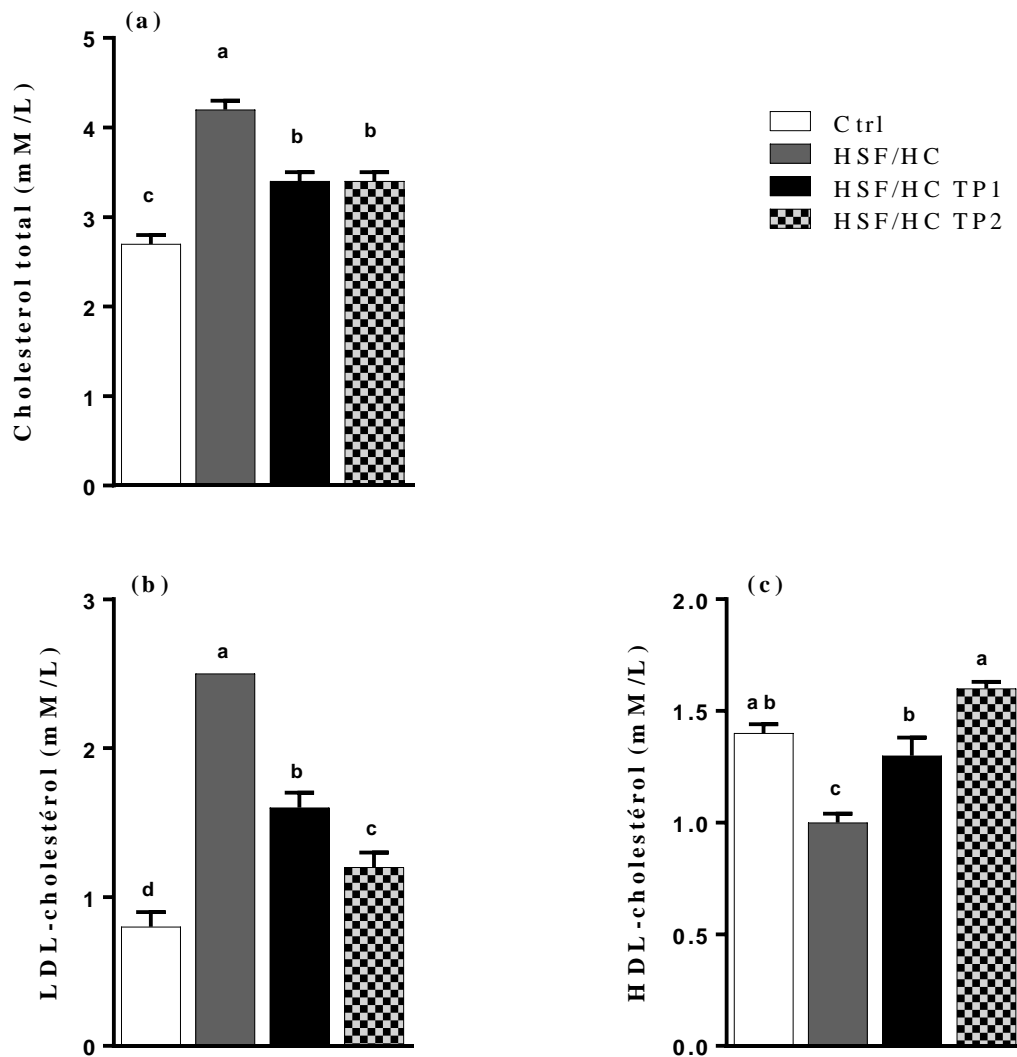


Figure 17 : Impact des différents régimes sur le cholestérol total (a) et les lipoprotéines sériques LDL-C (b) et HDL-C (c) des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. Les lettres différentes sont significativement différentes, ($p < 0,05$).

L'index athérogène du plasma, prenant en compte le Total-C et les HDL-C cholestérol, est réduit après la supplémentation par la PPT (source de lycopène), suggérant un effet protecteur contre la maladie cardiovasculaire. Cela peut être expliqué par l'effet stimulateur du lycopène sur le métabolisme lipidique en augmentant l'activité des récepteurs LDL.

Cependant, nous n’observons pas d’effet dose-dépendant de la teneur en PPT du régime sur les taux de cholestérol des souris HSF/HC TP1 et HSF/HC TP2.

En ce qui concerne le taux des AGNE, il apparaît que les souris Ctrl et les souris HSF/HC TP présentent des fortes concentrations plasmatiques d’acides gras non estérifiés (AGNE) par rapport aux souris HSF/HC ($150.6 \pm 3.9 \mu\text{mol/L}$ pour les souris HSF/HC TP2 vs. $132.9 \pm 2.4 \mu\text{mol/L}$ in HSF/HC) (**Figure 18**). Ce résultat est surprenant, on s’attendait à une diminution après l’administration d’un régime HSF/HC enrichi en PPT. En effet, en condition post-prandiale, les lipides provenant de l’alimentation et de la lipogenèse hépatique, vont être transportés dans le sang sous forme de TG pour être stockés au niveau du tissu adipeux blanc. En parallèle, la sécrétion d’insuline, consécutive au repas, va inhiber la lipolyse du tissu adipeux blanc, diminuant la libération d’AGNE et de glycérol dans le sang.

L’augmentation de la concentration plasmatique d’AGNE chez les souris HSF/HC TP peut être due à une stimulation de la lipolyse adipocytaire et à une diminution de la lipogenèse hépatique.

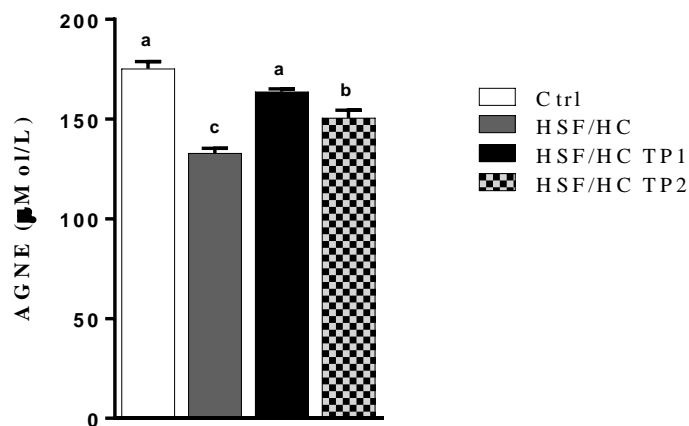


Figure 18: Impact des différents régimes sur les concentrations plasmatiques d’acides gras non estérifiés des souris après 12 semaines d’élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. Les lettres différentes sont significativement différentes, ($p < 0,05$).

Au vu de ces résultats on peut donc se poser la question de la validité de ceux-ci. La raison pourrait être la non intégrité du plasma. En effet, on peut supposer que les congélations/décongélations successives des échantillons pourraient provoquer la dégradation des TG, faussant ainsi les résultats. Les mesures obtenues sur plasma des

souris HSF/HC ayant été réalisées en même temps que celles des souris Ctrl et des souris HSF/HC TP, la validité de celles-ci est donc également discutable.

Cependant, si on se base sur les résultats préliminaires de l'OGTT et e l'IST, on aurait pu s'attendre à observer un taux d'AGNE supérieur chez les souris HSF/HC en raison de l'insulinorésistance développée. Des dosages à partir de plasma frais seraient tout de même nécessaires afin de vérifier cela !!.

IV.6. Evaluation des TBARS (Thiols Barbituric Acide Reactive Species)

L'augmentation de l'accumulation de TG lors d'une stéatose favoriserait une peroxydation des lipides avec par la suite le recrutement de médiateurs de l'inflammation et contribuerait ainsi à l'évolution vers une NASH [12]. C'est pourquoi nous avons décidé par la suite d'étudier l'effet de la PPT sur cette peroxydation lipidique.

Le niveau de peroxydes lipidiques est déterminé par un dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS).

Après 12 semaines (**Figure 19**), le régime HSF/HC induit une augmentation significative des TBARS en comparaison avec les souris Ctrl (1.52 ± 0.09 mM/ml pour HSF/HC vs. 0.07 ± 0.01 mM/ml pour les souris Ctrl).

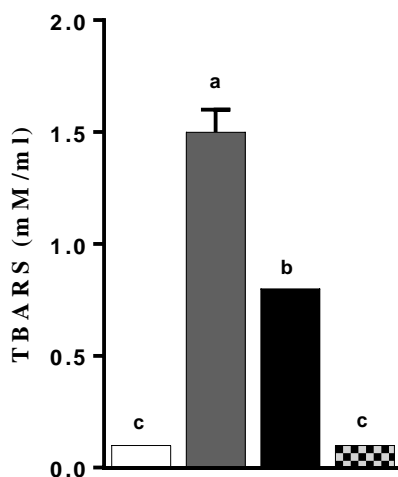


Figure 19 : Impact des différents régimes sur les concentrations plasmatiques en peroxydes lipidiques des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. Les lettres différentes sont significativement différentes, ($p < 0,05$).

Le régime HSF/HC augmente le niveau des lipides hépatiques. Cette accumulation excessive de lipides dépasserait la capacité de la mitochondrie à les oxyder, et la voie de

l'oxydation microsomale des acides gras à chaîne longue (AGCL), normalement mineure, prendrait alors le relais pour oxyder les lipides en excès [13]. L'oxydation microsomale des AGCL génère de grandes quantités de ROS, cela provoque des dommages au niveau de la chaîne respiratoire. Ces modifications vont à leur tour induire une augmentation de la production de ROS formant ainsi un cercle vicieux entre peroxydation lipidique et production de ROS [10]. Ceux-ci entraînent une augmentation des peroxydes lipidiques (TBARS) contribuant à une cytolysse hépatocytaire (ALAT/ASAT) et une inflammation, reflets d'une NASH [14, 15]. De plus, la peroxydation des lipides entraîne l'oxydation des protéines, connue pour être délétère pour la cellule [16]. En accord avec ce qui est déjà rapporté [11, 17-19], nos résultats montrent que les souris HSF/HC développent une stéatose après 12 semaines de régime HSF/HC puis une NASH. Ceci se traduit par une augmentation du niveau des TG, une cytolysse hépatocytaire (augmentation du rapport ALAT/ASAT) et la présence d'un stress oxydant (augmentation des TBARS).

La supplémentation des souris par la PPT, permet d'empêcher la peroxydation lipidique d'une façon dose-dépendante de la concentration en PPT (**Figure 19**). Les résultats obtenus montrent que des doses plus faibles de PPT (9 g/kg de régime) étaient efficaces et diminuaient la peroxydation lipidique, mais cette réduction augmente avec les fortes doses de PPT (0.06 ± 0.01 mM/ml pour HSF/HC TP2 vs. 0.75 ± 0.06 mM/ml pour les souris HSF/HC TP1). Ces résultats confirmaient la bio-activité de la poudre de tomate sur la peroxydation lipidique précédemment publiée [20, 21].

IV.7. Etude hépatique

IV.7.1. Bilan hépatique

Les activités des enzymes plasmatiques des quatre groupes de souris ont également été mesurées. Les transaminases (l'aspartate aminotransférase ou ASAT et l'alanine aminotransférase ou ALAT) sont des indicateurs sensibles d'atteintes hépatocytaires. Ce sont des enzymes normalement présentes dans le sérum à une faible concentration, mais lors de cytolysse, elles se retrouvent en grande quantité dans le sérum. Le niveau des aminotransférases (ALAT et ASAT) a augmenté de façon significative après 12 semaines chez les souris HSF/HC (**Figure 20**). Aussi, il apparaît clairement que le régime HSF/HC induit une cytolysse hépatocytaire traduite par une augmentation du rapport ALAT/ASAT chez les souris HSF/HC.

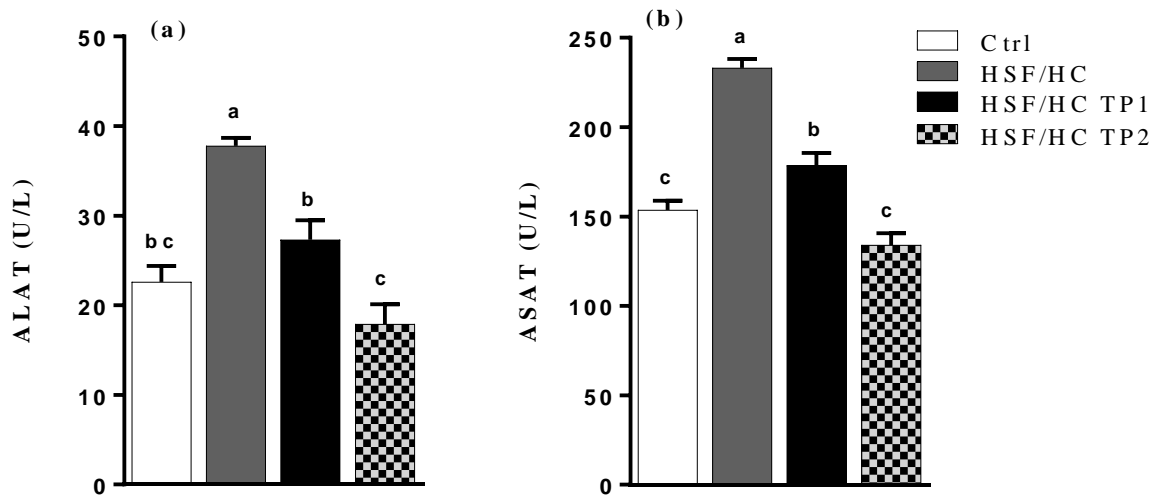


Figure 20 : Impact des différents régimes sur l'activité des aminotransférases (ALAT (a) et ASAT (b) des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. Les lettres différentes sont significativement différentes, ($p < 0,05$).

L'activité de l'ASAT a été diminuée d'une manière significative chez les souris HSF/HC TP2 en comparaison avec les souris HSF/HC et les souris Ctrl (134.0 ± 6.6 U/L pour les souris HSF/HC TP2 vs. 233.1 ± 5.0 U/L pour les souris HSF/HC et 153.7 ± 5.1 U/L pour les souris Ctrl). Cette élévation de l'activité des aminotransférases est expliquée par l'augmentation de la perméabilité de la membrane des hépatocytes.

Il est connu que l'ASAT est retrouvée à des concentrations élevées dans les cellules du foie. L'ALAT est localisée uniquement dans le cytosol, sa concentration dans les tissus non hépatiques est très faible, elle est dans ces cas confinée au cytoplasme. La forte élévation de sa concentration sérique est relativement spécifique d'une atteinte de l'hépatocyte. ALAT et ASAT sont deux enzymes libérées en cas de lésions cellulaires en rapport avec une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire ou d'une nécrose cellulaire. L'ALAT tend à augmenter ou chuter de façon parallèle à l'ASAT, mais la libération de l'ASAT mitochondriale à partir de l'hépatocyte est supposée impliquée dans des lésions cellulaires plus sévères que la libération de l'ALAT.

L'activité de la phosphatase alcaline (ALK) a été significativement élevée chez les souris HSF/HC en comparaison avec les souris Ctrl (140.0 ± 6.6 U/L pour les souris HSF/HC vs. 80.1 ± 5.0 U/L pour les souris Ctrl) (**Figure 21**). La supplémentation par la PPT a réduit d'une manière significative l'activité de l'ALK Ctrl (45.0 ± 1.6 U/L pour les souris HSF/HC TP1 et 35.1 ± 1.0 U/L pour les souris HSF/HC TP2).

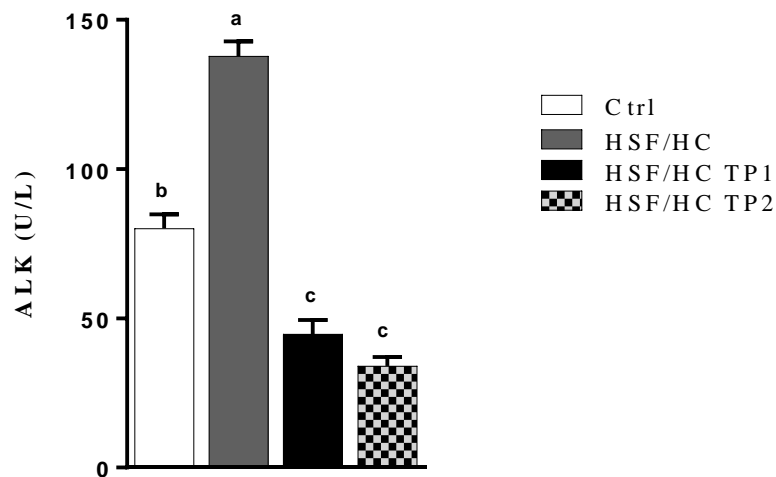


Figure 21 : Impact des différents régimes sur l'activité de l'alkaline phosphatase (ALK) des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. Les lettres différentes sont significativement différentes, ($p < 0,05$).

La ALK, est un marqueur de la toxicité, et exprime une éventuelle défaillance biliaire, ses taux augmentent, dans le cas de dommages subis par le foie [22]. L'effet de la PPT sur les activités des enzymes plasmatiques (ALAT, ASAT et ALK) laisse apparaître une réduction conséquente des activités, et plus particulièrement chez les souris HSF/HC TP2, ce qui laisse supposer que le régime enrichi en PPT a protégé les membranes hépatocellulaires ce qui permet de rétablir l'activité des enzymes plasmatiques.

Les dosages de bilirubine servent surtout au diagnostic de maladies hépatiques. Les souris HSF/HC présentent des fortes teneurs en bilirubine en comparaison avec les souris Ctrl ($18.0 \pm 0.6 \mu\text{M/L}$ pour les souris HSF/HC vs. $4.1 \pm 0.5 \mu\text{M/L}$ pour les souris Ctrl) (**Figure 22**).

La supplémentation des souris HSF/HC par la PPT a montré une nette diminution de la concentration de bilirubine, avec des concentrations 10 fois plus faible que les souris HSF/HC. L'augmentation de la bilirubine non conjuguée est expliquée par un défaut de conjugaison au niveau du foie, cela bloque la voie normale d'excrétion.

Les nombreuses études réalisées avec des rats et souris recevant un régime hyperlipidique enrichi par le vinaigre et le jus de la tomate ont montré une nette amélioration de la concentration sérique des enzymes plasmatiques [11, 19].

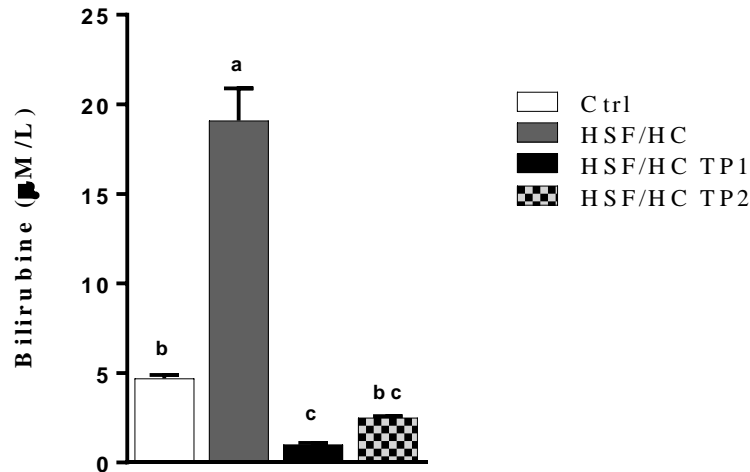


Figure 22 : Impact des différents régimes sur la bilirubine libre des souris après 12 semaines d'élevage. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. Les lettres différentes sont significativement différentes, ($p < 0,05$).

Dans notre étude l'augmentation de l'activité des enzymes plasmatiques et de la concentration en bilirubine, nous confirme la présence de dommages cellulaires hépatiques dus au régime HSF/HC. Ces dommages en association avec la stéatose et les facteurs d'inflammation, nous confirment la présence de NASH dans le foie des souris HSF/HC.

IV.7.2. Analyse histologique

Lors de chaque expérience des petits morceaux de foie sont prélevés pour être fixés dans du formol à 4%. Une analyse histologique est réalisée afin de mettre en évidence la présence de stéatose sur les foies des différents groupes de souris et de vérifier si le régime HSF/HC induit ou non une NASH.

Après fixation dans du formol, les coupes de foie des souris Ctrl (a), HSF/HC (b), HSF/HC TP1 (c) et HSF/HC TP2 (d) sont colorées avec de l'hématoxyline & éosine et observées à un grossissement de 10X. Les alvéoles blanc indiquent la présence de microvésicules lipidiques. Le seuil inférieur de présence de stéatose a été fixé à 5% des hépatocytes touchés. L'analyse histologique montre la présence de plusieurs gouttelettes lipidiques chez les souris HSF/HC (indiquées par les flèches rouges sur la **figure 23**), avec des proportions largement supérieures à 5%.

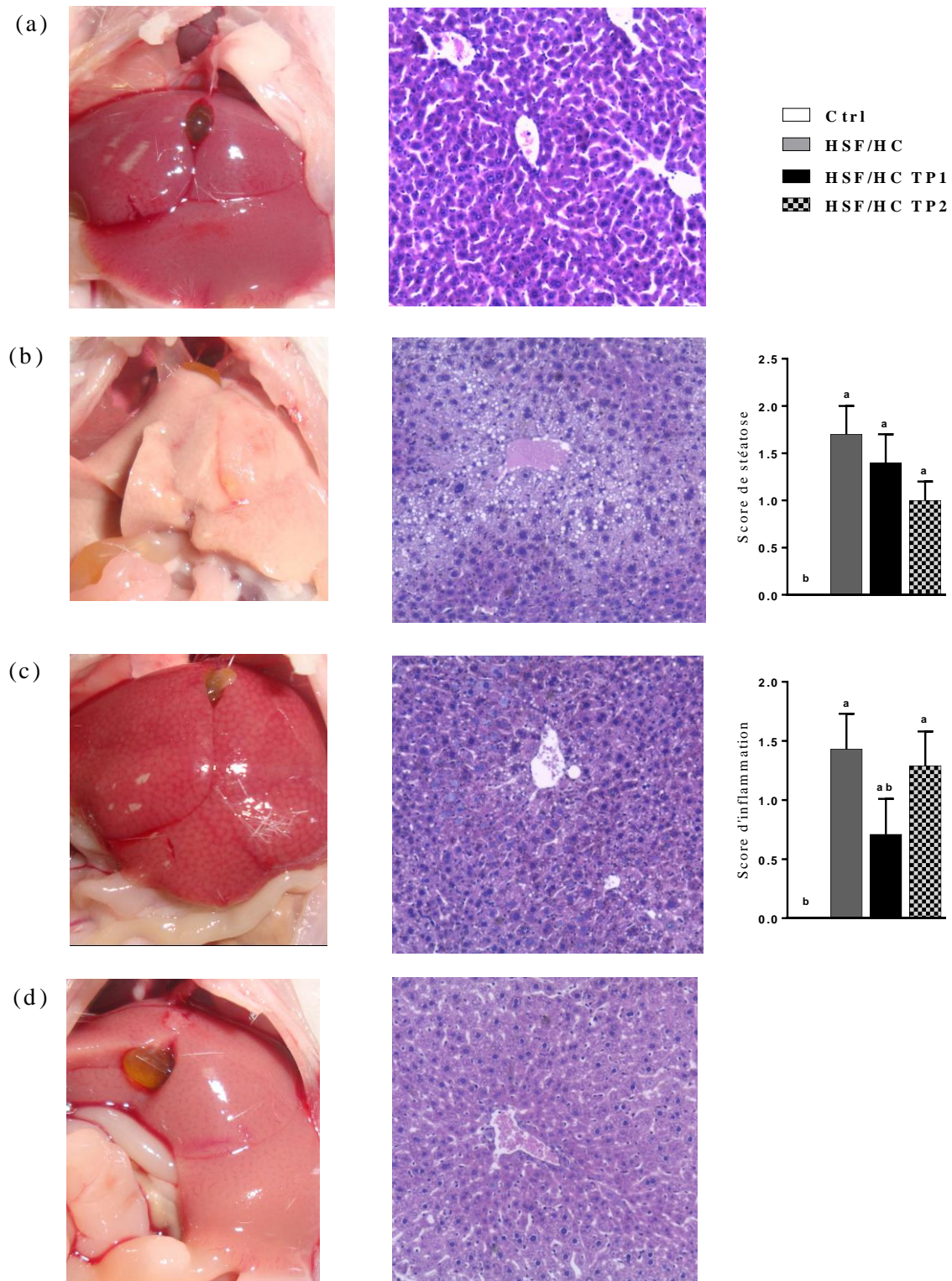


Figure 23 : Observation macroscopique et microscopique des foies des souris Ctrl (a), HSF/HC (b), HSF/HC TP1 (c) et HSF/HC TP2 (d) après 12 semaines d'élevage. Les échantillons de foie sont marqués avec de l'hématoxyline et de l'éosine (Grossissement X10). Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, n=10/groupe. Les lettres différentes sont significativement différentes, ($p < 0,05$).

Lors d'une première observation, à l'échelle macroscopique, le foie des souris HSF/HC apparaît pâle et gras en comparaison avec les rats contrôles. L'examen histopathologique a mis en évidence des lésions de stéatose, le plus souvent microvacuolaire, sur la quasi-totalité des animaux. La répartition de la stéatose était le plus souvent centro-lobulaire à portante (pontage entre les veines centro-lobulaires) plus marquée dans les hépatocytes des souris HSF/HC en comparaison avec les souris HSF/HC (**Figures 23a et 23b**).

En ce qui concerne l'inflammation, elle était le plus souvent de nature lymphoplasmocytaire à localisation sinusoidale essentiellement plus marquée chez les souris HSF/HC.

L'analyse histologique nous confirme la forte accumulation de lipides hépatiques (stéatose). Cette stéatose massive en présence des foyers inflammatoires, nous confirment la présence de NASH dans le foie des souris HSF/HC.

La supplémentation des souris HSF/HC par la PPT semble diminuer l'intensité de la stéatose hépatique et de l'inflammation, cependant certaines exceptions ont été observées, elles sont à mettre en relation avec la réponse individuelle de l'hôte (**Figures 23c et 23d**). Plusieurs études ont montré la capacité du jus de tomate et de vin de tomate de diminuer la stéatose hépatique des souris alimentées par un régime riche en lipide et en cholestérol [**11, 23**].

La question se pose donc du devenir des lipides ingérés, puisque ceux-ci ne sont pas stockés au niveau du foie. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées afin d'expliquer cela. Tout d'abord, si les lipides ne sont pas stockés au niveau du foie, ils sont peut être exportés et stockés au sein d'un autre tissu. Une deuxième hypothèse peut également être proposée pour expliquer la diminution de la stéatose. Si les lipides ne sont pas stockés, ils pourraient être utilisés et β -oxydés de manière accrue au niveau du foie. Il est connu que la CPT1A constitue l'étape cruciale et limitante de l'entrée des AGCL dans la matrice mitochondriale via son inhibition par le malonyl-CoA. De ce fait, la CPT1 constitue un site majeur de régulation de la β -oxydation mitochondriale des AGCL. Donc on peut suggérer que la PPT stimule l'activité de la CPT1 (**Figure 24**).

Enfin la diminution de la stéatose peut être expliquée par la capacité de la PPT à neutraliser les espèces réactives générées par la peroxydation lipidique.

IV.7.3. Effets de la PPT dans le foie

Une des approches proposées pour contrecarrer ou atténuer la stéatose hépatique consisterait à utiliser des produits antioxydants naturels. Dans ce contexte, on a choisi d'étudier l'effet de la poudre de pelures de tomate.

Nos résultats montrent que les souris HSF/HC supplémentées par la PPT semblent être en mesure d'atténuer le développement de la stéatose après 12 semaines sur régime. Cela pourrait s'expliquer par l'augmentation de la capacité mitochondriale à oxyder les TG *via* la supplémentation par la PPT, qui semble avoir la capacité à atténuer leurs niveaux après 12 semaines de régime HSF/HC TP. Ainsi la diminution de la peroxydation lipidique, la cytolysse hépatocyttaire (ALAT/ASAT) et de l'inflammation, reflétant une diminution de l'état de NASH.

Les souris HSF/HC TP2 accumulent moins de peroxydes, cela peut être expliqué par une diminution du niveau d'oxydation microsomale des AGCL et une stimulation de la β -oxydation (Figure 24). Ceci contribuerait à diminuer les peroxydes générés par les microsomes.

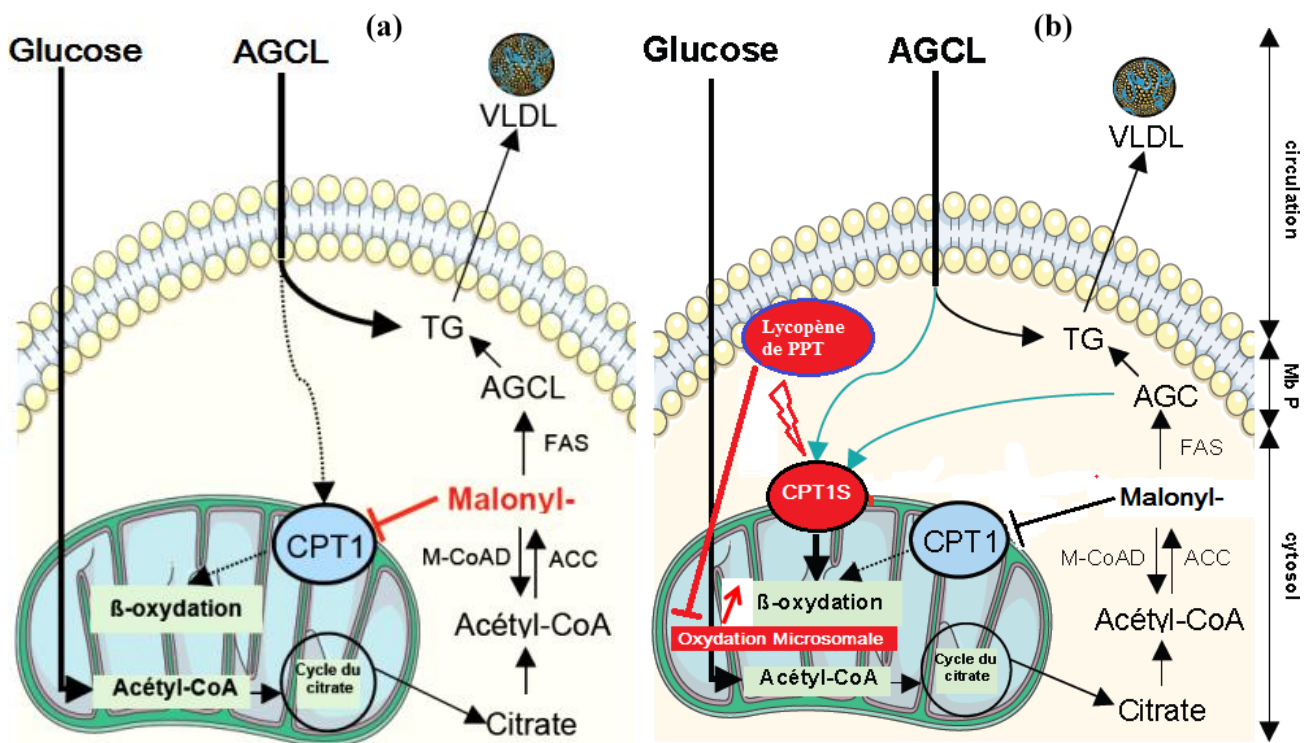


Figure 24 : Rôles possibles de la PPT dans l'inhibition de la progression d'une simple stéatose à une NASH au niveau des hépatocytes. (a) Etat post-prandial, (b) Effet de la PPT sur l'oxydation mitochondriale.

Cependant, l'absence d'effet significatif de la PPT sur la stéatose peut être due à une surcharge en TG dépassant la capacité du foie à oxyder les AGCL. Par ailleurs, des études ont déterminé l'effet de produits antioxydants naturels dans un modèle de NASH [17, 19, 24]. Ces études ont montré des résultats similaires aux nôtres : une diminution des ALAT et du stress oxydant en présence de ces composés antioxydants. Ces études ont donc mis en évidence qu'en diminuant le stress oxydant par apport d'antioxydants naturels, l'état de NASH est atténué. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle le stress oxydant serait le précurseur de l'évolution de la stéatose en NASH [25].

Pour récapituler, l'augmentation de la capacité mitochondriale à oxyder les AGCL, *via* la supplémentation par la PPT, chez des souris mises sur régime HSF/HC, permet non seulement de limiter l'induction de la voie microsomale de l'oxydation de AGCL, génératrice de ROS, mais aussi de diminuer la cytolysse hépatocytaire et l'inflammation.

Ainsi, ces résultats suggèrent que la stimulation de l'oxydation mitochondriale hépatiques des AGCL chez les souris supplémentées par la PPT permet de contrecarrer le développement d'une stéatose hépatique en NASH.

IV.8. Discussion générale et perspectives

IV.8.1. Principaux résultats

Depuis plusieurs années, la maladie de foie stéatosé non alcoolique (NAFLD) est reconnue comme étant une complication hépatique majeure dont la prévalence est de plus en plus importante dans le monde suite aux changements du mode d'alimentation, à la baisse d'activité physique et à l'augmentation de l'obésité. Sous cette dénomination de NAFLD sont regroupées la simple stéatose, résultant d'une accumulation excessive de lipides au niveau du foie, et sa forme progressive et délétère impliquant une inflammation du foie : la stéatohépatite non alcoolique (NASH) [26, 27].

Dans cette étude nous avons réalisé un régime qui reflète les habitudes alimentaires des patients atteints de NASH décrites par Musso [28]. Nous avons donc réalisé un régime enrichi en acides gras saturés (AGS) et de cholestérol de manière à tenter d'induire une stéatohépatite non alcoolique chez la souris. Ce régime a été donné *ad libitum* aux animaux dès leur sevrage, et pendant 12 semaines.

Après 12 semaines sous régime HSF/HC, les souris de ce groupe présentent une glycémie orale de 220 mg/dL après deux heures de prise du glucose. Cette valeur est supérieure à 150 mg/dL, elle est associée à une hypertriglycéridémie : triglycérides $\geq 1,7$ mmol/l, et une

peroxydation lipidique élevée. Ces augmentations sont considérées comme des marqueurs de développement d'une insulino-résistance. Selon Alberti [29], une insulino-résistance est identifiée par une hyperglycémie orale provoquée (glycémie $\geq 1,40$ g/l deux heures après la prise d'une solution de glucose associée à une hypertriglycéridémie : triglycérides $\geq 1,7$ mmol/l).

Le lycopène de la PPT peut moduler la glycémie à travers plusieurs mécanismes incluant la modification de la production hépatique de glucose ou l'augmentation de sa captation par les tissus périphériques [30].

L'étude histologique montre que les foies des souris traités présentent des lésions typiques d'une NASH établie, incluant une stéatose microvacuolaire et de l'inflammation. Ces observations sont en accord avec des données récentes obtenues pour d'autres groupes d'animaux, qui traitent les conséquences d'un régime riche en lipides et en cholestérol sur le métabolisme lipidique et hépatique [9, 19, 24, 31]. Chez ces souris recevant un régime riche en lipides et/ou en cholestérol, la stéatohépatite est associée à un niveau de triglycérides circulants extrêmement élevé. Comme cela a également été décrit précédemment, le régime HSF/HC induit une très massive stéatose, qui s'accompagne de phénomènes inflammatoires. Cette inflammation est mise en évidence par la présence de loci inflammatoires sur les coupes histologiques. Elle est la conséquence de la détérioration du système antioxydant, induite par la surcharge lipidique hépatique. Ces atteintes provoquent de sérieux dommages hépatiques, provoquant une augmentation des transaminases sériques (ALAT et ASAT) indiquant ainsi une dégénérescence cellulaire hépatique.

La découverte récente des relations étroites entre l'insulino-résistance, signe majeur de la NASH, et le stress oxydant (déséquilibre de la balance des produits pro-oxydants/antioxydants) devrait conduire à considérer les nutriments, à la fois antioxydants et potentiellement insulinosensibilisateurs, comme des facteurs nutritionnels de choix dans la stratégie de prévention de la NASH [32].

Le stress oxydant est en partie expliqué par l'hyperglycémie, source de production d'ERO, l'hyperinsulinisme et la diminution des défenses antioxydantes. L'altération de la sensibilité à l'insuline conduit à l'installation d'une insulino-résistance qui participe à une élévation chronique de la glycémie, donc un taux d'oxydation du glucose plus élevé et une augmentation de la production des OH[°] [33].

De ce fait, considérant que l'association entre insulino-résistance et stress oxydant est impliquée dans la sévérité de la NASH. Augmenter les apports nutritionnels antioxydants pourrait être un des moyens de prévention nutritionnelle contre les altérations métaboliques. Parmi les antioxydants nutritionnels, le lycopène de la PPT semble particulièrement intéressant, en raison de son fort pouvoir antioxydant [34].

Notre étude montre que la supplémentation des souris HSF/HC par la PPT augmente le taux du lycopène sérique, rétablit les paramètres sériques biochimiques et améliore la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose des souris. Cela conforte donc notre hypothèse selon laquelle une prévention efficace de la NASH doit s'appuyer sur des apports en antioxydants qui modulent également l'insulino-résistance. Cette constatation s'accorde avec des résultats similaires observés avec la Metformine, puissant régulateur de l'insulino-résistance dont l'effet antioxydant a été également décrit [35] ou avec la vitamine E, puissant antioxydant dont l'effet insulinosensibilisateur a également été décrit chez l'animal en syndrome métabolique [36] et avec le lycopène de l'extrait de la tomate [17].

La supplémentation par la poudre de pelures de tomate avec une concentration de 46 et 84 mg de lycopène/ 100 g d'aliment augmente le taux du lycopène plasmatique de 10 à 30 µg/L pour les souris HSL/HC TP1 et HSL/HC TP2 respectivement. Ce taux est relativement supérieur à celui trouvé par Alshatoui [20] chez des rats supplémentés par la poudre de tomate et les bandlets de lycopène pendant 5 semaines. Avec une concentration de 0.62 g de lycopène /Kg de diète. Les concentrations plasmatiques du lycopène varient entre 20 et 60 µg/L. Cette différence peut être due à la quantité élevée des lipides utilisés dans notre étude en comparaison avec le régime AIN93M utilisé dans l'étude précédente. En plus, dans la présente étude, on a utilisé l'huile de coprah riche en acides gras à moyenne chaîne, cela favorise la diffusivité des caroténoïdes et du lycopène [37].

A l'inverse, une étude récente semble montrer que la quantité des lipides dans le régime alimentaire n'a aucun effet sur le niveau du lycopène sérique [38]. D'autres études ont montré que la concentration du lycopène sériques chez des volontaires humains en bonne santé a augmenté après une semaine de consommation de sauce tomate (39 mg de lycopène), du jus de tomate (50 mg de lycopène), ou oléorésine de tomate (75 ou 150 mg de lycopène), en comparaison avec le placebo [39, 40].

La supplémentation par la PPT n'a pas réduit de manière significative l'augmentation du gain de poids corporel des souris HSF / HC après 12 semaines d'élevage, mais elle a

ralenti l'accumulation de tissu adipeux. Les études de l'effet des produits de la tomate sur le gain de poids sont contradictoires. Certaines rapportent une diminution du gain de poids corporel chez les rats nourris avec un régime riche en lipides et supplémenté par différentes concentrations de lycopène du vin de tomate pendant 6 semaines [31]. Cependant, aucun effet n'a été observé chez les hamsters supplémentés avec 3% et 9% de pâte de tomate, après 8 semaines sous un régime riche en lipides athérogène [41], ou supplémentés par le lycopène pur pendant 6 semaines à 10 mg/kg de poids corporel/ jour [41]. Les méthodologies des différentes études telles que la transformation de la tomate, la composition de l'alimentation, l'origine des lipides et la durée du traitement, peuvent en partie expliquer les différences en terme du gain de poids corporel. L'effet du lycopène sur l'adiposité est incertain. Des résultats récents indiquent que le lycopène n'a pas un effet anti-adiposité [42]. Les résultats de notre étude suggèrent que la PPT peut avoir un effet anti-adiposité, cela peut être dû à l'action des composants présents dans la PPT autre que le lycopène. Aussi, cela peut être expliqué par la quantité de lipides des régimes enrichis par la PPT, légèrement plus faible, par rapport à la diète HSF / HC.

La supplémentation par la PPT permet également d'augmenter la sensibilité à l'insuline et de diminuer l'intolérance au glucose d'une façon dose-dépendante. Ces effets bénéfiques sont prouvés par la concentration de l'insuline, le taux du glucose plasmatique, et HOMA-IR qui a été significativement plus élevée chez les souris HSF/HC TP1 (9% de PPT) que les souris HSF/HC TP2 (17% PPT). Plusieurs études ont prouvé que la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose sont associées au stress oxydatif [9, 43-45]; par conséquent, l'effet bénéfique de la PPT sur la sensibilité à l'insuline peut être expliqué par l'activité antioxydante du lycopène [46, 47]. Toutefois, l'effet du lycopène sur la sensibilité à l'insuline n'est pas consistant. Luvizotto, n'a pas constaté cet effet sur des rats supplémentés par le lycopène-oléorésine après 6 semaines d'élevage [42]. L'effet positif obtenu dans notre étude peut être due à l'utilisation directe de la poudre des pelures de tomate, qui est riche en composés bioactifs autres que le lycopène et de fibres. **L'Association canadienne du diabète** a rapporté que les fibres alimentaires ralentissent la vidange gastrique et l'absorption du glucose, ce qui conduit à améliorer le contrôle postprandiale du glucose dans le sang [48]. Cependant, nous estimons que la quantité de fibres de la PPT dans le régime alimentaire global n'a pas été suffisamment importante pour provoquer l'effet constaté dans cette étude.

Contrairement à la relation établie entre les concentrations élevées des AGNE et la résistance à l'insuline [49], les résultats de notre étude suggère qu'il n'y a pas une association entre l'accumulation de tissu adipeux, la concentration plasmatique des AGNE et la résistance à l'insuline. En effet, les souris HSF/HC avec des faibles concentrations plasmatiques en FFA, ont développé une résistance à l'insuline. A l'inverse, la sensibilité à l'insuline n'a pas été affectée chez les souris Ctrl et les souris supplémentées par la PPT, qui présentent des concentrations plasmatiques élevées en AGNE. En effet, des études récentes n'ont pas mis en évidence une relation entre la concentration plasmatique d'AGNE et l'intolérance au glucose et d'autres caractéristiques du syndrome métabolique [50, 51].

Pour le profil plasmatique des souris, le traitement par la PPT s'est traduit par une diminution significative des concentrations plasmatiques du cholestérol, LDL-C, Tg et des enzymes hépatiques (AST, ALT, et ALK) d'une manière dose-dépendante, à l'exception de la concentration en Tg, qui a été significativement réduite par la supplémentation de 9% de PPT. La supplémentation en PPT permet également d'augmenter les HDL-C, d'une façon dose-dépendante de la concentration en PPT. En effet, plusieurs études ont montré l'effet bénéfique du lycopène et des produits de la tomate sur le profil lipidique en augmentant la concentration plasmatique des HDL-C [41], et en diminuant les concentrations plasmatiques de Tg [20, 38, 52] et du cholestérol [41, 53] chez l'animal ou chez l'homme [54]. Cependant, une autre étude n'a observé aucune amélioration significative de la concentration plasmatique en cholestérol chez les rats supplémentés par le vin de tomate [31]. Dans l'étude précédente, il a été prouvé que l'augmentation du taux de HDL-c inhibe le développement de l'athérosclérose. Les résultats de notre étude suggèrent que la PPT a favorisé le transport inverse du cholestérol et donc elle est douée de propriétés antiathérogènes (ralentissement de l'oxydation des LDL-c, un phénomène à l'origine de la formation de la plaque d'athérome). Cependant, le mécanisme reste à élucider. La réduction du taux de LDL-c est devenu un objectif important de nombreuses études épidémiologiques qui ont étudié la relations entre le taux élevé de LDL-c et le risque cardio-vasculaire [55, 56]. Plusieurs études ont prouvé qu'une faible oxydation de LDL-c augmente les niveaux de cytokines pro-inflammatoires, ce qui stimule l'activité inflammatoire proathérogène [57, 58]. L'effet préventif de la PPT vis-à-vis de l'oxydation des LDL-c peut être expliqué par le caractère lipophile du lycopène des autres caroténoïdes, qui sont transportés par les lipoprotéines de faible densité [38]. De plus,

selon une autre étude, le lycopène peut inhiber l'activité du 3-méthyl glutaryl coenzyme A réductase, qui est impliquée dans la synthèse du cholestérol [41, 59]. Il a été démontré que les produits à base de tomates augmentent la résistance intrinsèque de LDL-c à l'oxydation induite par des ions de cuivre *in vitro* [60].

La supplémentation par la PPT a grandement amélioré le trouble métabolique provoqué par le régime riche en acides gras saturés et en cholestérol HSF/HC. Des résultats similaires ont également été trouvés chez des rats stéatosé nourris par un régime athérogène et supplémentés par le jus de tomate [19]. L'augmentation de l'activité sérique de l'ALAT et ASAT, est un marqueur primaire du développement de la NASH [19]. Egalement, d'autres auteurs ont établi une relation étroite entre l'élévation de l'activité des enzymes hépatiques, le diabète et la résistance à l'insuline [61, 62].

Les résultats de l'étude histologique montrent l'absence d'effet significatif de la PPT sur la stéatose et l'inflammation chez les souris HSF/HC. Nous avons donc émis l'hypothèse que les souris HSF/HC posséderaient des capacités d'exportation très efficaces au niveau du foie, afin d'orienter les lipides vers leur lieu de stockage périphérique via une augmentation des formes de transport des triglycérides (VLDL). En effet, une étude *in vivo* a démontré qu'un régime contenant 20% d'huile de coco hydrogénée augmente de 15-17% les VLDL et les LDL-c chez les rats [5]. Les souris HSF/HC présentent une masse de tissu adipeux blanc augmentée, ce qui est en accord avec une exportation accrue des triglycérides du foie vers cet organe de stockage qu'est le tissu adipeux.

Outre l'augmentation des systèmes d'exportation et de stockage, une autre possibilité peut expliquer la diminution de l'intensité de la stéatose hépatique chez les souris supplémentées par la PPT malgré la surcharge lipidique : une augmentation de la β -oxydation mitochondriale, la diminution de l'oxydation microsomale et la neutralisation des ROS par les substances antioxydantes de la PPT. Des études menées chez les rats ont donné des résultats prometteurs. Dans l'une, le traitement par l'extrait de tomate et le lycopène de rats atteints de NASH, a induit une diminution de l'inflammation (réduction >40%) et de l'expression de l'ARNm de plusieurs cytokines pro-inflammatoires [24]. Une autre étude sur rats nourris par un régime riche en lipides et en éthanol, a montré une amélioration de la stéatose hépatique, en réduisant la taille des gouttelettes de lipides dans les adipocytes blancs après supplémentation par le vin de tomate riche en lycopène [38]. En outre, la supplémentation par le jus de tomate riche en lycopène inhibe le

développement de la NASH chez de rats athérogène, par l'accumulation du lycopène dans le foie et la réduction de taux de Tg plasmatiques [17, 63].

IV.8.2. Avantages et limites du modèle animal

Nous avons travaillé sur modèle animal (souris BALB/c) développant une NASH induite par un régime hyperlipidique saturés/ hypercholestérolémique. Les études sur modèle animal offrent de nombreux avantages, mais présentent également des limites à prendre en compte dans l'interprétation des résultats.

Alors que les études cliniques sont réalisées chez des patients de différents âges, sexes, poids et habitudes alimentaires, le modèle animal permet d'étudier une population homogène et une consommation alimentaire dont un seul paramètre varie. De plus, le modèle animal permet de multiplier les prélèvements, d'accéder aux paramètres tissulaires, et d'obtenir ainsi des informations non accessibles chez les patients.

Ce modèle présente plusieurs limites :

- Sur le plan métabolique, il est connu que le métabolisme lipidique de la souris est très différent de celui de l'homme, ce qui ne permet pas d'étudier l'effet des régimes sur le métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines.
- La part du stress émotionnel dans le développement de l'insulinorésistance chez l'homme est bien décrite [64, 65]. Chez le rat, il a été rapporté des "répondeurs" et des "non répondeurs" au régime induisant la NASH, et la part de la réponse émotionnelle est donc difficilement quantifiable.

IV.8.3. Limites des paramètres mesurés

Pour des raisons logistiques, nous n'avons pas pu mesurer tous les paramètres souhaités au cours de nos expériences. En particulier, étant donné l'indisponibilité des kits murins de dosage des marqueurs d'inflammation, nous n'avons pas dosé les cytokines inflammatoires (Il-6, TNF-alpha et MCP-1). Aussi, la mesure de l'expression ARNm des enzymes lipogéniques (FAS, ACC et SCD), afin d'éclaircir les raisons de l'augmentation des AGNE plasmatiques chez les souris supplémentées par la PPT.

En ce qui concerne les relations stress oxydant/insulinorésistance, nous n'avons pas pu réaliser l'étude de l'expression des gènes et de la signalisation de l'insuline dans le foie et le muscle des souris recevant la PPT. La prise en compte de ces différentes approches

permettraient d'améliorer les connaissances sur le risque du stress oxydant dans les mécanismes inflammatoires au cours des maladies.

IV.9. Références bibliographiques

1. DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R: **Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum.** *Am J Physiol* 1998, 274:R1460-1467.
2. Rothwell NJ, Stock MJ: **Thermogenesis and BAT activity in hypophysectomized rats with and without corticotropin replacement.** *Am J Physiol* 1985, 249:E333-336.
3. Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G: **Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats.** *Br J Nutr* 2003, 90:953-960.
4. Bizeau ME, Hazel JR: **Dietary fat type alters glucose metabolism in isolated rat hepatocytes.** *J Nutr Biochem* 1999, 10:709-715.
5. Srivastava RA: **Regulation of the apolipoprotein E by dietary lipids occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms.** *Mol Cell Biochem* 1996, 155:153-162.
6. Tsitsimpikou C, Tsarouhas K, Kioukia-Fougia N, Skondra C, Fragkiadaki P, Papalexis P, Stamatopoulos P, Kaplanis I, Hayes AW, Tsatsakis A, Rentoukas E: **Dietary supplementation with tomato-juice in patients with metabolic syndrome: A suggestion to alleviate detrimental clinical factors.** *Food Chem Toxicol* 2014, 74:9-13.
7. Zhu J, Wang CG, Xu YG: **Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress.** *Pharm Biol* 2011, 49:1144-1149.
8. Kuhad A, Sethi R, Chopra K: **Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats.** *Life Sci* 2008, 83:128-134.
9. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA: **A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet.** *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 2010, 46:212.
10. Caroline R: **Stéatohépatite et adaptations métaboliques: Effets d'un régime enrichi en lipides saturés, ou carencé en choline et méthionine, sur la bioénergétique et le métabolisme hépatique de rat.** *UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I* 2007.
11. A-Young Kim Y-JJ, Yong Bok Park, Mi-Kyung Lee, Seon-Min Jeon, Robin A. McGregor, Myung-Sook Choi: **Dose dependent effects of lycopene enriched tomato-wine on liver and adipose tissue in high-fat diet fed rats.** *Food Chemistry* 2012:42-48.
12. Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A: **Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009, 19:291-302.

13. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC: **Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, 281:G1135-1139.
14. Leclercq I, Horsmans Y, Desager JP, Delzenne N, Geubel AP: **Reduction in hepatic cytochrome P-450 is correlated to the degree of liver fat content in animal models of steatosis in the absence of inflammation.** *J Hepatol* 1998, 28:410-416.
15. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A, et al: **Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients.** *Clin Sci (Lond)* 2004, 106:261-268.
16. van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB: **Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity.** *Physiol Behav* 2008, 94:231-241.
17. Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang XD: **Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats.** *Int J Cancer* 2010, 126:1788-1796.
18. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, et al: **Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet.** *Hepatology* 2007, 46:1392-1403.
19. Bernal C, Martin-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, Garcia-Alonso J, Canovas M, Periago MJ: **Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis.** *J Nutr Biochem* 2013, 24:1870-1881.
20. Alshatwi AA, Al Obaaid MA, Al Sedairy SA, Al-Assaf AH, Zhang JJ, Lei KY: **Tomato powder is more protective than lycopene supplement against lipid peroxidation in rats.** *Nutr Res* 2010, 30:66-73.
21. Moreira EA, Fagundes RL, Filho DW, Neves D, Sell F, Bellisle F, Kupek E: **Effects of diet energy level and tomato powder consumption on antioxidant status in rats.** *Clin Nutr* 2005, 24:1038-1046.
22. Brensilver HL, Kaplan MM: **Significance of elevated liver alkaline phosphatase in serum.** *Gastroenterology* 1975, 68:1556-1562.
23. Jamshidzadeh A, Baghban M, Azarpira N, Mohammadi Bardbori A, Niknahad H: **Effects of tomato extract on oxidative stress induced toxicity in different organs of rats.** *Food Chem Toxicol* 2008, 46:3612-3615.
24. Lee JH, Cho HD, Jeong JH, Lee MK, Jeong YK, Shim KH, Seo KI: **New vinegar produced by tomato suppresses adipocyte differentiation and fat accumulation in 3T3-L1 cells and obese rat model.** *Food Chem* 2013, 141:3241-3249.
25. LEGRAND P: **Conséquence de l'expression d'une CPT1 insensible au malonyl-CoA sur l'évolution d'une stéatose hépatique induite par un régime déficient en méthionine et choline chez la souris.** *Institut Cochin* 2009:41.
26. Jiang J, Torok N: **Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome.** *Metab Syndr Relat Disord* 2008, 6:1-7.
27. Anderson N, Borlak J: **Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis.** *Pharmacol Rev* 2008, 60:311-357.

28. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Faga E, Silli B, Pagano G: **Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2003, 37:909-916.
29. Alberti KG, Zimmet PZ: **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation.** *Diabet Med* 1998, 15:539-553.
30. Shimizu M: **Modulation of intestinal functions by food substances.** *Nahrung* 1999, 43:154-158.
31. Kim AY, Jeong Y-J, Park YB, Lee M-K, Jeon S-M, McGregor RA, Choi M-S: **Dose dependent effects of lycopene enriched tomato-wine on liver and adipose tissue in high-fat diet fed rats.** *Food Chem* 2012, 130:42-48.
32. Postic C, Girard J: **The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis.** *Diabetes Metab* 2008, 34:643-648.
33. Vincent HK, Taylor AG: **Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans.** *Int J Obes (Lond)* 2006, 30:400-418.
34. Kong KW, Khoo HE, Prasad KN, Ismail A, Tan CP, Rajab NF: **Revealing the power of the natural red pigment lycopene.** *Molecules* 2010, 15:959-987.
35. Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, Richard MJ, Favier A, Halimi S: **An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats.** *Diabetes* 1999, 48:353-357.
36. Faure P, Rossini E, Lafond JL, Richard MJ, Favier A, Halimi S: **Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets.** *J Nutr* 1997, 127:103-107.
37. Benakmoum A, Abbeddou S, Ammouche A, Kefalas P, Gerasopoulos D: **Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste.** *Food Chem* 2008, 110:684-690.
38. Ahuja KD, Pittaway JK, Ball MJ: **Effects of olive oil and tomato lycopene combination on serum lycopene, lipid profile, and lipid oxidation.** *Nutrition* 2006, 22:259-265.
39. Agarwal S, Rao AV: **Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study.** *Lipids* 1998, 33:981-984.
40. Basu A, Imrhan V: **Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials.** *Eur J Clin Nutr* 2007, 61:295-303.
41. Hsu YM, Lai CH, Chang CY, Fan CT, Chen CT, Wu CH: **Characterizing the lipid-lowering effects and antioxidant mechanisms of tomato paste.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2008, 72:677-685.
42. Luvizotto Rde A, Nascimento AF, Imaizumi E, Pierine DT, Conde SJ, Correa CR, Yeum KJ, Ferreira AL: **Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats.** *Br J Nutr* 2013, 110:1803-1809.

43. Avignon A, Hokayem M, Bisbal C, Lambert K: **Dietary antioxidants: Do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism?** *Nutrition* 2012, 28:715-721.
44. Bloch-Damti A, Bashan N: **Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress.** *Antioxid Redox Signal* 2005, 7:1553-1567.
45. Paolisso G, Giugliano D: **Oxidative stress and insulin action: is there a relationship?** *Diabetologia* 1996, 39:357-363.
46. Shixian Q, Dai Y, Kakuda Y, Shi J, Mittal G, Yeung D, Jiang Y: **Synergistic Anti-Oxidative Effects of Lycopene with Other Bioactive Compounds.** *Food Reviews International* 2005, 21:295-311.
47. Zanfini A, Corbini G, La Rosa C, Dreassi E: **Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and α -tocopherol in synthetic mixtures.** *LWT - Food Science and Technology* 2010, 43:67-72.
48. diabète CdedLddpcdlAcid: **Lignes directrices de pratique clinique: Thérapie nutritionnelle.** *Canadian Journal of Diabetes* 2013, 37:S409–S421.
49. Frayn KN, Williams CM, Arner P: **Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic diseases?** *Clin Sci (Lond)* 1996, 90:243-253.
50. Il'yasova D, Wang F, D'Agostino RB, Jr., Hanley A, Wagenknecht LE: **Prospective association between fasting NEFA and type 2 diabetes: impact of post-load glucose.** *Diabetologia* 2010, 53:866-874.
51. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN: **Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation.** *Diabetes* 2011, 60:2441-2449.
52. Aly E HF: **The effect of tomato pomace and paste on some biochemical aspects in serum and liver and antioxidant status of hypercholesterolemic rats.** 2004.
53. Ibrahim HS, Ahmed LA, El-din MM: **The functional role of some tomato products on lipid profile and liver function in adult rats.** *J Med Food* 2008, 11:551-559.
54. Story EN, Kopec RE, Schwartz SJ, Harris GK: **An update on the health effects of tomato lycopene.** *Annu Rev Food Sci Technol* 2010, 1:189-210.
55. Manninen V, Tenkanen L, Koskinen P, Huttunen JK, Manttari M, Heinonen OP, Frick MH: **Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment.** *Circulation* 1992, 85:37-45.
56. Griffin BA, Packard CJ: **Metabolism of VLDL and LDL subclasses.** *Curr Opin Lipidol* 1994, 5:200-206.
57. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ: **Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics.** *Circulation* 1995, 91:2488-2496.
58. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D: **NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X.** *Diabetologia* 1997, 40:1286-1292.
59. Fuhrman B, Elis A, Aviram M: **Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and**

- augmentation of LDL receptor activity in macrophages.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 233:658-662.
60. Upritchard JE, Sutherland WH, Mann JI: **Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 2000, 23:733-738.
61. Andre P, Balkau B, Born C, Royer B, Wilpart E, Charles MA, Eschwege E: **Hepatic markers and development of type 2 diabetes in middle aged men and women: a three-year follow-up study. The D.E.S.I.R. Study (Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome).** *Diabetes Metab* 2005, 31:542-550.
62. Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S, Posadas R, Williams K, Haffner SM, Stern MP, Ferrannini E: **Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study.** *Diabetes Care* 2005, 28:1757-1762.
63. Gitenay D, Lyan B, Rambeau M, Mazur A, Rock E: **Comparison of lycopene and tomato effects on biomarkers of oxidative stress in vitamin E deficient rats.** *Eur J Nutr* 2007, 46:468-475.
64. Rosmond R: **Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome.** *Psychoneuroendocrinology* 2005, 30:1-10.
65. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S: **Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food".** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:11696-11701.

CONCLUSION

Conclusion et perspectives

Dans cette étude nous avons réalisé un régime qui reflète les habitudes alimentaires des patients atteints de NASH. Nous avons donc réalisé un régime enrichi en acides gras saturés (AGS) et de cholestérol de manière à tenter d'induire une stéatohépatite non alcoolique chez la souris. Ce régime a été donné *ad libitum* aux animaux dès leur sevrage, et pendant 12 semaines.

Au terme des 12 semaines de régime HSF/HC (régime riche en acides gras saturés et en cholestérol), les souris développent une stéatose hépatique, avec mise en place d'une stéatose et de foyers inflammatoires au niveau du foie. L'analyse histologique nous confirme la forte accumulation de lipides hépatiques (stéatose). Cette stéatose massive en présence des foyers inflammatoires, nous confirment la présence de NASH dans le foie des souris HSF/HC. Le facteur clé impliqué dans le développement d'une stéatose associée à des phénomènes inflammatoires, soit l'induction de peroxydation lipidique et d'un excès ou d'un défaut d'exportation des triglycérides en développant des stigmates de NASH (hyperlipidémie, insulino-résistance). Cependant, l'augmentation de l'activité des enzymes plasmatiques et de la concentration en bilirubine, nous confirme la présence de dommages cellulaires hépatiques dus au régime HSF/HC. Donc le régime HSF/HC semble être un modèle idéal pour induire une stéatose hépatique non alcoolique chez la souris.

La supplémentation des souris HSF/HC par la PPT (poudre des pelures de tomate) semble diminuer l'intensité de la stéatose hépatique et de l'inflammation, cependant certaines exceptions ont été observées, elles sont à mettre en relation avec la réponse individuelle de l'hôte.

La supplémentation par la PPT n'a pas réduit de manière significative l'augmentation du gain de poids corporel des souris HSF / HC après 12 semaines d'élevage, mais elle a ralenti l'accumulation de tissu adipeux. Les résultats de notre étude suggèrent que la PPT peut avoir un effet anti-adiposité, cela peut être dû à l'action des composants présents dans la PPT.

Les résultats de notre étude montrent que la supplémentation des souris HSF/HC par la PPT augmente le taux du lycopène sérique, rétablit les paramètres sériques biochimiques et améliore la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose des souris. Pour la première fois dans la stéatose hépatique non alcoolique, les bénéfices d'une supplémentation chez la

souris par la PPT sont démontrés à la fois sur la régulation de la glycémie et sur la peroxydation lipidique. L'application de ces résultats à la prévention de la NASH place la PPT parmi les facteurs de prévention nutritionnelle du diabète et de ses complications oxydatives à prendre en considération.

En ce qui concerne l'augmentation de la concentration plasmatique d'AGNE chez les souris HSF/HC supplémentées par la PPT, ce résultat surprenant peut être expliqué par la stimulation de la lipolyse adipocytaire et la diminution de la lipogenèse hépatique.

Les résultats de notre étude suggèrent qu'il n'y a pas une association entre l'accumulation de tissu adipeux, la concentration plasmatique des FFA et la résistance à l'insuline. En effet, les souris HSF/HC, avec des faibles concentrations plasmatiques en FFA, ont développé une résistance à l'insuline.

Enfin, le rôle de la PPT dans le rétablissement de l'homéostasie lipido-glucidique et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline est frappant. Expérimentalement, les antioxydants de la PPT ont modulé les indicateurs associés à la NASH et au diabète de type 2 sans effet-dose dépendant.

L'association de tous nos résultats et de la littérature, nous laisse penser que la modulation des désordres métaboliques hépatiques par les antioxydants de la tomate donne des résultats positifs, mais ces études ne suffisent pas, pour le moment, à démontrer l'intérêt d'une supplémentation par les antioxydants de la tomate dans le cadre de la prévention du diabète type 2. Cela est expliqué par le fait que les radicaux libres sont indispensables à la transduction des signaux cellulaires, dont la voie de signalisation de l'insuline, rendant leur neutralisation excessive délétère. Cependant, la capacité antioxydante des aliments est sensible aux conditions environnementales, tels le pH, la présence et la concentration d'ions métalliques.

Ces premiers résultats sont expérimentaux. Ils démontrent la pertinence d'une association de nutriments antioxydants dans la prévention des facteurs associés à la NASH. Cependant, les nombreuses limites dues aux conditions expérimentales imposent de poursuivre ce travail par des études d'intervention chez l'homme, associant, dans une supplémentation combinée, la poudre des pelures de tomates et les extraits de tomates (jus, vinaigre). Il est tentant d'envisager une étude du mécanisme d'action moléculaire basée non seulement sur la PCR quantitative en temps réel, mais sur la mise au point d'une biopuce associant à la

fois les gènes du signalisation, de l'inflammation, et du stress oxydant, ainsi que qu'une étude de la réponse protéomique aux facteurs nutritionnels.

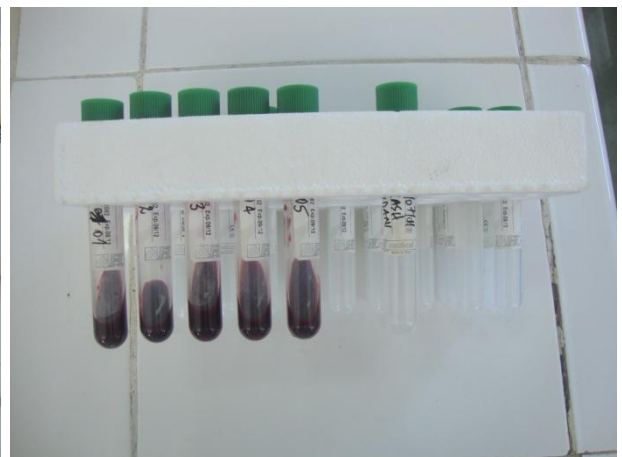
Un autre axe de recherche, celui des effets des antioxydants de la tomate sur le diabète type2, mériterait d'être développé pour une meilleure compréhension du mécanisme de protection par lequel les caroténoïdes, principalement le lycopène et les autres molécules de la poudre des pelures de tomate, préviennent l'insulinorésistance et le diabète type 2. Il serait, en effet, intéressant d'étudier leur effet sur la production des adipokines et des cytokines produites par le tissu graisseux (dont le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), l'interleukine 6 et, plus récemment, la résistine), facteurs qui induisent une insulinorésistance quand ils sont produits en excès. Ces molécules interagissent directement sur les voies de signalisation de l'insuline, modulant de ce fait, l'insulinorésistance.

ANNEXES

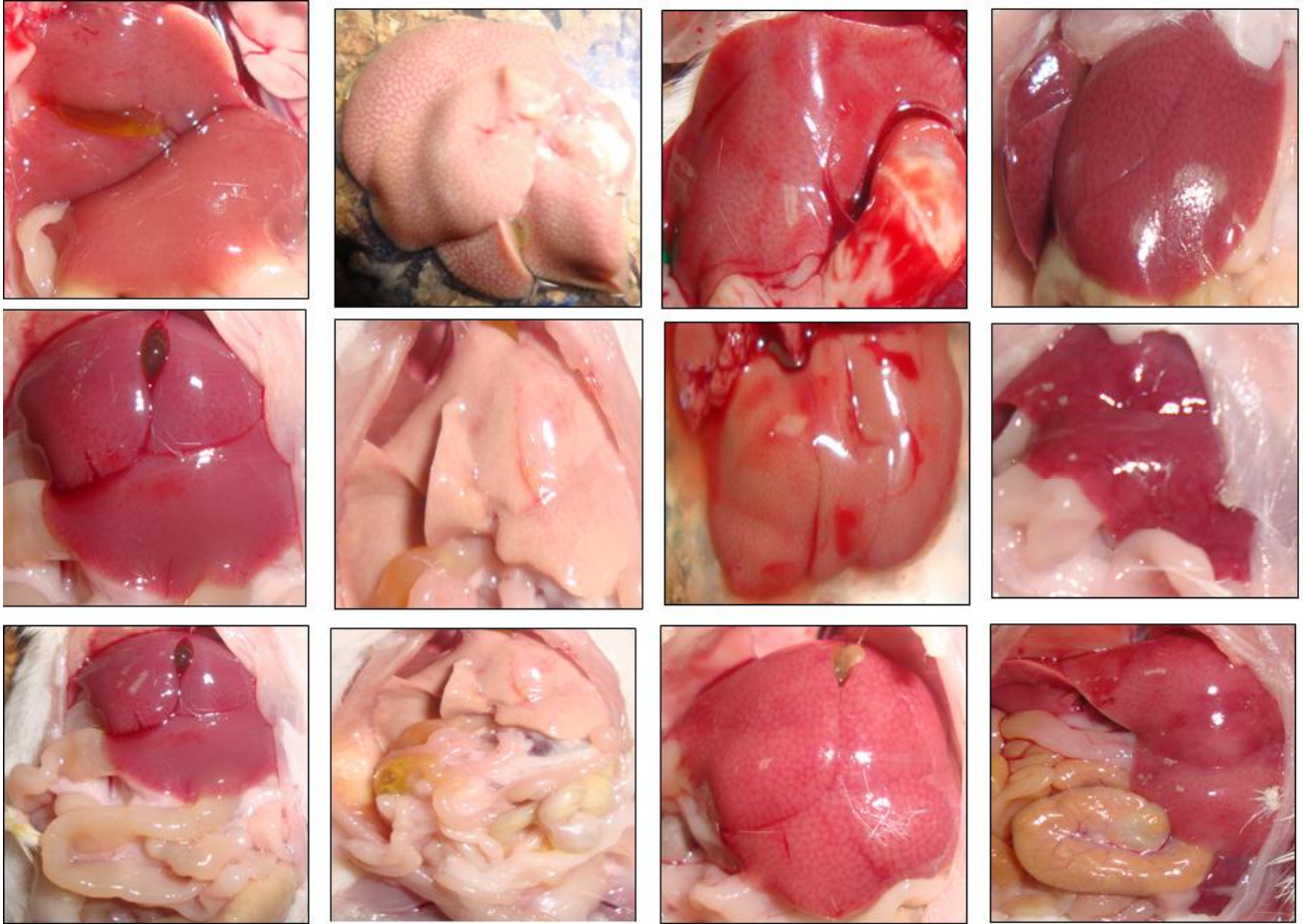
Expérimentation animale : (photos)



2. Sacrifice et prélèvements biologiques



3. Prélèvement du foie



Foie Ctrl

Foie HSF/HC

Foie HSF/HC TP1

Foie HSF/HC TP2

4. Etude histologique du foie



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Laboratoire de Biopathologie
Pr. A. Bouhadef

N° IPA : V86 à V120

Espèce : souris	Age : 12 semaines
Nature du prélèvement : prélèvements d'autopsie	
Siège du prélèvement : foie	
Vétérinaire traitant : CRD SAIDAL. ZIDANI SOFAINE	
Date de réception : 19/12/12	Date : 29/01/12

COMPTE RENDU

IL nous a été adressé des prélèvements hépatiques issus de souris âgées de 12 semaines utilisées dans le cadre d'une étude portant sur l'évaluation de la capacité des pelures de tomate à contre carrer ou à corriger la stéatohépatite non alcoolique induite par un régime hyperlipidique hypercholestérolémique.

Les animaux sont répartis en 05 groupes :

- Groupe control (G1)
- Groupe hyperlipidique / hypercholestérolémique (G2)
- Groupe lycopène 5% (G3)
- Groupe lycopène 10% (G4)
- Groupe gavage (lycopène 10%) (G5)

Une étude macroscopique a été réalisée, elle ne met en évidence des lésions de stéatose hépatiques chez les animaux du groupe 2 (G2).

Une étude histopathologique a été réalisée après coupe et coloration en HE et au trichome de Masson, elle met en évidence ce qui suit :

- groupe hyperlipidique / hypercholestérolémique

N° animal/ lésion	V87 08/F0	V90 11F0	V93 13F0	V101 12F0	V104 10F0	V117 9F0	V119 14F0
Stéatose	3	1	2	2	2	1	1
Inflammation	1	1	3	1	2	1	1
Fibrose	0	0	0	0	0	0	0

0 : absence de lésions

1 : lésion minimale

2 : lésion modérée

3 : lésion marquée

4 : lésion sévère.

- Groupe lycopène 5%

N° animal/ lésion	V88 18F0	V99 21F0	V103 17F0	V109 19F0	V112 16F0	V114 20F0	V120 15F0
stéatose	1	2	1	3	1	1	1
inflammation	0	1	0	1	0	1	2
fibrose	0	0	0	0	1	0	0

- Groupe lycopène 10%

N° animal/ lésion	V86 27F0	V91 22F0	V95 24F0	V102 28F0	V110 23F0	V115 26F0	V118 25F0
stéatose	1	2	0	1	1	1	1
inflammation	1	1	3	1	1	1	1
fibrose	0	0	0	0	0	0	0

- Groupe gavage.

N° animal/ lésion	V94 29F0	V98 33F0	V105 35F0	V106 34F0	V108 30F0	V111 32F0	V113 31F0
stéatose	1	2	2	2	1	1	1
inflammation	1	1	1	0	1	0	0
fibrose	0	0	0	0	0	0	0

Conclusion :

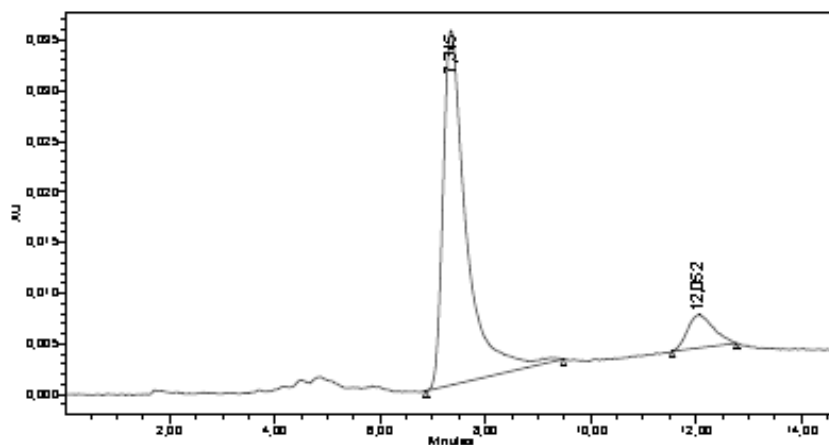
L'examen histopathologique a mis en évidence des lésions de stéatose (le plus souvent micro vacuolaire) sur la quasi-totalité des animaux. La répartition de la stéatose était le plus souvent centro-lobulaire à portante (portage entre les veines centro lobulaires) plus marquée pour le groupe ayant reçu une diète hyperlipidique hypercholestérolémique, quant à l'inflammation elle était le plus souvent de nature lympho plasmocytaire à localisation sinusoidale essentiellement le plus souvent plus marquée chez le groupe hyperlipidique hypercholestérolémique. (G2)

La fibrose n' a été observée que sur un seul animal (16F0).

L'addition du lycopène à la diète semble diminuer de l'intensité de la stéatose et de l'inflammation cependant certaines exceptions ont été observées, elles sont à mettre en relation avec la réponse individuelle de l'hôte.

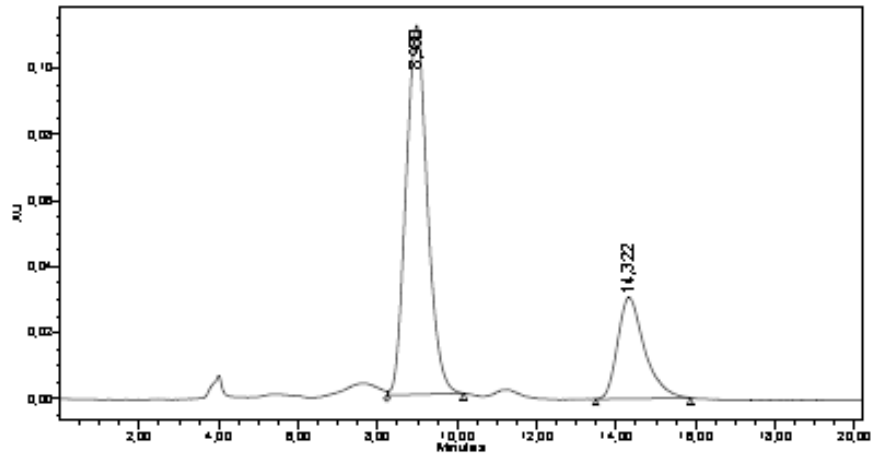
Institut Pasteur d'Algérie
Laboratoire de Bio Pathologie
et Génétique
DR. Y BENALI

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Étalon lycopéine 1 µl/1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	
Vial:	1	Acq. Method Set:	quantification de lycopéine s
Injection #:	14	Processing Method:	Étalon lycopéine 1 µl/1
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	2487 Channel 2
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	472
Date Acquired:	03/06/2012 12:00:29 CET		
Date Processed:	10/06/2012 07:42:23 CET		



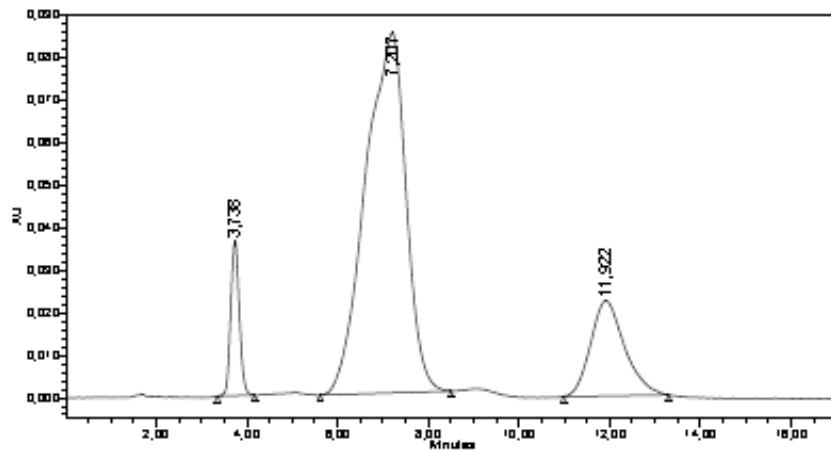
	RT	Area	% Area	Height
1	7.345	1074662	90,56	35045
2	12,052	112053	9,44	3279

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	lycopéne d'été 1 Inj1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	
Vial:	1	Acq. Method Set:	quantification de lycopéne s
Injection #:	2	Processing Method:	lycopéne tomate d'été 1 Inj1
Injection Volume:	10.00 µl	Channel Name:	2487 Channel 2
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr:	472
Date Acquired:	03/06/2012 08:18:31 CET		
Date Processed:	10/06/2012 07:49:49 CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	8,960	4180096	74,32	111688
2	14,322	1444041	25,68	30657

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	lycopéne d'été 2 1002	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	
Vial:	1	Acq. Method Set:	quantification de lycopenes
Injection #:	9	Processing Method:	lycopéne tomate d'été 2
Injection Volume:	10,00 µl	Channel Name:	2487 Channel 2
RT (min):	40,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	472
Date Acquired:	03/06/2012 10:37:29 CET		
Date Processed:	10/06/2012 07:44:11 CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	3,738	480249	6,96	36319
2	7,207	6254884	76,17	84671
3	11,922	1164086	16,87	22444