

~~8574~~
MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

Unité de Formation et de Recherche
En Sciences de la Santé

SECTION : Technicien Supérieur de Santé

Année Universitaire 2001 – 2002

BURKINA FASO
Unité - Progrès – Justice

MEMOIRE
DUE

N° :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

**THEME : ETUDE COMPARATIVE DE LA TENEUR EN
CAROTENOIDES DE DIX(10) TYPES DE PATATES
PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE
PERFORMANCE (HPLC)**

Mémoire présenté par **Ouédraogo Sidzanboma Olivier**
né le 08/01/1979 à Koudougou

Pour l'obtention de la licence professionnalisée en Analyses Biomédicales.



Maître de mémoire : **Dr Issa Somé**

Jury :

Président : **Pr. B. Koudogbo**

Membres : **Dr. Somé**

Dr. Bendesh

Le 12 Décembre 2002

MEM 92 A
ONE

DEDICACES



Je dédie ce travail.....

- **A mon père OUEDRAOGO Etienne**

et à ma mère YAOLIRE Marie-jeanne

Ce travail, le vôtre, est l'expression de ma sincère reconnaissance de votre partition inestimable dans les succès qui couronnent mes années.

- **A mes frères et sœurs : Rakiswendé Omer, Guyeswendé Oscar, Sidbéwendé Olga, Konsembwendé Hortence et Wendlasida Auberge.**

En reconnaissance de l'affection et du soutien constant dont je bénéficie de chacun de vous, ce travail vous est dédié. Veuillez y voir l'expression de mon amour fraternel.

- **A la famille de feu YAOLIRE François à Pissy.**

Vous m'avez accueilli et intégré en un membre à part entière de vos sympathiques familles, partageant mes joies et me soutenant dans toute les épreuves. Ce travail est le vôtre. Sincère remerciements pour tout ce que vous faites pour moi.

- **A monsieur BATIENO Emmanuel**

Merci pour ton aide.

- **A mes tante et oncles,**

Merci pour votre soutien.

- **A tous les aveugles du Burkina victimes de l'avitaminose A**

Ceci est ma modeste contribution pour que cela ne se réalise plus jamais.

- **A notre coordonnateur, le Professeur Blaise KOUDOGBO, Toxicologue,**
Conseiller Technique de la coopération Française.

C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici, l'expression de nos sentiments respectueux et de notre profonde gratitude.

- **A notre maître et Directeur de mémoire, le Docteur Issa SOME, Maître-**
assistant de chimie Analytique.

Cher maître, nous avons eu l'honneur de bénéficier de vos enseignements théoriques en chimie Analytique que vous dispensez avec dévotion, au cours de notre cursus. Nous avons également beaucoup appris à vos côtés dans le cadre de ce mémoire.

Nous avons beaucoup été émerveillé par vos qualités intellectuelles et humaines. Elles resteront pour nous un modèle. Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de diriger ce travail. Soyez assuré de notre profonde reconnaissance et de notre profonde gratitude.

- **A notre juge, le Docteur Bendesh, Représentant Résident Helen Keller**
International au Burkina.

C'est un honneur pour nous que vous ayez accepté de siéger dans le jury de ce mémoire. Sincères remerciements.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
I. INTRODUCTION	4
II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	5
1. LES DIFFERENTS TYPES DE CAROTENOIDES	5
2. LES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES CAROTENOIDES	7
a. <i>La solubilité</i>	7
b. <i>L'absorption lumineuse</i>	7
c. <i>L'adsorption et le partage</i>	8
d. <i>L'isomérisation et l'oxydation</i>	8
e. <i>Les réactions chimiques des groupements fonctionnels</i>	9
3 - INTERETS DES CAROTENOÏDES DANS L'ALIMENTATION	9
a. <i>caroténoïdes et cancers</i>	9
b. <i>Caroténoïdes et maladies cardiovasculaires</i>	10
c. <i>Caroténoïdes et pathologies rétinienne</i>	11
d. <i>Caroténoïdes et infection à VIH</i>	11
e. <i>Caroténoïdes et dermatologie</i>	12
f. <i>Caroténoïdes et autres pathologies</i>	12
4 - QUELQUES NOTIONS THEORIQUES DE CHROMATOGRAPHIE	13
a. <i>Historique</i>	13
b. <i>Principe de la technique</i>	14
c. <i>Quelques définitions</i>	14
III - MATERIEL ET METHODE	16
1. LE MATERIEL	16
a. <i>La chaîne HPLC</i>	16
b. <i>Autres matériels</i>	18
2. LA METHODE	19
a. <i>La préparation du mélange de calibration</i>	19
b. <i>Collecte et traitement des échantillons</i>	20
IV – LES RESULTATS	23
1 - Comparaison en fonction de la teneur de chaque type de caroténoïdes dans les dix (10) lots	23
2 - Comparaison des β -carotènes à autres caroténoïdes dans le lot	25
3 - Explication de la dispersion	26
4 - Comparaison en fonction de la teneur en caroténoïdes totaux	27
V- CONCLUSION	28
BIBLIOGRAPHIE	29

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui de près ou de loin, nous ont aidé à réaliser ce travail.

- Qu'il nous soit permis de remercier le **Docteur SOME** et toute son équipe, qui en dépit de leurs multiples occupations ont bien voulu suivre notre travail jusqu'au bout. Nous leur témoignons notre reconnaissance.
- Nos remerciements vont également à l'ONG Helen Keller International (HKI) qui a bien voulu commander cette analyse.
- **Au professeur Biase KOUDGOBO**, Toxicologue, Conseiller Technique de la coopération Française et Coordonnateur de la section des Techniciens Supérieurs de Santé à l'UFR I SDS.

Nous voilà au terme de trois longues, dures et laborieuses années d'études mais pleines, riches et fructueuses sous votre direction. Votre engagement physique et intellectuel pour mener à bien notre formation malgré les multiples et épreuves que vous avez rencontrées nous a beaucoup marqué.

Veillez trouver ici, l'expression de nos sentiments respectueux et notre gratitude.

- **A tous nos enseignants.** Sincères remerciements pour la qualité de vos enseignements.
- **A tous nos amis et à tous nos promotionnaires de classe.** Merci pour tout.

I. INTRODUCTION

Les caroténoïdes sont une vaste famille de pigments largement utilisés en tant que colorants dans l'alimentation, l'industrie pharmaceutique et également comme supplément nutritionnel. Ce sont des composés chimiques généralement en C40 constitués par 8 unités isopréniques (C5) jointes de façon à ce que la séquence soit inversée au centre. L'organisme humain est incapable de les synthétiser, aussi sont-ils fournis par l'alimentation.

La vaste famille des caroténoïdes comprend une vingtaine de types contenus dans les aliments. Ce sont principalement des provitamines A, mais d'autres fonctions biologiques leur sont attribuées. Le déficit en vitamine A est un problème majeur de santé publique, considéré par l'OMS comme une priorité de lutte dans les pays en voie de développement. Dans le monde 30 à 35 millions de personnes sont actuellement aveugles dû à un déficit profond en vitamine A. Plusieurs dizaines de millions d'individus sont atteints d'un déficit modéré. Le déficit en vitamine A est considéré comme responsable d'une morbidité et d'une mortalité infantiles élevées.

Compte tenu de leur grande activité provitamine A, la teneur en caroténoïdes dans divers aliments revêt un caractère important en matière de santé publique et ce, dans la cadre de la lutte contre l'Avitaminose A.

Les habitants de certaines régions de l'Afrique de l'ouest comme le Burkina produisent et consomment beaucoup de patates. C'est ainsi que nous avons participé à une étude comparative de la teneur en caroténoïdes de dix types de patates provenant de localités différentes commandée par l'ONG **Helen Keller International**. Dans notre travail, nous doserons cinq(5) principaux types que sont : la β -carotène, la α -carotène, la zéaxanthine, la lycopène et la cryptoxanthine. Pour cela nous avons utilisé la chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). Cette étude nous permettra de savoir quelles sont les patates potentiellement riches en caroténoïdes et par conséquent les plus aptes à nous fournir de la vitamine A.

II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. LES DIFFERENTS TYPES DE CAROTENOIDES

Actuellement plus de 600 types de caroténoïdes sont connus dont la plus grande majorité dans les algues, les champignons et les bactéries. Le nombre de types de caroténoïdes retrouvés dans les aliments est beaucoup plus restreint et est donné dans le tableau I [1].

Table 1. Trivial and semisystematic names of common food carotenoids

Trivial name	Semisystematic name
Antheraxanthin	5,6-epoxy-5,6-dihydro- β,β -carotene-3,3'-diol
Astaxanthin	3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione
Auroxanthin	5,8,5',8'-diepoxy-5,8,5',8'-tetrahydro- β,β -carotene-3,3'-diol
Bixin	methyl hydrogen 9'-cis-6,6'-diapocarotene-6,6'-dioate
Canthaxanthin	β,β -carotene-4,4'-dione
Capsanthin	3,3'-dihydroxy- β,κ -caroten-6'-one
Capsorubin	3,3'-dihydroxy- κ,κ -carotene-6,6'-dione
α -Carotene	β,ϵ -carotene
β -Carotene	β,β -carotene
β -Carotene-5,6-epoxide	5,6-epoxy-5,6-dihydro- β,β -carotene
β -Carotene-5,8-epoxide (mutatochrome)	5,8-epoxy-5,8-dihydro- β,β -carotene
β -Carotene-5,6,5',6'-diepoxide	5,6,5',6'-diepoxy-5,6,5',6'-tetrahydro- β,β -carotene
δ -Carotene	ϵ,ψ -carotene
γ -Carotene	β,ψ -carotene
ζ -Carotene	7,8,7',8'-tetrahydro- ψ,ψ -carotene
Crocetin	8,8'-diapocarotene-8,8'-dioic acid
α -Cryptoxanthin	β,ϵ -caroten-3'-ol
β -Cryptoxanthin	β,β -caroten-3-ol
Echinenone	β,β -caroten-4-one
Lutein	β,ϵ -carotene-3,3'-diol
Lutein-5,6-epoxide (taraxanthin)	5,6-epoxy-5,6-dihydro- β,ϵ -carotene-3,3'-diol
Lycopene	ψ,ψ -carotene
Neoxanthin	5',6'-epoxy-6,7-didehydro-5,6,5',6'-tetrahydro- β,β -carotene-3,5,3'-triol
Neurosporene	7,8-dihydro- ψ,ψ -carotene
Phytoene	7,8,11,12,7',8',11',12'-octahydro- ψ,ψ -carotene
Phytofluene	7,8,11,12,7',8'-hexahydro- ψ,ψ -carotene
Rubixanthin	β,ψ -caroten-3-ol
Violaxanthin	5,6,5',6'-diepoxy-5,6,5',6'-tetrahydro- β,β -carotene-3,3'-diol
α -Zeaxcarotene	7',8'-dihydro- ϵ,ψ -carotene
β -Zeaxcarotene	7',8'-dihydro- β,ψ -carotene
Zeaxanthin	β,β -carotene-3,3'-diol
Zeinoxanthin	β,ϵ -carotene-3-ol

Chimiquement les composés de ce tableau peuvent être regroupés en :

- caroténoïdes acycliques, qui n'ont pas de cycle dans leur formule. Les exemples sont la phytoène, la phytofluène, la ζ -carotène, la neurosporène et la lycopène.
- caroténoïdes cycliques, qui sont soit monocycliques, soit bicycliques selon leur formule. Les monocycliques sont : la β -zéacarotène, la α -zéacarotène, la γ -carotène, la δ -carotène. Les bicycliques regroupent la β -carotène et la α -carotène.
- caroténols (hydroxycaroténoïdes) qui ont une ou deux fonctions alcools dans leur formule. Ce groupe comprend la lycoxanthine, la lycophylle, la rubixanthine, la β -cryptoxanthine, la zeinoxanthine, la α -cryptoxanthine, la zéaxanthine et la lutéine.
- époxycaroténoïdes, qui ont un ou deux groupements époxy dans leur formule; ce sont : la β -carotène-5,6-époxyde, l'anthéroxanthine, la violaxanthine, la lutéoxanthine, l'auroxanthine, la néoxanthine et la lutéine-5,6-époxyde.
- caroténoïdes uniques c'est à dire qui n'ont pas d'analogues structuraux : la capsanthine, la capsorubine, la crocétine et la bixine sont de ce groupe.

A coté de ce regroupement par analogie structurale, il existe un autre regroupement en provitamines A et en non provitamines A. Ce regroupement est le plus intéressant à cause de l'importance capitale de la vitamine A dans l'organisme.

- Les provitamines A : β -carotène, α et β -cryptoxanthine, β -zéacarotène, γ -carotène, α -carotène.
- Les non provitamines A : néoxanthine, lutéine, violaxanthine, lutéine 5,6-époxyde, zéaxanthine, ζ -carotène, lycopène, phytoène, phytofluène, zeinoxanthine, β -carotène 5,8-époxyde, neurosporène, anthéroxanthine et rubixanthine.

Il existe quelques caroténoïdes typiquement animaux mais non synthétisés par eux. Ce sont en fait des intermédiaires dans le catabolisme des caroténoïdes alimentaires. Ils sont donc utilisés en HPLC comme standard interne dans le dosage des caroténoïdes alimentaires. Ce sont : la canthaxanthine, l'échinénone, la tunaxanthine et l'astaxanthine.

2. LES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES CAROTENOIDES

La détermination de la teneur en caroténoïdes par la méthode HPLC est basée sur les propriétés physiques et chimiques de ceux-ci. En effet une bonne compréhension de quelques propriétés physicochimiques des caroténoïdes permet à l'analyste de les doser avec une grande fiabilité.

a. *La solubilité*

A quelques exceptions près, toutes les caroténoïdes sont liposolubles. Ils sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques comme l'acétone, l'alcool, l'éther d'éthyle, le chloroforme et l'acétate d'éthyle. Ils sont très solubles dans l'éther de pétrole, l'hexane et le toluène. L'étude de la solubilité a permis de mettre au point des mélanges de solvants organiques adéquats pour l'extraction des caroténoïdes et pour la phase mobile de la méthode chromatographique.

b. *L'absorption lumineuse*

Le système de double-liaisons conjuguées constitue le chromophore qui donne aux caroténoïdes leurs couleurs attractives et est responsable de l'absorption dans le visible. L'absorption lumineuse est la base de l'identification partielle et de la quantification des caroténoïdes. Ils absorbent dans une moindre mesure dans l'ultra-violet. Les longueurs d'onde d'absorption maximale notées λ_{\max} dépendent aussi du solvant.

Les valeurs relatives de λ max. dans l'hexane et l'éther de pétrole sont pratiquement les mêmes que dans le diéthyl éther, le méthanol, l'éthanol et l'acétonitrile et supérieures pour 2-6 nm dans l'acétone, 10-20 nm dans le chloroforme ou le dichlorométhane et 18-24 nm dans le toluène. Les caroténoïdes en solution obéissent à la loi de Beer-Lambert. Leur densité optique (DO) est proportionnelle à leur concentration et ils sont donc quantifiés par spectrophotométrie.

c - L'adsorption et le partage

L'adsorption et le partage différentiels entre les différents types de caroténoïdes sont à l'origine de leur séparation en fonction de leur temps de rétention (RT) en chromatographie. Ce comportement des caroténoïdes s'explique par leur structure chimique. L'adsorption dépend du nombre de doubles liaisons conjuguées, de cyclisations, de la présence de substituants oxygénés et du système adsorbant/solvant (colonne / phase mobile) .

d - L'isomérisation et l'oxydation

La structure chimique des caroténoïdes fait d'eux des composés très aptes à l'isomérisation. L'isomérisation est provoquée par la chaleur, la lumière, les acides et l'adsorption sur une surface active comme l'alumine. Elle transforme les caroténoïdes usuels qui sont en configuration « trans. » en configuration « cis » et permettent ainsi leur dégradation. Quant à la dégradation par oxydation, elle dépend de la quantité d'oxygène disponible et est stimulée par la lumière, les enzymes et les métaux. Cette dégradation aboutit à des composés de faibles poids moléculaires et par conséquent la perte de la couleur et des activités biologiques. Les conditions nécessaires à l'isomérisation et à l'oxydation peuvent exister au cours de l'analyse et des mesures préventives doivent être prises pour garantir la fiabilité des résultats analytiques.

e - Les réactions chimiques des groupements fonctionnels

Les caroténoïdes comme les hydroxycaroténoïdes, les époxycaroténoïdes, les caroténoïdes uniques et les caroténoïdes typiquement animaux possèdent des groupes fonctionnels pouvant être responsable de réactions chimiques avec d'autres composés. Par exemple les fonctions alcools primaires et secondaires des hydroxycaroténoïdes sont acétylées par l'anhydride acétique dans la pyridine. Autrefois beaucoup de réactions chimiques avaient été proposées pour identifier les caroténoïdes, mais elles ont vite révélées leurs insuffisances .

3 - INTERETS DES CAROTENOIDES DANS L'ALIMENTATION

L'intérêt le plus connu des caroténoïdes est son activité provitamine A. Pourtant il en existe plusieurs autres. En effet, une corrélation inverse est établie dans la plupart des études entre apports ou concentrations plasmatiques en caroténoïdes et risques de cancers et de maladies cardiovasculaires. Les caroténoïdes ont un effet protecteur dans d'autres pathologies comme les atteintes rétiniennes ou dermatologiques.

a - caroténoïdes et cancers

Dans cette pathologie, comme dans d'autres, plusieurs types d'études ont été réalisées; soit mise en parallèle des apports alimentaires en caroténoïdes totaux ou d'un caroténoïde particulier (évalués avec plus ou moins de précision) et l'apparition de différentes formes de cancers, soit corrélation du taux plasmatique de caroténoïdes et du risque de cancer. L'effet d'une alimentation riche en caroténoïdes serait bénéfique vis à vis du cancer de la bouche, du pharynx et du poumon [2]. Toutefois une étude datant de 1990, n'a pas mis en évidence l'association entre alimentation enrichie en fruits et légumes et risques d'apparition du cancer du poumon. D'autres études portant sur le β -carotène montrent qu'il existe une relation inverse entre apport et risque de cancer de l'endomètre, du sein, de l'estomac, mais surtout du poumon, et en particulier chez les non fumeurs. La consommation de lycopène ne diminue pas celui du cancer du tractus digestif et de la prostate.

Il n'a pas été observé de relation entre les apports de cryptoxanthine et le risque d'apparition de cancers du poumon [3].

Toutefois, ces études doivent être interprétées en tenant compte du fait qu'une alimentation riche en caroténoïdes est également riche en flavonoïdes dont le rôle protecteur vis à vis des cancers est connu.

b - Caroténoïdes et maladies cardiovasculaires

L'athérosclérose est une des causes les plus importantes de décès dans les pays industrialisés. A la différence de la France, les régions du nord de la Finlande sont des régions où la mortalité par pathologies cardiovasculaires, et en particulier par maladie coronarienne est exceptionnellement basse. Cette différence semble liée à un statut anti-oxydant élevé, grâce à une alimentation riche en poisson, en légumes verts et fruits contenant des caroténoïdes. Il en est de même pour des populations asiatiques (Malaisie, Chine) malgré le pourcentage élevé de fumeurs [4].

Par ailleurs, de nombreux travaux font une relation entre la diminution des risques cardiovasculaires et des concentrations plasmatiques élevées en β -carotène. Les caroténoïdes par leur propriété anti – oxydante, leur localisation dans les membranes et dans les lipoprotéines, où ils jouent un rôle dans la neutralisation de l'oxygène singulet, seraient des acteurs importants dans la protection contre la péroration lipidique [5]. Ils agissent en synergie avec d'autres substances anti-oxydantes : α -tocophérol (vitamine E), acide ascorbique (vitamine C), urate, bilirubines et glutathion réduit.

Des études menées quant à l'efficacité des apports alimentaires en β -carotène, ont conclu à une diminution significative de la mortalité et de la morbidité cardiovasculaires des individus ayant un statut en β -carotène élevé sans atteindre des niveaux « toxiques ». Après un suivi de 4 à 13 ans, cette diminution pouvait atteindre 50% [6]. La plupart des études épidémiologiques sur les caroténoïdes et le risque de maladies cardiovasculaires ont mis en évidence l'existence d'un lien entre un faible taux de caroténoïdes et une augmentation du risque ou entre une concentration plasmatique élevée de caroténoïdes et une diminution du risque cardiovasculaire [7].

c - Caroténoïdes et pathologies rétinienes

Deux caroténoïdes sont présents dans l'œil : la zéaxanthine au niveau de la macula et la lutéine au niveau de la rétine [8]. La possibilité d'une transformation dans la rétine de la lutéine en zéaxanthine a été rapportée; cette dernière a une capacité à neutraliser l'oxygène singulet supérieure à celle de la lutéine. La lutéine et la zéaxanthine peuvent donc agir comme anti-oxydants pour protéger la macula des radiations à courte longueur d'onde et peuvent jouer un rôle important dans la prévention de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

Il a été démontré que des sujets ayant une consommation importante en caroténoïdes (particulièrement de zéaxanthine et lutéine) présentaient un risque moindre de dégénérescence sénile maculaire. De même, des concentrations sériques élevées de β -carotène, vitamine C et de lycopène sont associées à une diminution du risque de développement d'une dégénérescence maculaire sénile [9].

d - Caroténoïdes et infection à VIH

Chez les patients infectés par le VIH, le β -carotène sérique est diminué; le compte de CD4 et le ratio CD4/CD8 est corrélé avec la concentration sérique de carotène [10]. Parmi ces patients, ceux qui présentent un syndrome cachectique ont des concentrations de β -carotène et un nombre de CD4 significativement abaissés par rapport aux autres patients infectés par le VIH.

On retrouve chez des enfants infectés par le VIH et symptomatiques, des concentrations de β -carotène sériques diminuées de 4 à 6 fois par rapport à celles observées chez des enfants non infectés par le virus [11]. Par ailleurs, lorsque ceux-ci présentent un syndrome d'immuno-déficience acquise, le lycopène est diminué par rapport à celui des enfants infectés mais n'ayant pas les symptômes de la maladie. Phuapradit et coll. [12] trouvent, chez les femmes enceintes infectées par le VIH, une concentration de vitamine A et de β -carotènes sériques diminuées au cours du premier semestre de la grossesse, mais ceci est plus vraisemblablement lié à la grossesse qu'au VIH.

La supplémentation par de la β -carotène des patients VIH positifs présentant un syndrome d'ARC(Aids-Related Complex) provoque une augmentation du nombre de CD4, et prévient l'apparition de symptômes du SIDA. L'amélioration ne persiste pas après arrêt de la supplémentation [13].

e - Caroténoïdes et dermatologie

Le β -carotène est utilisé dans le traitement de la protoporphyrine érythropoïétique en raison de son activité antiradicalaire vis à vis des radicaux libres générés par l'excès de porphyrines cutanées excitées par la lumière solaire. La β -carotène, à des doses quotidiennes de 180mg et parfois 300mg, permet aux patients atteints de protoporphyrine érythropoïétique de mieux tolérer l'exposition solaire. Mathews-Roth a analysé 27 publications faisant état d'une augmentation de la tolérance au soleil de plus de 75% des patients et rapporte les résultats d'une étude collaborative dans laquelle 84% des patients traités ont multiplié par 3 leur capacité à tolérer l'exposition solaire.

Dans d'autres pathologies dermatologiques, les caroténoïdes semblent jouer un rôle; il a été rapporté des effets bénéfiques de la β -carotène dans le traitement de la photosensibilité de l'anémie sidérolastique [14]. Une relation inverse entre le psoriasis et la consommation d'aliments riches en caroténoïdes (carottes, tomates et fruits) a été mise en évidence. Enfin, la supplémentation à doses modérées de β -carotène avant et après exposition au soleil en association avec l'utilisation d'une crème écran solaire, permet d'obtenir une protection beaucoup plus efficace que celle liée à l'utilisation d'une crème solaire seule [15].

f - Caroténoïdes et autres pathologies

Un faible statut en vitamines anti-oxydantes (A, E et β -carotène) semble être un facteur de risques accrus de polyarthrite rhumatoïde [16]. Une étude portant sur les taux des vitamines A, E et caroténoïdes a mis en évidence chez des patients atteints de sclérose vasculaire multiloculaire, des concentrations sériques de β -carotène diminuées par rapport aux contrôles.

Dans la maladie d'Alzheimer, les mêmes observations sont faites alors qu'il existe dans cette maladie une accumulation de β -carotène dans les tissus sous-cutanés.

4 - QUELQUES NOTIONS THEORIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

a - Historique

La chromatographie est une technique analytique dont les premières expériences, celles de TSWETT, datent de 1903. Elle permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés dans un mélange pour leur identification et leur quantification. La forme moderne de la chromatographie en phase liquide est arrivée dans les laboratoires industriels à la fin des années soixante-dix, bien après la chromatographie en phase gazeuse ou celle sur couche mince (planaire). Ses performances ont permis des analyses qui n'étaient pas possibles auparavant. Les exigences de qualité étant de plus en plus strictes, cette méthode s'est rapidement répandue dans toutes les industries chimiques, para chimiques, cosmétiques, pharmaceutiques... Ce marché considérable a entraîné des développements rapides et aujourd'hui la chromatographie en phase liquide est une des principales méthodes d'analyse dans ces industries. Elle a atteint un haut degré de fiabilité et de performance. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) permet de réaliser assez facilement des séparations et des analyses qui seraient difficiles ou impossibles par d'autres techniques chromatographiques. A l'origine, la chromatographie en phase liquide se faisait dans des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression, le liquide est alors poussé par une pompe péristaltique. Puis, pour augmenter le débit (gagner du temps), des essais ont été effectués sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie Liquide sous Haute Pression (HPLC) .

Après d'autres modifications (taille des particules...), le P de pression est devenu le P de Performance. Aujourd'hui l'HPLC est la Chromatographie Liquide Haute Performance. Performance, car cette technique peut effectuer des séparations plus difficiles. Les quantités de solutés sont plus faibles. Les pics sont beaucoup plus fins et la résolution est nettement meilleure.

b - Principe de la technique.

La chromatographie en phase liquide est une méthode physico-chimique basée sur des différences d'interactions. Les molécules des produits à séparer (solutés) sont mises en solution dans un solvant . Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant) . Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire contenue dans un tube appelé colonne chromatographique. Ces interactions provoquent des échanges qui aboutissent à la séparation désirée.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt en permanence le système chromatographique. Le mélange, dissout dans un solvant, est injecté par l'intermédiaire d'une vanne, puis transporté au travers du système chromatographique, dont fait partie la colonne. Les composés en solution se répartissent suivant leur affinité, entre la phase mobile et la phase stationnaire. La théorie de séparation montre que le signal enregistré à la sortie d'un détecteur approprié, en fin de colonne a la forme d'une courbe de Gauss. Si la séparation est bonne, chaque pic représente un constituant du mélange à séparer. L'ensemble des pics qui représente l'absorbance du couple (phase mobile, substance séparée) est appelé chromatogramme.

c - Quelques définitions

- Phase : en chimie , une phase est la partie homogène d'un système.
Phase stationnaire : Support plus ou moins poreux (silice ou polymère) recouvert ou non d'un gel (liquide greffé) qui a des propriétés désirées pour retenir les molécules de soluté. Le diamètre des particules est généralement compris entre 3 et 10 μm .
- Eluant – phase éluante : un éluant est une phase mobile. La notion de pouvoir éluant correspond au pouvoir d'entraîner les solutés à travers la colonne.
- Temps de rétention (TR) : temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne. C'est le temps passé dans la colonne et les volumes morts (temps total dans la colonne).

Suivant les auteurs, le temps de rétention peut être mesuré entre l'entrée et la sortie du système chromatographique. Le temps de sortie, ou temps de rétention, est caractéristique du constituant, pour des conditions d'analyse données.

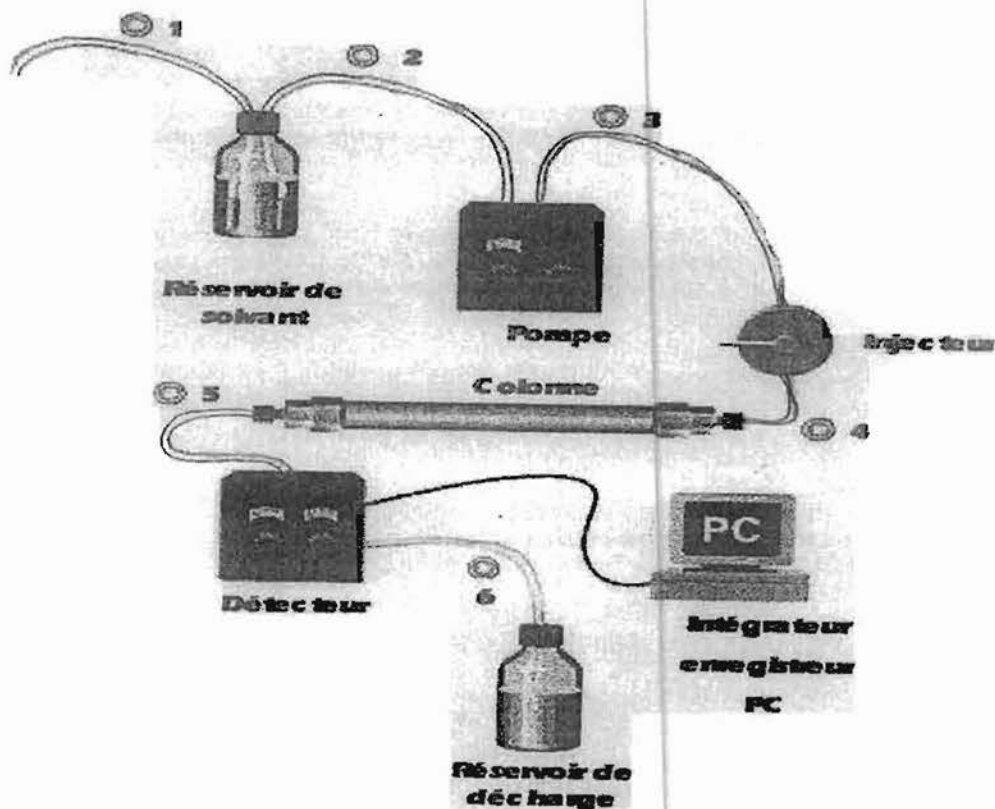
- Standard interne : substance pure, qui n'est pas endogène (non présent dans l'échantillon à analyser) et qui est sujette aux mêmes réactions chimiques que l'analyte à déterminer.
- Résolution : si dans certaines conditions, deux constituants sortent à des temps très proches, leurs pics risquent de se chevaucher. En optimisant les conditions analytiques, il est possible d'améliorer l'allure du chromatogramme. Le paramètre de résolution R quantifie la qualité de cette séparation.

III - MATERIEL ET METHODE

1. LE MATERIEL

a. La chaîne HPLC

Le schéma ci-dessous représente les équipements de base d'un système HPLC.

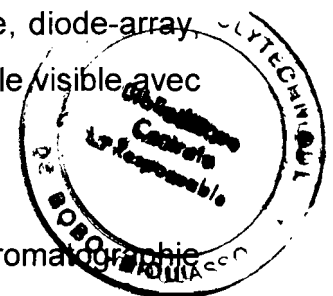


Les composantes de base de ce système sont :

- le réservoir de solvant qui contient la phase mobile (éluant). La phase mobile doit être dégazée. Dans notre travail, la phase mobile avait la composition suivante : Acétonitrile 70%
Méthanol 20%
Dichloroéthane 10%

- la pompe : elle permet de régler le débit d'écoulement permanent de la phase mobile. La pression délivrée par la pompe est si énorme quand on atteint le débit voulu, qu'il est conseillé de faire monter le débit graduellement pour ne pas abîmer la colonne. La pompe « JASCO PU-980 », que nous avons utilisée a une pression maximale de 300 Kg/cm² . Le débit de pompe est de 2 mL par minute.
- l'injecteur est équipé d'un système d'introduction de l'échantillon dont l'acronyme anglosaxon est « loop » d'injection de volume défini (20 µL) pour l'analyse en cours ; elle permet une introduction reproductible de l'échantillon dans le système. Il a deux positions : une position dite de charge, position dans laquelle on introduit l'échantillon dans la « loop » et une position dite injecte, position dans laquelle la phase mobile entraîne l'échantillon injecté sur la colonne.
- la colonne analytique où s'effectue la séparation des constituants d'un mélange selon les différents facteurs d'attraction des composés pour le matériel de la colonne. C'est la phase stationnaire. La colonne utilisée pour notre analyse est de type « SUPELCO LC-18 , 25cm x 4,6mm, 5µm ».
- le détecteur : les différents constituants d'un mélange sont détectés et quantifiés dans la cellule du détecteur avant d'être éliminés vers le réservoir de décharge. Il existe plusieurs types de détecteur : UV, visible, diode-array, fluoromètre, etc... Pour le dosage des caroténoïdes on a utilisé le visible avec $\lambda = 450 \text{ nm}$ et le type de détecteur , le « JASCO UV 975 ».
- l'enregistreur peut être un ordinateur muni d'un logiciel de chromatographie ou une imprimante . L'enregistrement peut aussi se faire simultanément avec l'ordinateur et l'imprimante comme ce fut le cas dans notre travail.

L'imprimante donne un chromatogramme avec une intégration automatique de chaque signal, alors qu'avec l'ordinateur on peut faire une intégration automatique ou manuelle. L'aire d'intégration de chaque pic est proportionnelle à la quantité de la substance qui l'a induite.



Notre système HPLC est piloté par un ordinateur et est muni d'un logiciel de traitement des données de type BORWIN (IMBS, France).

- le réservoir de décharge.

Tous ces éléments sont reliés par des tuyaux de O₂ à O₆ sur le schéma. Le tuyau O₁ permet de ravitailler le réservoir de solvant.

On peut greffer à ce système de base d'autres éléments très importants, une colonne de garde, un régulateur de pression négative et/ou un système de dégazage de solvant. Dans cette chaîne, tous les éléments sont indispensables. S'il y a un élément qui fonctionne anormalement, cela se répercutera sur le résultat final.

b. Autres matériels

- Des tubes à centrifuger .
- Un broyeur de cuisine (type moulinex) pour broyer la patate.
- Une balance pour peser la prise d'essai.
- Une centrifugeuse munie d'un réfrigérateur pouvant aller à -5°C.
- Un dégazeur à micro-ondes pour dégazer la phase mobile.
- Un spectrophotomètre pour déterminer les concentrations des différents constituants du mélange de calibration.
- Deux micropipettes : une de 200-1000µL et une de 10-100µL.
- Une éprouvette graduée pour préparer la phase mobile .
- Une bouteille d'azote sous-pression pour évaporer l'hexane .
- Un agitateur de type vortex
- Un marqueur pour identifier les tubes.
- Les solvants : Hexane
Acétonitrile
Méthanol
Dichloroéthane

- Les standards de calibration qui sont en poudre pure de :
 - lycopène
 - zéaxanthine
 - cryptoxanthine
 - échinonone (standard interne)
 - α -carotène
 - β -carotène

2. LA METHODE

L'analyse des caroténoïdes s'effectue à l'abri de la lumière car ce sont des substances photosensibles.

a. La préparation du mélange de calibration

La calibration est une étape clef dans l'analyse . En effet, elle permet d'identifier sur le chromatogramme les pics intéressant notre analyse et de calculer pour chaque composé un facteur de calibration relatif. D'où l'importance d'une bonne préparation du mélange de calibration.

- Détermination de la concentration en $\mu\text{g/mL}$ de chaque composé du mélange.

On dissout une quantité x de la poudre du calibrant dans 3mL d'hexane . On réalise une dilution au 1/10, 1/100, 1/1000 de cette solution en prélevant 0,3mL pour mélanger successivement avec 2,7mL d'hexane. On a ainsi 4 tubes numérotés de 1 à 4. On mesure la Densité Optique (DO) des 4 solutions à $\lambda = 450 \text{ nm}$.

On calcule ensuite la concentration de la solution ayant une DO comprise entre 0,1 et 0,9.

$$C = (D.O / \epsilon) \cdot 10^{-3} \mu\text{g/ml} \quad \epsilon = \text{coefficient d'extinction}$$

On répète l'opération pour les autres calibrants. Le tableau suivant donne les poids moléculaires(P.M) et les coefficients d'extinction des standards de calibration.

Composé	P.M	ϵ
Zéaxanthine	568	2348.10^{-4}
Cryptoxanthine	552,9	2386.10^{-4}
Echinenone	550,8	2158.10^{-4}
Lycopène	536,9	3450.10^{-4}
α -carotène	536,9	2544.10^{-4}
β -carotène	536,9	2590.10^{-4}

- Détermination du volume à prélever pour avoir 15 pmoles/20 μ L (375 pmoles/500 μ L)
 Connaissant le Poids Moléculaire et les différentes concentrations en μ g/mL, il est aisé de calculer le volume à prélever par des règles de trois.

Une fois ces volumes déterminés, on réalise leur mélange dans un tube et l'on évapore sous azote. On dissout le sédiment obtenu dans 500 μ L d'acétonitrile et on a le mélange de calibration. Dans ce mélange de calibration il est à noter que la β -carotène est en quantité double des autres, c'est à dire 30 pmoles/20 μ L. Le mélange de calibration est injecté en duplicata pour s'assurer de la concordance des temps de rétention et des aires des pics.

b. Collecte et traitement des échantillons.

Les échantillons nous ont été apportés par l'ONG Hellen Keller International(HKI) .
 Nous avons dix (10) lots de patates. Elles sont conservées au frigo pour empêcher le pourrissement. Chaque lot est divisé en trois(3) sous – lots. Chaque sous – lot est broyé avec le « Moulinex » jusqu'à obtention d'une pâte (les patates doivent être broyées le plus finement possible).

• Extraction des caroténoïdes de la pâte

- Peser 1à 2 g de la pâte obtenue dans un tube, ajouter 2 mL d'hexane, 1 ml de standard interne(SI) à 300 pmoles/500 μ L. SI = échinenone.
- Agiter bien à l'aide du Vortex.
- Centrifuger à 3000 tours/ min pendant 5 min à -5° c.

- Récupérer le surnageant .
- Ajouter 2mL d'hexane dans le culot, agiter à l'aide du vortex puis centrifuger dans les mêmes conditions.
- Prélever le surnageant et rajouter au premier surnageant.
- Evaporer le surnageant sous azote .
- Dissoudre le sédiment avec 800 μ L d'acétonitrile pour avoir 15 pmoles/20 μ L de SI lors de l'injection comme dans le mélange de calibration.
- Agiter à l'aide du Vortex et injecter 60 μ L.
- On réalise une extraction par sous-lot et deux (2) injections par extraction .

• **Méthode de calcul de la concentration de chaque type de caroténoïdes.**

- Calibration

Après injection du mélange de calibration, de concentration définie, et comprenant un Standard Interne, on calcule pour chaque pic un facteur de calibration relatif :

$$F_i = A_i \times C_{SI} / C_i \times A_{SI}$$

Où :

F_i = facteur de calibration du composé i par rapport au Standard Interne (SI).

A_i = aire sous la courbe ou la hauteur de pic du composé i .

C_i = concentration du composé i dans le mélange.

A_{SI} = aire sous la courbe ou hauteur du pic du SI.

C_{SI} = concentration du standard interne dans le mélange.

- Analyse :

$$C_i = (1/F_i)(A_i \times C_{SI}/A_{SI})$$

C_i = concentration du composé i dans l'échantillon.

A_i = aire sous la courbe ou la hauteur de pic du composé i obtenu après injection de l'échantillon.

C_{SI} = concentration du SI introduit dans l'échantillon.

A_{SI} = aire sous la courbe ou la hauteur de pic du SI après injection de l'échantillon.

- Exemple :

Après injection de 20 μL d'un mélange de calibration comprenant de la zéaxanthine et de l'échinenone à une concentration de 15 pmoles/ 20 μL , on obtient les hauteurs de pics suivantes :

Zéaxanthine : 1350 aufs

Echinenone : 1600 aufs (Standard Interne) .

On détermine le facteur de calibration relatif pour la zéaxanthine :

$$F_i = (1350 \times 15) / (15 \times 1600) = 0,84375$$

On injecte ensuite 20 μL d'un échantillon de concentration inconnue contenant 15 pmoles/20 μL de SI, on obtient les hauteurs de pics suivantes :

Zéaxanthine = 2425aufs

Echinenone = 1525 aufs

(aufs = absorbance unit full scale)

$$C_i = (1/0,84375)(2425 \times 15 / 1525) = 28,27 \text{ pmoles dans } 20 \mu\text{L injecté}$$

On rapporte ce résultat à 800 μL préparé. Connaissant le Poids Moléculaire de la zéaxanthine on retrouve sa teneur par gramme de patate.

Dans notre travail, le mélange de calibration comprend par ordre de temps rétention croissante :

Zéaxanthine (Zéa) : 1,882 min

Cryptoxanthine (Crypto) : 3,200 min

Echinenone (Echi) : 3,530 min

Lycopène (Lyco) : 3,967 min

α -carotène (α -caro) : 5,715 min

β -carotène (β -caro) : 5,970 min

IV – LES RESULTATS

Notre étude porte sur la détermination des taux de caroténoïdes dans 10 types de patates. Les caroténoïdes étudiés sont : la zéaxanthine, la cryptoxanthine, la lycopène, la α -carotène et la β -carotène.

1 - Comparaison en fonction de la teneur de chaque type de caroténoïdes dans les dix (10) lots.

Le tableau 3 nous donne les teneurs en $\mu\text{g} / 100\text{g}$ de patate (moyenne des 6 dosages par lot) pour chaque type de caroténoïdes. Les chiffres entre parenthèses représentent les imprécisions (écart type) sur la détermination des taux de caroténoïdes.

Tableau 3

LOTS		ZEA	CRYPTO	LYCO	α -CARO	β -CARO
LOT1	CN1442-59 NIGER	17,2(11,2)	9,9(11,1)	x	x	95(83,5)
LOT2A	MING SHU NIGER	19,5(1,1)	13,5(1,6)	x	x	6,66(1,60)
LOT2B	LANTAOGO 2	3,17(1,51)	x	x	x	38(8)
LOT3	KARMA 98 NIGER	17,2(4)	5,1(2,2)	17,8(0,3)	89,8(0,01)	429(525)
LOT4	CAROMEX NIGER	43,9(15,2)	16,9(2,2)	24,2(18,4)	202(114)	2046(1192)
LOT5	JEWEL	38(3,1)	15,7(1,2)	9,6(1,03)	136(11)	1911(148)
LOT6	TAINING 64 NIGER	12,32(3,6)	12,6(2,7)	5,9(2,9)	x	774(357)
LOT7	NARUMINTANG NIGER	28,4 (3,5)	17,2(2,4)	10,4(2,7)	151(17)	2348(210)
LOT8	KOLOKOHOGO BF	6,71(2,48)	x	x	x	4,59(1,05)
LOT9	LANTAOGO BF	72,1(24,8)	10,6 (6,7)	x	x	170(50)

x : absence du composé

A partir de ce tableau, nous pouvons faire le commentaire suivant :

- Teneur en zéaxanthine : le lot 9 en est le plus riche avec 72 μg /100g et le lot 2B, le plus pauvre avec 3,17 μg /100g. Entre ces deux extrêmes se classent par ordre de teneur décroissante les lots 4, 5, 7, 2A, 1 et 2B, 6,8.
- Teneur en cryptoxanthine : les lots 2B et 8 ne possèdent pas de cryptoxanthine. Sa teneur croît du lot 3, 2A, 4, 5, 6 au lot7 qui a 17,2 μg /100g .
- Teneur en lycopène : la lycopène est absente dans 5 lots (1, 2A, 2B, 8 et 9). Dans les 5 lots restants, sa teneur passe de 24,2 μg /100g dans le lot 4 à 5,9 μg /100g dans le lot 6.
- Teneur en α -carotène : 6 lots (1, 2A, 2B, 6, 8, 9) ne possèdent pas de α -carotène . Alors que dans le lot 4 son taux est jusqu'à 202 μg /100g et même à 89,8 μg /100g dans le lot 3 qui est le plus pauvre des quatre qui en possèdent.
- Teneur en β -carotène : la β -carotène est présente dans tous les lots. Mais sa teneur dans certains lots(2A, 2B, 8) est négligeable au regard des plus riches (lot7, 4, 5) qui ont respectivement 2348 ; 2046 ; 1911 μg /100g.

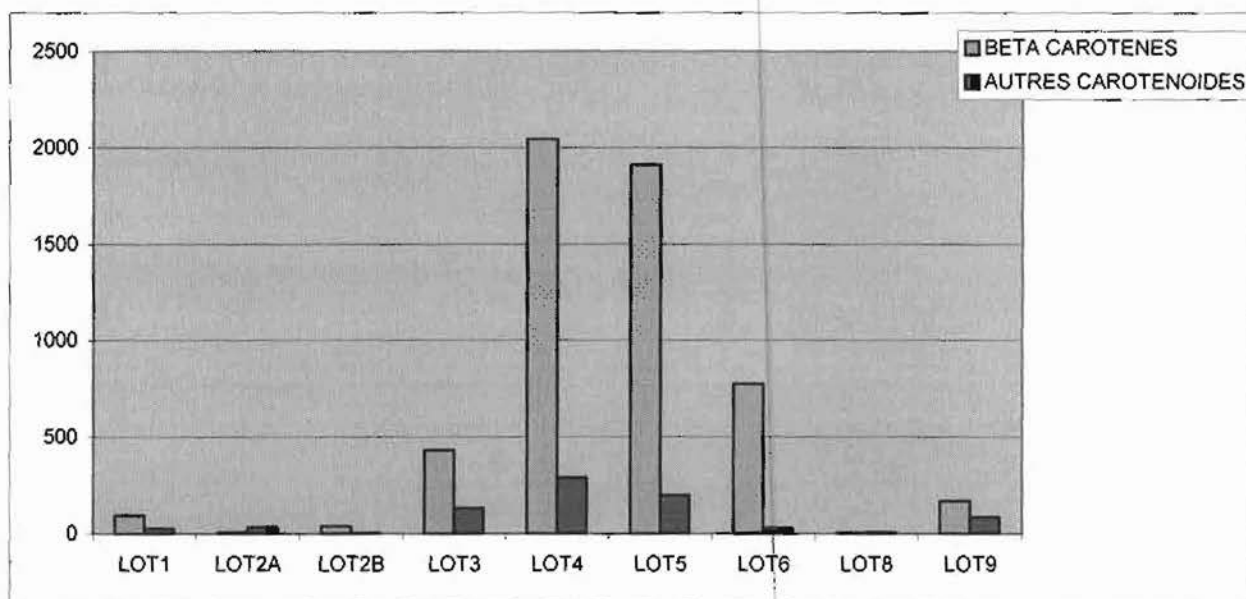
2 - Comparaison des β -carotènes à autres caroténoïdes dans le lot

Le tableau 4 donne les teneurs en β -carotènes, en autres caroténoïdes et en caroténoïdes totaux pour chaque type de patate.

Tableau 4

LOTS		BETA CAROTENES	AUTRES CAROTENOÏDES	CAROTENOÏDES TOTAUX
LOT1	CN1442-59 NIGER	95 (83,5)	27,1 (15,8)	122,1 (85,)
LOT2A	MING SHU NIGER	6,66 (1,60)	33, (1,9)	39,66 (2,5)
LOT2B	LANTAOGO 2	38 (8)	3,2(1,5)	41,2 (7,9)
LOT3	KARMA 98 NIGER	429 (525)	130 (4,6)	559(525,4)
LOT4	CAROMEX NIGER	2045 (1192)	286,6(116,5)	2331,6(1198)
LOT5	JEWEL	1911(148)	199,1 (11,7)	2110,1 (148,5)
LOT6	TAINING 64 NIGER	774 (356)	30,9 (5,4)	804,9(356,9)
LOT7	NARUMINTANG NIGER	2348(210)	207 (6,4)	2555 (108,2)
LOT8	KOLOKOHOGO BF	4,59 (1,05)	6,7 (2,5)	11,29 (2,70)
LOT9	LANTAOGO BF	169 (50)	82,8 (25,7)	251,8(56,4)

Les β -carotènes dominent dans tous les lots sauf dans le lot 2A et le lot 8, en témoigne le diagramme suivant.

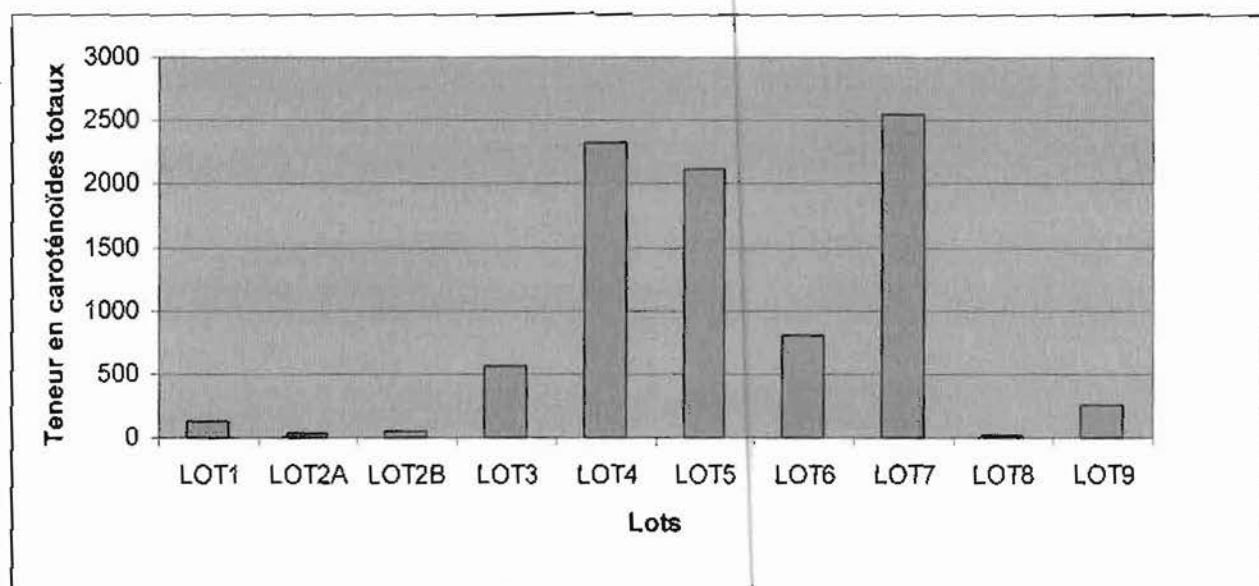


Dans le lot 6 la teneur en β -carotènes est plus de 20 fois celle des autres caroténoïdes et environ 10 fois dans les lots 2B, 5, 7. Le rapport teneur en β -carotènes sur teneur en autres caroténoïdes est de 3,5 (lot1); 3,3 (lot3); 7,15 (lot4) et 2 (lot9). Dans le lot 2A et le lot 8 ce rapport est respectivement 0,2 et 0,7.

3 - Explication de la dispersion

Nous avons calculé l'écart type qui montre l'étendu de la dispersion autour de la moyenne. Il nous montre qu'au sein d'un lot, d'un sous lot et même d'une gousse de patate, les caroténoïdes ne sont pas repartis de façon homogène. Il y'a dans certains lots des écart types qui sont très élevés (dépassant parfois la moyenne), alors que la procédure d'analyse a été validée dans la thèse d'un étudiant en Pharmacie. L'hétérogénéité est alors la seule explication valable et s'observe même visuellement à travers la différence de pigmentation au sein d'un même type de patate.

4 - Comparaison en fonction de la teneur en caroténoïdes totaux.



Le diagramme illustre la dernière colonne du tableau 4. Il permet de voir que trois lots (4, 5, 7) sont les plus riches en caroténoïdes avec plus de 2g / 100g (2000 μ g/100g). Les autres lots ont des teneurs inférieures à 1g/100g (1000 μ g/100g). Le lot le plus pauvre en caroténoïdes est le lot 8 avec 11,3 μ g/100g. A côté de lui, on trouve les lots 2A et 2B qui ont des teneurs inférieures à 100 μ g/100g. Les teneurs en caroténoïdes totaux sont les reflets des teneurs en β -carotènes.

Il est à remarquer que seules les espèces Kolokohogo BF (lot 8) et Ming shu Niger (lot 2A) présentent une teneur en autres caroténoïdes supérieure à celle en β -carotènes. Cependant les teneurs en β -carotènes et autres caroténoïdes sont peu différentes pour le type Kolokohogo BF (lot 8).

Les types Narumintang Niger (lot 7) et Jewel (lot 5) donnent les teneurs les plus homogènes aussi bien en β -carotène qu'en caroténoïdes totaux. Le type Caromex Niger (lot 4) bien que riche en caroténoïdes totaux présente une variabilité assez grande.

V- CONCLUSION

L'étude des caroténoïdes a été freinée pendant longtemps par le manque de techniques sensibles et précises susceptibles d'être utilisées pour leur séparation et leur quantification. Mais depuis quelques années les techniques HPLC ont permis de résoudre ces problèmes. C'est ainsi que nous avons pu mener cette étude. Elle nous révèle qu'il faut encourager la consommation et pourquoi pas la production des patates de type Jewel (lot 5) et de type Narumintang Niger (lot 7) car ils sont les plus riches et les plus homogènes en β -carotène et en caroténoïdes totaux. Cependant la patate n'est pas le seul aliment riche en caroténoïdes. Certains légumes et fruits sont également riches en caroténoïdes. Parmi ceux – ci nous citerons les épinards, les choux verts, les feuilles de manioc, les carottes, les courges, la papaye, la mangue et l'huile de palme non raffinée. D'autres études peuvent être entreprises avec ces légumes et fruits.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]. A guide to carotenoids analysis in foods de Delia B. Rodriguez-Amaya .
- [2]. Ziegler RG, Colavito EA, Hartge P . Importance of alpha-carotene, beta-carotene and other phytochemicals in the etiology of lung cancer .
- [3]. Le Marchand L, Hankin JH, Beecher GR, Wilkens LR, Zhao LP. Intake of carotenoids and lung cancer risk.
- [4]. Lindeberg S, Vessby B . Fatty acid composition of cholesterol esters and serum tocopherols in melanesians apparently free from cardiovascular disease.
- [5]. Woodall AA, Britton G, Jackson MJ. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposome against oxidation by peroxy radicals : relationship between carotenoid structure and protective ability.
- [6]. Jha P, Flather, Lonn E, Farkouk M, Yusuf S. The oxidant vitamins and cardiovascular disease.
- [7]. Gaziano JM, Hennekens CH. Antioxidant vitamins in the prevention of coronary artery disease.
- [8]. Thurnham DI. Carotenoids : functions and fallacies.
- [9]. Tavani A, Negri E, Larecchia C. Food and nutrient intake in risk of cataract.
- [10]. Allard JP, Aghdassi E, Chau J, Salit I, Walmsley S. Oxidative stress and plasma antioxidant micronutrients in humans with HIV infection.
- [11]. Omene JA, Easington CR, Glew RH, Prosper M, Ledlie S. Serum beta-carotene deficiency in HIV-infected children.
- [12]. Phuapradit W, Chaturachinda K, Taneepanichskul S, Sirivarasry J, Khupulsup K, Lerdvuthisopon N. Serum vitamin A and beta-carotene levels in pregnant women infected with human immunodeficiency virus – 1.
- [13]. Fryburg DA, Mark JR, Griffith BP, Askenase PW, Patterson PF. The effect of supplemental beta-carotene on immunological indexes in patients with Aids.
- [14]. Mathews-Roth MM. Beta-carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity disease.
- [15]. Golnick HPM, Hopfenmuller W, Hemmes C. Systemic beta-carotene plus tropical UV-sunscreen are an optimal protection against harmful effects of natural UV-sunlight : results of the Berlin-Eilath Study.

[16]. Comstock GW, Burke AE, Hoffman SC. Serum concentrations of alpha-tocopherol, beta-carotene and retinol preceding the diagnosis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.

Tous les auteurs de [2] à [15] sont cités par H.Faure, V.Fayol, C.Galabert, P.Grolier, G.LeMoël, J.P.Steghens, F.Nabet dans « Annales de Biologie Clinique : Les caroténoïdes, pathologie et études de supplémentation ».