

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté par

AMTOUT Lamia

BELARBI Siham

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER II en Sciences Alimentaires

Spécialité : Nutrition et pathologies

THÈME

**Exploration *in vitro* du potentiel
biologique du lycopène**

Soutenu le 21/06/2020

DEVANT LE JURY

Présidente:	Ziar hasnia	MCA Univ. Mostaganem
Examinatrice:	Yahla Iméne	MCB Univ. Mostaganem
Promotrice:	Keddari soumia	MCA Univ. Mostaganem
Co-promotrice :	Hamed djahira	Doct. Univ. Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments fonctionnels et de la santé
(LMBAFS)*

Année Universitaire : 2019/2020

REMERCIEMENT

Nous tenons tout d'abord à remercier le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qui nous a donné durant toutes les années d'études et d'avoir guider nos pas vers la vie du savoir.

Nous adressons, notre profonde gratitude et tout notre amour à nos parents, nos sœurs et frères, qui ont su nous faire confiance et nous soutenir en toutes circonstances.

*Nous voudrions remercier le **Pr. RIAZI Ali**, Le directeur de Laboratoire Des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé.*

*Nos sincères remerciements s'adressent aussi à notre promotrice **Dr. Keddari Soumia** maitre de conférences A à l'**université de Mostaganem**, département des sciences alimentaires et ceci pour sa disponibilité, ses pertinents conseils qu'elle nous a accordés tout le long de ce travail et pour sa patience et les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire.*

*Nous voudrions remercier également, notre co-promotrice et l'ingénieur de laboratoire **LMBAFS Madame Djahira Hamed**, nous ne saurons jamais la remercier assez pour son aide, sa disponibilité, son soutien et sa sympathie.*

*Nous adressons nos remerciements à **Dr. Ziar H.**, maitre de conférences A au Département des sciences alimentaires, Université Mostaganem, d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous profonds remerciements vont à **Dr. Yahla I.**, maitre de conférences B au Département des Sciences alimentaires, Université de Mostaganem, qui nous fait l'honneur d'examiner ce travail.*

Ainsi qu'à tous nos proches amis qui nous ont toujours soutenus et encouragés même dans les périodes les plus difficiles.

Dédicaces

On dédie ce modeste travail qui est le fruit de nos efforts :

A nos chers parents pour tout le soutien ,leurs sacrifices et leurs encouragements durant toutes nos années d'études

A nos chers frères et sœurs Ainsi que pour toutes nos amies ;

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.

Et à toute la famille « BELARBI »

Et la famille « AMTOUT ».

TABLE DE MATIERE

Remerciement

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Introduction.....01

Partie 1 : Etude bibliographique

Chapitre I : Généralité sur le lycopène et bienfaits santé

I.1. Caroténoïdes03

I.2. Lycopène03

I.2.1. Structure chimique03

I.2.2. Propriétés physico-chimiques.....04

I.2.3. Les sources naturelles de lycopène.....04

I.2.4. Lycopène de la tomate.....05

I.2.5. Facteurs influençant la teneur en lycopène.....06

I.2.6. Absorption, transport et métabolisme.....07

I.2.7. Répartition du lycopène dans les tissus.....08

I.2.8. Biodisponibilité pour la santé.....08

I.2.9. Recommandation.....09

I.2.10. Vertus de lycopène.....09

I.2.10.1. Rôle antioxydant du lycopène.....	09
I.2.10.2. La prévention des maladies cardiovasculaires	10
I.2.10.3. La prévention du cancer	10
I.2.10.4. Action du lycopène sur d'autres pathologies.....	11

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

II.1. Matériels	13
II.1. 1. Matériel végétal	13
II.2. Méthodes.....	13
II.2.1. L'extraction	13
II .2.1.1 Méthode d'extraction.....	13
II.2. 1.2 Purification de lycopène par la méthode de recristallisation.....	14
II.2.1.3 Le rendement de l'extraction	14
II.2.1. 4 CCM analytique du lycopène extrait de la tomate concentrée	15
II.2.1.5. L'optimisation de la méthode de purification par le plan expérimental Box- Behnken.....	16
II.2.2. Activité biologique de lycopène.....	18
II.2.2.1. Activité antioxydante.....	18
a) Mode opératoire.....	18
b) Préparation de la solution de DPPH.....	19
c) Préparation des échantillons.....	19
II.2.2.2 Activité antimicrobienne	20
a) Origine des souches.....	20
b) Réactivation des souches.....	20
c) II.1.3. Méthode de diffusion en puits AWDT (Barefoot et kaenhammer, 1983).....	20
➤ Mode opératoire	21

CHAPITRE III : Résultats et Discussion.

III.1. Rendement d'extraction de lycopène.....	21
III.2. Purification de lycopène par CCM.....	22
III.3. L'optimisation de la méthode de purification par le plan expérimental Box- Behnken.....	23
III.4. Evaluation du pouvoir antioxydant du lycopène par test de DPPH.....	24
III.4.1. pourcentages d'inhibitions I%.....	24
III.4.2. La concentration inhibitrice à 50% (IC50).....	26
III .5. Activité antibactérienne des extraits de Caroténoïdes et de lycopene....	27
Conclusion	30
Référence bibliographiques	32

Liste des Tableaux

Tableau01 : Propriétés physico-chimiques du lycopène (Shie et Le Maguer, 2000)	04
Tableau02 : Aliments Contenant le lycopène (Degrou, 2013).....	05
Tableau03 : Teneur en lycopène dans les tomates et ses dérivées (Bilton et al., 2001).....	06
Tableau04 : Répartition du lycopène dans les organes (David et al., 2002).....	08
Tableau05 : Les différentes variables du plan expérimental BBD.....	17
Tableau06 : Les souches pathogènes utilisés.....	20
Tableau07 : Facteurs d'optimisation de la purification de lycopène par la méthode de recristallisation.....	24
Tableau08 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait caroténoïdes et lycopène.....	26
Tableau09 : Zone d'inhibition (mm) des souches pathogènes sous l'effet des deux extraits caroténoïdes et lycopène.....	29

Liste des figures

Figure01 : Structure chimique du lycopène (Boumendjel et al., 2012).....	04
Figure02 : Action des antioxydants (Wiseman et al., 2000).....	09
Figure03 : Les étapes de l'extraction de lycopène.....	14
Figure04 : Mode opératoire de l'analyse par chromatographie sur couche mince.....	15
Figure05 : Réaction de test de DPPH (Congo, 2012).....	18
Figure06 : Protocole de test DPPH (Benarib et al., 2013).....	19
Figure07 : Rendement d'extraction de Lycopène.....	23
Figure08 : La confirmation de la pureté de l'extrait de lycopène par CCM.....	24
Figure09 : Effet anti radicalaire d'extrait caroténoïdes sur la réduction de DPPH.....	26
Figure10 : Effet anti radicalaire de lycopène sur la réduction de DPPH.....	27
Figure11 : Pouvoir antibactérien des extraits de caroténoïdes et de lycopène par la méthodes de diffusion en puits vis-à-vis des souches pathogènes testés. D,E,F,G,H.....	31

Liste des abréviations

Ac : Absorbance du contrôle négatif.

AH : Donneur de l'hydrogène.

At : Absorbance de l'extrait

ATCC: American Type Culture Collection.

AWDT : Méthode de diffusion en puits

BBD : Box-Behnken

BHIB : Bouillon infusion cœur-cervelle

C : Extrait de caroténoïdes

C40H56 : Formule de lycopène

CAB : Conserverie Amor BENAMOR

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

DPPH° : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

DPPH-H : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine

F : Lycopène pur de France

G/mol : Unité de mesure gramme sur mole (poids moléculaire)

I %: Pourcentages d'inhibitions

IC50 : La concentration d'extrait qui assure la réduction de **50%** du **DPPH**

L : Extrait du lycopène purifié

LDL : Les lipoprotéines de basse densité

LMBAFS : Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé.

M₀: Matière première

M₁: Matière terminale

Mg : Milligramme

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

MS : Matière sèche

Nm : Nanomètre

Nmol/L : Nanomoles per Litres

R : Le rendement de l'extraction

R : Notre lycopène purifié

RF : Le rapport frontale

UFC/ml : Mesure de la concentration de mycoplasmes dans un prélèvement.

UV : Ultra violet

V : Volume

X1 : Volume de filtrat récupéré de l'extraction (ml)

X2 : Température d'évaporation de filtrat (°C)

X3 : Le volume du solvant apolaire ajouté (ml)

λ_{\max} : Longueurs d'onde

Résumé

Résumé

La présence du lycopène dans notre produit alimentaire s'avère bénéfique pour notre santé. C'est un colorant alimentaire naturel qui présente aussi des propriétés antioxydantes. La tomate et ses produits dérivés sont les principales sources de lycopène. L'extraction du lycopène à partir de concentré de tomate a permis la valorisation de cette dernière. L'analyse chromatographique par CCM a permis d'identifier le lycopène avec un rapport frontale (RF= 0.86). L'optimisation de la méthode de recristallisation par trois paramètres (température, quantité de l'extrait et quantité du solvant apolaire ajouté) nous a permis d'enregistrer les meilleures conditions pour avoir un bon rendement (91.7mg de lycopène pur). Le lycopène a un effet antioxydant significatif avec un IC₅₀= 580 µg/ml et un effet antimicrobien avec une activité inhibitrice importante vis à vis à la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Mots clés : Lycopène - Tomate concentrée - Extraction – Optimisation- pouvoir Antioxydants – pouvoir Antimicrobien.

Summary

The presence of lycopene in our food product is beneficial for our health. It is a natural food coloring which also has antioxidant properties. Tomatoes and their derivatives are the main sources of lycopene. The extraction of lycopene from tomato concentrate has enabled the latter to be valued, Chromatographic analysis by TLC identified lycopene with a frontal ratio (RF = 0.86). The optimization of the recrystallization method by three parameters (temperatures, amount of extract and amount of non-polar solvent added) allowed us to record the best conditions for a good yield (91.7 mg of pure lycopene). Lycopene has a significant antioxidant effect with an IC₅₀ = 580 µg / ml and an antimicrobial effect that they have a significant inhibitory activity with respect to the *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 strain.

Keyword: Lycopene - Concentrated tomato - Extraction - Optimization - Antioxidants – Antimicrobial activity.

الملخص

إن وجود الليكوبين في منتجنا الغذائي مفيد لصحتنا. إنه ملون غذائي طبيعي له أيضًا خصائص مضادة للأكسدة. الطماطم ومشتقاتها هي المصادر الرئيسية لليكوبين. إن استخراج الليكوبين من مركز الطماطم قد مكن من تقييم هذا الأخير ,حدد التحليل الكروماتوجرافي بواسطة CCM الليكوبين بنسبة أمامية (RF = 0.86). سمح لنا تحسين طريقة إعادة التبلور بثلاث معلمات (درجات الحرارة وكمية المستخلص وكمية المذيب غير القطبي المضاف) بتسجيل أفضل الظروف للحصول على عائد جيد (91.7 مجم من الليكوبين النقي). له تأثير مضاد للأكسدة كبير مع $IC_{50} = 580$ ميكروغرام / مل وتأثير مضاد للميكروبات لديهم نشاط مثبت كبير فيما يتعلق بسلالة *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 .

الكلمات الرئيسية: الليكوبين - الطماطم المركزة - الاستخراج - التحسين - مضادات الأكسدة - مضادات الميكروبات.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

De nombreuses études épidémiologiques ont démontré les effets bénéfiques d'un régime riche en fruits et légumes, ces effets pourraient être en partie dus aux microconstituants (caroténoïdes, composés phénoliques, vitamines, minéraux, etc.) contenus dans ces produits (Chanforan, 2010).

Aujourd'hui, les consommateurs sont de plus en plus exigeants en matière de goût, de couleur, de texture... Ils cherchent des produits bénéfiques pour la santé mais aussi des aliments qui ont du goût, une couleur attirante, et qui se conservent longtemps. Ainsi, des additifs sont fabriqués pour répondre à ces demandes. Ces substances sont ajoutées intentionnellement et en petite quantité à un aliment au cours de sa préparation afin d'assurer une meilleure conservation ou de compenser la perte des qualités sensorielles. Elles peuvent être d'origine naturelle (minérale, végétale ou animale), issues de la transformation de substances naturelles ou obtenues par synthèse.

Ces dernières décennies, les produits « bio » ont pris une ampleur chez le consommateur, contrairement aux produits synthétiques qui sont généralement mutagènes, cancérigènes ou même gènotoxiques.

Les antioxydants naturels sont très utilisés en alimentation humaines, incorporés dans différents produits industrialisés à la place des additifs alimentaires et sont très réputés pour leur pouvoir antioxydant et anticancéreux, tel que le lycopène.

Le lycopène est un pigment naturel qui donne à de nombreux fruits et légumes leur teinte rougeâtre. Il s'agit plus précisément d'un antioxydant de la famille des caroténoïdes.

De nombreuses études épidémiologiques fournissent des preuves solides que le lycopène et ses métabolites sont actifs dans plusieurs activités biologiques (Wang, 2007). Ces activités biologiques et le rôle dans l'amélioration de la fonction immunitaire ont été largement publiés (Waliszewski et al., 2010 ; Cruz et al., 2013 ; Anese et al., 2013).

Ces recherches ont rapporté que l'importance du lycopène en tant que composant bioactif est associée à un risque plus faible de certaines maladies dégénératives. En outre, les tests de culture cellulaire et l'intervention alimentaire ont fourni des preuves supplémentaires

que le lycopène peut jouer un rôle spécifique dans la prévention du cancer de la prostate (**Wertz et al., 2004**).

Le lycopène se trouve dans la pastèque, le pamplemousse, la goyave et le melon d'eau mais la tomate est la source majeure de ce caroténoïde (**Degrou, 2013**).

La tomate fournit 9 des 40 caroténoïdes présents dans le sang et les tissus. Elle contient majoritairement du lycopène (de 5 à 71 mg/kg), du β -carotène (de 4 à 17 mg/kg) et de la lutéine (de 0,5 à 2 mg/kg) (**Stahl & Helmut, 2004**). Cette tomate est transformée en produits alimentaires tels que le Ketchup, et produits en conserve plus riche en lycopène que le produit frais.

Des quantités importantes de tomate industrielle sont produites en Algérie chaque année, environ 380 milliers de tonnes en 2009 (**Bouزيد & Bedrani, 2013**). La production de tomate se situe au quatrième rang mondial des légumes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail portant sur l'activité biologique du lycopène, dont l'objectif est d'extraire le lycopène à partir de double concentré de tomate en variant les conditions d'extraction afin d'optimiser les méthodes d'extraction et avoir un bon rendement avec des coûts plus faibles et d'évaluer son effet antioxydant et antimicrobien.

CHAPITRE I :
Généralité sur le lycopène et bienfaits santé

I.2.2. Propriétés physico-chimiques

Le lycopène est une substance lipophile, insoluble dans l'eau. Dans les milieux aqueux ou les solvants polaires hydratés, il a tendance à former des agrégats et précipiter en cristaux. Il est soluble dans les solvants apolaires comme le chloroforme, le benzène, le bisulfite de carbone, modérément soluble dans l'éther, l'éther de pétrole, l'hexane et l'huile. Les principales propriétés physico-chimiques du lycopène sont représentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du lycopène (Shie et Le Maguer, 2000)

Formule chimique	C40H56
Poids moléculaire	536,9 g/mol
Couleur	Rouge foncé
Absorbance	Longueur d'onde optimale : 472 nm
Solubilité	Soluble dans le chloroforme et le benzène, pratiquement insoluble dans le méthanol et l'éthanol.
Point de fusion	172-173 °C

I.2.3. Les sources naturelles de lycopène

A l'inverse d'autres caroténoïdes, on ne trouve du lycopène que dans un petit nombre de végétaux, principalement les fruits et les légumes de couleur rouge (tableau 2). La tomate et ses produits dérivés (jus, ketchup, sauces et pâtes) sont les sources de lycopène par excellence. Les autres sources alimentaires de lycopène sont la goyave rose, le pamplemousse rose, la papaye, l'abricot et la pastèque. En Occident, la tomate et les aliments à base de tomates fournissent plus de 85 % des besoins en lycopène (Fraser & Bramley, 2004).

Tableau 2: Aliments Contenant le lycopène (Degrou, 2013).

Aliments	Teneur en lycopène µg/100g ou 100 mL de matière fraîche)
Abricot	54
Ananas	265-605
Courge	500
Figue	320
Goyave	769-1816
Kiwi	<10
Mangue	<10-724
Pamplemousse	750
Pastèque rouge	4770-13523
Pêche	11

Rhubarbe	120
Tomate	850-12700
Tomate cerise	800-12000
Tomate concentrée	49300-94000
Tomate, jus	1024-11000
Tomate, Ketchup	4710-23400
Tomate, purée	13160-26110

I.2.4. Lycopène de la tomate

Les tomates et les produits à base de tomates sont les principales sources de lycopène (Tableau 3). La teneur en lycopène des tomates fraîches est extrêmement variable, selon des critères agronomiques. Elle varie de 1,9 à 6,8 mg/100 g, selon les variétés, et de 1,9 à 6,8 mg/100g en fonction des calendriers de récolte. Elle augmente considérablement avec la maturité du fruit (Bilton et al., 2001). Ainsi, la durée et la température de conservation jouent un rôle, la conservation à 20°C étant optimale (Brandt et al., 2003). Les transformations technologiques, de la tomate modifient la teneur en lycopène essentiellement par un effet de concentration. On observe cela avec la sauce tomate (6,20 mg/100 g), le concentré de tomate (8 mg/100 g), le jus de tomate (de 5 à 11,6 mg/100 g) et le ketchup (de 9,9 à 13,4 mg/100 g). La cuisson de la tomate en jus, purée ou ketchup augmente la teneur en caroténoïdes de 100 à 600 %, elle entraîne par contre, une réduction de la teneur en vitamine C de 2 à 4 fois (Khachik & Carvalho., 2002).

Tableau 3 : Teneur en lycopène dans les tomates et ses dérivées (Bilton et al., 2001).

Aliments	Mg/100g
Tomates fraîches	0.88 à 4.20
Tomates cuites	3.70
Sauce tomate	6.20
Concentré de tomate	5.4 à 150
Soupe de tomate	7.99
Poudre de tomate	11.20 à 12.60
Jus de tomate	5 à 11.60
Tomate séchée - à l'huile	46.50
Sauce pizza	12.70
Ketchup	9.90 à 13.40

I.2.5. Facteurs influençant la teneur en lycopène

- **Les variétés :** il y a une grande différence entre certaines variétés de tomates rouges et jaunes dans teneur de lycopène. Le lycopène est plus abondant dans les tomates rouge (15 mg/ 100g

matière sèche), contre seulement 0,5mg/100g matière sèche dans les tomates jaunes (**Le Maguer & Shi, 2000**). Par ailleurs, les variétés industrielles sont les moins riches en lycopène.

- **Le stade physiologique** : Durant la maturation, une importante variation de la couleur a lieu au niveau du fruit. La mesure de la couleur se traduit par un ratio a/b représentant les parties vertes et rouges orangé du fruit. Cette mesure indique une variation de la coloration au cours de la maturation qui se traduit par l'accumulation du lycopène et autres pigments (caroténoïdes) au dépend de la chlorophylle qui est le pigment original. Au stade vert, le taux de lycopène avoisine le zéro ; Au stade jaune, la chlorophylle disparaît et ne se retrouve plus qu'à l'état de traces, à ce stade, le beta-carotène est plus abondant que le lycopène ; En fin de maturation, la synthèse du lycopène prend une forte accélération afin d'obtenir une coloration rouge.

I.2.6. Absorption, transport et métabolisme

Le lycopène est fortement liée aux macromolécules dans les aliments, les lipides alimentaires jouent un rôle important dans la dissolution de lycopène et son absorption (**Clinton, 1998**). Les chylomicrons sont responsables du transport de lycopène, de la muqueuse intestinale vers le sang. Dans le plasma, il est transporté 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, et il est présent sous forme d'un mélange contenant 50 % de forme cis et 50 % de forme trans (**Stahl et Coll, 1992**).

L'isomère cis présente une meilleure biodisponibilité que le trans, probablement parce qu'il est plus facilement solubilisé par les sels biliaires et ainsi plus facilement incorporé aux chylomicrons (**Shi et Le Maguer., 2000**).

Les gras alimentaires facilitent l'absorption du lycopène et devraient être consommés en parallèles avec les aliments sources de lycopène (**Basu & Imrhan, 2007**). 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. Les fibres alimentaires diminuent la biodisponibilité du lycopène (**Erdman et al., 1986**).

L'absorption du lycopène semble plus importante lorsqu'il est ingéré en présence de bêta-carotène (**Jackson, 1997**). La grosseur des particules alimentaires et les facteurs génétiques peuvent aussi influencer l'absorption du lycopène (**Shi & Le Maguer, 2000**).

La concentration sérique du lycopène varie de 50 nmol/L à 900 nmol/L, elle varie beaucoup d'un individu et d'une population à l'autre.

I.2.7. Répartition du lycopène dans les tissus

Le lycopène est distribué partout dans le corps humain dès son absorption (tableau 4), les taux les plus élevés sont observés dans les testicules et dans la prostate, étant donné la richesse en récepteurs de lipoprotéines que d'autres tissus (David et al., 2002).

Tableau 4: Répartition du lycopène dans les organes (David et al., 2002).

Tissus	Concentration en lycopène en nmol/g de poids
Testicules	4,34 à 21,36
Glandes surrénales	1,90 à 21,60
Foie	1,28 à 5,72
Prostate	0.80
Seins	0.78
Pancréas	0.70
Poumon	0,22 à 0,57
Rein	0,15 à 0,62
Colon	0.31
Peau	0.43
Ovaires	0.30

I.2.8. Biodisponibilité pour la santé

Dans le corps humain, le lycopène représente de 21 à 43% des caroténoïdes du plasma sanguin et peut être caroténoïde dominant (Stahl et al., 1996). Le taux de lycopène et de β -carotène dans le sérum et le plasma sanguin est en moyenne de 0,3 et 0,5 nmol/ml respectivement (Stahl et al., 1996). Pourtant, l'absorption des caroténoïdes est variable et dépendante de plusieurs facteurs comme le sexe, l'âge ou les besoins ponctuels du corps (Järvinen, 1995).

D'autre part, la solubilité des caroténoïdes influence leur bio-activité dans le corps humain. Ils ne sont bien absorbés que dans l'intestin avec un peu de matière grasse (van-het-Hof et al., 2000). Chez l'humain, l'absorption journalière de 5 à 10 mg de lycopène peut protéger les lipides et les protéines contre l'oxydation (Rao et al., 2002). Ce carotène est potentiellement un agent préventif contre certains carcinogènes des poumons (Kim et al., 2000), des seins (Simon et al., 2000), notamment de la prostate (Kucuk et al., 2002) et contre des maladies cardiovasculaires (Hadley et al., 2003).

I.2.9. Recommandation

La dose recommandée est de 30 à 60 mg par jour. Il faut donc consommer plus de 10 portions de tomates cuites ou d'aliments riches en lycopène par semaine.

Un tel apport de lycopène pourrait diminuer du tiers le risque de cancer de la prostate (Saad et al., 2003).

Des données, révèlent que l'apport alimentaire en lycopène de la majorité des humains est très inférieur à ce qui est actuellement considéré comme un taux recommandé, soit 5 à 7 mg chaque jour (Anne et al., 1996).

I.2.10. Vertus de lycopène

Cette molécule a plusieurs débouchés. Elle sert de colorant et antioxydant alimentaires, elle peut être aussi commercialisée sous forme de capsules, en tant que préparation thérapeutique, afin de prévenir certaines maladies d'origine tumorale.

I.2.10.1. Rôle antioxydant du lycopène

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Cano et al., 2006). Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent inoffensifs (Vansant, 2004).

Le lycopène est un puissant antioxydant qui peut contribuer aux défenses vis-à-vis d'une production exagérée ou mal contrôlée d'espèces oxygénées. La capacité du lycopène à neutraliser les radicaux libres provenant de l'oxygène moléculaire se fait physiquement et chimiquement (Fig.2).

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.

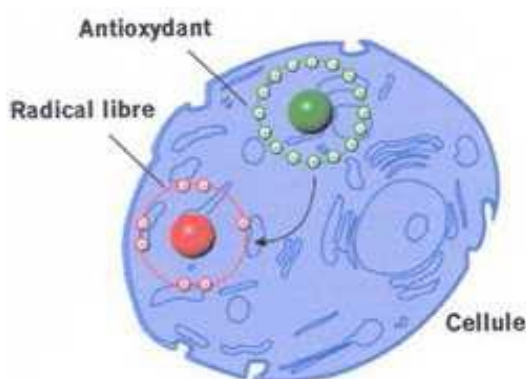


Figure 2 : Action des antioxydants (Wiseman et al., 2000).

I.2.10.2. La prévention des maladies cardiovasculaires

La tension d'oxydation est maintenant reconnue comme un facteur étiologique important dans la causalité de plusieurs maladies chroniques en incluant les maladies cardiovasculaires (Rao et al., 2006). L'oxydation des LDL, qui est une des hypothèses majeures dans l'apparition de l'athérosclérose, peut être évitée par la présence d'antioxydants (Shi et Le Maguer, 2000).

In vitro, le lycopène et d'autres substances caroténoïdes ont la capacité d'inhiber l'oxydation des LDL. Les antioxydants pourraient réduire la progression de l'athérosclérose en inhibant les

dommages causés par le processus d'oxydation. Un taux de lycopène sanguin faible a été associé à une augmentation du risque de mortalité par maladie cardiovasculaire (**Kristenson et al., 1997**).

Le lycopène a suscité beaucoup d'attention ces dernières années en raison de son effet bénéfique dans la prévention de certaines pathologies (**Sawdago et al., 2015**). Une étude a été menée auprès des sujets ayant une alimentation dépourvue de lycopène sur une période de deux semaines. Une diminution de 50 % du taux de lycopène sérique et une augmentation de 25 % de l'oxydation des lipides ont été observées (**Rao & Agarwal, 2000**).

1.2.10.3. La prévention du cancer

Des études épidémiologiques ont montré que la consommation de tomates et des produits à base de tomates pourraient prévenir certaines maladies chroniques, telles que les cancers de la cavité buccale, du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac, du rectum, de la prostate et du sein (**Sawdago et al., 2015**).

L'enrichissement de la diète en lycopène augmenterait les communications intercellulaires des cellules fibroblastiques d'embryon de souris. Ces communications sont importantes dans la prévention ou la réversion de transformations de cellules malignes (**Agarwal et Rao, 2000**).

Il a été suggéré que la diète méditerranéenne, riche en fruits et légumes, notamment en tomates, soit responsable de la faible incidence de cancer dans cette région. Un apport élevé en tomate est associé à une réduction de 50 % du taux de mortalité peu importe le site du cancer.

L'estimation de l'apport en lycopène par les produits de la tomate est inversement proportionnelle au risque de cancer de la prostate. Une réduction de près de 35 % du risque de cancer est observée avec une consommation de 10 portions et plus par semaine de produits de la tomate.

Une grande consommation régulière de tomates a été associée à une diminution du risque d'atteinte de cancer du système digestif. Dans une récente étude, le seul antioxydant à avoir démontré une association inverse significative avec le risque de cancer du sein est le lycopène. Dans une étude de cohortes, on a découvert que la concentration sérique du lycopène était inversement en corrélation avec le risque de cancer de la vessie (**Rao et Agarwal, 2000**).

1.2.10.4. Action du lycopène sur d'autres pathologies

Après le cancer et la coronaropathie, des études se penchent maintenant sur le rôle du lycopène dans d'autres maladies humaines. Des études, menées sur l'action du lycopène dans la prévention de l'ostéoporose, ont démontré que le lycopène stimule la prolifération et le marqueur de formation des os, l'activité phosphatase alcaline des ostéoblastes et qu'il réduisait l'activité de résorption des os et la formation d'ostéoclastes multinuclées (**Flourie et al., 2006**). Ces résultats, portent à croire que le lycopène cause une réduction des marqueurs du stress oxydant et des taux de renouvellement des cellules osseuses chez des femmes post ménopausiques (**Delattre et al., 2003**).

La consommation de lycopène, chez des sujets légèrement hypertensifs a résulté en une réduction significative de la tension artérielle systolique et diastolique (**Thérond et al., 2005**).

Un autre important trouble de la santé chez l'humain, est l'infertilité masculine. Le sperme humain, qui contient des taux élevés d'acides gras insaturés dans la membrane cellulaire, présente un risque élevé de dommages oxydatifs, lesquels mènent à une fonction anormale. Des hommes infertiles ayant reçu 8 mg de lycopène par jour sous forme de gélule, ont connu une amélioration significative de la qualité du sperme, incluant un accroissement de la densité, de la concentration fonctionnelle et de la mobilité (**Tsuchihashi et al., 1995**). Après avoir traité ces hommes par le lycopène pendant 12 mois, on a rapporté un taux de grossesse de 36% chez leurs partenaires.

L'emphysème est un trouble de santé humaine important qui est associé, entres autres facteurs, avec l'habitude de fumer. Le lycopène provenant de jus de tomates a conféré, à des souris, un effet protecteur significatif contre les troubles alvéolaires causés par la fumée. Ce qui laisse présager, d'un effet protecteur contre l'asthme et l'emphysème (**Joye & Sarah, 2004**).

Dans une étude clinique, le traitement de patientes souffrant de prééclampsie, le traitement à l'aide d'un supplément de lycopène, a réduit de façon significative l'incidence de prééclampsie, la tension artérielle diastolique et le retard de croissance intra-utérin (**Judy et al., 2002**). Bien que, la majorité des preuves qui soutiennent le rôle du lycopène dans les maladies humaines reposent sur des études épidémiologiques, plusieurs études sur le terrain chez l'humain sont actuellement en cours.

En considérant les observations tirées de ces études, il est raisonnable de conclure que le lycopène est un phytonutriment bénéfique aux propriétés antioxydantes puissantes, qui joue un rôle important dans la prévention de bon nombre de maladies chroniques.

CHAPITRE II :

Matériels et Méthodes

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

L'objectif de ce travail vise l'optimisation de l'extraction du lycopène à partir de sources végétales (tomate) réputées par leur richesse en ce composant caroténoïdes et l'exploration de ces activités biologiques.

II.1. Matériels

Notre travail a été effectué au sein du laboratoire de recherche des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem.

II.1. 1. Matériel

Le matériel végétal utilisé pour l'extraction de lycopène est la tomate en conserve commercialisée, c'est un produit concentré de tomate, local de marque CAB Amor Ben Amor.

II.2. Méthodes

II.2.1. L'extraction

L'extraction est une action de séparer une substance du composé dont elle fait partie, souvent au moyen d'un solvant (**Richard & Multon, 1992**). L'extraction a été réalisée selon la méthode (**Kumar et al., 2013**), des modifications ont été rapportées à cette méthode.

II.2.1.1 Méthode d'extraction

500 g de tomate concentré sont dilués dans 500 ml d'acétone, après agitation de 10 minutes, le filtrat est récupéré à travers un papier Wattman, et séché à l'air ambiant. Par la suite, 500 ml d'un mélange de solvant éther de pétrole-Hexane et dichlorométhane (2 :1 :1) v/v est ajouté à ce filtrat, le tout est agité pendant 15 min. Quelques grammes de l'agent hydratant ($MgSO_4$) est additionnée au mélange, après la décantation et filtration de la phase rouge orangée. L'extrait de caroténoïdes de la tomate est récupéré. La poudre est obtenue après évaporation à l'étuve à une température de 50 °C pendant 24 heures.



Figure 3: Les étapes de l'extraction de lycopène

II.2. 1.2 Purification de lycopène par la méthode de recristallisation:

Le filtrat de couleur rouge-orange correspondant à l'extrait de caroténoïde, 5 à 7 ml d'un solvant apolaire sont rajoutés à la poudre récupérée et sous agitation les cristaux du lycopène brut se forment immédiatement, on les récupéré par centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min.

II.2.1.3 Le rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction est déterminé entre la masse de lycopène extraite et la masse de la matière première végétale traitée. Le rendement exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = (M_1 / M_0) \times 100$$

R : Rendement

M₁ : Teneur en lycopène extraits en g

M₀ : Matière première en g (Tomate)

II.2.1. 4 CCM analytique du lycopène extrait de la tomate concentrée

La chromatographie sur couche mince est une méthode d'analyse qualitative. Cette méthode a été utilisée pour confirmer la pureté du lycopène extrait de la tomate concentrée. La CCM a été réalisée selon (Baldermann, 2008) avec une petite modification, la phase mobile liquide est un mélange de trois solvants éther de pétrole-hexane et acétone (5:4 :1 v / v) et la phase stationnaire est un gel de silice.

A l'aide de pipette pasteur environ 20 µL de Lycopène pur de France (F) déposé sur le premier point de la ligne de dépôt de la plaque comme standard et le même volume a été déposé pour l'extrait de Caroténoïdes (c) de la tomate et de lycopène purifié (R).

La plaque a été placée dans la phase mobile, figure 4. Les caroténoïdes sont instables et sensibles à l'oxygène, à la lumière et à la chaleur. Par conséquent, toutes les procédures de CCM ont été effectuées aussi rapidement que possible.

Le rapport frontale « RF » a été calculé par la formule suivant :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par l'éluant}} = \frac{x}{y}$$

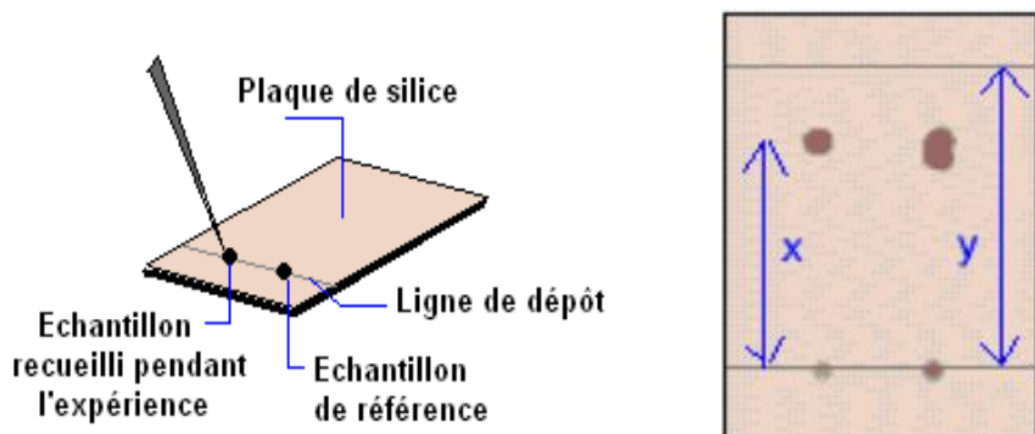


Figure 4 : Mode opératoire de l'analyse par chromatographie sur couche mince

II.2.1.5. L'optimisation de la méthode de purification par le plan expérimental Box-Behnken

L'optimisation de la méthode de purification par cristallisation du lycopène à extraire de la tomate concentrée a été réalisée à l'aide d'un Box-Behnken (BBD), trois paramètres ont été choisis pour la recristallisation :

- X1= Volume de filtrat récupéré de l'extraction (ml),
- X2= Température d'évaporation de filtrat (°C)
- X3= le volume du solvant apolaire ajouté (ml) pour la formation des cristaux.

Pour déterminer les points expérimentaux, on a utilisé le concept (BBD) (**Silva et al., 2018**), les variables utilisées dans le plan expérimental sont présentées dans le tableau 5.

II.2.2. Activité biologique de lycopène

II.2.2.1. Activité antioxydante

Le test DPPH permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH, initialement violet, se transforme en DPPH, Jaune pale

La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violette à une couleur jaune, l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 517 nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité antiradicalaire (**Milardovic et al., 2006**) qui est calculée par la formule suivante : $I\% = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$; dont A_C : absorbance du contrôle négatif et A_T : absorbance de l'extrait.

Tableau 5 : Les différentes variables du plan expérimental BBD

N°	(X3) le volume du solvant apolaire ajouté (ml)	(X2) Température	(X1) Volume de filtrat récupéré de l'extraction (ml)
1	3	0	20
2	7	0	30
3	3	50	30
4	7	50	30
5	3	25	20
6	7	25	20
7	3	25	40
8	7	25	40
9	5	0	20
10	5	50	20
11	5	0	40
12	5	50	40
13	5	25	30
14	5	25	30
15	5	25	30

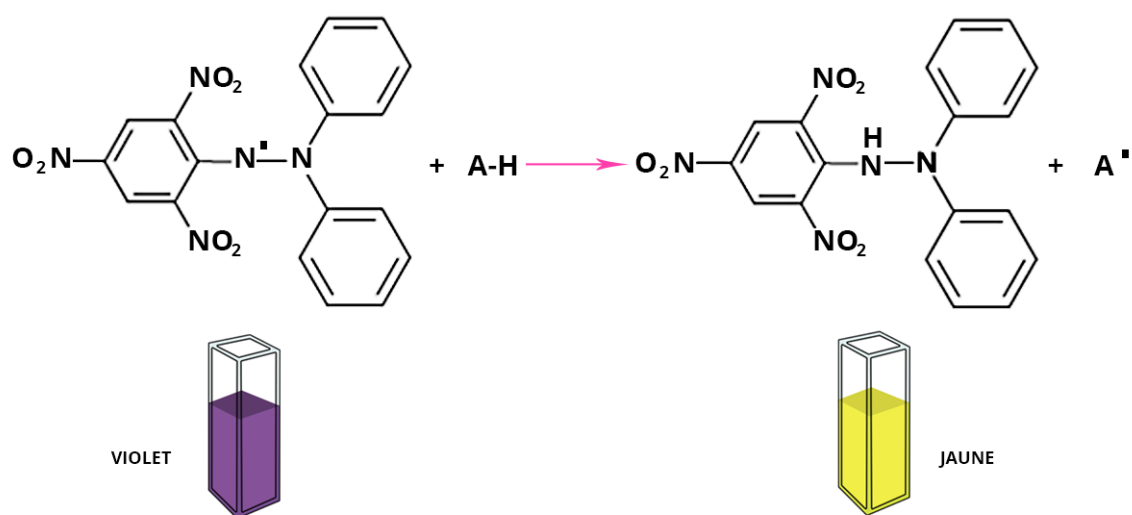


Figure 5: Réaction de test de DPPH (Congo, 2012)

d) Mode opératoire

L'effet de l'extrait sur la réduction du DPPH a été réalisé selon le protocole de (Benariba et al., 2013). En raison du fait que le lycopène est insoluble dans l'éthanol, les solutions de DPPH de lycopène et l'extrait de caroténoïde ont été diluées de manière appropriée avec un mélange d'éthanol et dichlorométhane (1: 2, v/v) (Fabienne et al., 2017).

e) Préparation de la solution de DPPH

5.9 mg de DPPH est dissoute dans 50 ml du mélange éthanol -dichlorométhane (1: 2 v/v) pour obtenir une solution de concentration (0.16 mmol/ml).

f) Préparation des échantillons

Une série de dilutions a été préparée pour les deux échantillons lycopène pur et extrait de caroténoïde, l'acide ascorbique a été utilisé comme standard aux concentrations suivantes: C1 = 250 mg.L⁻¹, C2 = 125 mg.L⁻¹, C3 = 75,3 mg.L⁻¹, C4 = 50,5 mg.L⁻¹, C5 = 25,2 mg.L⁻¹, C6 = 12,6 mg.L⁻¹

Un Volume de 1ml de l'extrait est dissout dans 500 μ l de solution de DPPH (0.16mmol/ml), fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 500 μ l de l'éthanol avec 1 ml d'une solution de DPPH à la même concentration utilisée. Le mélange obtenu est ensuite agité, puis gardé à l'abri de lumière à température ambiante pendant 30 min. Ensuite, la lecture ce fait à l'aide d'un spectrophotomètre à 517nm (Fig. 6).

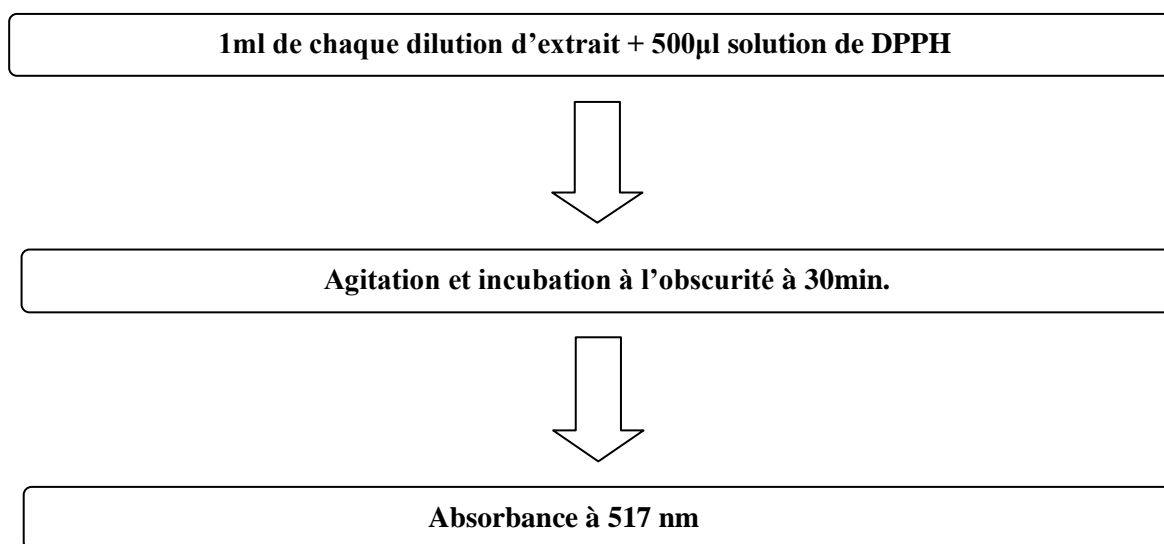


Figure 6 : Protocole de test DPPH (Benarib et al., 2013).

La valeur IC50 est la concentration d'extrait qui assure la réduction de 50% du DPPH, déterminée graphiquement par la régression linéaire, pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de réduction en fonction de la concentration (Samarth et al., 2008).

II.2.2.2 Activité antimicrobienne

d) Origine des souches

Les souches utilisées dans ce travail sont des souches pathogènes qui proviennent de la collection du laboratoire LMBAFS (tableau 6).

e) Réactivation des souches

La réactivation des souches est effectuée par ensemencement dans un bouillon BHIB à 37°C pendant 24 heures d'incubation avant chaque test d'antagonisme pour obtenir une culture jeune. L'inoculum est ajusté à la densité optique de 0.08 à 0,10.

Tableau 6 : Les souches pathogènes utilisées

Souches	Référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659

ATCC: American Type Culture Collection.

II.1.3. Méthode de diffusion en puits AWDT (Barefoot et kaenhammer, 1983)

La méthode de diffusion est très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle). L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit testé (Broadasky et al., 1976).

➤ **Mode opératoire :** Cette méthode consiste à couler 15 ml d'une gélose molle de Muller Hinton avec 100 µl d'une culture jeune de 24 h d'incubation sur une boîte de pétri. Après solidification à température ambiante dans une zone stérile, des puits sont creusés à l'aide d'un embout jaune stérile. On réalise 3 puits par boîte de 6 mm de diamètre. Un volume de 50 µl de chaque extrait (extrait de caroténoïdes(C) et le lycopène purifié (L) et poly Ethyl Glucol comme témoin) sont mises dans les puits. Du fait que le lycopène et l'extrait de caroténoïdes sont insoluble dans l'eau. Le solvant apolaire est remplacé par le poly EthylGlucol qui ne possède aucune activité antimicrobienne.

Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (pré-diffusion) (Doumandji et al., 2010)

CHAPITRE III :

Résultats et Discussion

CHAPITRE III : Résultats et Discussion

III.1. Rendement d'extraction de lycopène

Après l'extraction et la récupération de l'extrait du lycopène à partir de la tomate concentrée, le rendement a été déterminé par rapport à 100 g de matière végétale exprimé en pourcentage.

Le rendement de l'extraction de lycopène est égal à 2% par rapport à 100 g de matière première et le résultat est illustré par la figure 7.

Cette concentration de 0,650 g de lycopène extraite de 100g de tomate concentrée, parmi les autres caroténoïdes contenant dans ce produit, est largement satisfaisante. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par les travaux de **Degrou, (2013)**. Où il a utilisé plusieurs échantillons commercialisés de tomate concentrée. La teneur trouvée en lycopène varie entre 0,493 et 0,940 g/100g de matière sèche dans les échantillons analysés.

Les teneurs de lycopène extraites de la tomate concentrée locale de marque Amor Ben Amar sont plus importantes que ceux révélées par les travaux de **Bilton et al. (2001)**, dont des concentrations de lycopène varie entre 0,004 et 0,150 g/100g de concentré de tomate ont été enregistrées.

Le calcul de la teneur de rendement d'extraction repose sur plusieurs facteurs à savoir température d'extraction, de la matière végétale initiale et l'humidité (**Wattiaux, 1994**).

Selon **Michel et al. (2012)**, le rendement des extractions dépend de la nature du solvant utilisé et des propriétés chimiques des molécules à extraire. De même, la méthode d'extraction (macération, décoction, infusion) joue également un rôle important dans la détermination du rendement ainsi que la composition chimique de l'extrait préparé (**Tefiani, 2015**).

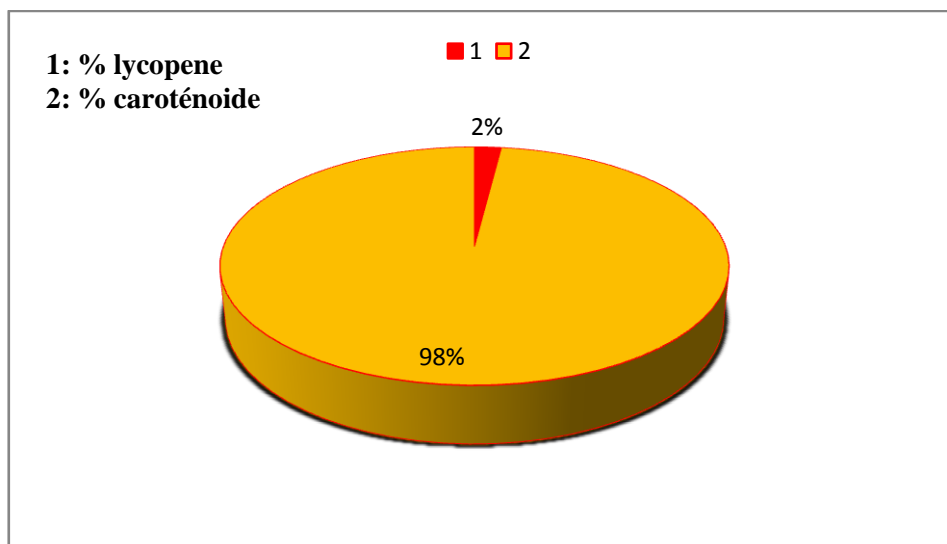


Figure 7: Rendement d'extraction de Lycopène

III.2. Purification de lycopène par CCM

Une combinaison de trois solvants a été utilisée comme phase mobile de la chromatographie sur couche mince, Ether de pétrole-hexane et acétone avec une proportion de (5:4:1 v/v)

La fraction caroténoïde brute a donné un spot d'une couleur orange rougeâtre(C), or des spots de couleur jaune ont été obtenus par les deux échantillons de lycopène (lycopène pur de France F « standard » et lycopène purifié extrait de la tomate concentrée R) (Fig.8).

Le rapport frontal enregistré par les échantillons de lycopène est idem ($R_f=0,86$), ceci signifie que l'échantillon de lycopène extrait de la tomate concentrée est pur en comparaison avec le standard qui est des molécules commercialisées de lycopène pur. Ce résultat vient renforcer la fiabilité de la méthode d'extraction et les solvants utilisés.



Figure 8: La confirmation de la pureté de l'extrait de lycopène par CCM.

Conditions opératoires :

- Phase mobile : 5ml d'Ether de pétrole+ 4ml d'hexane + 1ml d'acétone
- Phase fixe : plaque de silice 60 F654 10 x20)
- Echantillons : Témoin (F), lycopène standard ($R_f=0,86$) ; (C) caroténoïdes et (L) lycopène extrait de concentré de tomate ($R_f=0,86$).

III.3. L'optimisation de la méthode de purification par le plan expérimental Box-Behnken

Le plan expérimental Box-Behnken permet de créer un plan d'expériences afin de modéliser la courbe des données étudiées et de déterminer les paramètres de facteurs qui optimisent l'extraction.

Les résultats obtenus par l'optimisation selon la méthode de purification par recristallisation du lycopène extrait de concentré de tomate sont représentés dans le tableau 7.

Les trois facteurs étudiés dans cette méthode et qui influence positivement le rendement (91.7mg de lycopène pur) sont illustrés dans le tableau 7, est obtenus par les paramètres de l'expérience 12 [$X_1= 40\text{ml}$ (Volume de filtrat récupéré de

l'extraction), X2= 50°C (Température d'évaporation de filtrat), X3= 5 ml (le volume du solvant apolaire ajouté)].

Tableau 7 : Facteurs d'optimisation de la purification de lycopene par la méthode de recristallisation

N°	le volume du solvant apolaire ajouté (ml)	Température	Volume de filtrat récupéré de l'extraction (ml)	Quantité de lycopène (mg)
1	3	0	20	22.4
2	7	0	30	3.6
3	3	50	30	50.9
4	7	50	30	4.98
5	3	25	20	8.8
6	7	25	20	1.4

				8
7	3	25	40	3
				8
				.
				2
8	7	25	40	6
				5
				.
				1
9	5	0	20	3
				2
				.
				6
1	5	50	20	5
0				4
				.
				6
1	5	0	40	3
1				7
1	5	50	40	9
2				1
				.
				7
1	5	25	30	6
3				8
				.
				9
1	5	25	30	6
4				0
				.
				2
1	5	25	30	5

5	1
	.
	5

III.4. Evaluation du pouvoir antioxydant du lycopène par test de DPPH

L'activité antioxydante de l'extrait de caroténoïde de tomate concentrée (C) et de lycopène pur (L) est évaluée par le test de réduction du radical libre DPPH. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical de couleur violacée qui absorbe dans l'UV- visible à la longueur d'onde de 517nm, par spectrophotométrie.

III.4.1. pourcentages d'inhibitions I%

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait de caroténoïde de tomate concentrée et de lycopène pur sont illustrés dans le tableau n°8.

Le lycopène est réputé par son pouvoir antioxydant, selon les résultats exprimés ci-dessous, le lycopène extrait du concentré de tomate exerce une bonne inhibition du radical libre de DPPH à faible concentration en comparaison avec les caroténoïdes. On enregistre un pourcentage d'inhibition élevé de 16, 21 % pour le lycopène (Fig.10) et de 9,5% pour les caroténoïdes (Fig.9) à la même concentration utilisée de 0,0059 mg/ml d'extrait.

Tableau 8 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait Caroténoïdes et lycopène

Concentrations d'extrait (mg/ml)	0,0	0,01	0,02	0,04
	0	1	3	7
	5	9	9	8
	9	5		1
% d'inhibition de Caroténoïdes	9,5	14,7	31,9	35,5
	4	3	2	7
	7	6		

	3	8		
% d'inhibition de lycopène	16,2	27,2	27,9	32,2
	2	7	7	9
	1	3	8	5
			4	5

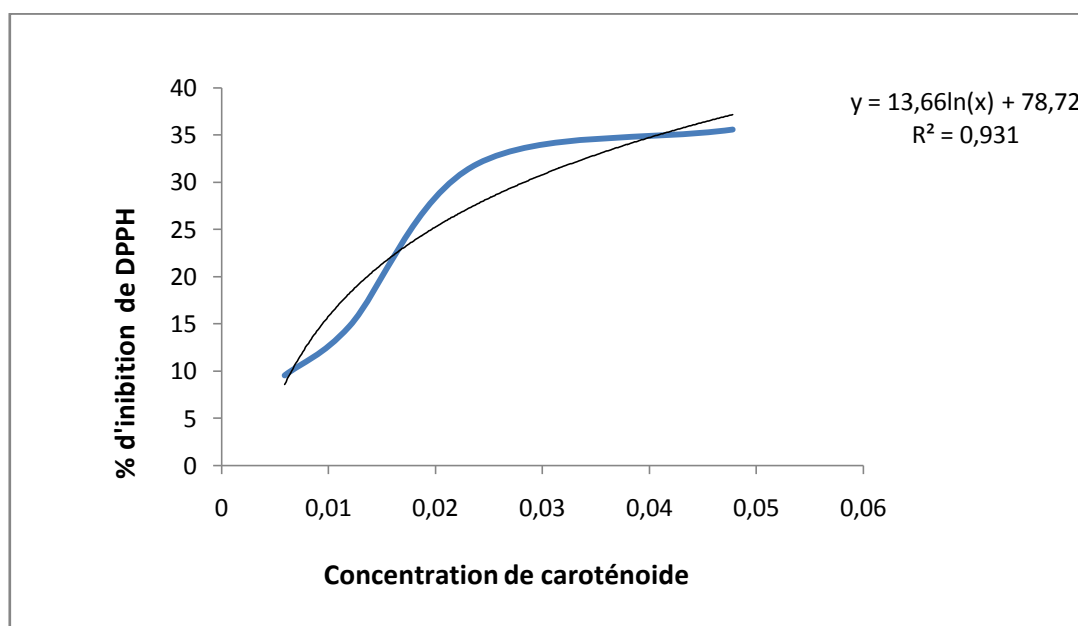


Figure 9: Effet anti radicalaire d'extrait Caroténoïdes sur la réduction du DPPH

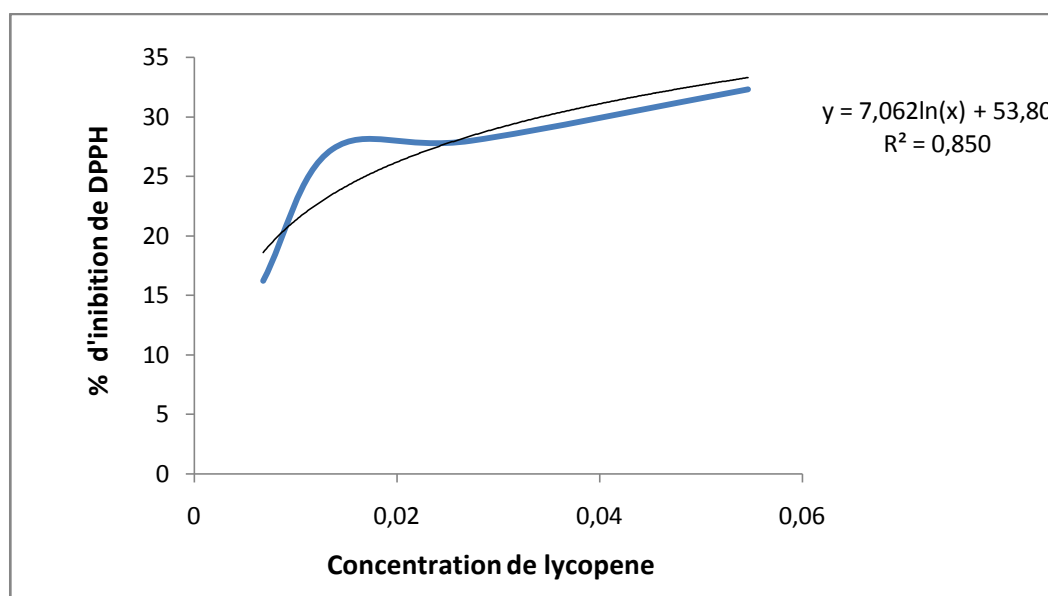


Figure 10 : Effet anti radicalaire de lycopène sur la réduction du DPPH

III.4.2. La concentration inhibitrice à 50% (IC50)

La concentration inhibitrice à 50% (IC50) est définie comme étant la concentration de l'extrait qui permet de réduire le pourcentage d'inhibition du DPPH à 50% et il est inversement proportionnel à la capacité antioxydante.

Nos résultats ont été exprimés par le calcul de la concentration efficace (EC50 « efficient concentration », ce paramètre a été introduit apparemment par Brand- Williams et ses collègues, et a été utilisé par la suite par plusieurs chercheurs pour présenter leurs résultats (Molyneux P., 2004).

La valeur EC50 des échantillons a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibitions calculées en fonctions de six concentrations différentes d'échantillons préparés et est exprimé en $\mu\text{g/ml}$. L'équation de régression pour les caroténoïdes est : $y = 13,661 \ln(x) + 78,728$, et celle de lycopène est : $y = 7,0368 \ln(x) + 54,675$

Les concentrations d'extrait de caroténoïdes et du lycopène nécessaires pour réduire le radical de DPPH à 50% étaient de $122,1 \mu\text{g/ml}$ et $580 \mu\text{g/ml}$ respectivement. On remarque bien que le pouvoir antioxydant des caroténoïdes est plus important que celui

du lycopène pur. Car il y a un effet synergique entre les différents composants de caroténoïde qui a été confirmé par les travaux de **Chen .J et al., (2009)**.

Le lycopène et le β -carotène sont deux caroténoïdes connus pour être de puissants antioxydants capables de protéger les cellules vivantes contre les attaques radicalaires et les dommages oxydatifs (**Rao et al., 2006**).

La recherche de ressources naturelles de ces composés bioactifs permet de répondre à la tendance de consommation de produits naturels pour la santé. On en trouve dans plusieurs fruits et plantes généralement de couleur rouge et orange. Parmi eux, la tomate concentrée, la pastèque, le pamplemousse et la goyave qui contiennent des teneurs en lycopène et β -carotène les plus élevées (**Pattan et al., 2011**).

III .5. Activité antibactérienne des extraits de Caroténoïdes et de lycopene

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobienne d'extrait de Caroténoïdes et de lycopène par la méthode de diffusion en puits AWDT (**Barefoot et Klaenhammer, 1983**) sur un milieu gélosé molle, Mueller-Hinton, c'est le milieu le plus utilisé pour faire ces tests d'antagonisme.

L'activité antimicrobienne de l'extrait de Caroténoïdes et de lycopène a été estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant l'extrait à tester vis-à-vis de 7 souches microbiennes testés qui proviennent de la collection du laboratoire LMBAFS, dont deux bactéries Gram positif (+) : *B. cereus* ATCC10876 et *S. aureus* ATCC 33862, et quatre bactéries Gram négatif (-) *P.aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 et *P. mirabilis* ATCC 35659 et *K. pneumoniae* ATCC 13883 ainsi qu'une levure *C. albicans* ATCC 10231.

La technique de diffusion en puits AWDT est utilisée pour étudier la capacité des substances exerçants un effet antimicrobien.

D'après Les résultats obtenus, on remarque que les propriétés antimicrobiennes dans ce test ont montré que l'extrait de caroténoïdes et de lycopène influence totalement sur toutes les souches tableau 9, et ceci en se basant

sur la loi de **Barros et Coll (2007)**, qui définit la relation entre le diamètre d'inhibition enregistré et le pouvoir microbien.

- ✓ Diamètre inférieurs à 7mm, aucune activité antimicrobienne.
- ✓ Diamètre de 7 à 9.9mm activité antimicrobienne faible.
- ✓ Diamètre de 10 à 11.9 activité antimicrobienne modeste
- ✓ Diamètre de 12 à 15 activités antimicrobiennes élevées.

Tableau 9 : Zones d'inhibitions (mm) des souches pathogènes sous l'effet des deux extraits Caroténoïdes et lycopène

La souche	Zone d'inhibition / mm	
	fongique	Lycopène
Souches Caroténoïdes		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	29mm	28mm
Souche bactériennes gram positif		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	30 mm	29 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	32 mm	30 mm
Souche bactériennes gram négatif		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	33mm	32 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25mm	8mm
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	11 mm	8mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	13 mm	/

Les souches testées dans cette étude sont toutes sensibles aux extraits de caroténoïdes et de lycopène mais à des degrés différents.

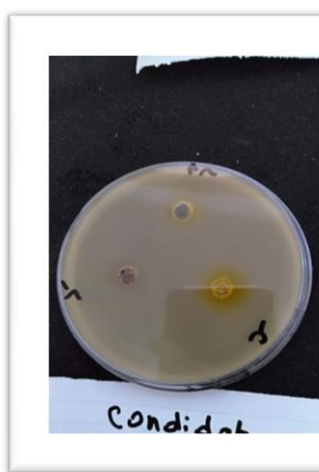
Les extraits de Caroténoïdes et de lycopène ont montrée des diamètres d'inhibition compris entre 33 mm à 8mm vis à vis de toutes les souches testés. Ainsi qu'ils possèdent une

activité inhibitrice importante vis à vis la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, qui enregistre un diamètre d'inhibition presque similaire de 33mm et 32mm en contact avec les deux extraits Caroténoïdes et le lycopène respectivement, alors que les deux souches *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae* sont les moins sensibles vis avis ces extraits avec des diamètres entre 13 et 8mm (Fig.11et 12). Selon les travaux rapportés par **Woo sang et al.(2007)**, Le lycopène a montré un potentiel remarquable comme agent antibactérien dans le traitement des maladies infectieuses causées par *S. aureus* et *E. coli* O-157.

Egalement, dans le domaine de mycologie, le lycopène a également montré un puissant pouvoir antifongique contre les souches fongiques pathogènes humaines. Ce composé, a exercé un effet positive à des valeurs varies dans une plage de concentration de 2,5 à 5 µg/ ml. Le lycopène a enregistré des valeurs de CMI inférieures sur l'activité



D : *Proteus mirabilis*

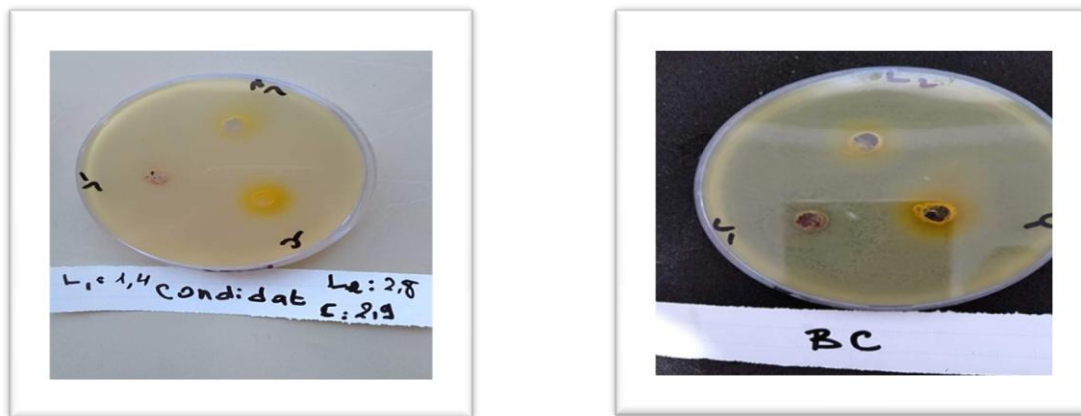


E : *Candida albicans*



F : *Staphylococcus aureus*

antifongique que l'activité antibactérienne (**Woo sang et al., 2007**).



G : *Candida albicans*

H : *Bacillus cereus*

Figure 11: Pouvoir antibactérien des extraits de Caroténoïdes et de lycopène par la méthode de diffusion en puits vis-à-vis des souches pathogènes testés. A,D,E,F,G,H.

Conclusion

CONCLUSION

Le lycopène est un candidat important dans la prévention nutritionnelle, en partie en raison de leur impact antioxydant sur les maladies cancéreuses et d'autres maladies chroniques.

L'objectif de cette étude est optimisé la méthode d'extraction du lycopène du concentré de tomate et exploré ces propriétés biologiques *in vitro*.

Les résultats de cette étude confirment que la tomate et particulièrement le concentré de tomate, constitue une réserve importante de composés bioactifs, dont l'importance est cruciale pour la santé humaine. L'originalité de ce travail réside dans le fait que nous avons touché à trois aspects dans cette thématique, à savoir l'aspect technologique et industriel, ainsi que le volet nutritionnel.

Le choix de la méthode d'extraction du lycopène reste tributaire des coûts économiques. Néanmoins, nos résultats concordent avec plusieurs travaux déjà établi.

Le rendement de l'extraction de lycopène est de 2% par 100 g de matière première. La purification par la plaque CCM a révélée la fraction caroténoïde brute sous forme de spot orange rougeâtre et les deux substances de lycopène pur de France lycopène extrait de la tomate concentrée de couleur jaune avec le même rapport frontale enregistré ($R_f = 0,86$). Ce résultat confirme la pureté de l'échantillon du lycopène étudié.

Selon les résultats de l'optimisation des trois facteurs étudiés (température, solvant et filtrat) dans le plan expérimental Box-Behnken qui donne un bon rendement de (91.7mg de lycopène pur) ont été obtenus avec les paramètres de l'expérience 12. Dans cette expérience, le volume du filtrat extrait de concentré de tomate récupéré est de 40 ml, le solvant apolaire est incorporé à un volume de 5ml et le tout est évaporé à 50°C.

Pour l'évaluation du pouvoir antioxydant, les concentrations d'extrait de caroténoïdes et de lycopène nécessaires pour réduire l'absorbance de DPPH de 50% étaient de 122.1 µg/ml et 580 µg/ml respectivement.

L'activité antimicrobienne a été explorée par la méthode de diffusion en puits AWDT appliquée sur les sept souches pathogènes étudiées. Les extraits de Caroténoïdes et de

lycopène ont montrée une activité antimicrobienne allant de bonne à négligeable dont les diamètres d'inhibitions comprises entre 33 mm à 8 mm vis à vis de toutes les souches.

Les deux extraits possèdent une activité inhibitrice importante vis à vis la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, qui obtenu donne un diamètre d'inhibition de 32 à 33 mm. Alors que, les deux souches *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae* sont les moins sensibles aux substances caroténoïdes avec des diamètres de 8 et 13mm.

Comme prospective, il est souhaitable d'étudier le statut antioxydant du lycopène *in vivo* sur des rats normaux et atteints de maladies métaboliques.

Référence
Bibliographiques

❖ **A**

Agrawal S., Rao A.V., 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Can. Med. Am. J.*, vol.163, p.734-739.

Anese, M., Mirolo, G., Fabbro, A., & Lippe, G. (2013). Lycopene bioaccessibility and bioavailability from processed food. *Journal of scientific y Industrial recherche*, 72, 543-547.

Anne GM., Boyer MJ., Vellas B., Thouvenot JP., Albarade JL. (1996). Activity antioxydante, lipoperoxydation et vieillissement chez l'homme. *Nutr. Clin. Matbol*, 10 : 151-160

❖ **B**

Baldermann, S., Fleischmann, P., Bolten, M., Watanabe, N., Winterhalter, P., Ito, Y.,(2009). Centrifugal precipitation chromatography, a powerful technique for the .Victor R. Preedy - 2013 - Medical

Barefoot et Klaenhammer, 1983 Determination and activity of lactacin B, bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(6): 1808-181.

Basu A., Imrhan V., 2007. Tomatoes terrus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: Conclusions from clinical trials. *Eur. J. Clin. Nutr.* , vol.61, n.3, p.295-303.

N. Benariba, A. Bechiri, E. Chekroun & R. Djaziri (2013) Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*, *Phytothérapie* 14, pages 207–212

Bilton R., Gerber M., Grolier P., Leoni C. (2001). The White Book on antioxidants in tomatoes and tomato products and their health benefits, 2nd rev. edition 2001, CMITI Sarl Avignon, ISSN 1145-9565.

Boumendjel M., Mouhamedi M., Samar M.F. Sabeg H., Boutteba A., Soltane M., 2012. Effet des traitements thermiques d'appertisation sur la qualité biochimique, nutritionnelles et technologiques du simple, double et triple concentré de tomate, *Vol. 36*, p. 51-59.

Bouزيد A., Bedrani S., 2013. La performance économique de la filière Tomate industrielles en Algérie, Vol. 103, p. 85-105.

Brandt S., Lugasi A., Barna E., Hovari J., Pek Z., Helyes L. (2003). Effects of the growing methods and conditions on the lycopene content of tomato fruits. *Acta Alimentaria* 32(3) : 269-278.

Broadasky, T. F., Lewis, C., Eble, T.E. (1976). Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr*, 123: 33-44.

❖ C

Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M. & Leverve, X., 2006 . Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Edition Springer, p 255.

Chanforan C (2010) ; Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénolique, carténoïde, vitamine C et E) au cours des procédés de transformation :études en systèmes modèles mis en point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate . Thèse doctorale. 54-68 ,84-88.

Clinton S.K., 1998.Lycopene chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.*, vol.56, n.2, p.35-51.

Cruz, R., González, J., & Sánchez, P. (2013). Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutricion Hospitalaria*, 28(1), 6-15.

❖ D

David H., Qing-Yi Lu. (2002). Overview of Mechanisms of Action of Lycopene. *Society for Experimental Biology and Medicine* : 920-923.

Degrou A.E., 2013. Etude de l'impact des procédés de transformation sur la diffusion des caroténoïdes : Cas du lycopène de la tomate. 190 p.

Delattre J., Durand G., Jardillier JC. (2003). Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Radicaux libres et antioxydants. Flammarion Médecine – Sciences; 203 pages.

Djuric Z., Zand L., Powell C. (2001). Antioxidant capacity of lycopene-containing foods . *International Journal of Food Sciences and Nutrition*; 52 : 143 -149

Doumandji A., Hellal A., Saidi N., (2010). Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4(2): 25-47.

❖ **E**

Erdman J. W., Fahey G. C., White C. B., 1986.Effect of purified dietary fibre sources on carotene utilisation by the chick. *J. Nutr.*, vol.116, p.2415.

❖ **F**

Flourie F., Arab K., Rossary A. (2006). Effets des différents antioxydants sur la lipoperoxydation in vitro initiée par le radical °OH. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 21 : 229–233.

❖ **H**

Hadley, C. W., Clinton, S. K. et Schwartz, S. J. (2003). The Consumption of Processed Tomato Products Enhances Plasma Lycopene Concentrations in Association with a Reduced Lipoprotein Sensitivity to Oxidative Damage. *The Journal of Nutrition*, 133, 3, 727-732.

❖ **J**

Järvinen, R. (1995). Carotenoids, retinoids, tocopherols and tocotrienols in the diet; the Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. *International journal for vitamin and nutrition research*, 65, 1, 24-30.

Joye K., Sarah LH. (2004). Antioxidant and prevention of chronic disease. *Critical reviews in Food science and nutrition*, 44 : 275 – 295.

Judy L., Hughes J., Colette NM., Sanner S. (2002). Antioxidant in food : a summary of the review conducted for the Food Standards Agency British Nutrition Foundation *Nutrition bulletin* , 27 : 227 – 236

❖ **K**

Khachik F., Carvalho L. (2002). Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health . *Exp Biol Med (Maywood)*, 227(10) : 845-851.

Kim, D. J., Takasuka, N., Nishino, H. et Tsuda, H. (2000). Chemoprevention of lung cancer by lycopene. *BioFactors*, 13, 1, 95-102.

Kishore, G.K., Pande, S., & Podile, A.R. (2005) Biological control of late leaf spot of Peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 95: 1157–65.

Kristenson M., Zieden B., Kucinskiene Z., et coll, 1997. Antioxidant state and mortality from coronary heart disease in Lithuanian and Swedish men: Concomitant cross sectional study of men aged 50. vol.314, 629 p.

Kucuk, O., Sarkar, F. H., Djuric, Z., Sakr, W., Pollak, M. N., Khachik, F., Banerjee, M., Bertram, J. S. et Wood, D. P. (2002). Effects of Lycopene Supplementation in Patients with Localized Prostate Cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 10, 881-885.

Kumar D; (2013) Syntheses, spectral characterization, and antimicrobial studies on the coordination compounds of metal ions with schiff base containing both aliphatic and aromatic hydrazide moieties. *Bioinorg Chem Appl* 2013:981764

❖ M

Michel T., Destandau E., Le Floch G., Lucchesi M.E., Elfakira C., (2012). Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed, *Food Chemistry*, 131(3). 754-760.

Milardović Stjepan; Damir Ivekovic et Bozidar S Grabarić (2006) A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical *Bioelectrochemistry* 68(2):175-80

Multon J. L., 1992. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Paris, Lavoisier. 793 p.

❖ P

Paul D. Fraser, Peter M. Bramley. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* .43 : 228–265.

❖ R

Rao A.V., Agarwal S., 2000. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J.Am. Coll. Nutr.*, vol.19, p.563-569.

Rao A.V., Ray M.R., Rao L.G., 2006. Lycopene: *Adv. Food. Nutr. Res.*, vol. 51:p.99-164.

Rao, A. V. et Shen, H. (2002). Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutrition Research*, 22, 10, 1125-1131.

Saad F., Perotte P, 2003. Mise à jour sur le cancer de la prostate: Où sommes-nous? Le clinicien, vol 1, p. 101-102.

❖ **S**

Samarth R.M., Panawar M.,Soni A., Kumar M., (2008). Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract, Food Chemistry, 106,868-873

Sawadogo I. Koala M., Dabire C., Outtara L.P., Bazie V. Hema A., Gnoula C., Pale E.,Nebie R. 2015. Etude de l'influence des modes de tranformation sur les teneurs en lycopene de quatre variétés de tomate de la région du nord de bourkina, Vol. 9, p. 362-370.

Shi J. Le Maguer M., 2000.Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affecte by food processing. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., vol.40, n.1, p.1-8.

Silva1Yasmini P. A. · Tânia A. P. C. Ferreira1 · Giovana B. Celli2 · Marianne S. Brooks (2018) Optimization of Lycopene Extraction from Tomato Processing Waste Using an Eco-Friendly Ethyl Lactate–Ethyl Acetate Solvent: A GreenValorization Approach Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature

Simon, M. S., Djuric, Z., Dunn, B., Stephens, D., Lababidi, S. et Heilbrun, L. K. (2000). An Evaluation of Plasma Antioxidant Levels and the Risk of Breast Cancer: A Pilot Case Control Study. The Breast Journal, 6, 6, 388-395.

Stahl W., Schwarz W., Sundquist A.R. and Sies H., 1992.Cis-trans isomers of lycopene and b-carotene in human serum and tissues. Arch. Biochem. Biophys, vol.294, p.173-177.

Stahl, W. et Sies, H. (1996). Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans? Archives of Biochemistry and Biophysics, 336, 1, 1-9.

Stahl, W et Helmut, S. (2004).Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine, 24 : 345-351.

SUNG, WOO SANG¹, IN-SEON LEE², AND DONG GUN LEE¹ (2007). Damage to the Cytoplasmic Membrane and Cell Death Caused by Lycopene in Candida albicans J. Microbiol. Biotechnol. 17(11), 1797–1804.

❖ **T**

TEFIANI, I. (2015). Contribution à l'étude phytochimique et à l'effet antioxydant des extraits d'algue verte: *Ulva linza* (Doctoral dissertation, université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen-).

Théron P., Blache D. In: Delattre J, Beaudeau JL., Bonnefont-Rousselot D. (2005). Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et thérapeutiques. Tec et Doc Lavoisier; 233 pages.

Tsuchihashi H, Kigashi M, Iwastuki M, Niki E. (1995). Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 17 : 137– 147.

❖ V

van-het-Hof, K. H., West, C. E., Weststrate, J. A. et Hautvast, J. G. A. J. (2000). Dietary Factors That Affect the Bioavailability of Carotenoids. *The Journal of Nutrition*, 130(3), 503-506.

Vansant G., 2004. Radicaux libres et antioxydant : Principes de base. Symposium antioxydant et alimentation, Institut Danone.

Véronique B., Daniel L. (2001). Le lycopène : un antioxydant très puissant, partieII, le clinicien Consultation en nutrition vol 12 : 53 -60.

❖ W

Wang, S. (2007). Fruits with high antioxidant activity as functional foods. In J. Shi (Ed.), *Functional food ingredients and nutraceuticals, processing technologies.* Florida.

Wattiaux David(1994) :Prediction of the electronic equipment during a pyrotechnic shock., In first International Symposium on Environmental Testing Engineering,(23) :541-545.

Waliszewski, K., & Blasco, G. (2010). Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud pública de méxico.*, 52(3), 254-265.

Wertz, K., Siler, U., & Goralczyk, R. (2004). Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), 127-134.

Wiseman S. A., Balentine D. A., Frei B., Malvy D., Remsy C.,2000. Les antioxydants duthé. *Thé et santé*, vol. 35, n.1. p.113.