



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE de l'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عبد الحميد بن باديس مستغانم

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM

THESE DE DOCTORAT LMD 3^{ème} Cycle (Doctorat LMD)

DOMAINE : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Nutrition et pathologie

THEME

Lycopène : Propriétés chimiques, biologiques et bienfaits santé

Présentée par **Mme HAMED Djahira**

Devant le jury :

Président :	Pr. A. Cheriguene	Univ	Mostaganem
Rapporteur :	Pr. S. Keddari	Univ	Mostaganem
Examineur :	Pr. N. Nasrallah	Univ	USTHB. Alger
Examineur :	Pr. M. Beghalia	Univ	Tissemsilt
Examineur :	Dr. A. Benbouzaine	Univ	Mostaganem

Année universitaire 2022-2023

DEDICACE

Je dédie cette thèse à :

Mes très chers parents

Mon mari qui n'arrête pas de me soutenir

Mes très chers enfants

Mes chers frères.

Mes chères sœurs,

Mes amis et mes collègues particulièrement

Bentaïba Karima

Enfin à tous qui me sont chers.

Sans oublier la promotion de Nutrition et pathologie 2019/2020

DJAHIRA HAMED

REMERCIEMENT

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné la force et le courage de mener ce travail à terme.

Je tiens tout d'abord, à exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à ma directrice de thèse, **Mme S. KEDDARI**, professeur à l'université de Mostaganem, de m'avoir accepté dans son équipe et de m'avoir fait l'honneur de diriger avec beaucoup d'attention et de soin ce travail. Je lui suis très reconnaissante pour la confiance, la bienveillance, l'aide, le soutien, les précieux conseils, la patience et la disponibilité permanente qu'elle m'a témoignée dans ce travail ainsi que, pour la grande autonomie qu'elle m'a accordée. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma plus profonde gratitude.

Je souhaite témoigner mes remerciements tout aussi sincères aux membres de notre jury :

Je remercie grandement **Mr. CHERIGUENE Abderahim**, professeur à l'université de Mostaganem, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ma thèse

A **Mr. BEGHALIA Mohamed**, professeur à l'université de Tissemsilt de l'intérêt qu'il a apporté à ce travail en acceptant d'examiner cette thèse. Je lui adresse mes sincères et vifs remerciements.

A **Mr. NASRALLAH Noureddine**, professeur à l'université Houari Boumediene USTHB Alger, pour le grand intérêt qu'ils ont apporté à ce travail. Je vous prierais de trouver ici l'expression de ma très haute considération.

A **Mr BENBOUZAINE Bouasria**, maitre de conférences à l'université de Mostaganem, pour l'honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie grandement **Mme BOUFADI Yasmine**, professeur à l'université de Mostaganem, pour tout ce qu'elle m'a apporté tout au long de mes études, pour son écoute, sa gentillesse, sa générosité et sa grande disponibilité.

Mes remerciements s'adressent également aux ingénieurs de laboratoires : T. Amina, Youcef, R. Nabil, M. Wahiba, K. Nassima et Latifa et les doctorantes B. Karima, B. Amine, B. Abla, K. Kawtar et O. Nawal. Pour leur grande aide, leur disponibilité, leur gentillesse, leur patience et leur bienveillance et sans qui, je n'aurais pu avancer dans mes travaux de recherches.

Je voudrais enfin associer à ces remerciements toute l'équipe du laboratoire Bioéconomie, Sécurité Alimentaire et Santé et l'équipe du laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé.

Résumé :

Le lycopène est un pigment bioactif d'une grande importance alimentaire obtenu généralement à partir de quelque fruit et légumes rouge, son utilisation dans les produits alimentaires et pharmaceutiques nécessite une haute pureté. L'objectif de cette thèse consiste en extraction et purification du lycopène à partir du concentré de tomate et de pastèque, ainsi que l'exploration de ses effets biologiques *in vitro* et *in vivo*. En premier temps, la purification du lycopène a été réalisée par l'utilisation d'une nouvelle approche efficace, c'est la méthode de recristallisation par utilisation du DMSO comme anti-solvant, la pureté de ces cristaux a été confirmée par une panoplie de méthodes d'analyses (UV-Vis, CCM, FTIR, HPLC et DRX). Une conception Box-Behnken de la méthodologie de surface de réponse a été appliquée pour optimiser les conditions de purification (le volume du filtrat, la température d'évaporation et le volume d'anti-solvant) dont les conditions optimales enregistrées étaient respectivement de 20 mL, 50 °C et 5 mL, ce qui a engendré un rendement maximal de lycopène pur de 2,73 mg g⁻¹. Dans un deuxième temps, nous avons testé la concentration minimale inhibitrice (CMI) du lycopène en testant six souches référencées, les valeurs de CMI obtenues étaient relativement élevées, ce qui se traduit par une faible activité antimicrobienne. Afin de l'améliorer, nous avons combiné le lycopène avec l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L. L'interaction du lycopène avec *Ammi visnaga* a engendré un effet synergique sur trois souches : *E. coli*, *K. pneumonia* et *S. aureus*.

L'étude *in vivo* de l'effet thérapeutique du lycopène est basée sur un traitement d'une prostatite chronique provoquée par *staphylococcus aureus* chez le rat *wistar*. Un modèle de CBP (prostatite bactérienne chronique) a été développé par une instillation urétrale de la bactérie *S. aureus* dans le canal prostatique. Vingt rats de modèle CBP) divisés aléatoirement en quatre groupes ont reçu un traitement, soit par le lycopène seul, soit lycopène combiné au céfalexine ou céfalexine seul avec un témoin positif. Après deux semaines de traitements, les échantillons des urines recueillis ont fait l'objet d'une uroculture afin de dénombrer les bactéries existantes et après sacrifices des rats, la prostate a été récupérée pour des tests microbiologiques et histologiques. Les résultats obtenus montrent une réduction significative du nombre de bactéries dans les urines et dans les tissus prostatiques chez les rats traités par le lycopène combiné avec l'antibiotique céfalexine. Ces résultats suggèrent que cette combinaison peut avoir un effet synergétique dans le traitement de la CBP causé par *S. aureus*.

Mots clés : Lycopène, Extraction, Purification, Optimisation, Effet synergétique, Prostatite chronique, *S. aureus*, Céfalexine

Abstract:

Lycopene is a bioactive pigment of great dietary importance usually obtained from some red fruits and vegetables; its use in food and pharmaceutical products requires high purity. The theme of this thesis consists in the extraction and purification of lycopene from tomato concentrate and watermelon as well as the exploration of its biological effects *in vitro* and *in vivo*. At first Lycopene purification is achieved by using a new effective approach is the recrystallization method by using DMSO as an anti-solvent. The purity of these crystals was confirmed by the following analytical methods UV-Vis, TFC, FTIR, HPLC and DRX. A Box-Behnken design of the response surface methodology was applied to optimize the purification conditions (filtrate volume, evaporation temperature and anti-solvent volume). Optimum conditions for filtrate volume, evaporation temperature and DMSO volume were respectively, 20 mL, 50°C and 5 mL, resulting in a maximum pure lycopene yield of 2.73 mg g⁻¹. In a second phase, we studied the minimum inhibitory concentration (MIC) of lycopene by testing six referenced strains, the MIC values obtained were relatively high, resulting the low antimicrobial activity. To improve it, we combined lycopene with *Ammi visnaga* L essential oil. The interaction of lycopene with *Ammi visnaga* L resulted in a synergistic effect on three strains: *E. coli*, *K. pneumonia* and *S. aureus*. The *in vivo* study of the therapeutic effect of lycopene is based on the treatment of chronic prostatitis caused by *S. aureus* in wistar rats. We developed the model of CBP (chronic bacterial prostatitis) by a urethral instillation of *S. aureus* in the prostate canal. Twenty model rats (PBC) randomly divided into four groups were treated with either lycopene alone or lycopene in combination with cefalexin or cephalixin alone with a positive control. After two weeks of treatment, the urine samples collected were urocultured to count the existing bacteria, after sacrifices the prostate were recovered for microbiological and histological tests. The results obtained show a significant reduction in the number of bacteria in urine and prostatic tissues in rats treated with lycopene combined with the antibiotic cefalexin. These results suggest that the combination of lycopene and cefalexin may have a synergistic effect in the treatment of *S. aureus* induced PBC.

Key words: Lycopene, Extraction, Purification, Optimization, Synergistic effect, chronic prostatitis, *S. aureus*, Cefalexin.

المخلص

اللايكوبين هو صبغة نشطة بيولوجيا ذات أهمية غذائية كبيرة، وعادة ما يتم الحصول عليها من بعض الفواكه والخضروات الحمراء، استخدامها في المنتجات الغذائية والصيدلانية يتطلب درجة نقاء عالية. الهدف من هذه الرسالة هو استخراج وتنقية مادة اللايكوبين من مركبات الطماطم والبطيخ، وكذلك استكشاف آثارها البيولوجية في المختبر وفي الجسم الحي. في البداية تم تنقية اللايكوبين باستخدام طريقة جديدة وفعالة وهي طريقة إعادة التبلور باستخدام DMSO كمضاد للمذيبات.

تم التأكد من نقاء هذه البلورات من خلال طرق التحليل التالية: UV-Vis و TLC و FTIR و HPLC و DRX. تم تطبيق تصميم Box-Behnken لمنهجية سطح الاستجابة لتحسين ظروف التنقية (حجم المرشح، درجة حرارة التبخر وحجم مضاد المذيبات). كانت الظروف المثلى لحجم المرشح ودرجة حرارة التبخر وحجم DMSO 20 مل و 50 درجة مئوية و 5 مل على التوالي، مما أعطى أقصى مردودية من اللايكوبين النقي والتي بلغت 2.73 مغ/غ.

ثانيًا، درسنا الحد الأدنى للتركيز المثبط (MIC) للليكوبين باختبار ست سلالات ممرضة مدرجة، وكانت قيم MIC التي تم الحصول عليها مرتفعة نسبيًا، مما يُترجم انخفاض نشاط المضاد للميكروبات. من أجل تحسينه، قمنا بدمج اللايكوبين مع الزيت العطري لنبات *Ammi visnaga L.* أدى تفاعل اللايكوبين مع الزيت العطري لـ *Ammi visnaga* إلى تأثير تآزري على ثلاث سلالات: *E. coli* و *K. pneumoniae* و *S. aureus*. تعتمد الدراسة في الجسم الحي للتأثير العلاجي للليكوبين على علاج التهاب البروستات المزمن الذي تسببه المكورات العنقودية الذهبية (*S. aureus*) في فئران ويستار.

لقد قمنا بتطوير نموذج CBP (التهاب البروستات الجرثومي المزمن) عن طريق ادخال بكتيريا *S. aureus* في مجرى البول بالقناة البروستاتية للحيوان بعملية التقطير. عشرون نموذجًا من الفئران (CBP) مقسمة عشوائيًا إلى أربع مجموعات تلقت العلاج، إما بالليكوبين وحده، أو اللايكوبين مع سيفاليكسين أو سيفاليكسين بمفرده مع استعمال شاهد إيجابي. بعد أسبوعين من العلاج، تم إخضاع عينات البول التي تم جمعها لزرع البول من أجل عد البكتيريا الموجودة به، وبعد تشريح الفئران، تم استعادة البروستات للاختبارات الميكروبيولوجية والأنسجة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها انخفاضًا كبيرًا في عدد البكتيريا في البول وأنسجة البروستات في الفئران المعالجة بالليكوبين مع المضاد الحيوي سيفاليكسين. تشير هذه النتائج إلى أن الجمع بين اللايكوبين والسيفاليكسين قد يكون له تأثير تآزري في علاج CBP الذي تسببه بكتيريا *S. aureus*.

الكلمات المفتاحية: اللايكوبين، الاستخراج، التنقية، التحسين، التأثير التآزري، التهاب البروستات المزمن، (*S. aureus*) المكورات العنقودية الذهبية، السيفاليكسين،

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Aliments Contenant le lycopène (µg/100g ou 100 mL de matière fraîche)	04
Tableau 02	Effets rapportés du lycopène dans certains types de cancer.....	14
Tableau 03	Les diverses formulations contenant du lycopène.....	20
Tableau 04	Facteurs et leurs niveaux dans les conceptions RSM.....	27
Tableau 05	Conception de la matrice CCD et rendement en lycopène mesurés dans différentes conditions expérimentales et réponses prévues.....	28
Tableau 06	Liste des antibiotiques utilisés.....	35
Tableau 07	Absorption Maximale et coefficients d'extinction molaire.....	46
Tableau 08	Bandes d'absorption IR du lycopène extrait et purifié de la pâte de tomate.....	48
Tableau 09	Adéquation du modèle de surface de réponse et analyse ANOVA...	52
Tableau 10	ANOVA pour la régression du modèle.....	53
Tableau 11	Solubilité du lycopène dans les huiles.....	60
Tableau 12	CMI of lycopene and Essential oil <i>Ammi visnaga</i> . L.....	64
Tableau 13	Effet de la combinaison entre le lycopène et l'huile essentielle contre différentes bactéries.....	66
Tableau 14	Résultats des antibiotiques exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.....	69
Tableau 15	Paramètres anthropométriques et biologiques chez le rat (CBP) traité ou non au lycopène et à la céfloxine.....	73
Tableau 16	Résultats microbiologiques quantitatifs de la culture des urinaires et tissus prostatiques.....	75

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 01	Structure chimique du lycopène (Boumendjel et al., 2012)	05
Figure 02	Structure du lycopène et de plusieurs isomères (Chasse et al., 2001)	06
Figure 03	Processus d'absorption du lycopène à partir de son apport alimentaire (Caseiro et al., 2020)	08
Figure 04	Les étapes de l'extraction du lycopène à partir de concentré de tomate	22
Figure 05	Purification du lycopène par la méthode de cristallisation par l'utilisation de l'antisolvant DMSO.....	23
Figure 06	Les différentes étapes de l'extraction du lycopène à partir de fruits de pastèque.....	24
Figure 07	Représentation schématique du procédé de coacervation complexe utilisant de l'alginate de sodium et de l'agar agar comme polymères.....	30
Figure 08	Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant ...	30
Figure 09	Activités antimicrobiennes de la combinaison du lycopène et l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> .L (Méthode de Checkerboard)	33
Figure10	Les différentes étapes de Provocation de la prostatite (l'instillation de <i>S. aureus</i>) original.....	36
Figure11	Schéma récapitulatif du protocole expérimental (Groupes et traitements)	39
Figure12	Sacrifiés des rats avec isolation de la glande prostatique.....	40
Figure13	Spectre DRX du lycopène standard et du lycopène purifié.....	44
Figure14	Spectres UV-vis standard et Lycopène purifié dans l'Hexane, (a) Spectres UV-vis standard et Lycopène purifié dans le Toluène. (b).....	46
Figure15	Plaques de gel de silice CCM ont été développées avec la phase mobile, éther de pétrole-hexane et acétone (5 :4 :1v/v/v), les spots déposés : Lycopène standard(L) lycopène purifié et l'extrait de tomate (T).	47
Figure16	Spectre IRTF du lycopène standard et du lycopène purifié.....	49
Figure17	Chromatogramme HPLC du lycopène standard (a), chromatogramme HPLC du lycopène purifié (b) chromatogramme HPLC du β-carotène standard (c) chromatogramme HPLC du caroténoïde de tomate	50

	(oléorésines) (d) et chromatogramme HPLC du lycopène purifié par rapport aux standards	
Figure 18	Diagramme de dispersion de la réponse prévue par rapport à la réponse réelle pour le rendement en lycopène purifié.....	54
Figure 19	Graphiques 2D et 3D présentant les effets corrélatifs de (A) volume du filtrat correspondant à l'oléorésine de caroténoïde, (B) température d'évaporation du filtrat (°C) et (C) volume de DMSO ajouté (mL).....	59
Figure 20	Billes d'alginate- Agar agar de lycopène.....	61
Figure 21	Effet anti radicalaire de lycopène, d'extrait de caroténoïdes et le vitamine C sur la réduction du DPPH.....	63
Figure 22	Microplaque de la combinaison antimicrobienne du lycopène et l'huile essentielle de <i>d'Ammi visnaga</i> L.....	66
Figure 23	L'antibiogramme de la souche <i>S. aureus</i>	68
Figure 24	Les colonies <i>Staphylococcus aureus</i> sur la gélose au sang (présence d'hémolyse) (a) Coloration de gram de <i>Staphylococcus aureus</i> (b).....	70
Figure 25	Observation microscopique d'un frotti du sperme du rat atteint une prostatite bactérienne chronique (CBP) par coloration de May-Grünwald Giemsa indique la présence des leucocytes (grossissement x 40)	71
Figure 26	Observation microscopique d'un frotti du sperme d'un rat normale par coloration de May-Grünwald Giemsa (grossissement x 40).	71
Figure 27	Micrographies représentatives de sections de tissu prostatique (H &E x 100) (a) groupe contrôle. (b) groupe traité par lycopène, (c) groupe traité au céfalexine. (e) le groupe traité avec lycopène / céfalexine, IF : fibrose interstitielle, IIC : l'infiltration de cellules inflammatoires, CVS : congestion des vaisseaux sanguins, CV : congestion vasculaire, ED : œdème interstitiel.	76

Liste des abréviations

A β 1-42 : Amyloid β (A β)- 42

mA : Milli-Ampère

AP-1 : Protéine activatrice-1

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde

BACE1: β -site APP cleaving enzyme 1

BBD: Box-Behnken

BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

CBP : Prostatite bactérienne chronique

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CuKa : (radiation) Type de rayons X

Cx 43 : jonction gap de connexine 43

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

DRX : Diffractomètre à rayons X

FIC: Concentration inhibitrice fractionnaire

GDM: gestational diabetes mellitus

GJC: gap junctional communication

HBP : Hyperplassie bénigne de la prostate

H&E : Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

HHPE : L'extraction à haute pression hydrostatique

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IFN- γ : Interferon

INT : p-iodonitrotétrazolium violet

IVU : Récurrence des voies urinaires

KV : Kilo-Volt

LDL : lipoprotéines de basse densité.

MAE : Extraction assistée par micro-ondes

MAPK : Mitogen- activated protein kinases

MCV : Maladies cardiovasculaires

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

MH : Mueller Hinton

NF- κ B : Factor nuclear K β

Nrf2 : Translocation nucléaire (nuclear factor erythroid 2-related)

PBS : Tampon phosphate salin (phosphate-buffered saline)

PSA : Prostate Specific Antigen

RSM : Méthodologie de surface de réponse

SFE : Extraction par fluide supercritique

TGF- β : Facteur de croissance transformant

UFC : Unité formant colonie.

USA : United States of America

UV : ultraviolet

γ **IL-10** : Interleukine **7-KC** : Le 7-cétocholestérol

Table des matières

Remerciement.....	
Dédicace.....	
ملخص.....	
Resumé.....	
Abstract.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction générale.....	<i>1</i>
CHAPITRE I : PROPRIETE ET BIENFAITS DU LYCOPENE	
I.1 Généralité sur lycopène.....	<i>3</i>
I.1.1. Sources alimentaires du lycopène.....	<i>3</i>
I.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	<i>5</i>
I.1.2.1. Isomères et transformation des tomates.....	<i>6</i>
I.1.2.2. Absorption de la lumière et de la couleur.....	<i>7</i>
I.1.2.3. Solubilité.....	<i>7</i>
I.1.3. Biodisponibilité et métabolisme.....	<i>7</i>
I.1.4. Répartition du lycopène dans les tissus.....	<i>9</i>
I.1.5. L'évaluation de la sécurité du lycopène.....	<i>9</i>
I.2. Méthodes d'extraction.....	<i>9</i>
I.2.1 La méthodologie de surface de réponse (RSM).....	<i>9</i>
I.2.2. L'extraction enzymatique.....	<i>10</i>
I.2.3. L'extraction assistée par ultrasons.....	<i>10</i>
I.2.4. L'extraction par fluide supercritique (SFE).....	<i>11</i>
I.2.5. L'extraction assistée par micro-ondes (MAE).....	<i>11</i>
I.2.6. L'extraction à haute pression hydrostatique (HHPE).....	<i>11</i>
I.3. Les bienfaits du lycopène.....	<i>11</i>

I.3.1. Effet du lycopène sur la fonction cellulaire.....	11
I.3.1.1 Activité antiradicalaire du lycopène.....	12
I.3.1.2 Effet du lycopène sur les troubles neurologiques liés à l'âge et l'amnésie.....	12
I. 3.1.3 Induction des communications par jonctions de lacunes.....	13
I.3.2 Prévention du Cancer.....	13
I.3.3 Maladies inflammatoires.....	15
I.3.4 Maladies de la peau.....	15
I.3.5 Infertilité.....	15
I.3.6. La prostatite et l'hyperplasie de la prostate.....	16
I.3.6.1. La prostatite.....	16
I.3.6.1.1. Symptômes de l'infection.....	17
I.3.6.2. L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP).....	17
I.3.7 Autres pathologies.....	17
I.3.7.1 Effet sur le Vieillissements humain.....	18
I.3.7.2. Modulation du Diabète gestationnel.....	18
I.3.7.3. La maladie d'Alzheimer.....	18
I.3.7.4. La maladie de Parkinson.....	18
I.4. Formulations contenant du lycopène.....	19
I.4.1. Formulations orales à base de lycopène.....	19
I.4.2. Formulations intraveineuses avec du lycopène.....	19
I.4.3. Formulations topiques avec du lycopène.....	19
1.4.5. Les difficultés de l'incorporation du lycopène.....	20

I.4.5.1 Encapsulation du lycopène.....	21
--	----

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériel végétal.....	22
II.2 Extraction et purification du lycopène.....	22
II.2.1 Extraction à partir de la tomate concentrée.....	22
II.2.1.1 Purification du lycopène par la méthode de cristallisation par ajout d'anti-solvant	23
II.2.2 Extraction à de pastèque.....	23
II.2. 3 Le rendement de l'extraction.....	24
II. 3. Caractérisation chimique du lycopène purifié	25
II.3.1. Diffraction des rayons X (DRX).....	25
II.3.2 Caractérisation par UV- VIS.....	25
II.3.3 Caractérisation par CCM.....	25
II.3.4 Analyse par spectroscopie IR à transformée de Fourier (FTIR).....	25
II.3.5 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	26
II.4. Optimisation de purification du lycopène selon le plan expérimental Box-Behnken :	26
II.5. Solubilité du lycopène dans certaines huiles essentielles.....	26
II.6. Encapsulation du lycopène par coacervation complexe alginate de sodium et agar agar	29
II.7. Activité biologique du lycopène <i>in vitro</i>	30
II.7.1 L'activité antioxydante	30
II.7.2 Activité antimicrobienne.....	31
II.7.2.1 Effet synergique antimicrobien entre le lycopène et l'huile essentielle <i>d'Ammi visnaga</i>	31
II.7.2.1.1 Microorganismes utilisés	31
II.7.2.1.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du lycopène et l'huile essentielle <i>d'Ammi visnaga. L</i>	32
II.7.2.1.3 L'évaluation des activités antimicrobiennes de la combinaison du lycopène et l'huile essentielle <i>d'Ammi visnaga. L</i> (Méthode de Checkerboard)	32
II.8. Activité biologique du lycopène <i>in vivo</i>	33
II.8.1 Origine de la souche utilisée.....	34
II.8.2 Les rats d'expérimentation et conditions d'élevage.....	34
II.8.3Antibiogramme de <i>staphylococcus aureus</i>	34

II.8.4 Modèle de prostatite bactérienne chronique (CBP).....	35
II.8.4.1 Préparation de la suspension bactérienne.....	35
II.8.4.2. Provocation de la prostatite (CBP Modèle chez les rats <i>wistar</i>)	36
II.8.4.3. Prélèvement et analyse microbiologique du sperme.....	36
II.8.4.3.1. La coloration de May-Grünwald Giemsa.....	37
II.8.4.4 Prélèvement et analyse microbiologique des urines	38
II.8.5. Groupes expérimentaux et traitements.....	38
II.8.6. Sacrifice des animaux, analyses microbiologiques et histologique.....	39
II.8.7 L'étude histopathologie.....	41
II.8.7.1 La fixation.....	41
II.8.7.2. Déshydratation.....	41
II.8.7.3. Clarification.....	41
II.8.7.4. Imprégnation.....	41
II.8.7.5. La microtomie	42
II.8.7.6. Coloration, déshydratation et montage des lames.....	42
II.9 Etude statistique.....	42

CHAPITRE III : RESULTAT ET DISCUSSIONS

III.1. Le rendement d'extraction du lycopène.....	43
III.2. Caractérisations chimiques du lycopène purifié	44
III.2.1. Caractérisation du lycopène par diffraction des rayons X (DRX)	45
III.2.2. UV-VIS caractérisation.....	45
III.2.3. Caractérisation du lycopène par CCM.....	47
III.2.4. Caractérisation du lycopène par FTIR.....	48
III.2.5. Caractérisation du lycopène par HPLC	48
III.3. Optimisation de la purification	51
III.3.1 Rendement de purification du lycopène et modélisation.....	54
III.3.2 Effets des paramètres du procédé sur l'efficacité de la méthode de purification.....	55
III.4. Etude de la solubilité.....	60
III.5. Encapsulation du lycopène par coacervation complexe alginate de sodium et agar agar.....	61

III.6. Activité biologique <i>in vitro</i>	62
III.6.1 L'activité antioxydant (DPPH).....	62
III.6.1.1 La concentration inhibitrice à 50% (IC50)	62
III.7.2 L'activité antimicrobienne	64
III.7.2.1. Concentration minimale inhibitrice (CMI) du lycopène et l'huile essentielle <i>d'Ammi visnaga. L</i>	64
III.7.2.2. Effet synergique antimicrobien de la combinaison de du lycopène et l'huile essentielle <i>d'Ammi visnaga L</i>	65
III.8 Activité biologique <i>in vivo</i>	67
III.8.1. Etude de la sensibilité de la souche <i>staphylococcus aureus</i> vis-à-vis des antibiotiques standards.....	67
III.8.2. Model prostatite bactérienne chronique CBP	69
III.8.3. Résultat de l'effet thérapeutique de lycopène seul ou combiné avec céfalexine sur CBP.....	72
III.8.3.1 Paramètres anthropométriques et biologiques des rats.....	72
III.8.3.2 Résultat microbiologiques des tissus prostatiques et cultures d'urine	73
III.8.3.3 Etude histologiques de la prostate.....	75
Conclusion.....	78

INTRODUCTION

GENERAL

Introduction :

Chez l'être humain, les caroténoïdes ne peuvent pas être synthétisés, ils sont simplement absorbés par l'alimentation. Dans notre régime alimentaire, trois principaux caroténoïdes (le bêta-carotène, la lutéine et le lycopène) constituent 80 % des apports en pigment. Le lycopène est un caroténoïde hydrocarboné naturel, de couleur rouge, abondamment trouvé dans quelque fruits rouges et légumes rouges comme la tomate, la pastèque, le goyave rose, et les papayes (Palozza et al., 2010). C'est une molécule de formule $C_{40}H_{56}$, non saturé à chaîne ouverte avec un poids moléculaire de 536 g/mol. Il est insoluble dans l'eau, éthanol et méthanol, et soluble dans l'hexane, chloroforme, benzène, huiles végétales et graisses (Faisal et al., 2013 ; Cáceres et al., 2015).

Le lycopène est considéré comme étant une molécule d'intérêt ayant de nombreuses applications en cosmétologie, en industrie alimentaire en tant que colorant, ainsi qu'en industrie pharmaceutique, où il a plusieurs formulations: orales (Raikos et al., 2019), intraveineuses (Stojiljkovic et al., 2018) et topiques (Ciriminna et al., 2016).

Le lycopène est un candidat important dans la prévention nutritionnelle, c'est un puissant antioxydant capable de protéger les cellules vivantes contre les attaques radicalaires et les dommages oxydatifs permettant la lutte contre les maladies chroniques et prévenir des maladies liées au vieillissement (Rodriguez-Amaya, 2019; Weber et al., 2020). Ce carotène est doté d'un effet protecteur contre la dysplasie, le cancer de la prostate et du tube digestif (Hirsch et al., 2007). Le lycopène est potentiellement un agent préventif contre certains cancérigènes, ceci est étroitement lié à sa capacité de régulation du microbiote intestinal, du cholestérol et du métabolisme (Wiese et al., 2019).

La purification du lycopène peut se faire par plusieurs méthodes à savoir : la chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince (CCM) (Saeid et al., 2016), résines d'adsorption macroporeuses (Liu et al., 2010) et par recristallisation (Aghel et al., 2011).

Cette thèse se fonde sur un double ancrage expérimental. Une étude *in vitro* vise à développer une nouvelle méthode rapide et moins onéreuse de purification du lycopène à partir de deux produits locaux, le concentré de tomate CAB Amor ben Amor et la pastèque ; à optimiser les conditions de purification par la méthode de cristallisation du lycopène selon la conception de surface Box-Behnken; à explorer la solubilité du lycopène dans quelques huiles essentielles et enfin évaluer l'effet synergétique antibactérien entre le lycopène et l'huile essentielle d'*Ammi visnaga L.* L'étude *in vivo* de l'effet thérapeutique du lycopène est basée

sur un traitement d'une prostatite chronique provoquée par *staphylococcus aureus* chez le rat *wistar*.

CHAPITRE I

Synthèse Bibliographique

CHAPITRE I : PROPRIETE ET BIENFAITS DU LYCOPENE

I.1 Généralité sur le lycopène

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 (Pattan et al., 2011). Dans le corps humain, le lycopène représente de 21 à 43% des caroténoïdes du plasma sanguin et peut être le caroténoïde dominant (Stahl et al., 1996).

Chez les plantes, les algues et autres organismes photosynthétiques, le lycopène est responsable des pigmentations jaune, orange et rouge, de la photosynthèse et de la photoprotection (Ordoñez-Santos & Ledezma-Realpe, 2013). En raison de sa forte coloration et de sa non-toxicité, le lycopène est devenu un colorant alimentaire recommandé (Alda et al., 2009). Parmi les caroténoïdes, le lycopène a une valeur ajoutée croissante en tant qu'ingrédient bioactif important doté de plusieurs propriétés biologiques, qui a envahi le domaine agroalimentaire, cosmétiques et cosméceutiques (Zuorro et al., 2012).

I.1.1. Sources alimentaires du lycopène

Le lycopène disponible dans le commerce peut être produit par synthèse chimique, fermentation ou isolement à partir d'un petit nombre de sources naturelles abondantes, telles que la biosynthèse à partir d'algues, de champignons, de plantes et, à plus petite échelle, par des micro-organismes. Les animaux étant incapables de produire des caroténoïdes, ils dépendent entièrement des sources alimentaires pour un apport adéquat de ce nutriment (Jaswir et al., 2011). Bien que la principale source de lycopène dans l'alimentation humaine soit la tomate, la teneur en lycopène peut varier considérablement en raison de facteurs environnementaux, de techniques agricoles ainsi que des types de tomates et de leur maturation (Ordoñez-Santos & Ledezma-Realpe, 2013). Le lycopène apparaît également dans les graines et les résidus d'épluchures d'autres sources naturelles comme la pastèque (Nobre et al, 2012), l'abricot, la papaye, la goyave, le raisin rouge, le pamplemousse rose, les citrouilles, le fruit de l'églantier (Selgas & Calvo, 2009), l'orange, la mangue et la grenade (Tab. 01) (Degrou et al., 2013). De même, la teneur en lycopène de la pastèque peut varier en raison de

différences dans le patrimoine génétique, l'illumination et l'approvisionnement en eau (Ordoñez-Santos & Ledezma-Realpe, 2013).

Tableau 01 : Aliments Contenant le lycopène ($\mu\text{g}/100\text{g}$ ou 100 mL de matière fraîche)

Aliments	Teneur en lycopène
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

D'autre part, certains auteurs soutiennent que les fruits de la pastèque et du gac ont des niveaux plus élevés de lycopène que la tomate (Krishnaiah & Sarbatly, 2014 ; Tran & Nguyen, 2016). Lors de la dégradation de la tomate, la chlorophylle se dégrade et donne naissance à des pigments jaunes tels que les carotènes et les xanthophylles. L'accumulation des carotènes développe la couleur rouge de la tomate (dos Santos et al., 2015), le lycopène étant cinq fois plus concentré dans la peau que dans la pulpe (Nobre et al., 2012).

I.1.2. Propriétés physico-chimiques

Le lycopène est un caroténoïde rouge vif (Krishnaiah et al., 2014) dont le poids moléculaire est de 536,89 g/mol correspondant à 89,45% de carbone et 10,51% d'hydrogène ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) (Kong et al., 2010). C'est un caroténoïde acyclique insaturé avec 11 liaisons doubles

linéaires conjuguées et 2 non conjuguées (Fig.1). (Aghel et al., 2011), et un tétraterpène assemblé à partir de 8 unités isoprènes (Alda et al., 2009). La plage de pH optimale pour la stabilité du lycopène se situe entre 3,5 et 4,5 (Stojiljkovic et al., 2018).

Le lycopène étant insoluble dans l'eau, l'éthanol et le méthanol (Kong et al., 2010 ; Okonogi & Riangjanapatee, 2015), et généralement solubilisé dans des solvants organiques tels que le tétrahydrofurane, le chloroforme, l'hexane, le benzène, le disulfure de carbone, l'acétone, l'éther de pétrole et l'huile (Ascenso, 2012 ; Kong et al., 2010). En raison de son extrême hydrophobie parmi d'autres facteurs, l'absorption du lycopène des fruits et légumes par le corps humain pourrait être faible. De plus, c'est également un facteur limitant pour sa formulation et son application (Shariffa et al., 2016). Le lycopène présente un pic endothermique à 172-173 °C correspondant au point de fusion de la forme cristalline (Okonogi et Riangjanapatee, 2015). La structure du lycopène est assez vulnérable aux traitements thermiques et aux processus d'oxydation. Il est donc important de protéger le lycopène de la lumière, de l'oxygène, des températures élevées, des acides, des catalyseurs et des ions métalliques (Kong et al., 2010).

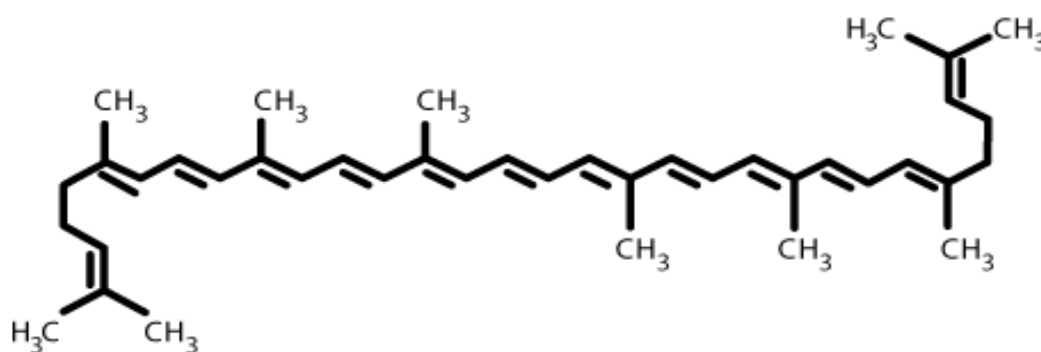


Fig .1 : Structure chimique du lycopène (Boumendjel et al., 2012)

I.1.2.1. Isomères et transformation des tomates

Le lycopène se trouve dans la nature sous la forme All-trans (Campos et al., 2017), la forme la plus stable sur le plan thermodynamique (Varma et al., 2010). Malgré une stabilité plus faible, les isomères cis présentent une moindre tendance à l'agrégation et à la cristallisation et une plus grande solubilité dans les milieux lipidiques (Phan-Thi & Waché, 2014). Par conséquent, les isomères cis sont plus bioactifs et ont une plus grande absorption (Phan-Thi & Waché, 2014). Même si le lycopène peut prendre 2048 configurations

géométriques grâce aux 11 doubles liaisons carbone-carbone conjuguées de son squelette moléculaire, seuls certains groupes de doubles liaisons subissent une isomérisation géométrique liée à l'encombrement stérique. Par conséquent, le lycopène subit une isomérisation pour produire un ensemble d'isomères mono- ou poly-cis, tels que 5cis-, 9cis-, 13cis- et 15cis- (Honest et al., 2011). Le site structure de plusieurs isomères du lycopène est présentée à la figure 2.

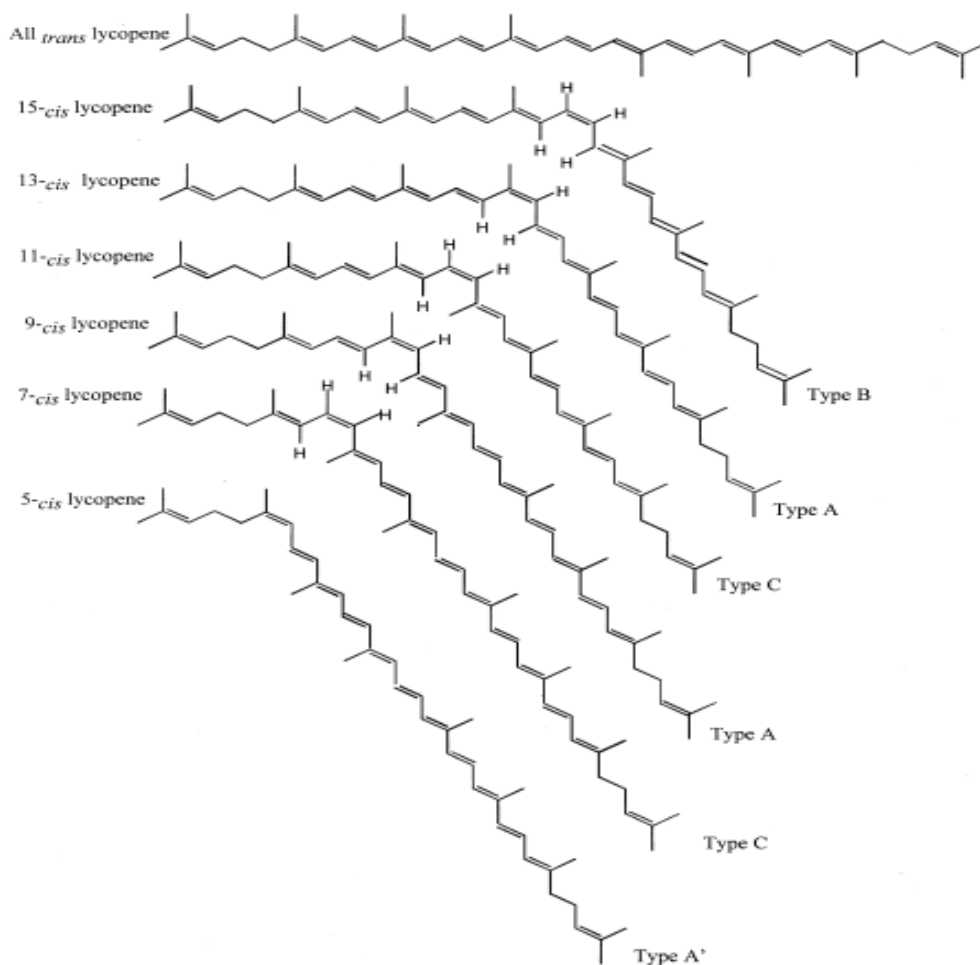


Fig.2 Structure du lycopène et de plusieurs isomères (Chasse et al., 2001)

I.1.2.2. Absorption de la lumière et de la couleur

La couleur des caroténoïdes est due à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 nm et 500 nm (Britton 1995). Chaque double liaison réduit l'énergie nécessaire à un électron pour passer à un niveau d'énergie supérieur, ce qui permet à la molécule d'absorber progressivement des longueurs d'onde (λ_{max}) de plus en plus grandes de la lumière visible

(déplacement bathochrome). Le lycopène, avec 11 doubles liaisons, absorbe la plupart du spectre lumineux dans la zone violette, seul le rouge reste visible. Le spectre d'absorption du lycopène dans l'hexane est maximal à trois longueurs d'ondes : 444, 470 et 502 nm.

I.1.2.3. Solubilité

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 (Zumbrunn et al., 1985) sous l'effet des interactions faibles et réversibles entre les liaisons hydrogènes, des forces dipolaires, des interactions électriques de type Van Der Waals et de l'effet de l'hydrophobie (Köhn et al., 2008). 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. Dans l'éthanol et le méthanol, le lycopène presque insoluble (Budavari et al., 1996). La solubilité dépend aussi de sa structure en *trans*- ou *cis* isomères. Dans l'huile et la plupart des solvants organiques, les *cis*-isomères sont plus solubles que la forme all-*trans* (Failla et al., 2008).

I.1.3. Biodisponibilité et métabolisme

La biodisponibilité du lycopène peut être affectée par la transformation et la cuisson des aliments, la composition du régime alimentaire (N. Story et al., 2010), la mastication, les configurations isomériques du lycopène (Moran et al., 2013) et les probiotiques (N. Story et al., 2010). En fait, la biodisponibilité du lycopène s'avère être la plus faible dans les sources brutes, légèrement augmentée dans les aliments légèrement transformés et la plus élevée dans les sources alimentaires thermotraitées et les préparations huileuses purifiées (Honest et al., 2011).

En tant que caroténoïde liposoluble, le lycopène a une absorption similaire à celle des graisses alimentaires. Dans l'estomac, il est libéré de la matrice alimentaire et dissous dans la phase lipidique. Avant l'absorption, les sels biliaires réagissent avec les pancréatique lipases, formant des micelles dans la phase lipidique (Kong et al., 2010). Dans l'intestin grêle, les micelles lipidiques sont transportées passivement vers les cellules de la muqueuse, et postérieurement, incorporées dans des chylomicrons riches en triacylglycérols qui sont ensuite transférés vers le foie via le système lymphatique. Après absorption, le lycopène est transporté dans le plasma au cœur des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Durairajanayagam et al., 2014). Le processus d'absorption du lycopène peut être résumé dans la figure 3.

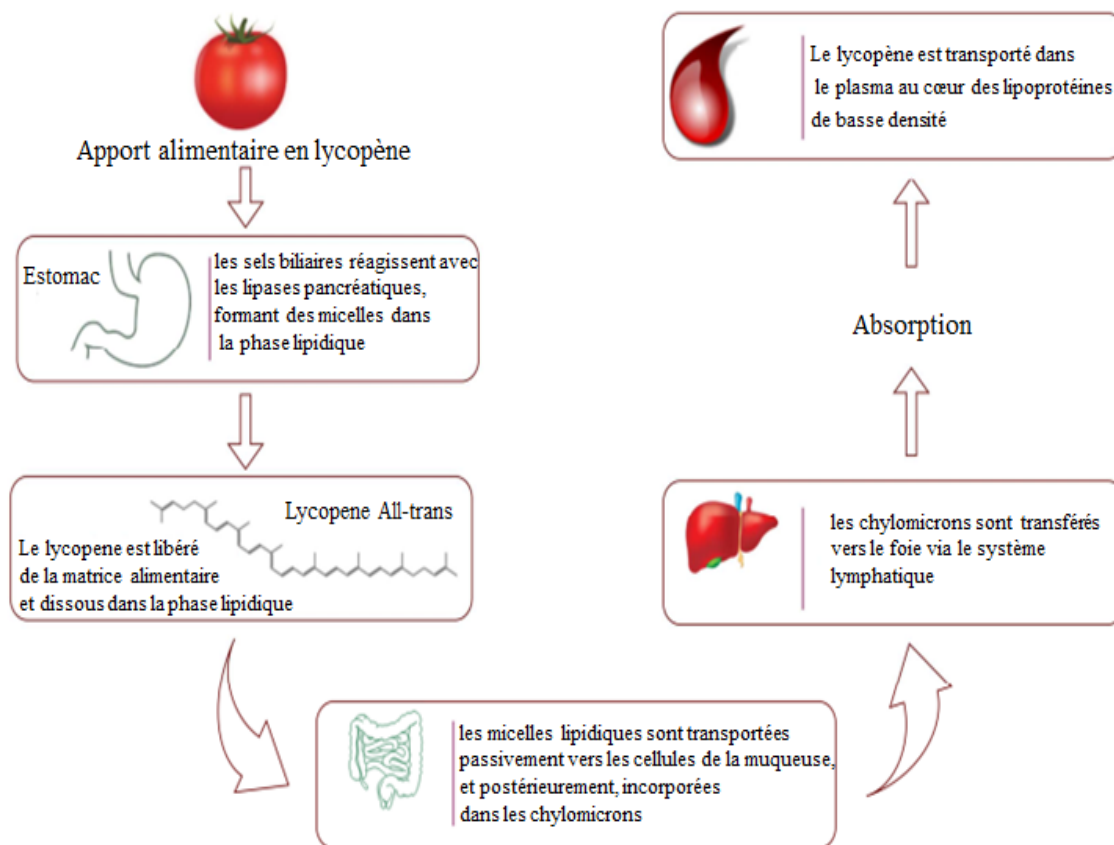


Fig. 3 Processus d'absorption du lycopène à partir de son apport alimentaire (Caseiro et al., 2020)

Les isomères cis du lycopène sont plus facilement incorporés dans les lipoprotéines que les isomères trans en raison de leur plus grande solubilité (Ascenso, 2012) et une longueur de chaîne plus courte qui s'insère dans les micelles.

I.1.4. Répartition du lycopène dans les tissus

La structure chimique du lycopène influence le processus de distribution, il est distribué via le système circulatoire, s'accumulant dans divers tissus, préférentiellement dans les testicules, les glandes surrénales, le foie et la prostate. Cette énorme accumulation peut être causée par la présence d'un grand nombre de récepteurs aux lipoprotéines, une absorption relativement plus élevée des lipoprotéines et/ou un taux de métabolisme/oxydation plus élevé dans ces tissus. Ainsi, la distribution inégale du lycopène suggère son rôle biologique exclusif dans certains tissus. (Durairajanayagam et al., 2014)

I.1.5. L'évaluation de la sécurité du lycopène

Comme cela a été démontré, le lycopène cristallin pur et le lycopène formulé dans des conditions stables ne sont pas génotoxiques (Ascenso, 2012). Il est important de mentionner que le lycopène peut moduler la toxicité et la génotoxicité de différentes génotoxines (telles que le peroxyde d'hydrogène, la n- nitrosodiéthylamine et l'aflatoxine B1) (Fernández-Bedmar et al., 2018).

I.2. Méthodes d'extraction

L'industrie de la tomate produit des quantités non négligeables de déchets solides, comme les pelures et les graines. Par conséquent, la plupart du lycopène provenant de ces sources est gaspillé. Cela a ouvert une nouvelle opportunité pour plusieurs chercheurs de commencer à traiter les déchets alimentaires pour obtenir de nouvelles sources d'agents actifs qui, à leur tour, ont conduit à l'extraction sélective des principaux composés phytochimiques de la matière naturelle (Faria-Silva et al., 2019). La valeur du lycopène récupéré dépend de la méthode d'extraction utilisée et/ou du traitement préalable des pelures et du type de matière première comme la variété de tomate (K.K.Ho, et al., 2015). Le constant diélectrique, la structure chimique du solvant organique, les proportions de solvant et les propriétés chimiques du composé affectent également l'extractibilité du lycopène (Briones-Labarca, et al., 2019).

I.2.1 La méthodologie de surface de réponse (RSM)

La RSM détermine l'effet de divers paramètres d'extraction (le ratio de solvant, le ratio solide-liquide, la puissance des micro-ondes et les équivalents énergétiques) sur le rendement en lycopène. Cependant, la procédure d'extraction à l'aide du RSM prend généralement du temps et présente un risque de dégradation du lycopène car les échantillons sont exposés à la chaleur pendant des périodes prolongées (Ho et al., 2015).

Bien que l'extraction du lycopène soit indépendante du débit du solvant, elle est influencée par certains facteurs, étant augmentée avec la pression et la température à 60°C et diminuée avec une taille de particules plus élevée au début de l'extraction. L'extraction du lycopène peut être réalisée par différentes techniques utilisant des enzymes, des ultrasons, la macération, entre autres (Nobre et al., 2012).

I.2.2. L'extraction enzymatique

L'extraction avec des enzymes présente plusieurs avantages tels que la haute spécificité et l'efficacité catalytique, la solubilité aqueuse, l'absence de toxicité et la biodégradabilité. En outre, elle peut être réalisée dans des conditions opérationnelles douces de pH, de température et de pression. Cependant, les enzymes sont relativement instables et leur récupération est coûteuse (Nobre et al., 2012).

I.2.3. L'extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons est très facile et moins coûteuse, mais elle induit la formation d'un réseau de fibres puissant dans la pulpe de tomate, ce qui piège le lycopène dans la matrice de la tomate, le rendant ainsi plus vulnérable moins accessibles pour la digestion (Nobre et al., 2012). Dans l'extraction conventionnelle par macération, la récupération du lycopène est généralement faible (Nobre et al., 2012). Certains auteurs soutiennent que les solvants organiques, comme l'hexane et l'acétate d'éthyle, sont les plus efficaces pour l'extraction des caroténoïdes des graines et des pelures de tomates. En fait, les rendements d'extraction des isomères cis sont plus élevés lorsque le rapport solide-liquide diminue et que la proportion d'acétate d'éthyle augmente (Ho et al., 2015). Cependant, l'extraction du lycopène par des méthodes conventionnelles consomme généralement de grandes quantités de solvants organiques qui sont coûteux, toxiques et dangereux (Ascenso et al., 2013).

I.2.4. L'extraction par fluide supercritique (SFE)

L'extraction par fluide supercritique est adéquate pour l'extraction du lycopène des déchets industriels de la tomate, car elle réduit l'utilisation de solvants toxiques en obtenant un extrait sans solvant à des températures modérées avec une sélectivité et un rendement plus élevé (Nobre et al., 2012). Bien que le SFE soit une technique non toxique et non inflammable, il nécessite la présence d'un stabilisateur et d'un cosolvant en raison de son caractère non polaire. De plus, la dégradation et/ou l'isomérisation du lycopène peut se produire lors de toute étape d'extraction (Ascenso et al., 2013). En alternative au dioxyde de carbone supercritique, l'éthane peut également être utilisé en raison de sa plus grande polarisabilité et de sa faible température et pression critiques (305,4 K et 48,2 atm, respectivement), ce qui permet un processus moins coûteux et une extraction plus rapide avec une récupération plus élevée du lycopène (Nobre et al., 2012).

I.2.5. L'extraction assistée par micro-ondes (MAE)

L'extraction assistée par micro-ondes constitue une amélioration par rapport à l'extraction conventionnelle et à l'extraction par fluide supercritique. Alors que l'extraction conventionnelle fournit des proportions plus élevées d'isomères cis, l'EMA est une technique rapide pour récupérer le lycopène tout-trans et total (Ciriminna et al., 2016). Le MAE induit un chauffage rapide des composants cellulaires polaires, améliorant la migration du lycopène dans le solvant d'extraction tandis que la courte durée du traitement limite l'exposition à la chaleur exposition à la chaleur des composants non polaires (Ho et al., 2015).

I.2.6. L'extraction à haute pression hydrostatique (HHPE)

L'HHPE est utilisée pour extraire les substances phytochimiques des fruits et légumes. Elle peut modifier la bioaccessibilité des composés bioactifs. Cette méthode est plus rapide et plus efficace que les extractions conventionnelles (Briones-Labarca. et al., 2019).

I.3. Les bienfaits du lycopène

I.3.1. Effet du lycopène sur la fonction cellulaire

La réactivité du lycopène dans les systèmes biologiques dépend de multiples facteurs, tels que sa structure moléculaire et physique, sa concentration, sa source, sa localisation ou son site d'action dans les cellules, sa compétence à interagir avec d'autres antioxydants et la contribution de la pression partielle de l'oxygène (Ascenso, 2012). Le lycopène possède diverses propriétés bénéfiques pour la santé humaine (Kelkel et al., 2011).

I.3.1.1. Activité antiradicalaire du lycopène

Le lycopène est un puissant antioxydant (Jaswir et al., 2011), contre l'oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN (Durairajanayagam et al., 2014). De plus, le lycopène peut agir sur d'autres radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde d'azote et les radicaux hydroxyles. En outre, l'activité du lycopène contre les radicaux libres est augmentée de manière synergique par la présence d'autres substances phytochimiques de la tomate telles que le β -carotène, le phytoène et le phytofluène (Zuorro et al., 2012). Lorsque le lycopène est exposé à des radicaux libres ou à des agents d'oxydation, les doubles liaisons peuvent être clivées ou ajoutées, interrompant ainsi la chaîne polyénique. Avec ces réactions, le lycopène peut être dégradé et perdre sa couleur (Kong et al., 2010). Parmi tous les caroténoïdes, le lycopène a la plus grande capacité de piégeage des espèces singulières de radicaux libres d'oxygène en raison du nombre élevé de doubles liaisons dans sa structure qui fournit de

nombreux électrons qui peuvent être donnés aux radicaux libres, ce qui entraîne une réactivité élevée (Ascenso, 2012). Lorsque la tension d'oxygène est faible, le lycopène peut piéger les radicaux peroxydes, supprimant l'étape de propagation de la peroxydation lipidique, et donc, inversant l'initiation de la tumeur (dos Santos et al., 2015).

I.3.1.2. Effet du lycopène sur les troubles neurologiques liés à l'âge et l'amnésie

L'administration quotidienne et prolongée de 50mg de lycopène durant deux mois aux souris CD- 1 âgées, améliore nettement les aspects liés au vieillissement non seulement au niveau du comportement mais aussi au niveau biochimique (Zhao et al., 2018). L'administration orale de lycopène peut arrêter l'accumulation toxique d'A β 1-42 dans le cerveau en diminuant les protéines APP et bêta-sécrétase 1 (BACE1) et ainsi prévient le dysfonctionnement cognitif. En outre, les dommages neuronaux liés à l'âge dans l'hippocampe et le dysfonctionnement synaptique sont améliorés par le lycopène avec une augmentation du niveau des facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF). Le prétraitement par le lycopène (5 et 10 mg/kg) améliore les symptômes dans le modèle d'amnésie induite par la scopolamine chez la souris, par une amélioration exceptionnelle de la capacité d'apprentissage et la rétention de la mémoire apprise, en améliorant le niveau accru L'acétylcholinestérase (d'AChE) dans le cerveau. De plus, l'inhibition du stress oxydatif et des dommages neuronaux dans le cortex et l'hippocampe, peut être attribuée à ces potentiels neuroprotecteurs de la lycène. (Bala et al., 2015)

I. 3.1.3 Induction des communications par jonctions de lacunes

La communication par jonction gap est réalisée par des canaux composés de protéines de jonction gap telles que la connexine 43 (Cx 43) (Ascenso, 2012 ; Jaswir et al., 2011). La GJC permet l'échange de molécules de signalisation et de nutriments entre les cellules voisines (Kelkel et al., 2011). La GJC est également impliquée sur la polarisation épithéliale et joue un rôle important dans la formation de membranes biologiques plus stables, notamment différents types d'épithéliums et la peau (Lima et al., 2016).

L'une des caractéristiques de la carcinogenèse est la perte de GJC. Ainsi, la prolifération des cellules tumorales n'est pas inhibée (Durairajanayagam et al., 2014). Le lycopène peut induire le GJC par un mode différentiel et dose-dépendant, en inhibant la progression cancérigène des fibroblastes initiés vers des fibroblastes transformés de manière réversible. Différents auteurs rapportent une relation positive entre l'expression de GJC ou de Cx 43 avec la consommation de lycopène.

I.3.2 Prévention du Cancer

Le lycopène retarde la croissance des tumeurs et inhibe la tumorigenèse (Kazim Sahin et al., 2019). Son effet protecteur est démontré contre certains cancers (Vila et al., 2019) comme celui de la prostate, de la vessie, du col de l'utérus, de la leucémie (Jaswir et al., 2011), de la bouche, de l'œsophage, du pancréas, du rectum, du côlon (ou tube digestif), du poumon et du sein (Ascenso, 2012). Des études épidémiologiques révèlent une corrélation inverse entre l'apport alimentaire en lycopène et le risque de certains types de cancer. Chez les patients atteints de cancer de la prostate, un régime riche en lycopène réduit le stress oxydatif et, par conséquent, diminue les dommages causés aux lipoprotéines plasmatiques, aux protéines sériques et à l'ADN des lymphocytes. De cette façon, le lycopène inhibe le développement du cancer et réduit l'agressivité des tumeurs de la prostate (Kelkel et al., 2011). Certains auteurs suggèrent qu'il existe une association inverse entre le lycopène et le risque de certaines maladies avancées (Kong et al., 2010). Le [tableau 02](#) résume les différentes études concernant l'effet du lycopène sur plusieurs types de cancer.

Tableau 02. Effets rapportés du lycopène dans certains types de cancer

type de cancer	Type d'étude	Les effets de lycopène	Références
Cancer colorectal	Etude prospective de Cohort	La forte consommation de légumes vert-jaune, responsables des taux sériques de lycopène, peut réduire le risque de mortalité par cancer colorectal dans les populations rurales japonaises.	(Ito et al, 2005 ; Story et al,2010)
	Etude de cas-contrôle	Il y'a aucune relation entre la consommation du lycopène et le risque du cancer colorectal	(Kune & Watson,2006 ; Story et al., 2010)
Cancer des poumons	Etude de cohort	Des risques plus faibles de cancer du poumon sont observés pour les plus grands quintes (1/5) de lycopène par rapport aux plus bas quintes	(Holick et al., 2002 ; Kazim Sahin et al., 2019)
Cancer du pancréas	Etude de cas contrôle	La consommation des tomates et des produits à base de tomates Qui contiennent une grande teneur en lycopène peuvent aider à diminuer le cancer du pancréas.	(Nkondjock, et al., 2005 ; Kazim et al., 2019)
Cancer de la prostate	Méta-analyse	La consommation du lycopène ou les aliments qui le contient, diminuent le risque de développer un cancer de la prostate.	(Aydemir et al., 2013; Etminan et al., 2004)
	Etude d'éventuelle observation	La consommation de lycopène est associée à un risque réduit de cancer de la prostate.	(Giovannucci et al, 2002; Kong et al., 2010)
	Etude prospective de cohort	Un apport plus élevé en lycopène comme aliment ou complément réduit le risque d'hypertrophie bénigne de la prostate chez l'homme	(Kristal et al., 2008 ; N. Story et al., 2010)

I.3.3. Maladies inflammatoires

Le lycopène a des effets positifs sur l'inflammation et le déséquilibre redox grâce à sa capacité à activer l'expression des gènes antioxydants et à réguler les voies de signalisation responsables de l'induction des médiateurs inflammatoires. Ainsi, le lycopène active l'expression de gènes antioxydants, étant responsable de la translocation nucléaire de Nrf2 (Campos et al., 2017). Le lycopène inhibe également la libération du facteur de nécrose tumorale (TNF)- α et stimule la production d'interleukine (IL)-10. (Ascenso, 2012).

Les différents effets anti-inflammatoires du lycopène peuvent être résumés en : a) modulation de l'expression de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase ; b) régulation de l'oxyde nitrique synthase inductible ; c) interférence avec le NF-kB ainsi qu'avec la protéine activatrice-1 (AP-1) et avec la signalisation des MAPK (Kelkel et al., 2011). Comme la pathogenèse de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 implique une augmentation des niveaux d'interleukine (IL)-1 β , de TNF- α et de protéine C-réactive, ces troubles sont intimement associés à l'inflammation (Zeng, et al., 2017).

I.3.4. Maladies de la peau

Les mécanismes de protection de la peau peuvent être augmentés par le lycopène en raison de la synthèse des prostaglandines et des composants phospholipidiques de la membrane cellulaire. Ainsi, l'application topique de lycopène peut réduire l'infiltrat inflammatoire (Ascenso, 2012). En fait, l'œdème et l'érythème induits par l'anthraline sur les oreilles de souris se sont avérés être significativement atténués par l'application épicutanée de 0,05% de lycopène comparable au traitement avec une solution de 1 mg/g de bétaméthasone (Ascenso et al., 2013). Certains auteurs suggèrent que les conditions de vie des individus influencent la concentration en caroténoïdes de la peau humaine. En effet, alors que la concentration du lycopène cutané est faible chez les fumeurs, elle est plus élevée chez les personnes végétariennes (Lademann et al., 2011). Le lycopène protège et prévient les photodommages aigus induits par les ultraviolets (UV).

I.3.5 Infertilité

Le stress oxydatif peut affecter la viabilité et la motilité des spermatozoïdes ainsi que les dommages à l'ADN, qui sont les principales causes de l'infertilité, principalement par le facteur masculin idiopathique. Le lycopène est capable de diminuer la peroxydation lipidique et les dommages à l'ADN des spermatozoïdes ainsi que de renforcer l'immunité par

l'augmentation des antioxydants tels que la catalase et la glutathion peroxydase. Ainsi, le lycopène peut améliorer le nombre et la viabilité des spermatozoïdes (Durairajanayagam et al., 2014).

I.3.6. La prostatite et l'hyperplasie de la prostate

La prostatite est une maladie des voies urinaires fréquente mais gênante en pratique urologique qui agace patients et urologues du monde entier. Le taux d'incidence de la prostatite suit de peu celui du cancer de la prostate et l'hyperplasie bénigne de la prostate dans toutes les affections des voies urinaires masculines. (Schaeffer, et al., 2006).

I.3.6.1. La prostatite

La prostatite est une douleur associée à un gonflement, une inflammation, ou les deux, de la prostate. La cause est parfois une infection bactérienne ou non. Des douleurs peuvent se manifester dans la zone comprise entre le scrotum et l'anus ou dans la région lombaire, le pénis ou les testicules.

Les Instituts nationaux de la santé ont classé la prostatite dans les quatre catégories suivantes: prostatite bactérienne aiguë; prostatite bactérienne chronique ; prostatite chronique/douleur pelvienne chronique syn- (CP/CPPS); et prostatite inflammatoire asymptomatique.

Parmi ces quatre types, la prostatite bactérienne chronique (CBP) représente environ 5 à 10 % de tous les cas symptomatiques, et environ 30 % des hommes adultes souffrent de prostatite bactérienne chronique qui se manifeste par des infections urinaires récurrentes. La CBP est causée par une infection bactérienne et maintient un état de faible infection des voies urinaires qui déclenche de multiples troubles. Bien qu'une infection bactérienne soit la cause principale, le traitement optimal est encore inconnu. (Zhao et al., 2020)

La prostatite bactérienne chronique (CBP) est une maladie subtile, souvent insidieuse dans son apparition, elle peut engendrer des signes et symptômes tel que la présence de sang dans l'urine (hématurie) ou le sperme, une sensation de brûlure ou douleur pendant la miction avec une douleur ou sensation de pression dans le rectum , la prostatite peut également provoquer une fièvre, frissons et douleurs musculaires et infections urinaires récurrentes. (Schaeffer et al., 2006).

I.3.6.1.1. Symptômes de l'infection

La prostatite bactérienne chronique (CBP) est une maladie subtile, souvent insidieuse dans son apparition elle peut engendrer des signes et symptômes tel que la présence de sang dans l'urine (hématurie) ou le sperme, une sensation de brûlure ou douleur pendant la miction avec une douleur ou sensation de pression dans le rectum, la prostatite peut également provoquer une fièvre, frissons et douleurs musculaires et infections urinaires récurrentes. (Schaeffer, et al., 2006)

I.3.6.2. L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP)

L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) est une hypertrophie non maligne de la prostate. Ce trouble prolifératif affecte les cellules épithéliales et les muscles lisses dans la zone de transition de la prostate (Auffenberg et al., 2009). L'HBP est une maladie fréquente chez les hommes âgés, a environ 50 % dans la cinquantaine, augmentant jusqu'à 90% chez les hommes âgés de 80 ans et plus. La pathologie peut entraîner une augmentation du tonus des muscles lisses et résistance, ainsi que l'obstruction de l'urètre proximal, Pour abaisser les symptômes des voies urinaires, une panoplie de de traitement est disponibles pour les hommes diagnostiqués avec le cancer et l'hyperplasie bénigne de la prostate (McVary et al., 2011). L'acte chirurgical comprend une ablation de la prostate, que ce soit par prostatectomie radicale ouverte, laparoscopique ou approche laparoscopique assistée par robot. Autres interventions comprennent la radiothérapie externe, la curiethérapie, les surveillances (ou attente vigilante), ainsi que des traitements expérimentaux tels que les ultrasons focalisés de haute intensité et la thérapie focale (Heidenreich et al., 20011).

Parmi les traitements naturels ou bien phytothérapie, le prunier d'Afrique, la baie de palmier nain, la racine d'ortie et le bêta-sitostérol utilisé comme des traitements alternatifs. La supplémentation en lycopène peut entraîner une diminution de l'incidence de l'HBP. (Ilic et al., 2012).

I.3.7. Autres pathologies

Le lycopène réduit le taux de cholestérol (Jaswir et al., 2011), contribuant à l'amélioration des maladies cardiovasculaires en raison de la réduction des plaques d'athérome (Durairajanayagam et al., 2014). Le 7-cétocholestérol (7-KC) semble avoir un rôle majeure dans l'athérosclérose., Certains auteurs suggèrent que le lycopène peut prévenir les effets néfastes du 7-KC en réduisant le stress oxydatif et l'apoptose dans les macrophages humains. (Palozza et al., 2010). La tige mésenchymateuse transplantées dans des maladies

ischémiques et prétraitées avec du lycopène peuvent être utilisées dans le traitement de certaines lésions tissulaires, car le lycopène prévient les lésions ischémiques par la suppression de la voie de signalisation associée à l'apoptose et l'augmentation de la protéine antioxydante (Kim et al., 2015).

I.3.7.1 Effet sur les vieillissements humains

Des niveaux sériques élevés de lycopène peuvent également être associés à un risque plus faible de dégénérescence maculaire liée à l'âge (Kelkel et al., 2011) en raison de la plus grande capacité du lycopène à éteindre l'oxygène singulet présent dans l'œil, ainsi que de l'influence sur les processus athérogènes qui affectent indirectement la macula (Martínez & Melendez-Martínez, 2016).

I.3.7.2. Modulation du Diabète gestationnel

Le lycopène sérique est inversement associé aux concentrations de glucose plasmatique et d'insuline à jeun (Kong et al., 2010). Une étude transversale soutient que la consommation de lycopène alimentaire peut réduire le risque de diabète sucré gestationnel en raison de la réduction de la glycémie à jeun. En effet, une augmentation de 1 mg de la consommation de lycopène réduit de 0,005 mmol/L la glycémie à jeun et, par conséquent, diminue de 5% le risque de diabète sucré gestationnel (Gao et al., 2019).

I.3.7.3. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est marquée par l'accumulation de β -amyloïde dans le cerveau, principalement la β -Amyloïde1-42 ($A\beta$ 1-42). Une étude sur des rats injectés avec le peptide $A\beta$ 1-42 a suggéré que le traitement au lycopène peut diminuer significativement le dysfonctionnement mitochondrial induit par l' $A\beta$ 1-42, les médiateurs de cytokines inflammatoires tels que NF- κ B, IL-1 β , TNF- α et le facteur de croissance transformant (TGF)- β , ainsi que l'activité de la caspase-3, dans le cerveau (Sachdeva et Chopra, 2015).

I.3.7.4. La maladie de Parkinson

Le stress oxydatif peut jouer un rôle important dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson. Une étude menée sur des rats traités à la roténone a suggéré que le lycopène peut prévenir non seulement les altérations des antioxydants induites par la roténone, mais aussi le stress oxydatif et les déficits neurocomportementaux. Ainsi, la supplémentation en lycopène peut s'appliquer aux maladies neurodégénératives qui impliquent un stress oxydatif accentué. (Kaur et al., 2011).

I.4. Formulations contenant du lycopène

I.4.1. Formulations orales à base de lycopène

Les préparations alimentaires de lycopène sont formulées sous forme de suspensions dans des huiles comestibles ou de poudres dispersables dans l'eau, étant stabilisées par des antioxydants (Dhakal et al., 2016). En effet, la présence d'huile améliore la bio accessibilité du lycopène grâce aux acides gras libres qui augmentent l'efficacité de solubilisation du lycopène, lors du processus de digestion. Une étude récente a encapsulé de la poudre de lycopène (> 10%) dans une émulsion de boisson à base d'huile d'orange (pH 3,2) avec différents ratios de triglycérides à chaîne longue et courte, révélant que la bio accessibilité du lycopène augmente de 2,7% lorsque le ratio de triglycérides à chaîne longue et courte est de 75:25, respectivement, en augmentant la capacité de solubilisation du lycopène avant l'absorption. (Raikos et al., 2018).

I.4.2. Formulations intraveineuses avec du lycopène

Une étude chez le rat a révélé que le lycopène encapsulé dans des nanoliposomes présente un degré plus élevé de récupération des changements structurels du tissu rénal induits par le méthotrexate, et l'a réduit plus efficacement que le lycopène dissous dans l'huile de maïs. Par conséquent, la formulation avec des nanoliposomes évite l'interaction rapide entre le lycopène et les composés hautement réactifs, tels que les protéines plasmatiques et/ou les ions métalliques (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} ou Cu^{2+}), prolongeant sa présence dans la circulation et, par conséquent, permettant au lycopène d'agir sur le tissu ciblé, tissu endommagé (Stojiljkovic et al., 2018).

I.4.3. Formulations topiques avec du lycopène

Ces dernières années, l'administration par voie cutanée après application topique de composés actifs, dont le lycopène, a gagné en importance et en développement en raison du moindre risque d'effets secondaires systémiques par rapport à l'administration orale. Le lycopène est largement utilisé dans les produits cosmétiques comme anti-âge, les hydratants pour le visage et les crèmes pour les yeux afin de protéger la peau des dommages potentiels des rayons UV et de prolonger le bronzage de la peau (Ciriminna et al., 2016). Il existe plusieurs systèmes avancés d'administration de médicaments tels que les nanoparticules, les liposomes et les cyclodextrines, les nano/microémulsions, entre autres (Ascenso, 2012).

1.5. Les difficultés de l'incorporation du lycopène

Il existe plusieurs problèmes (Tab . 03) associés à chaque formulation de lycopène, à savoir dans, les formulations orales, intraveineuses et topiques. Ces dernières années, le développement de nouvelles formulations a permis de résoudre ces problèmes en se basant sur des explications plausibles.

Tableau 03. Les diverses formulations contenant du lycopène.

Formulations	Difficulté	Explication	Solution pratique	Références
Orale	Hydrophobicité du lycopène	L'huile augmente la solubilisation du lycopène pendant la digestion, et améliorant sa biodisponibilité	Lycopène formulé Sous forme de suspensions dans les huiles comestibles ou dans l'eau poudre dispersible stabilisé par antioxydants	(Dhakal et al.,2016; Raikos, et al.,2018;)
	Dégradation du lycopène dans l'environnement gastrique.	Libération du lycopène dans la lumière intestinale lumen pour être absorbé.	Gels d'arabinoxylane, en agissant comme porteurs de lycopène	(Hernández et al., 2012)
Intraveineuse	La dégradation du lycopène dans le plasma en raison d'une Interaction avec les protéines plasmatiques et/ou des ions métalliques.	Prolongation de lycopène dans le plasma lui permet d'atteindre tissu cible.	Lycopène encapsulé dans des nanoliposomes	(Stojiljkovic et al., 2018)
	Peau difficile pénétration du lycopène en	Augmenter la pénétration du lycopène	Chargé en lycopène systèmes d'administration	(Ascenso, 2012 ; Ascenso et

Topique	raison de sa rétention dans la stratum corneum.	dans les couches viables de la peau par le biais de lycopène transporteurs	avancés chargés de lycopène : - Nanoparticules, - Liposomes	al., 2013
---------	---	--	---	-----------

I.4.5.1 Encapsulation du lycopène

La libération du lycopène peut être améliorée par une technique de dispersion solide. la préparation de pilules goutte à goutte dans des supports hydrosolubles, augmentant sa solubilité. Les techniques d'encapsulation du lycopène peuvent améliorer sa stabilité par la conversion de la forme liquide en forme solide afin de favoriser la manipulation et l'utilisation du lycopène. L'encapsulation peut être réalisée par séchage par pulvérisation, lyophilisation, coacervation complexe (Celli et al., 2016), séparation de phases, co-cristallisation, polymérisation interfaciale, extraction assistée par micro-ondes, extraction par fluide supercritique, entre autres (Guo et al., 2014).

Il existe plusieurs agents qui peuvent être utilisés dans le processus d'encapsulation, comme la maltodextrine, l'isolat de protéines de lactosérum et l'amidon modifié par l'octénylesuccinate. Une étude, utilisant ces trois agents encapsulants, a montré leur effet sur les propriétés physicochimiques ainsi que l'évaluation de la stabilité du lycopène à partir de concentré de tomate microencapsulé, par séchage ou par pulvérisation. Les agents d'encapsulation qui se sont avérés les plus adéquats pour protéger le lycopène pendant le séchage par atomisation, la maltodextrine et l'amidon modifié ont été les agents de stockage les plus efficaces, car la rétention la plus élevée du lycopène a été observée immédiatement après le séchage, ainsi qu'une meilleure capacité antioxydante et des taux de dégradation plus faibles du lycopène (Souza et al, 2018).

CHAPITRE II

Matériels et Méthodes

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériel végétal

Le matériel végétal est le premier maillon essentiel dans la réalisation de cette expérimentation. Son choix était conditionné par l'abondance du lycopène, la disponibilité sur le marché local et le prix réduit. La tomate et la pastèque sont des aliments abondants et riches en lycopène.

Dans ce travail, l'extraction de lycopène a été effectuée à partir de deux sources alimentaires locales, le concentré de tomate, qui est un produit local de la marque CAB Amor Ben Amor et la pastèque de la variété, *Citrullus lanatus* achetée au marché de Mostaganem en mois de juillet 2020.

II.2 Extraction et purification du lycopène

II.2.1 Extraction à partir de la tomate concentrée

Afin d'hydrater le concentré de tomate, 100 g sont dilués dans 100 mL d'acétone. Le mélange est agité pendant 10 minutes puis filtrer avec un papier filtre whatmen N°1. 100 mL d'un mélange de solvant éther de pétrole-Hexane-dichlorométhane (2 :1 :1 v/v/) est ensuite ajouté à cette pâte (Periago et al., 2004), le tout est agité pendant 15 min, puis additionné de quelques grammes d'agent hydratant Sulfate de magnésium (MgSO₄). Après filtration de la suspension épaisse, le filtrat récupéré est de couleur rouge-orange correspondant à l'oléorésine de caroténoïde (fig. 05).

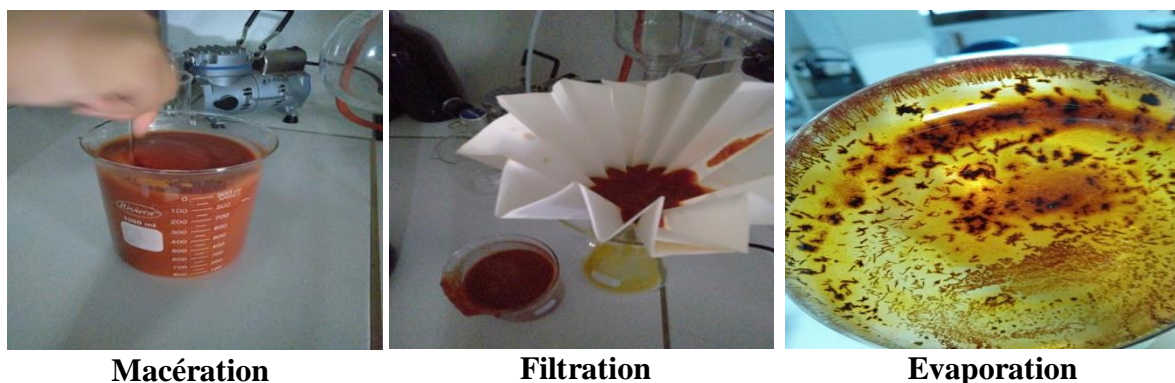


Fig.4.: Les étapes de l'extraction du lycopène à partir de concentré de tomate (**Photo originale**).

II.2.1.1 Purification du lycopène par la méthode de cristallisation

L'oléorésine obtenue est évaporé à 50°C, 5 ml de DMSO ont été additionnés sous agitation comme anti-solvant. Les cristaux de lycopène brut apparaissent immédiatement, puis on ajoute 10 ml d'éthanol à 96% de pureté pour faciliter la précipitation. Les cristaux sont récupérés par centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min, lavés deux fois avec l'éthanol (96%) et séchés pendant une nuit à une température de 40 °C (Hamed et al., 2022). Par la suite, les cristaux obtenus ont été caractérisés par diverses méthodes analytiques.

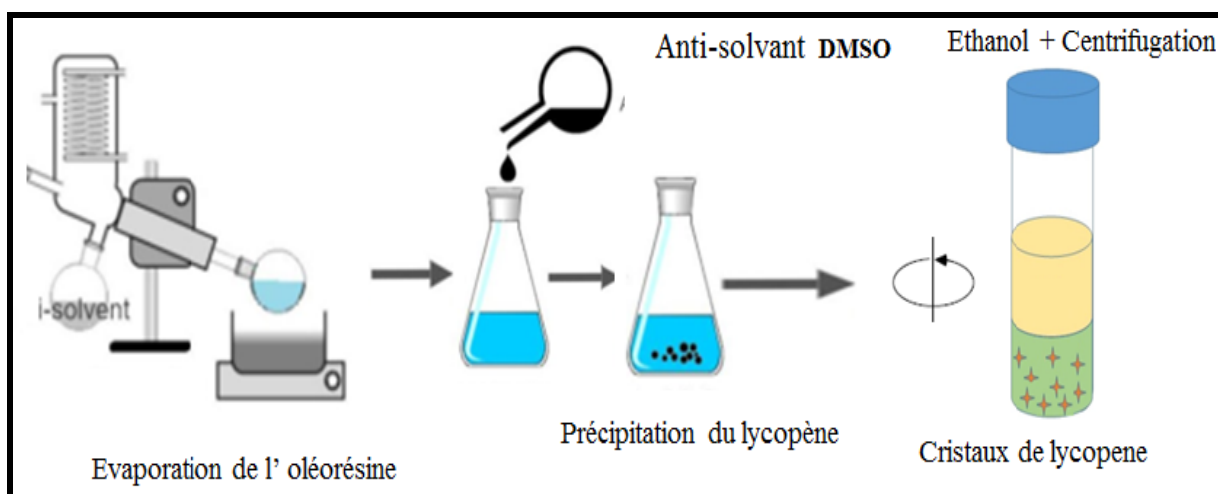


Fig.5. : Purification du lycopène par la méthode de cristallisation par l'utilisation de l'antisolvant DMSO (originale).

II.2.2 Extraction à partir de pastèque

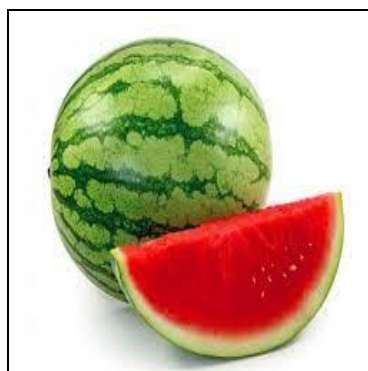
Après l'achat, les fruits de la pastèque étaient immédiatement transportés au laboratoire, la récupération de jus de pastèque a été effectuée en plusieurs étapes. Les fruits mûrs de la pastèque ont été lavés avec de l'eau pour enlever les saletés lourdes, puis relavés aux 1/10 chlorure de sodium 2% diluée pendant 20 min, suivi par un rinçage à l'eau distillée. Le lavage du fruit est succédé par une opération du peeling qui consiste à enlever la peau recouvrant le fruit avec un couteau de cuisine (inox acier) et toute la chair extérieure blanche recouvrant le rouge chair (comestible), ainsi que les pépins noirs. Cette chair rouge récupérée, a été coupée en petits morceaux et mixée, afin d'extraire le maximum de jus, qui est filtré par la suite et conservé à -20 C°. L'extraction du lycopène à partir de jus de pastèque est réalisée selon le protocole de [Dhuique-Mayer et al. \(2007\)](#) avec quelques modifications. Dans un tube

de centrifugeuse d'un volume de 15 cm³, On met un mélange de jus de pastèque et d'acétone (v/v), ensuite, on centrifuge le mélange à 3000 tr/min pendant 15 min. Le culot rouge correspond au lycopène. Le culot est rincé par l'éthanol à raison de 96% deux fois de suite, le lycopène humide obtenu est récupéré et séché pendant une nuit à l'étuve à une température de 40°C (fig.06).

II.2. 3 Le rendement de l'extraction

Le rendement d'extraction est déterminé entre la masse de lycopène extrait (M₁) et la masse de la matière première végétale traitée (M₀). Le rendement est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

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



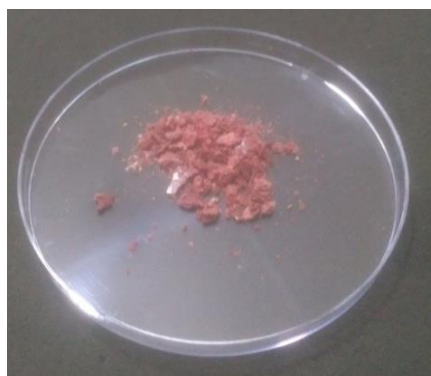
1- *Citrullus lanatus*



2- Broyage



3- Mélange jus /acétone (v/v)
séparation par Centrifugation



4-Lycopène siché à 40 C°

Fig.6. Les différentes étapes de l'extraction du lycopène à partir de la pastèque (Photo originale).

II. 3. Caractérisation chimique du lycopène purifié

Afin de confirmer la validation des méthodes d'extraction utilisées dans cette étude et la pureté du lycopène extrait à partir des deux sources, tomate concentrée et pastèque, plusieurs tests ont été effectués.

II.3.1. Diffraction des rayons X (DRX)

Deux échantillons de lycopène purifié et lycopène standard (Sigma-Aldrich), ont été étudiés à l'aide d'un diffractomètre à rayons X Shimadzu (DRX) à température ambiante. Le site angle de balayage allant de 5° à 50° (2θ); mode de balayage utilisant le rayonnement $\text{CuK}\alpha$ filtré à travers le nickel a été utilisé avec une tension électrique de 30 kV et une intensité de courant électrique de 30,0 mA à une vitesse de balayage de 4°/min (Divya et al., 2011).

II.3.2. Caractérisation par UV- VIS

Les spectres UV-Vis du lycopène purifié ont été déterminés dans deux solvants organiques, le n-hexane et le toluène, avec une plage de balayage de 200 à 600 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis Jenway 6800.

II.3.3. Caractérisation par CCM

La chromatographie sur couche mince est une méthode d'analyse qualitative. Cette méthode a été utilisée pour confirmer la pureté du lycopène extrait. La CCM a été réalisée selon Baldermann et al., (2008) avec 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 chaque solution (lycopène purifié, standard et oléorésine) déposé successivement sur le point de la ligne de dépôt de la plaque, après séchage des dépôts, la plaque est introduite dans la cuve contenant l'éluant composé d'éther de pétrole-hexane et acétone.

II.3.4. Analyse par spectroscopie IR à transformée de Fourier (FTIR)

La spectrophotométrie infrarouge a été utilisée pour identifier et caractériser la molécule de lycopène purifiée. Pour ce faire, le lycopène standard et le lycopène purifié sont dissous dans le dichlorométhane. Une goutte de cette solution est déposée à la surface de la cellule de la spectroscopie infrarouge (SHIMADZU), qui est directement analysée (López-Cervantes et al., 2014).

II.3.5. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'analyse par HPLC permet d'identifier et de confirmer la pureté des cristaux de lycopène. Le système HPLC (SHIMADZU) est composé d'un détecteur à (PDA-UV/Vis) et d'un injecteur automatique. Le Système est contrôlé avec le logiciel de chromatographie Labsolutions, la colonne chromatographique analytique non polaire C-18 "A Discovery BIO Wide Colonne C18 "Pore", 25cm×4.6mm, taille des particules 5µM, est utilisée comme phase stationnaire pour la séparation et la détermination des molécules de lycopène hydrophobe non polaire. L'analyse est effectuée de manière isocratique à un débit de 1mL / min pendant 10 min à 22 °C. La phase mobile est un mélange de solvants composé d'acetonitrile – Dichlorométhane- méthanol (55 :35 :10 v /v)(Priam et al., 2017), le volume d'injection est de 20µl dans la boucle. Le lycopène a été détecté à une longueur d'onde de 480 nm.

II.4. Optimisation de purification du lycopène selon le plan expérimental Box-Behnken :

L'optimisation des conditions de purification par la méthode de cristallisation du lycopène extrait du concentré de tomate, a été réalisée à l'aide d'un Box-Behnken (BBD). Le but de cette expérience est de déterminer les meilleures conditions pour maximiser le rendement du lycopène pur. Trois paramètres principaux ont été choisis pour modéliser la cristallisation, ces paramètres ont un effet direct sur l'optimisation de la réponse : A : le volume du filtrat correspondant à l'oléorésine de caroténoïde (ml), B : la température d'évaporation du filtrat (°C) et C : le volume du DMSO (ml) ajouté comme anti-solvant pour la formation des cristaux.

La relation entre les variables et la réponse a été modélisée par une équation polynomiale. L'identification des meilleures conditions de la purification a été faite en termes de rendement le plus élevé. Les valeurs des variables indépendantes ont été codées à trois niveaux : -1, 0, +1 (Tab. 04) (Box & Behnken, 1960) . En outre, au total 15 expériences ont été menées avec 3 répétitions au point central (Tab. 05). L'évaluation de l'analyse statistique de Box-Behnken a été effectuée par le progiciel Design- Expert® version 11. L'analyse statistique, les effets des variables et leurs interactions, ont été évalués par une analyse ANOVA. Les différences ont été considérées comme significatives à un niveau de confiance supérieur à 95 % ($p < 0,05$). La précision de l'ajustement du modèle a été évaluée en analysant le coefficient de régression (R^2). Le BBD était une conception idéale pour la méthodologie de surface de réponse parce qu'il exige moins d'expériences, moins de temps et moins de coût pour construire l'équation du modèle (Nam et al., 2017). De plus, un modèle de régression de

second ordre a été utilisé pour trouver l'association fonctionnelle entre les variables indépendantes et la réponse, comme le montre l'équation (1) :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A_1 + \beta_2 B_2 + \beta_3 C_3 + \beta_{12} A_1 B_2 + \beta_{13} A_1 C_3 + \beta_{23} B_2 C_3 + \beta_{11} A_1^2 + \beta_{22} B_2^2 + \beta_{33} C_3^2 + \varepsilon \quad (1)$$

Tableau 04 : Facteurs et leurs niveaux dans les conceptions RSM

Les variables indépendantes	Code des niveaux			
	Symbol	+1	0	-1
Volume de filtrat correspond au caroténoïde (mL).	A	20	30	40
La température d'évaporation (C°).	B	0	25	50
Le volume de DMSO (mL).	C	3	5	7

Tableau 05 : Conception de la matrice CCD et rendement en lycopène mesuré dans différentes conditions expérimentales et réponses prévues.

	Facteur 1		Facteur 2		Facteur 3		Réponse	Réponse prédite
Std	Run	A : V Filtrat	B : T évaporation	C : V DMSO	Y Lycopène	Y Lycopène		
		ml	°C	ml	mg/g	mg/g		
3	1	20	50	5	2,73	2,7200		
10	2	30	50	3	1,69	1,6825		
15	3	30	25	5	2,3	2,2900		
2	4	40	0	5	1,4	1,4100		
8	5	40	25	7	1,29	1,2725		
5	6	20	25	3	1,44	1,4575		
11	7	30	0	7	0,78	0,7875		
1	8	20	0	5	1,63	1,6150		
9	9	30	0	3	0,54	0,5375		
14	10	30	25	5	2,29	2,2900		
4	11	40	50	5	2,31	2,3250		
7	12	30	50	7	1,66	1,6625		
11	13	20	25	7	1,45	1,4575		
6	14	40	25	3	1,05	1,0425		
13	15	30	25	5	2,28	2,2900		

II.5. Solubilité du lycopène dans certaines huiles essentielles

La solubilité du lycopène a été testée dans trois huiles essentielles différentes et une huile végétale : *Anethum graveolens*, *Amm ivisnaga.L*, huile essentielle d'oranges et huile végétale de son de riz. 10,0 mg de poudre de lycopène ont été solubilisés en ajoutant 0,5 à 2 ml des huiles testées. Les différentes préparations ont été mélangées par vortex pendant 5 à 10 minutes. Cette procédure a été répétée jusqu'à ce que le lycopène soit complètement dissous. Les tubes ont été pesés pour obtenir le poids exact des huiles ajoutées. La solubilité a été exprimée en mg de lycopène et par g d'huile (Okonogi & Riangjanapatee, 2015). Toutes les valeurs sont exprimées comme la moyenne de trois essais \pm écart type. L'huile essentielle qui va fournir la meilleure solubilité du lycopène sera sélectionnée pour des études ultérieures.

II.6. Encapsulation du lycopène par coacervation complexe alginate de sodium et agar agar

Les alginates ont des propriétés remarquables qui leurs permettent de former des gels, des sphères ou encore des micro ou nanoparticules en raison de leur capacité à agir comme un agent réticulent. Ils sont également utilisés en raison de leur caractéristiques biocompatibles, biodégradables et non toxiques (Oliveira et al., 2014).

Le protocole de coacervation est une adaptation selon le protocole d'Ollagnier et al. (2014) avec des modifications. Pour immobiliser le lycopène sous forme de billes de gel, l'extrait de lycopène a été mélangé avec une solution d'alginate de sodium. 150 mL de solution d'alginate de sodium à 4% (p / v) a été préparée avec de l'eau distillée et la solution a été mélangée doucement pour obtenir l'homogénéité et éradiquer les bulles d'air qui peuvent être piégées dans les billes. Quand cela a été accompli, la solution d'alginate a été ajoutée à l'extrait de lycopène dans un rapport 1 : 1 (v / v) pour obtenir une concentration finale en alginate de 2% (p / v). La solution a été remoulue sous agitation magnétique pendant 20 à 30 min jusqu'à ce que le lycopène soit émulsionné et paraissait crémeux. Un autre polymère améliorant l'agrégation, l'agar agar, a été ajouté par la suite à la composition d'alginate améliorée. Cela implique l'ajout d'une solution d'agar à 1% (p / v) dans l'eau distillée à 80 ° C, cela permet d'obtenir un mélange 1: 1: 1 (v / v) de lycopène-alginate-agar. Les tests pour former des billes ont été effectués à l'aide d'une seringue avec un hypodermique de calibre 18 aiguille. Pour la production des billes, on effectue une injection du mélange de fluides lycopène-alginate-agar dans 0,2 M de la solution de chlorure de calcium (CaCl₂) à température ambiante (20 ° C) en contrôlant la vitesse. Les diamètres des perles ont été mesurés avec une échelle. Des agitateurs magnétiques ont été utilisés dans la solution gélifiante pour empêcher les billes de coller ensemble. Les billes ont été imprégnés dans la solution de CaCl₂ pendant 30 minutes pour durcir. La récupération des billes a été faite par filtration et lavage à l'eau désionisée (fig.07).

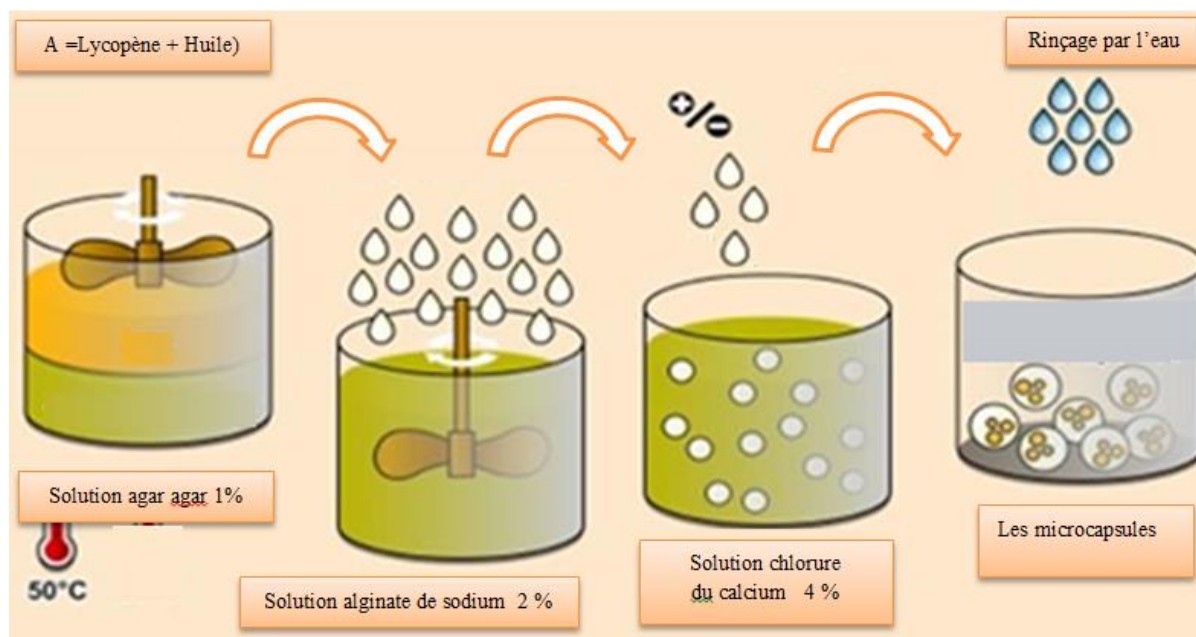


Fig.7. Représentation schématique du procédé de coacervation complexe utilisant de l'alginate de sodium et de l'agar agar comme polymères.

II.7. Activité biologique du lycopène *in vitro*

II.7.1. L'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 à réduire le radical chimique DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violette à une couleur jaune (fig.08), 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.

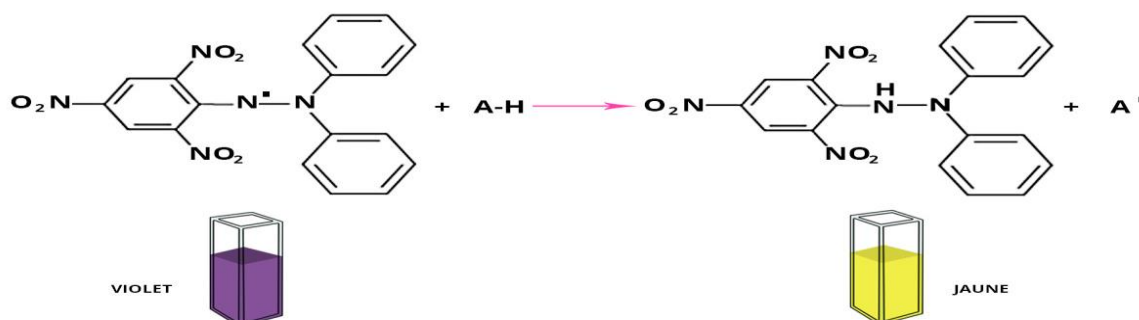


Fig.8. Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant (Cillard, 2006)

L'activité de piégeage des radicaux libres du lycopène purifiée a été évaluée en utilisant la méthode développée par (Brand-Williams et al., 1995 ; Maataoui et al., 2006) avec des modifications. L'acide ascorbique, a été utilisé comme antioxydant de référence. Comme le lycopène est insoluble dans l'éthanol pur, les solutions de DPPH (10^{-3} M), de lycopène et de standards ont été diluées de manière appropriée avec un mélange éthanol et dichlorométhane (1 :2, v/v). Une série de dilutions a été préparée aux différentes concentrations (5,05 ; 12,6 ; 25,2 ; 50,5 ; 75,3 ; 125,6 ; 187,5 ; 250 mg. L⁻¹). Un Volume de 100 µL de chaque dilution est dissout dans 2,5 mL de solution de DPPH (0.16 mmol/mL), Après 30 min d'incubation à l'abri de la lumière, l'absorbance à 517 nm a été lue sur un spectrophotomètre Jenway 6715 UV10. L'activité de piégeage des radicaux libres a été déterminée en mesurant le pourcentage d'inhibition de l'absorbance du DPPH par les antioxydants. La CE50, qui est la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire la concentration initiale de DPPH de 50 %, a donc été calculée pour chaque échantillon.

II.7.2. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne du lycopène a été étudiée par peu de chercheurs suite à la difficulté de sa diffusion dans la gélose. Dans ce travail, nous avons non seulement, essayé d'améliorer leur solubilité mais aussi d'améliorer leur activité antimicrobienne par l'étude de l'effet synergétique du lycopène avec l'huile essentielle *d'Ammi visnaga L.*

II.7.2.1. Effet synergique antimicrobien entre le lycopène et l'huile essentielle *d'Ammi visnaga*

II.7.2.1.1. Microorganismes utilisés

L'effet synergétique de l'activité antibactérienne entre le lycopène et l'huile essentiel *d'Ammi visnaga L* a été évalué en testant deux bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* (ATCC 33862), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), et trois bactéries Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et une levure *Candida albicans* (ATCC10231). Toutes les souches utilisées ont été fournies par l'institut pasteur, Algérie. La levure et les souches bactériennes ont été maintenues sur des géloses favorables à leur croissance, sabouraud et gélose nutritive, respectivement, pendant 24 h à 37 °C.

II.7.2.1.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du lycopène et de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*. L

Pour la détermination de la CMI individuelle du lycopène et de l'huile essentielle contre les souches bactériennes sélectionnées, on a utilisé la méthode du microdilution (Sharma et al., 2020). Les solutions mères de l'huile essentielle et du lycopène ont été préparées en les dissolvants dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et tween 40 à 1% respectivement dans le rapport 1 :1 (v/v). Les solutions mères sont diluées par progression géométrique de façon à obtenir les dilutions suivantes : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128. La gamme de concentrations finales d'huile essentielle utilisée va de 0.83 à 13,35 µg/ml et du lycopène de 500 µg/ml à 15,62 µg/ml. Un volume final de 200 µl dans chaque puits de microplaque contenant 90 µl de MHB (Bouillon Mueller Hinton) et 10 µl de la suspension microbienne de 10⁶ UFC/ ml complété par 100 µl de chaque dilution de lycopène ou de l'huile essentielle. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour la levure.

La détection de croissance des différents germes se fait par l'ajout d'un indicateur de couleur p-iodonitrotétrazolium violet (INT) (0,04%) juste avant la lecture. 40 µl sont versés dans tous les puits, et incubés durant 30 min à 37°C. Une couleur rose apparaît suite à la croissance bactérienne.

II.7.2.1.3 L'évaluation des activités antimicrobiennes de la combinaison du lycopène et l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*. L (Méthode de Checkerboard)

Le lycopène est trop soluble dans l'huile essentielle (H.E) d'*Ammi visnaga*, cette solubilité facilite la combinaison entre Lycopène et l'huile essentielle. Pour étudier les interactions entre les deux substances, la méthode de dilution par microplaque a été utilisée (Sharma et al., 2020). A partir de la double concentration de CMI du lycopène seul et double concentration de la CMI de H.E seul, une série de dilution a été préparée et combinée dans un rapport de 1 :1 (v/v) avec 50 µL de différentes dilutions H.E allant de 1/16 MIC à 1/2 MIC, de même pour l'interaction H.E et lycopène. Les tubes ont ensuite été incubés à 37 °C pendant 24 h. La révélation de couleur se fait par INT. L'index de concentration inhibitrice fractionnaire (FIC) détermine la nature de l'interaction entre lycopène et l'huile essentielle (Pei et al., 2009 ; Sharma et al., 2020),

FIC de lycopène = CMI du lycopène en combinaison avec H.E / CMI du lycopène seul

FIC de l'huile = CMI de l'huile en combinaison avec lycopène/ CMI de l'huile seul (Pei et al.,

2009

FICI= FIC de lycopène +FIC de l'huile.

FICI \leq 0.5 Synergie totale ; 0.5 < FICI \leq 0.75 Synergie partielle ; 0.75 < FICI \leq 2 Aucun effet ; FICI > 2 Antagonisme (Sharma et al., 2020).

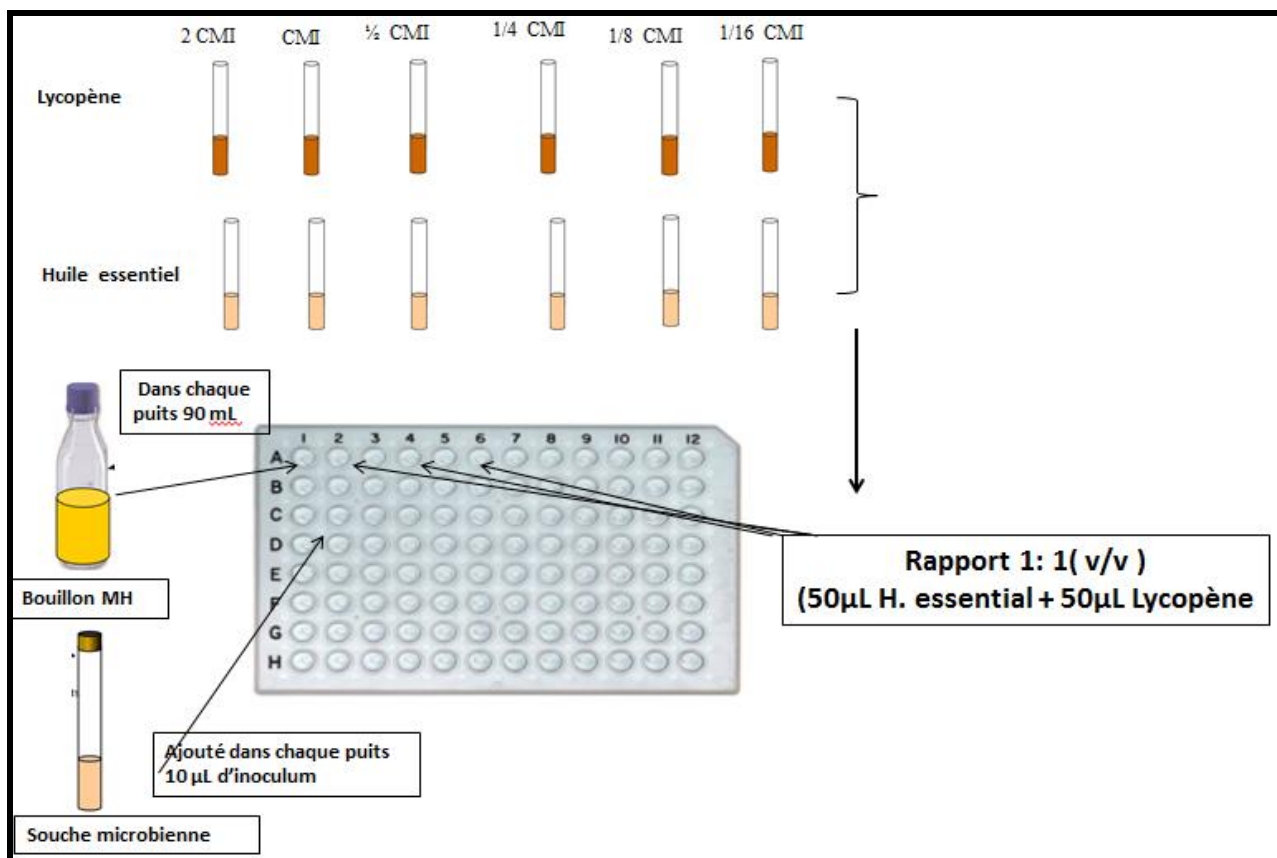


Fig.9. Activités antimicrobiennes de la combinaison du lycopène et l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* .L (Méthode de Checkerboard) .

II.8. Activité biologique du lycopène *in vivo* :

Cette partie a été consacrée à l'exploration de l'effet thérapeutique *in vivo* du lycopène sur la prostatite chronique. La pathologie a été provoquée chez le modèle animal par instillation de bactérie pathogène, *staphylococcus aureus*, responsable des infections urinaires fréquentes chez l'homme, L'effet thérapeutique du lycopène a été comparé avec l'antibiotique recommandé dans cette pathologie.

II.8.1 Origine de la souche utilisée

La souche utilisée dans cette expérimentation, est une souche pathogène *staphylococcus aureus*. Cette souche est isolée par une spermoculture d'un patient atteint d'une prostatite chronique qui provient du laboratoire clinique privé, Mostaganem. Cette souche a été identifiée par le VITEK[®] automatisé.

II.8.2. Les rats d'expérimentation et conditions d'élevage

Vingt-neuf rats mâles *Wistar albinos* conventionnels, dont le poids varie entre 150 et 250 g, ont été utilisés dans le protocole *in vivo*. Ces animaux ont été fournis par le service d'animalerie de l'institut pasteur d'Alger.

Les rats males sont maintenus dans des cages métaboliques et divisés en lot de 6 par cage d'une surface de sol de 180 cm² et une hauteur de 12 cm. Ces cages sont mises dans une chambre à environnement contrôlé (12h de lumière et 12h d'obscurité, température 22 ± 2 °C, humidité 56 ± 5%). Les rats sont nourris *ad libitum* avec de l'eau stérilisée et un aliment standard fourni par l'institut Pasteur.

II.8.3. Antibiogramme de *staphylococcus aureus*

La sensibilité de *staphylococcus aureus* isolée aux antibiotiques a été évaluée par la méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé (NCCLS, 1997). Un volume de 100 µl de suspension microbienne standardisée à 10⁸ UFC/ml (Haddouchi et al., 2009) a étéensemencé par étalement sur un milieu de culture gélosé Mueller Hinton. Des disques d'antibiotique standard ont été déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface du milieu. Les boîtes de Pétri ont été fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 1H. Elles ont été par la suite portées à incubation à 37°C pendant 24H.

La lecture des résultats a été faite par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée. Les différents antibiotiques testés contre les bactéries sont listés dans le [tableau 06](#).

Tableau 06. Liste des antibiotiques utilisés

Antibiotique	Sigle	Charge du disque
Pénicilline 10	P ₁₀	10 µg
Amoxicilline 25	AMX ₂₅	25 µg
Gentamicine 10	GEN ¹⁰	10 µg
Cephalexin 25	CEP ₂₅	25 µg
Polymyxine B 100	PB ₁₀₀	100 UI
Acide nalidixique	NA ₃₀	30 µg
Ampicilline	AMP	10 µg
Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	SXT ₂₅	25 µg
Doxycycline 30	DXT ₃₀	30 µg
Pipéracilline 30	PRL ₃₀	30 µg
Oxacilline 5	OX ₅	5 µg
Erythromycine 15	E ₁₅	15 µg

II.8.4 Modèle de prostatite bactérienne chronique (CBP)

II.8.4.1 Préparation de la suspension bactérienne

La souche *staphylococcus aureus* a été incubée pendant 18 h dans un Bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) dans un incubateur à 37°C. Les cellules *staphylococcus aureus* ont été centrifugées, lavées trois fois et remises en suspension dans l'eau physiologie. Par la suite, la suspension bactérienne subit des dilutions par l'eau physiologie stérile afin d'ajuster la densité optique de 0,08 à 0,10 lue à la longueur d'onde de 625 nm qui correspond à 10⁸ UFC/ml (Kishore et al., 2005).

II.8.4.2. Provocation de la prostatite (CBP Modèle) chez les rats *wistar*

La mise au point du modèle CBP de rat a été effectuée selon [Han et al. \(2008\)](#). Les rats males ont été anesthésiés par une injection intramusculaire de la kétamine (50 mg/kg) ([fig. 09](#)) et la zone génitale a été nettoyée avec de l'alcool à 70%. Ensuite, un tube stérile en polyéthylène (diamètre extérieur de 0,9 mm, 2,5 cm de longueur) a été inséré dans l'urètre. À l'aide d'une seringue à insuline, 0,2 ml de la suspension de *staphylococcus aureus* contenant 1×10^8 (UFC /mL) ont été injectée dans l'urètre prostatique. L'anesthésie a été maintenue pendant 1 h afin d'éviter toute fuite d'urine due au mouvement des rats, ce qui a permis aux bactéries d'atteindre et d'envahir la prostate.



Fig.10. Les différentes étapes de l'instillation de *S. aureus*.

Après quatre semaines, des prélèvements des échantillons des urines et des spermes chez les rats infectés par la souche *staphylococcus aureus* ont été effectués pour sélectionner les animaux positifs dont la CBP a été bien installée

II.8.4.3. Prélèvement et analyse microbiologique du sperme.

Le prélèvement de spermes chez les rats a été réalisé selon le protocole de [Zambelli et al. \(2007\)](#), qui consiste à provoquer une éjaculation induite pharmacologiquement par α -adénorécepteurs épидидymaires responsables de la contraction du canal déférent, du trigone et des sphincters urinaires, suite à leur stimulation. Après injection de médétomidine aux rats à la dose de 140 μ g/Kg, le prélèvement a été réalisé à l'aide d'un cathéter pédiatrique urétral (un tube stérile en polyéthylène de diamètre extérieur de 0,9 mm, 2,5 cm de longueur, sectionné dans sa partie distale) ([figure 09](#)), Le cathéter utilisé est vidé sous la pression de l'air à l'aide d'une seringue, le sperme est récolté dans un tube Eppendorff stérile. C'est la méthode la plus simple et la plus rapide. Sur 29 prélèvements réalisés dans l'étude, trois rats n'ont pas réussi à éjaculer.

Pour chaque rat, une goutte de sperme a été étalée directement sur la lame et préparée pour la coloration de May-Grünwald Giemsa qui confirme la présence ou l'absence de leucocyte (Ameret al., 2001). Pour mettre en évidence la présence des *staphylococcus aureus* dans les échantillons de spermes, une spermoculture a été effectuée, environ 10 µL de sperme sont ensemencés sur la gélose à base de sang. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

Un nombre élevé de leucocyte, une présence de *staphylococcus aureus* dans le sperme et l'urine révèlent une CBP positive. Les rats développant une prostatite bactérienne chronique sont sélectionnés pour la suite du travail, contrairement des rats qui n'ont pas eu une prolifération de la souche pathogène *Staphylococcus aureus* seront exclus du protocole expérimental.

II.8.4.3.1. La coloration de May-Grünwald Giemsa

La coloration de May-Grünwald Giemsa, parfois également appelée coloration de Pappenheim est une méthode de coloration utilisée notamment en hématologie pour différencier les cellules du sang lors des préparations cellulaires (cytologie).

Principe de la coloration :

Il repose sur l'action combinée de deux colorants neutres :

- Le **May-Grünwald**, contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène.
- Le **Giemsa**, contenant lui aussi de l'éosine, et un colorant basique, l'azur de méthylène

Ces deux colorants sont en solution dans l'alcool méthylique sous forme inactive. Lors de l'addition d'eau, les sels précipitent (éosinate de méthylène et azur de méthylène) et se fixent sélectivement sur les constituants cellulaires.

Mode opératoire :

Sur un frottis de sperme, séché à l'air libre et fixé par l'alcool pendant 1h, faire couler 15 à 20 gouttes de colorant May-Grünwald de façon à recouvrir totalement la lame. Attendre 2 à 3 minutes pour que le méthanol fixe les cellules.

Diluer le Giemsa immédiatement avant l'utilisation en mettant 20 ml d'eau neutre avec 30 gouttes de colorant dans une éprouvette. Verser le contenu dans une boîte de Laveran dès que la lame est prête et mélanger en agitant doucement (le pouvoir du colorant est maximal au

moment du mélange). Poser la lame, face frottis vers le fond de la boîte de Laveran. Laisser agir 20 min. et rincer à l'eau distillée.

II.8.4.3. Prélèvement et analyse microbiologique des urines

a) Prélèvement

La collecte des urines se fait par une expulsion volontaire durant la manipulation des rats. Pour la qualité des échantillons obtenus exempts de contamination et de volume suffisant, l'urine a été recueillie aseptiquement dans la zone stérile du bec Bunsen dans une boîte de pétri stérile. L'échantillon d'urine a fait l'objet d'une analyse quantitative bactérienne.

b) Uroculture

50 µl de l'échantillon d'urine de chaque rat a été introduit dans 450 µl d'eau physiologie stérile. Une série de dilutions (10^{-1} , 10^{-2} 10^{-12}) a été effectuée. Pour la réalisation de ce protocole, chaque boîte contenant gélose au sang est divisée en 3 parties ; à l'aide d'une micropipette, on dépose 3 spots (10 µl) d'une dilution dans chaque partie et on incube les boîtes à 37°C (Guiraud, 2003). Après incubation de 24 h, les colonies sont dénombrées. Le résultat est exprimé par le nombre UFC / mL selon la formule suivante :

$N = \Sigma n \text{ colonies} \cdot 1000 \mu\text{l} / 30 \mu\text{l}$: nombre de colonies comptées ;

N : unité formant Colonies (UFC).

II.8.5. Groupes expérimentaux et traitements

20 rats de modèle CBP positif ont été répartis aléatoirement en 4 groupes, chaque groupe contient 5 individus et le cinquième groupe représente le témoin négatif qui contient des rats sains (absence de CBP) (Fig.10).

- Groupe (1) Témoins positif : les rats reçoivent 1 ml d'eau physiologique par voie orale
- Groupe (2) : Animaux traités par lycopène seul (10 mg / kg par poids corporel). Le lycopène extrait de pastèque a été dilué dans 1 ml de tween 40 à 10 % et administré par voie orale à l'aide d'une sonde de gavage, deux fois par jour pendant 2 semaines.
- Groupe (3) : Animaux Traités par l'antibiotique de céfalexine, 2,5 mg / kg par poids corporel. Il a été dilué dans 1 ml d'eau distillée et administré par voie orale à l'aide d'une sonde de gavage, deux fois par jour pendant 2 semaines.

- Groupe (4) : Animaux Traités par lycopène / l'antibiotique de céfalexine (10 mg / kg par poids corporel du lycopène et 2,5 mg / kg de poids corporel de céfalexine). Le traitement a été administré par voie orale à l'aide d'une sonde de gavage, deux fois par jour pendant 2 semaines.
- Groupe (5) Témoin Négatif, rats sains (absence de CBP).

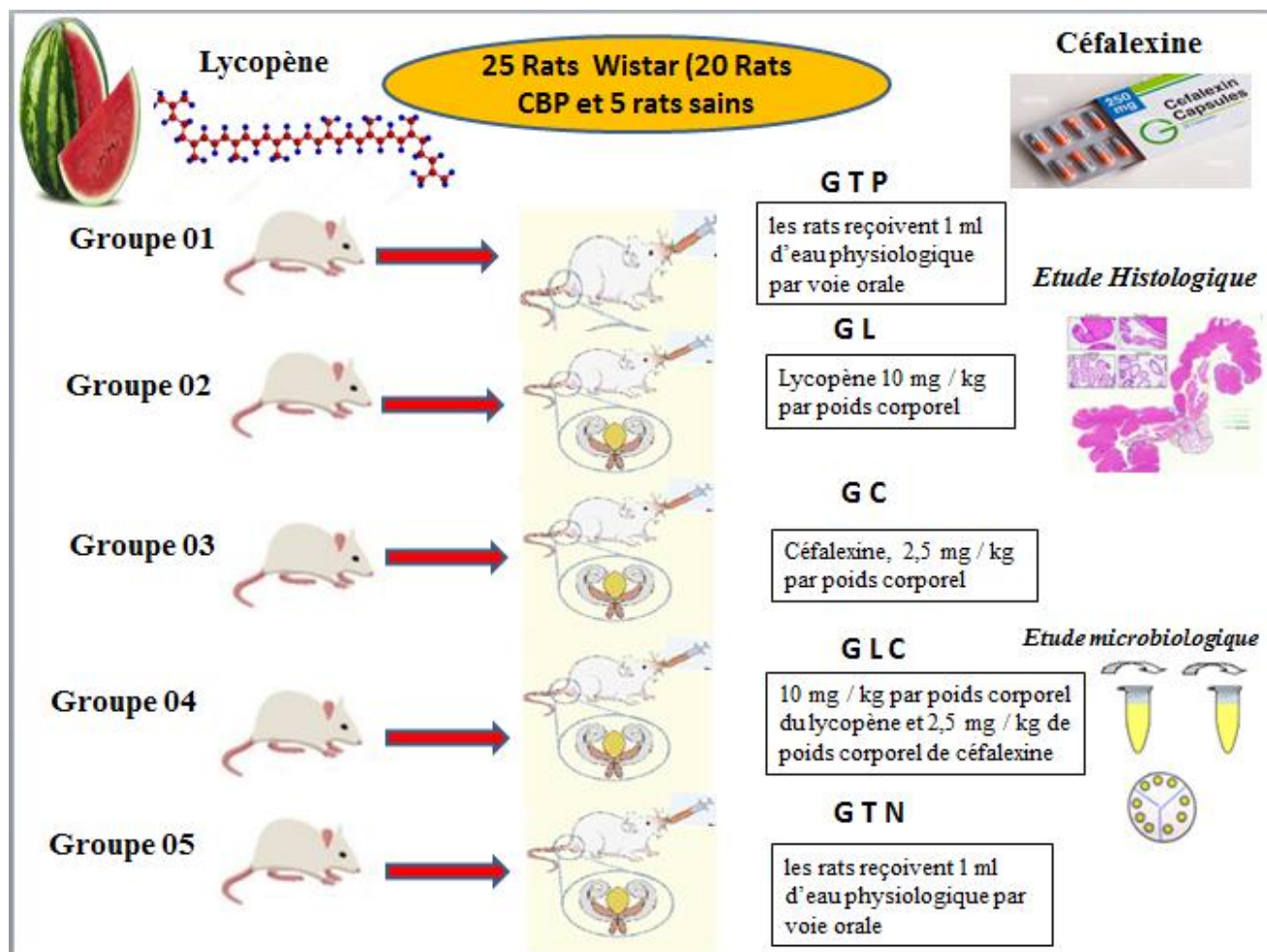


Fig.11. Schéma récapitulatif du protocole expérimental (Groupes et traitements).

II.8.6. Sacrifice des animaux, analyses microbiologiques et histologique

A la fin de la période du traitement, les rats ont été mis sous le jeun pendant une nuit. Le jour qui suit, des prélèvements des urines ont été réalisés pour chaque animal de chaque groupe dans des conditions aseptiques. Les échantillons des urines recueillis ont fait l'objet d'une uroculture afin de dénombrer les bactéries existantes.

Les rats pesés ont été maintenus sous une légère anesthésie de chloroforme avant d'être sacrifiés, Les échantillons de sang ont été obtenus par ponction cardiaque et recueillis dans des tubes secs pour l'analyse de PSA (Antigène Prostatique Spécifique), tandis que les prostates ont été excisées avec soin et la capsule prostatique a été soigneusement récupérée pour obtenir uniquement les glandes prostatiques. Une partie du tissu prostatique de chaque rat a été coupé et soniqué pendant 10 minutes dans 10 ml d'eau PBS dans les conditions aseptique. Par la suite, le tissu soniqué subit une série de dilution pour réaliser le dénombrement.

Des échantillons aléatoires de la prostate ventrale de chaque groupe ont été fixés dans du formol tamponné à 10 % pour évaluer l'étude histologique.

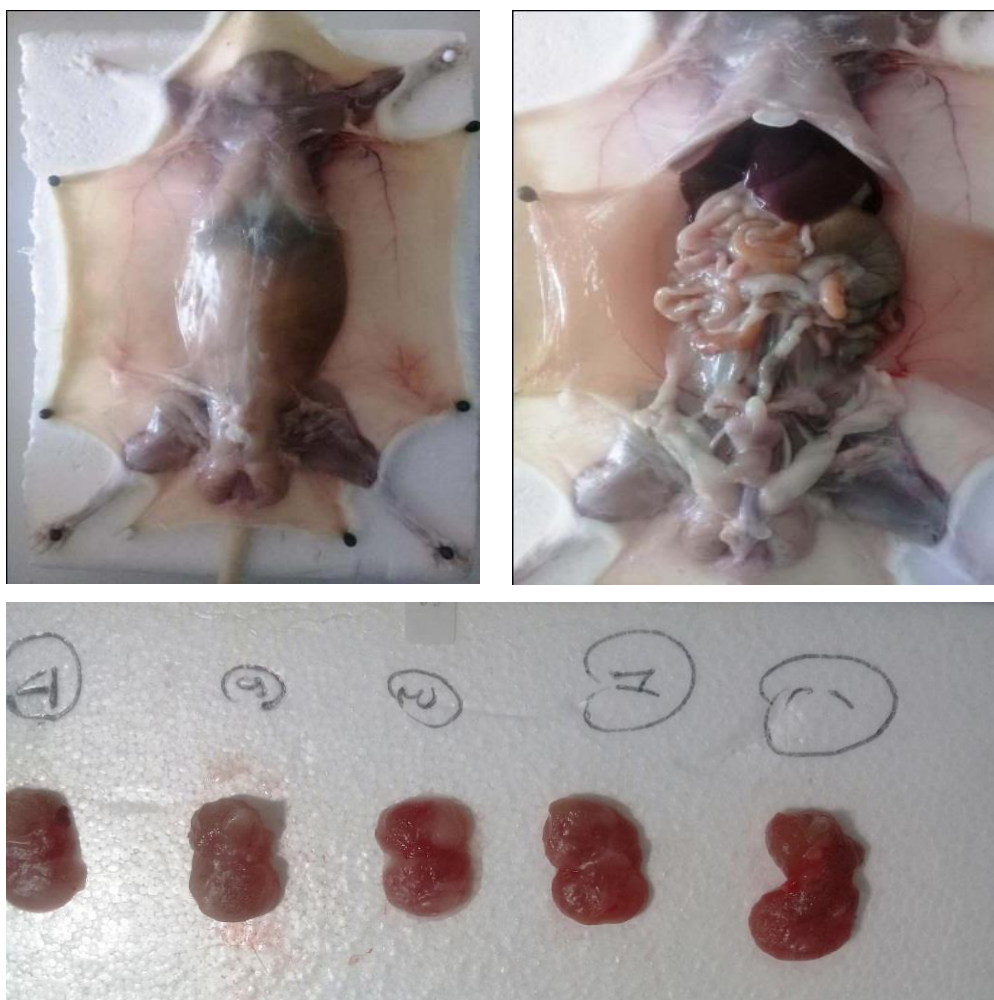


Fig.12. Sacrifice des rats avec isolation de la glande prostatique.

II.8.7. Etude histopathologique

L'étude histologique a été réalisée au niveau du laboratoire d'anatomo-pathologie de l'institut Supérieur vétérinaire de Tiaret suivant le protocole de [Drury et Wallington \(1980\)](#) ; ou nous avons suivie rigoureusement les différentes étapes classiques de l'histologie à savoir : l'inclusion, la déshydratation, l'imprégnation suivie d'une inclusion dans la paraffine pure ; ensuite une coloration par la méthode (HE) suivie d'un montage sur lame et lecture à l'aide d'un microscope optique.

II.8.7.1 La fixation

La fixation des tissus doit se faire dans les minutes qui suivent le prélèvement, par immersion de la pièce dans la solution saline. Dans notre cas, les organes sont fixés dans du bouin. Cette technique nous a permis de conserver nos pièces pendant plusieurs semaines. Il est recommandé de placer un échantillon par cassette. Les cassettes sont plongées 1h au minimum dans une solution de formol à 10% (V/V) représentant 10 fois celui du prélèvement.

II.8.7.2. Déshydratation

La déshydratation permet l'élimination d'eau d'organes en les plongeant dans l'alcool pendant un temps suffisant à degré croissant : alcool à 70° (acétone I) pendant 45 minutes, alcool 90° pendant 45 minutes et alcool absolu 100° pendant 45 minutes. Toutes les réactions ont lieu dans des bacs fermés hermétiquement dans un lieu bien aéré ou sous haute aspirante à une température ambiante sauf le paraffinage à 56 C° ensuite les blocs sont refroidis au congélateur.

II.8.7.3. Clarification

L'agent déshydratant étant rarement miscible avec le milieu, durant cette étape le tissu devient transparent, d'où le non de l'opération. Un mauvais éclaircissement donne des blocs consistance hétérogène, des rétractions ou distorsions excessives. Cette étape comporte deux bains successifs de toluène ,30 minutes pour chaque bain.

II.8.7.4. Imprégnation

La pièce est placée dans le milieu d'inclusion qui pénètre dans toutes les cellules, imprégnations successives puis inclusions dans la paraffine pure (55 °C à 57 °C).

II.8.7.5. La microtomie

On récupère les cassettes congelées pour réaliser des coupes de 3 à 5 μm à l'aide d'un microtome (Leica, Allemagne) que l'on étale sur des lames propres avant de les déparaffiner par 2 bains successifs de 10 min dans du xylène. Ensuite, on procède à la réhydratation qui consiste à éliminer le xylène pour le remplacer par l'eau. Pour ce faire, les lames sont passées 2 min dans 2 bains successifs d'alcool éthylique de degré décroissant (100, 95, 90 et 70°). Le dernier bain est suivi d'un rinçage à l'eau courante pendant 5 min.

II.8.7.6. Coloration, déshydratation et montage des lames

La coloration des lames par tri chromique hématoxyline a été effectuée comme suit :

- Bleuir le noyau avec l'hématéine pendant 3 à 4 min ;
- Laver les lames avec de l'eau de robinet jusqu'au virage de la couleur au bleu-noir ;
- Les tremper dans l'éosine 1% (P/V) pendant 2 min ;
- Les déshydratées dans deux bains successifs d'alcool éthylique à 70° puis à 96° pendant 5 min chacun pour alléger la sur-coloration ;
- Mettre les lames dans du xylène à deux reprises pendant 5 min.

Les lames sont montées pour préserver les colorations, on colle des lamelles de verre par-dessus grâce à une goutte de baume de Canada. Les lames préparées sont laissées sécher avant d'être observées sous microscope.

II.9 Etude statistique.

Toutes les expériences sont répétées trois fois, les analyses statistiques, effets des variables et leurs interactions ont été évaluées par l'analyse (ANOVA). Les valeurs ont été considérées comme statistiquement significatives au seuil de probabilité de 5 % ($p < 0.05$).

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Le rendement d'extraction du lycopène

Après l'extraction, purification et la récupération de l'extrait du lycopène à partir de la tomate concentrée (Amor Ben Amor) commercialisée localement et de la pastèque locale, le rendement a été déterminé par rapport à 100 g de matière première exprimé en pourcentage. Il est estimé de 0,27% pour la tomate concentrée et 0,18% pour la pastèque.

Le rendement obtenu dans cette étude, soit à partir du concentré de tomate, soit à partir de la pastèque est largement satisfaisant, en se comparant avec les travaux ultérieurs utilisant les mêmes sources. Cette concentration de 0,273 g de lycopène extraite de 100g de tomate concentrée, parmi les autres caroténoïdes contenant dans ce produit, est assez importante. 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 0,0493 et 0,0940 g/100g de matière sèche dans les échantillons analysés. Les teneurs de lycopène extraites de la tomate concentrée locale de marque Amor Ben Amor sont plus importantes ([Hamed et al., 2022](#)) que ceux révélées par les travaux de [Bilton et al. \(2001\)](#), dont des concentrations faibles de lycopène varient entre 0,004 et 0,150 g/100g de concentré de tomate ont été enregistrées. De même, la teneur de lycopène obtenu à partir de pastèque est plus au moins importante, par rapport aux concentrations obtenues (0,023 et 0,072g/100) par les travaux de [Krinsky et al. \(2005\)](#).

Le calcul de la teneur de rendement d'extraction repose sur plusieurs facteurs à savoir la 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](#)).

III.2. Caractérisation chimique du lycopène purifié

III.2.1. Caractérisation du lycopène par diffraction des rayons X (DRX)

Cette technique permet à la fois de démontrer la nature cristalline ou amorphe d'un solide ou une poudre, et de déterminer les différentes phases cristallines. Le principe de la DRX consiste à faire diffracter les rayons X sur un échantillon solide plat ou une poudre. La diffraction se fait suivant la loi de Bragg lorsqu'il existe une organisation des atomes dans le solide suivant des plans cristallins. Le spectre confirme la forme semi cristalline du lycopène purifié comparé au lycopène standard (fig.13) (Bo Shu et al., 2006).

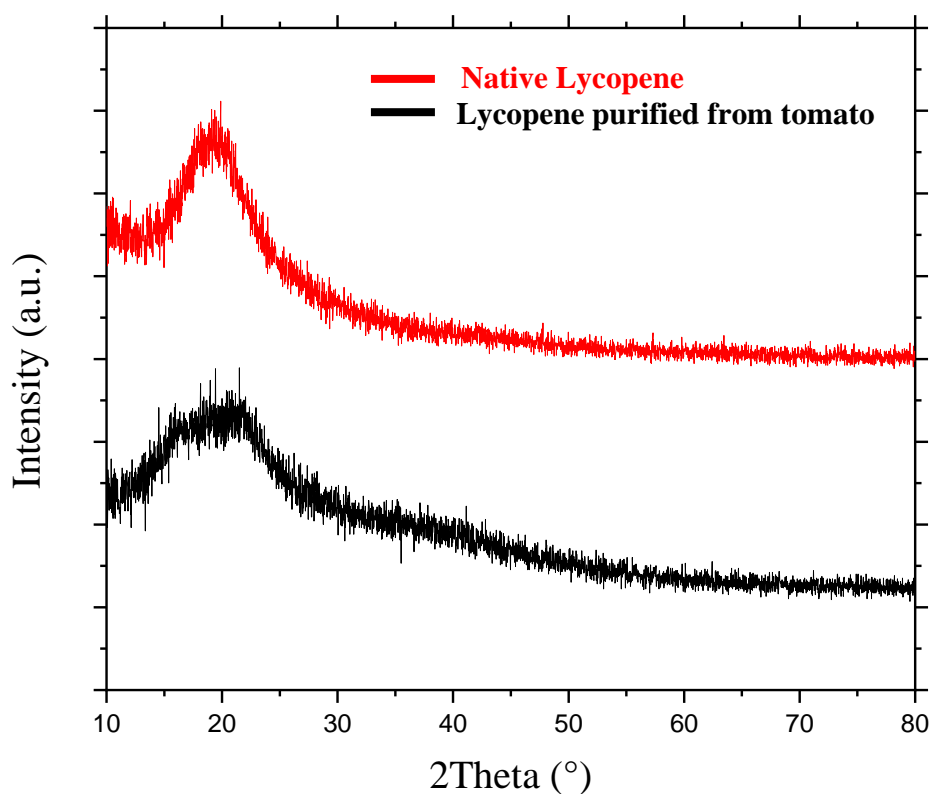


Fig.13. Spectre DRX du lycopène standard et du lycopène purifié

III.2.2. Caractérisation par UV- VIS

La [figure14](#) présente les spectres UV-Vis du lycopène purifié et du lycopène standard dans les deux solvants hexane et toluène. Selon la loi de Beer Lambert, le coefficient d'absorption molaire du composé spécifique peut être évalué à l'aide de la formule suivante :

$$A = \epsilon cL \quad (2)$$

Où, ϵ désigne le coefficient d'absorption molaire du composé donné. La lettre **L** représente la distance de l'onde incidente se propageant à travers le milieu absorbant. La longueur du trajet du porte-échantillon (cuvette) est de 1 cm. Le pic d'absorption maximum du composé qui peut être lu à partir de la spectroscopie est désigné par **A** et **c** représente la concentration du composé à étudier.

D'après l'analyse spectrale de la [figure14 \(a\)](#) et [\(b\)](#), on peut observer que le lycopène est absorbé dans la gamme spectrale entre 340 nm et 570 nm. Trois pics maximaux sont apparus pour le lycopène standard et purifié, $\lambda_{max(Hexane)}$ à 445, 472, 503 nm, et $\lambda_{max(toluene)}$ à 457, 486, 519 nm ([Tab. 07](#)). Les pics maximaux similaires sont en accord avec la littérature. L'isomère 5-Cis- lycopène est absorbé à $\lambda_{max(Hexane)}$ 448, 473, 505 nm ([Adriany et al., 2017](#)), et est également absorbé à $\lambda_{max(toluene)}$ 456.5, 485, 519.5 nm ([Takehara, 2014](#)). Nous avons observé un changement du pic maximal dans les valeurs UV-Vis entre l'hexane et le toluène. Ceci est dû à l'effet bathochrome, qui signifie que nous pourrions obtenir des pics maximaux différents dans l'UV-Vis, pour un composé purifié dans différents solvants en fonction de leur polarité. ([Yadigar et al., 2011](#)).

Les coefficients d'absorption molaire des échantillons de lycopène extrait en solution hexane et toluène sont résumés dans le [tableau 07](#).

Tableau 07. Absorption Maximale et coefficients d'extinction molaire.

Solvant	Echantillon	λ_0 (nm)	λ_1 (nm)	ϵ (L/mol.cm)	λ_2 (nm)	ϵ (L/mol.cm)	λ_3 (nm)	ϵ (L/mol.cm)
Hexane	Lycopène E	364	445	49957.62	472	72801.59	504	64022.93
	Standard	362	445	15675.47	472	21984.04	503	19257.23
Toluène	Lycopène E	373	458	60070.46	486	85503.27	517	67913.94
	Standard	371	457	24464.01	486	32846.00	519	26192.75

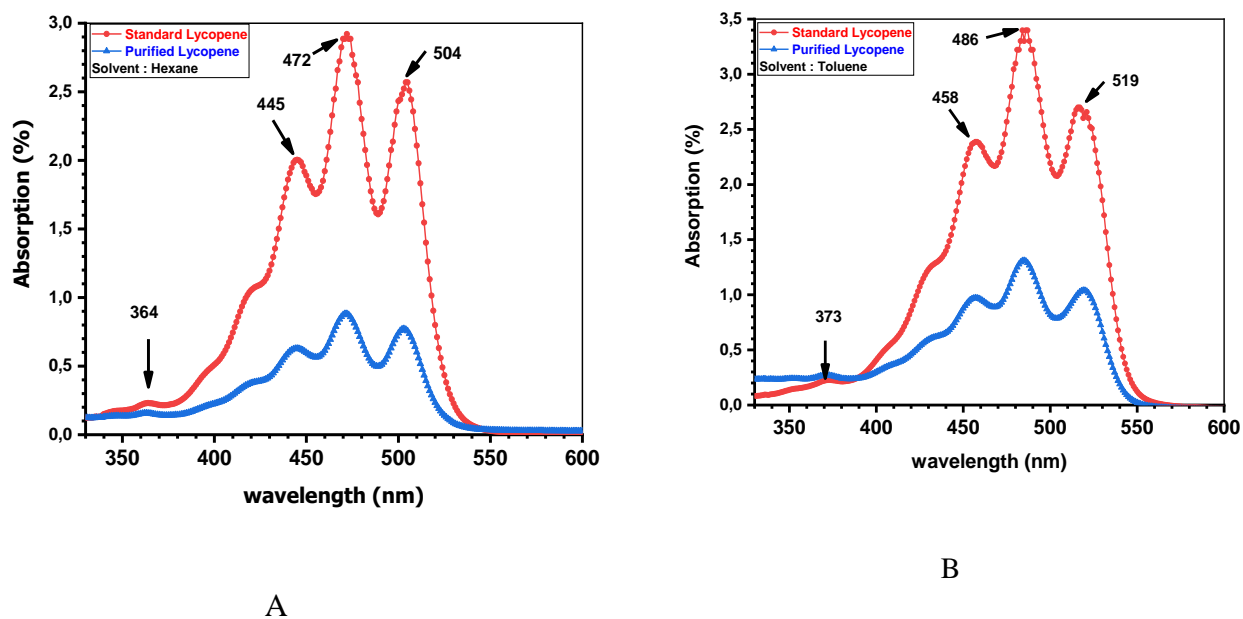


Fig.14. (A) Spectres UV-vis du lycopène standard et purifié dans l'Hexane, (B) Spectres UV-vis du lycopène standard et purifié dans le Toluène.

III.2.3. Caractérisation du lycopène par CCM

Une combinaison de trois solvants a été utilisée comme phase mobile de la chromatographie sur couche mince, l'éther de pétrole, l'hexane et l'acétone (5:4:1v/v). La fraction caroténoïde brute a révélée des spots de couleur orange rougeâtre (T), ceci s'explique par la présence d'un mélange de molécules. La mise en évidence des spots de couleur rouge par les deux échantillons du lycopène, purifié(E) et standard (L) (Fig.15) avec le même rapport frontal ($R_f = 0,86$), confirme la pureté de l'échantillon étudié. Ce résultat vient renforcer à la fois la fiabilité de la méthode d'extraction, le choix des solvants et la méthode de purification explorée dans la présente thèse.

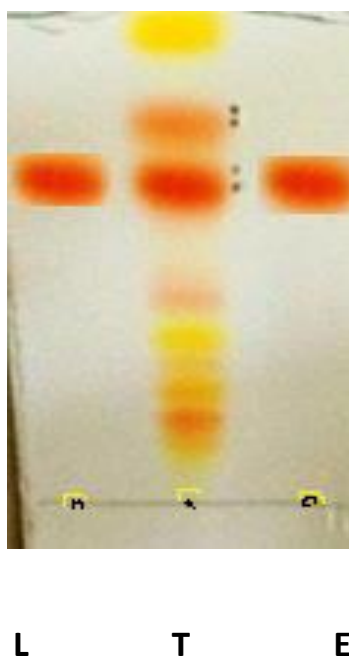


Fig.15. Plaque de gel de silice CCM a été développée avec la phase mobile [éther de pétrole-hexane et acétone (5 :4 :1v/v)], les dépôts effectués : Lycopène standard (L) lycopène purifié (E) et l'extrait de tomate (T).

III.2.4. Caractérisation du lycopène par spectroscopie FTIR

La spectroscopie FTIR a été utilisée pour déterminer les groupes fonctionnels du lycopène purifié à partir de la pâte de tomate par la méthode de cristallisation et pour les comparer au lycopène standard. L'échantillon fourni a montré la présence de liaisons d'insertion et d'une chaîne droite comme l'indique le spectre FTIR (fig. 16). Les pics majeurs du spectre avec des pics caractéristiques à 3037, 2831, 1450 cm^{-1} correspondant respectivement à la liaison C-H, = liaison C = CH₃ et liaison C = C ont été interprétés pour déterminer les groupes fonctionnels respectifs présents illustrés par le tableau 8. Une grande similarité entre les spectres a été obtenue, ce qui représente la bonne identité du lycopène (López-Cervantes et al., 2014 ; Priam et al., 2017).

Tableau 8 : Bandes d'absorption IR du lycopène standard et purifié de la pâte de tomate

Fréquence (cm^{-1})	
2914.44 :	C-H Méthylene / Méthyl
1658.78 :	C= C Alcène
1366.79	C-H Déformation, Méthyl
1056.99 :	CH Trans
958.62:	R-HC=CH-R. Z

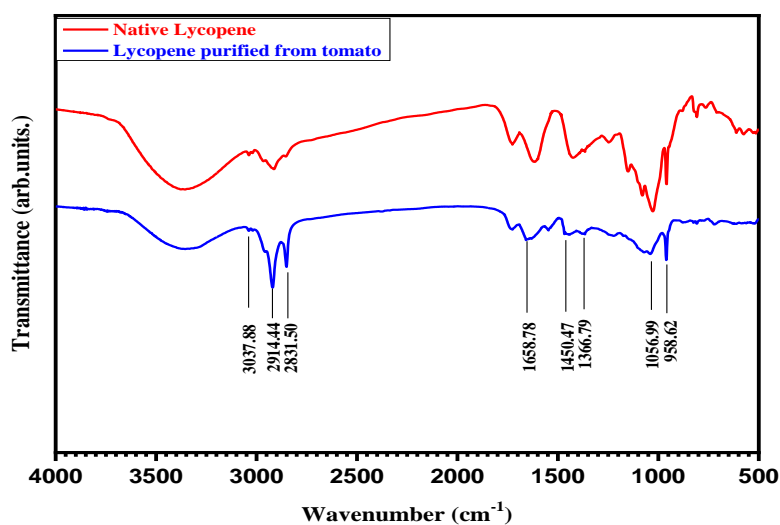


Fig.16. Spectre FTIR du lycopène standard et du lycopène purifié.

III.2.5. Caractérisation du lycopène par HPLC

Quatre injections ont été réalisées par HPLC : oléorésine (extrait de tomate avant purification), lycopène purifié (extrait de tomate après purification) et deux standards, lycopène et bêta-carotène. Il vise à comparer leurs chromatogrammes et à s'assurer que le procédé de purification est capable d'éliminer le β -carotène qui est le deuxième composant carotène majeur de la tomate après le lycopène.

Les chromatogrammes du lycopène standard et purifié sont représentés par les figures 17a et 17b, respectivement. Une grande similarité a été observée entre les deux chromatogrammes avec le même temps de rétention de 4 min. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Barba et al. (2006), dont l'échantillon de pâte de tomate avec un temps de rétention de 4,3 minutes a été enregistré

Le chromatogramme HPLC de l'oléorésine de tomate avant et après la purification du lycopène est présenté dans les figures 17c et 17d. D'après le contraste des chromatogrammes de la fig. 17e, on observe l'élimination du pic de β -carotène par le processus de purification. Ce résultat montre l'efficacité et la fiabilité de la méthode de purification développée dans cette expérience.

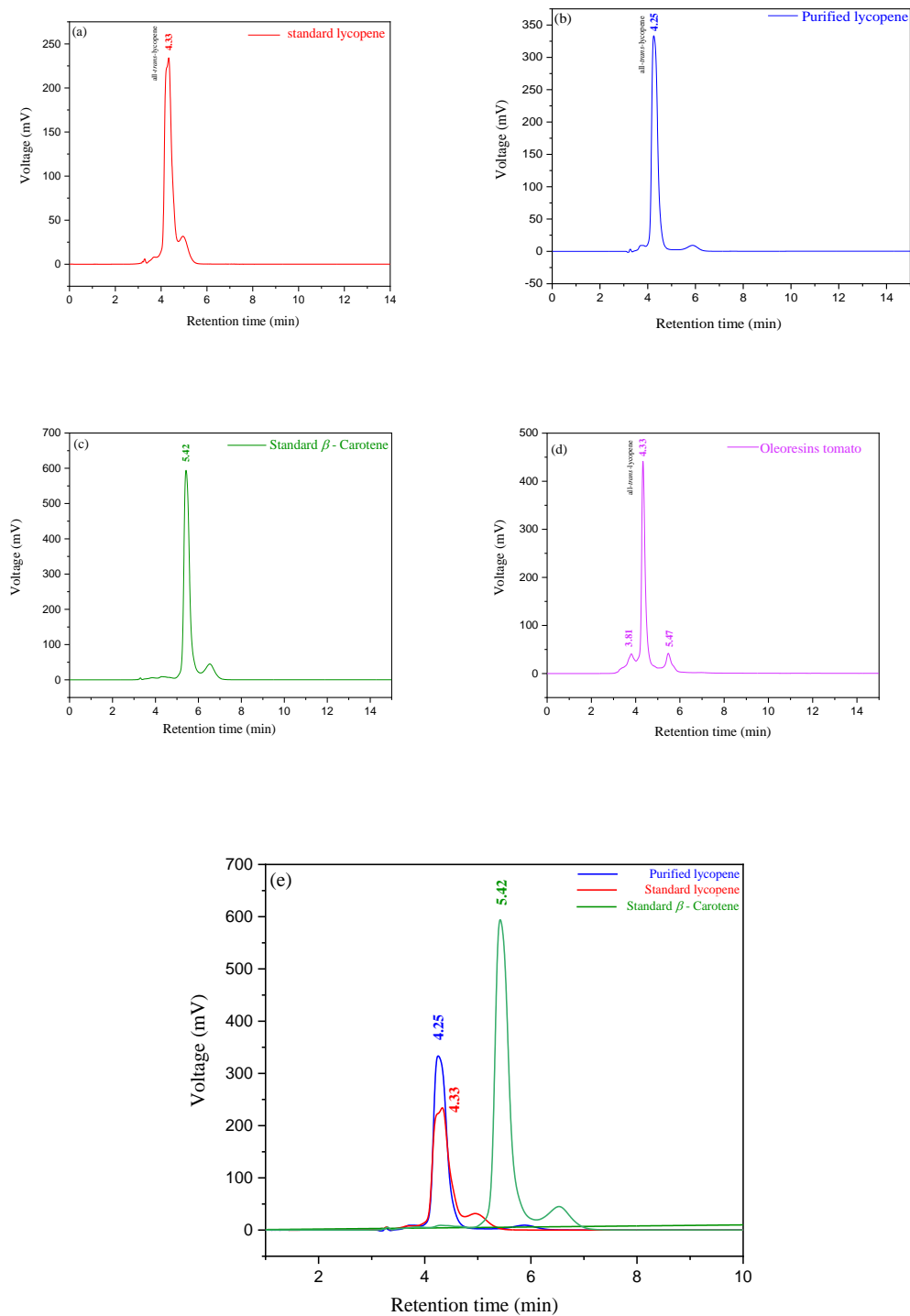


Fig.17. Chromatogramme HPLC : lycopène standard (a), lycopène purifié (b) β -carotène standard (c) caroténoïde de tomate (oléorésines) (d) et lycopène purifié par rapport aux standards(e)

III.3. Optimisation de la purification

Nous avons utilisé la méthode de surface de réponse RSM pour optimiser les conditions de purification et identifier les effets de chaque variable sur la réponse, à la fois indépendamment et cumulativement, tout en permettant de réduire les coûts. La conception de Box-Behnken permet d'optimiser trois variables importantes, qui sont les principaux paramètres de cette expérience : A : le volume du filtrat correspondant à l'oléorésine de caroténoïde (mL), B : la température d'évaporation du filtrat (°C) et C : le volume de DMSO (mL) ajouté comme anti-solvant. Un nombre total de 15 séries de lots a été dérivé de ce plan de Box-Behnken comprenant trois points centraux utilisés pour déterminer l'erreur expérimentale.

L'analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée sur le modèle complet pour déterminer les variables significatives affectant le rendement en lycopène pur ($p < 0,05$). (voir l'annex 03)

Le modèle quadratique complet initial a été affiné par élimination pas à pas des termes non significatifs (Lundstedt et al., 1998), en utilisant un niveau de signification de 5%. L'analyse ANOVA a été utilisée pour évaluer la signification et la qualité de l'ajustement du modèle réduit final utilisé pour prédire le rendement en lycopène.

Les valeurs estimées des coefficients de régression avec leur erreur standard et la valeur p du modèle polynomial quadratique prédit ont été regroupées dans les [Tableau 9](#) et [10](#). L'équation de régression avec les coefficients linéaires, carrés et d'interaction est la suivante :

$$Y_{\text{Lycopene}} (\text{mg/g}) = + 2.29 - 0.1500 \mathbf{A} + 0.5050 \mathbf{B} + 0.0575 \mathbf{C} - 0.0475 \mathbf{AB} + 0.0575 \mathbf{AC} - 0.0675 \mathbf{BC} - 0.0662 \mathbf{A}^2 - 0.2062 \mathbf{B}^2 - 0.9163 \mathbf{C}^2 \quad (3)$$

Le volume du filtrat, la température d'évaporation et le volume de DMSO ont eu une forte influence sur le rendement des cristaux de lycopène (avec $p = 0,0001$). Le volume du filtrat a eu un effet linéaire négatif sur le rendement. Cependant, le volume de DMSO et la température ont eu un effet linéaire positif sur l'efficacité de l'isolement du lycopène. Les interactions entre AB ($p = 0.0036$), AC ($p = 0.0016$) étaient significatives alors que l'interaction entre BC est hautement significative ($p = 0.0007$) ([Tab. 09](#)).

Tableau 9 : Adéquation du modèle de surface de réponse et analyse ANOV

Source	Somme des carrés	Df	Moyenne des carrés	Valeur -F	Valeur -p
Model	5,46	9	0,6062	1783,03	< 0.0001**
A-V Filtrat	0,1800	1	0,1800	529,41	< 0.0001**
B-T évaporation	2,04	1	2,04	6000,59	< 0.0001**
C-V DMSO	0,0264	1	0,0264	77,79	0,0003**
AB	0,0090	1	0,0090	26,54	0,0036*
AC	0,0132	1	0,0132	38,90	0,0007*
BC	0,0182	1	0,0182	53,60	0,0016*
A ²	0,0162	1	0,0162	47,66	< 0.0001**
B ²	0,1571	1	0,1571	461,96	< 0.0001**
C ²	3,10	1	3,10	9116,89	0,0016*
Résiduels	0,0017	5	0,0003		0,1712 [#]
Lack of Fit	0,0015	3	0,0005		
Error Pure	0,0002	2	0,0001	5,00	
Totale Cor	5,46	14			

* Significatif (p < 0.05), ** hautement significatif (p < 0.0001), # Non significatif

L'ajustement du modèle de régression a été évalué par la valeur estimée du coefficient de détermination (R^2), du coefficient de détermination ajusté (R^2 adj) et du coefficient de détermination prédit (R^2 pred). Ils ont été calculés pour 0,9991 et 0,9955 respectivement. Une valeur élevée de (R^2) montre le degré de précision du modèle lorsqu'il spécifie la relation entre la réponse et les variables indépendantes (Tab. 10). La valeur ajustée de R^2 indique que seulement 0,09% de la variation totale n'a pas été expliquée par le modèle.

La valeur la plus faible de l'erreur pure (0,0001) indique le plus haut degré de précision et de fiabilité des expériences réalisées. Le manque d'ajustement (0,1712) mesure l'incapacité du modèle à représenter les données dans le domaine expérimental. En outre, le manque d'ajustement non significatif peut également renforcer la fiabilité du modèle comme le soulignent Poojary et Passamonti, (2015).

Tableau 10. ANOVA pour la régression du modèle

Source	Valeur-p séquentielle	Le manque d'ajustement p-value	Ajusté R ²	Prédites R ²	
Linéaire	0,1078	0,0003	0,2512	-0,0404	
2FI	0,9909	0,0002	-0,0166	-1,1706	
Quadratique	< 0.0001	0,1712	0,9991	0,9955	Suggestif
Cubique	0,1712		0,9997		Alias

Après l'analyse de la variance, le modèle a montré un bon ajustement. La [figure18](#) montre la relation entre les valeurs réelles et prédites pour le rendement en lycopène pur. D'après cette figure, nous pouvons dire que le modèle développé est adéquat car la majorité des points de données suivent de près la ligne ajustée, sans valeurs aberrantes raisonnables, ce qui est confirmé par le coefficient de corrélation élevé (R^2) avec une valeur de 0,99 ([Kehili et al., 2019](#)).

Design-Expert® Software

Y Lycopene

Color points by value of
Y Lycopene:

0,54  2,73

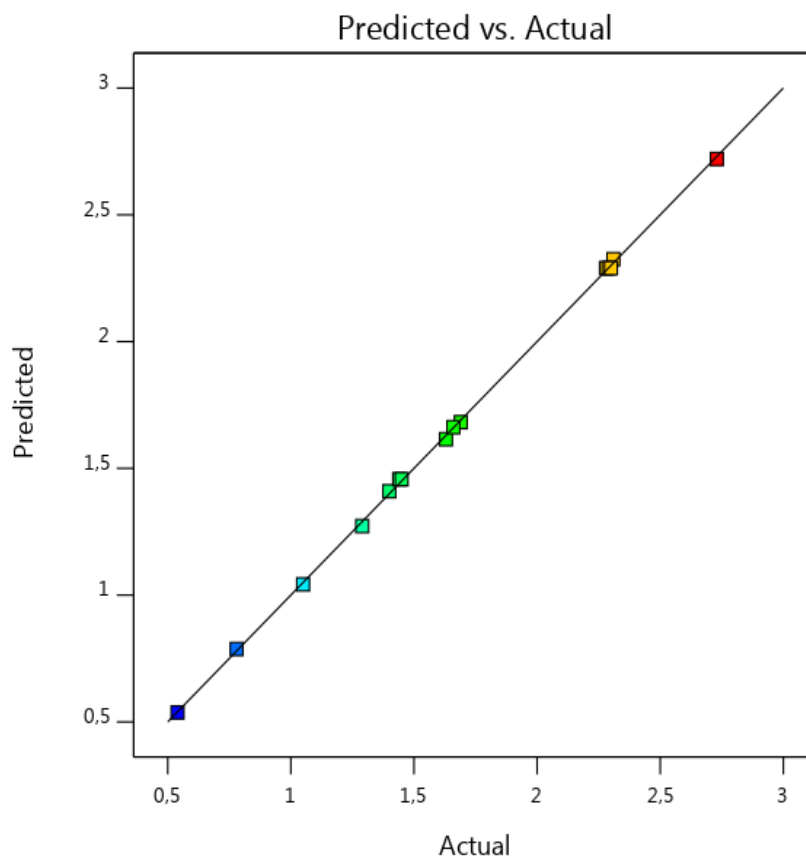


Fig. 18. Diagramme de dispersion de la réponse prévue par rapport à la réponse réelle pour le rendement en lycopène purifié.

III.3.1 Rendement de purification du lycopène et modélisation

La valeur F la plus élevée du modèle (1783,03) et la valeur p la plus faible ($p < 0,0001$) ont montré que les coefficients étaient hautement significatifs, ce qui suggère un ajustement très satisfaisant du modèle (Berger et al., 2018). Le rendement d'extraction du lycopène peut varier de manière significative entre différentes études, en fonction des conditions d'extraction appliquées et de la matière première utilisée (Yasmini et al., 2018). Le rendement maximal de lycopène pur (2,73 mg/g) a été enregistré dans l'expérience 1 (Tab. 05) avec les conditions expérimentales suivantes : volume du filtrat (20 mL), température d'évaporation (50 °C) et volume de DMSO (5 mL). Ce rendement est trois fois supérieur à celui des travaux de Degrou et al. (2013) et Bilton et al. (2001) dont les concentrations de lycopène obtenues varient de 0,493 à 0,940 mg/g et de 0,04 à 1,50 mg/g respectivement.

Le rendement maximal prédit de lycopène (2,72124 mg/g) a été enregistré dans les conditions optimales prédites : volume du filtrat (20 mL), température d'évaporation du filtrat (50 °C) et volume de DMSO (4,93 mL). Les valeurs expérimentales étaient en bon accord avec les valeurs prédites, ce qui indique que le modèle d'équation est adéquat.

III.3.2 Effets des paramètres du procédé sur l'efficacité de la méthode de purification

Pour étudier l'effet individuel et l'interaction des variables indépendantes (X1 : A, X2 : B, X3 : C,) sur le rendement du lycopène (y), des graphiques de surface de réponse ont été construits à partir du modèle de régression de l'équation (3). Comme il y avait trois facteurs, deux facteurs ont été tracés et ont varié dans leur angle (-1 à +1) tandis que le troisième facteur a été fixé au centre (0). Les résultats sont présentés dans les [fig. 19a-c](#).

a) Effet du volume du filtrat

Le volume du filtrat a eu un effet significatif sur le rendement en lycopène pur ([Fig.19a](#)). Le rendement le plus élevé a été obtenu avec le plus petit volume de filtrat qui est égal à 20 mL. L'augmentation du volume du filtrat génère une diminution de la quantité de cristaux de lycopène. Cet effet peut être expliqué par le phénomène de saturation, c'est l'état correspondant à la quantité maximale de produit qui peut être dissoute dans un volume donné de solvant à une température et une pression données ([Couriol et al., 1997](#)).

b) Effet de la température

Les résultats ont montré que les valeurs de rendement en lycopène étaient inférieures à la température de 0°C mais qu'elles augmentaient avec la température jusqu'à 50°C ([Fig. 19b](#)). L'augmentation de la température pourrait avoir contribué à briser les tissus compacts du fruit, conduit à une rupture des structures de la paroi cellulaire de la tomate, perturbant les membranes des chromoplastes et réduisant l'intégrité cellulaire. Ainsi, le rendu de plusieurs substances phytochimiques ([Oberoi et al., 2017](#)), y compris le lycopène, et l'augmentation du rendement en lycopène est lié étroitement à la température, malgré son effet positif d, elle ne doit pas dépasser 50 C° car la molécule de lycopène peut se dégrader comme le confirment d'autres travaux ([Kunthakudee et al., 2019 ; Shi et Maguer, 2000](#)).

c) Effet anti-solvant du DMSO

Suite aux résultats obtenus, il a été constaté que la quantité de cristaux de lycopène pur augmente avec le volume de DMSO ajouté à raison de 3 à 5 mL. Augmentation du volume de DMSO jusqu'à 7 mL, minimise la quantité de lycopène pur ([Fig. 19c](#)).

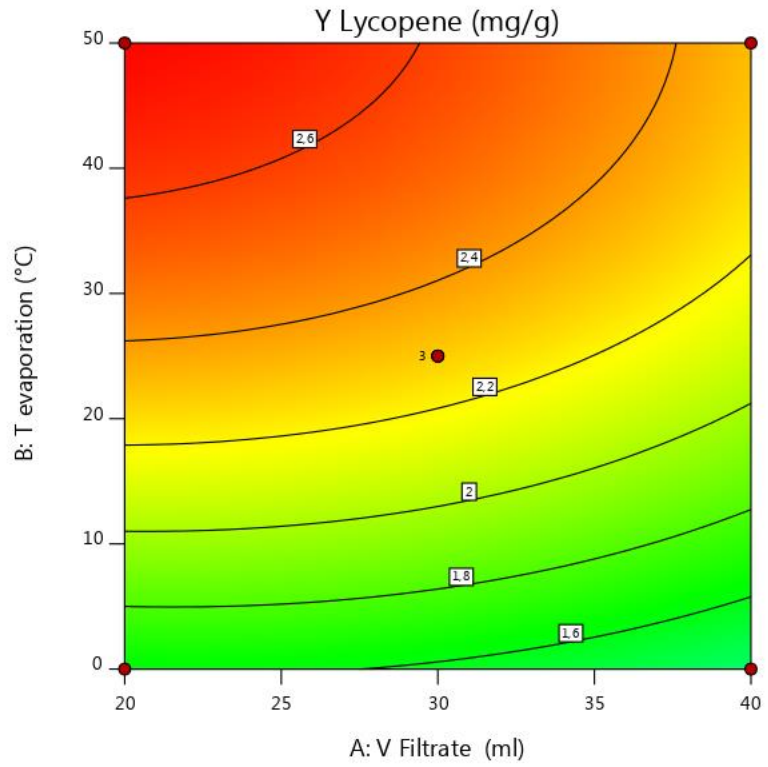
Le volume de DMSO est l'un des facteurs importants pour la purification du lycopène. L'ajout de DMSO comme anti-solvant ou précipitant à la solution, entraîne la réduction de la solubilité du soluté dans le solvant d'origine et, par conséquent, la génération d'une force motrice de sursaturation (Nowee et al., 2008). Le DMSO est reconnu comme étant le plus puissant de tous les solvants organiques apparentés disponibles. La capacité de solvation du DMSO est principalement liée à sa constante diélectrique élevée, qui dépasse celle de la plupart des autres solvants aprotiques dipolaires courants. La paire d'électrons solitaires hautement directionnelle qui existe au sommet de la pyramide aide à complexer et solvater les molécules typiques (Balakin et al., 2004). Pour cette raison, le DMSO a été choisi comme anti-solvant pour la méthode de purification. Il a la capacité de solubiliser tous les autres caroténoïdes de l'extrait à l'exception du lycopène qui peut être isolé sous forme de cristaux, qui sont donc observés au niveau de la couche superficielle. Les autres caroténoïdes sont rejetés dans la phase liquide, comme le β -carotène, qui est très soluble dans le DMSO. Un éventuel excès de DMSO dans l'extrait provoque également la solubilisation des cristaux et réduit donc le rendement en lycopène pur.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Y Lycopene (mg/g)
● Design Points
0,54 2,73

X1 = A: V Filtrate
X2 = B: T evaporation

Actual Factor
C: V DMSO = 5

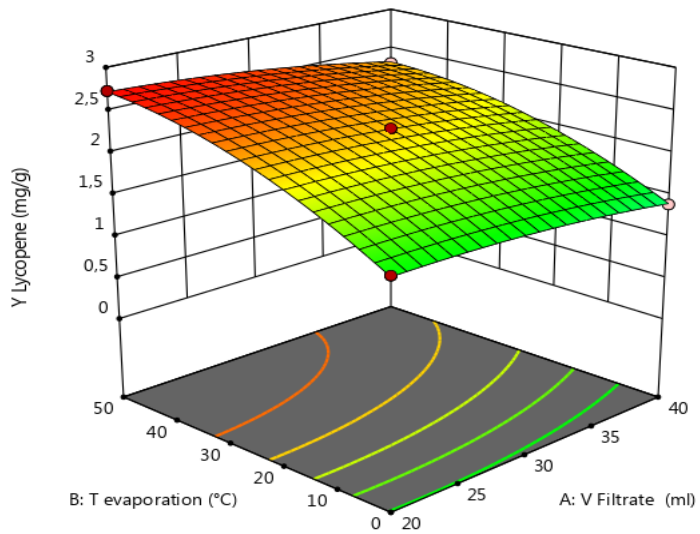


Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Y Lycopene (mg/g)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
0,54 2,73

X1 = A: V Filtrate
X2 = B: T evaporation

Actual Factor
C: V DMSO = 5



(a)

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

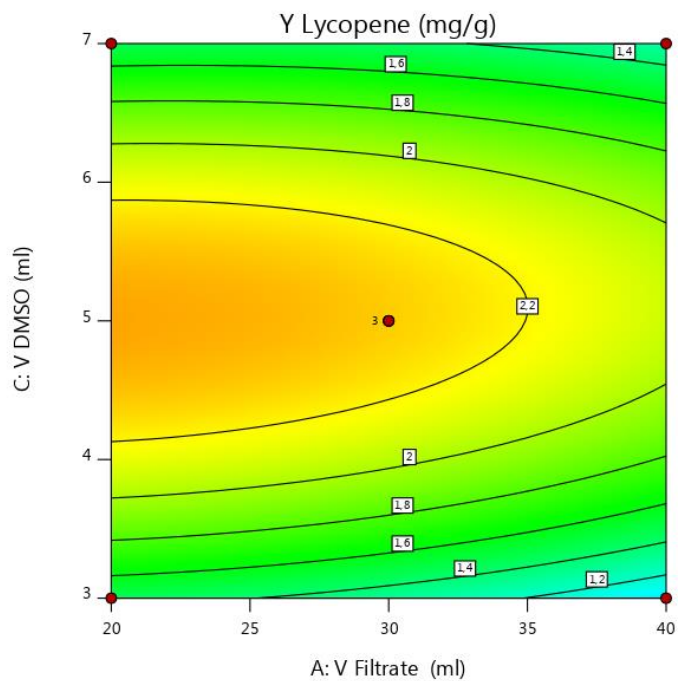
Y Lycopene (mg/g)

● Design Points
0,54 2,73

X1 = A: V Filtrate
X2 = C: V DMSO

Actual Factor

B: T evaporation = 25



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

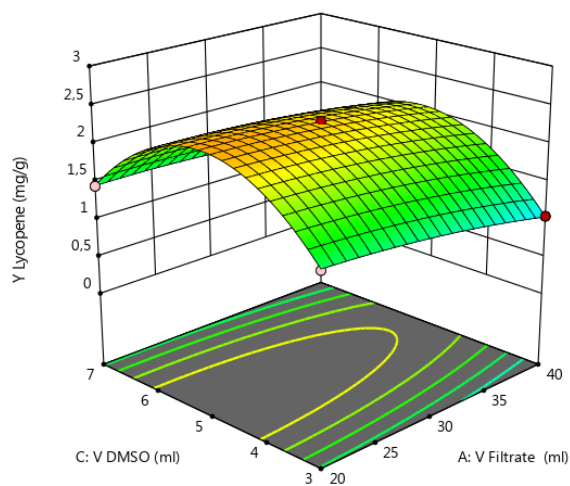
Y Lycopene (mg/g)

● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
0,54 2,73

X1 = A: V Filtrate
X2 = C: V DMSO

Actual Factor

B: T evaporation = 25



(b)

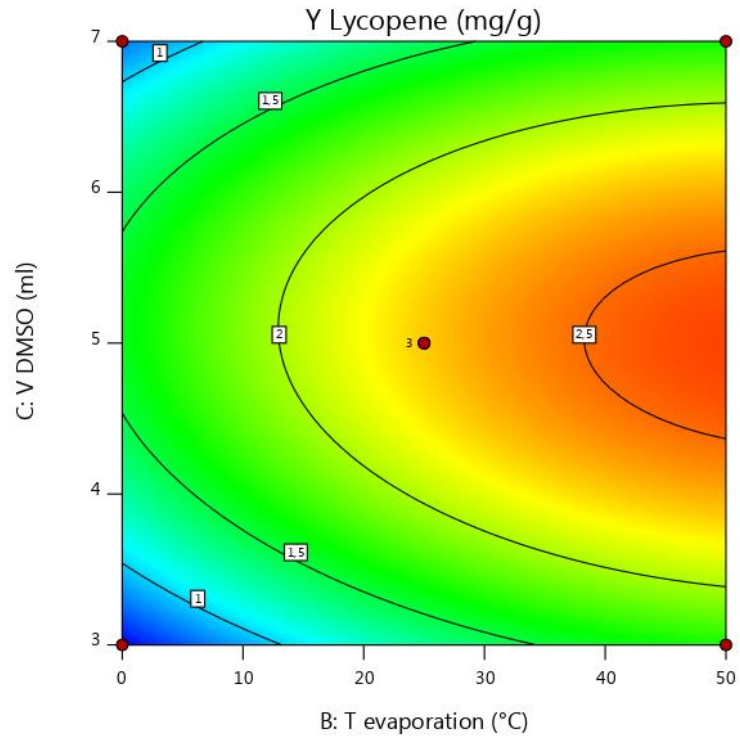
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Y Lycopene (mg/g)

● Design Points
0,54 2,73

X1 = B: T evaporation
X2 = C: V DMSO

Actual Factor
A: V Filtrate = 30



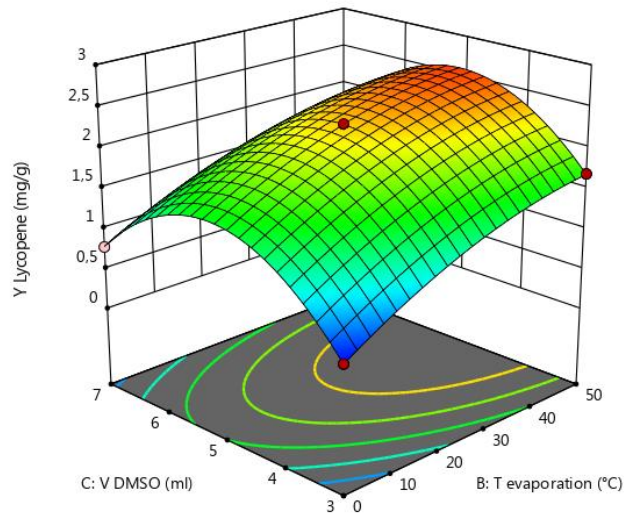
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Y Lycopene (mg/g)

● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
0,54 2,73

X1 = B: T evaporation
X2 = C: V DMSO

Actual Factor
A: V Filtrate = 30



(c)

Fig.19. Graphiques 2D et 3D présentant les effets corrélatifs de (A) volume du filtrat correspondant à l'oléorésine de caroténoïde, (B) température d'évaporation du filtrat (°C) et (C) volume de DMSO ajouté (mL).

III.4. Etude de la solubilité

La molécule du lycopène est hydrophobe ce qui pose un majeur problème pour sa solubilité dans l'eau, mais elle est plus facilement dissoute dans les solvants organiques toxiques tels que le chloroforme, le benzène et le dichlorométhane. Par la suite, la dégradation du lycopène au cours du temps dans ces solvants est facile (Amiri- Rigi et al, 2018). Pour surmonter ces difficultés et obtenir le lycopène sans traces de solvants organiques, dans ce travail, les huiles essentielles sont utilisées comme co-solvant naturel, et comparées avec l'huile végétale de son de riz.

Le [tableau 11](#), présentent les résultats de la solubilité du lycopène dans les différentes huiles essentielles et dans l'huile végétale de son de blé sont . Les résultats statistiques montrent qu'il existe une différence significative en terme de solubilité du lycopène ($P < 0,05$). On observe que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*.L ($15,1 \pm 0,2$ mg/g) a la plus grande capacité de solubilisation parmi les différentes huiles essentielles testées, suivie de celle d'*Anethum graveolens*.L ($12,2 \pm 0,6$ mg/g), puis de celle d'orange ($10,5 \pm 0,3$ mg/g). Nous constatons que les huiles essentielles sont plus efficaces que les huiles végétales en comparant aux résultats obtenus par les travaux de [d'Okonogi et Riangjanapatee \(2015\)](#) où seules les huiles végétales ont été étudiées.

Tableau 11 : Solubilité du lycopène dans quelques huiles

Les Huiles utilisées	Solubilité (mg/g)
Huile Essentielle l' <i>Ammi visnaga</i>	15.1 ± 0.2^a
Huile Essentielle d' <i>Anethum Graveolens</i> .L	12.2 ± 0.6^b
Huile Essentielle d'Orange	10.5 ± 0.3^c
L'huile de son de riz	5.9 ± 0.3^d

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ET. a-d : différence significative à $P < 0,05$

III.5. Encapsulation du lycopène par coacervation complexe alginate de sodium et agar

Aujourd'hui, de nombreux compléments nutritionnels sont disponibles sous forme de gélules ou de comprimés qui libèrent les principes actifs de manière contrôlée. Le but de la présente étude est de développer une formulation de lycopène de qualité alimentaire. L'objectif visé dans cette étude est l'encapsulation du lycopène extrait de la pastèque combiné avec l'huile essentielle *d'Ammi visnaga* immobilisée.

Lorsque le lycopène extrait a été mélangé avec une solution d'alginate de sodium à 4 %, et l'huile essentielle *d'Ammi visnaga* qu'il n'a pas été complètement dissous, une couche de l'huile séparée s'est formée, du fait que ce dernier n'était pas miscible dans l'alginate. Ceci était en partie attendu car l'alginate est un polysaccharide dissous dans une solution polaire, tandis que l'huile essentielle est insoluble dans l'eau. Une solution d'agar-agar à 1 % a été ajoutée à la solution d'alginate, qui a permis à la solution s'amalgamer et former le mélange lycopène-alginate-agar.

Les billes ont été préparées en utilisant du CaCl_2 (0,2 M). Il a été enregistré que les concentrations de 1 et 2 % d'alginate ne permettaient pas une bonne formation de billes qui se dissolvaient dans la solution de CaCl_2 . Ceci peut être expliqué par le non-abondance d'alginate pour former de fortes liaisons croisées afin de produire un gel stable. En revanche, des billes de résistance satisfaisante se sont formées lorsqu'une solution à 4 % d'alginate a été utilisée, donnant plus de rigidité et de forme aux billes (fig.20).

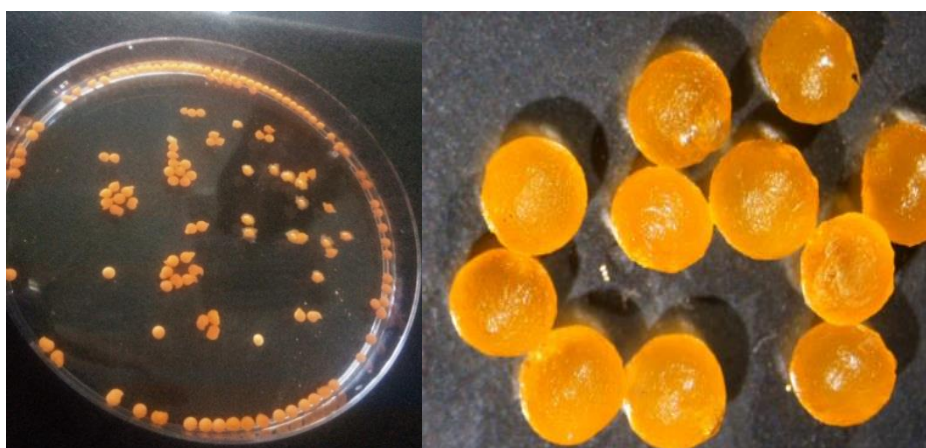


Fig.20. Billes de lycopène encapsulés

III.6. Activité biologique *in vitro*

III.6.1. L'activité antioxydante

Le test DPPH est une méthode rapide pour déterminer l'activité antioxydante. Cependant, le DPPH ne se dissout que dans les solvants organiques, notamment le méthanol et l'éthanol. Cela rend difficile l'évaluation des propriétés antioxydantes du lycopène, car les caroténoïdes sont à peine solubles dans l'éthanol ou le méthanol (Gutierrez et al., 2008). Ce dosage a nécessité l'utilisation d'un solvant approprié (éthanol-dichlorométhane 1 :2 v/v) pour permettre la remise en suspension des caroténoïdes, du DPPH et des étalons dans les mêmes conditions.

Les courbes présentées en Figure 21 montrent l'effet piègeur sur les radicaux libres du standard (vitamines C), de l'extrait de caroténoïdes et du lycopène purifié.

III.6.1.1. 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 inhibitrice (IC50), 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 IC50 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 µg/ml. L'équation de régression pour les caroténoïdes est : $y = 13,661 \ln(x) + 78,728$, de lycopène est : $y = 7,0368 \ln(x) + 54,675$ et celle de vitamine C : $y = 9,9176x + 22,806$

Les concentrations d'extrait de caroténoïdes, du lycopène et de vitamine nécessaire pour réduire le radical de DPPH à 50% étaient de 122.1 µg /mL, 580 µg /mL et 27,4 µg /mL, respectivement. On remarque bien que la vitamine C a montré une forte activité antioxydante, tandis que l'effet antioxydant a été observé plus rapidement avec l'extrait de caroténoïdes par rapport au lycopène purifié. Ceci s'explique par l'effet synergique entre les différents composants de caroténoïde, qui a été confirmé par les travaux de Chen et al., (2009). Les profils des courbes de l'acide ascorbique et de lycopène, qui reflètent leur activité antioxydante, étaient similaires aux courbes obtenues par Srikanth et al., (2010).

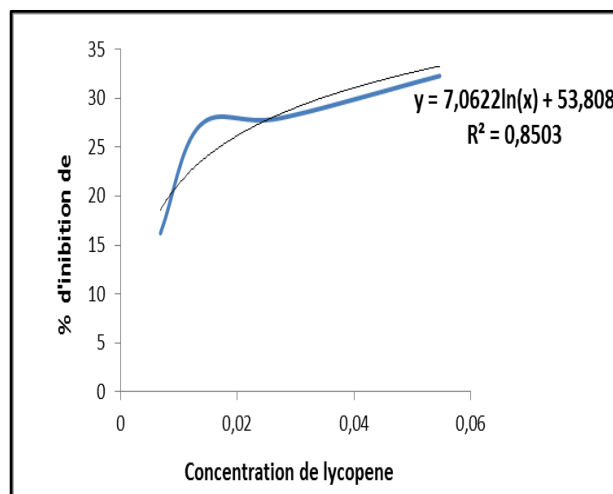
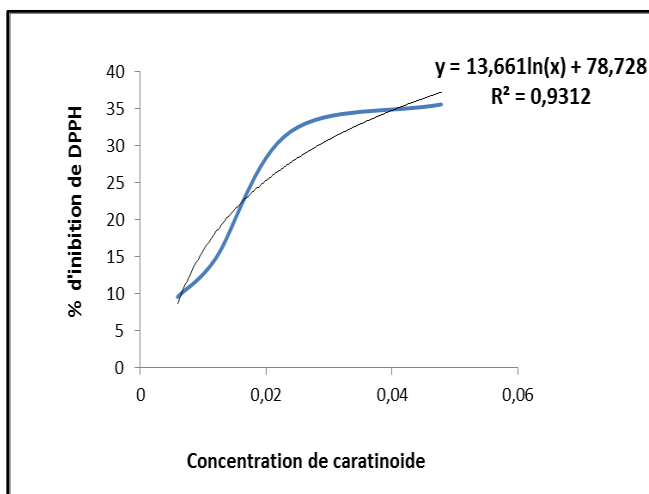
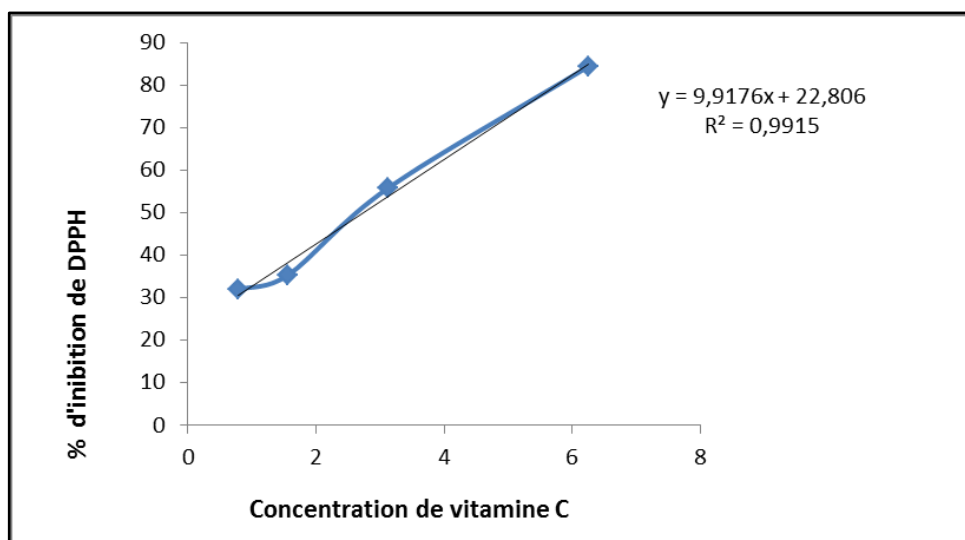


Fig. 21. Effet anti radicalaire de lycopène, d'extrait de caroténoïdes et de la vitamine C sur la réduction du DPPH

III.7.2. L'activité antimicrobienne

III.7.2.1. Concentration minimale inhibitrice (CMI) du lycopène et de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*. L

Cinq souches pathogènes et une levure ont été utilisées pour évaluer leur résistance en présence soit du lycopène, soit de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*. La CMI pour une souche pathogène donnée, est la concentration la plus faible d'un inhibiteur donné à laquelle les bactéries ne peuvent pas survivre. Les concentrations minimales inhibitrices des différentes souches pathogènes testées dans ce travail sont variables, selon la souche et selon la molécule active, elles varient entre 62,5 µg/ml à 500 µg/ml pour le lycopène et 0,83 µg/mL à 6,67 µg/ml pour l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*. L

Les résultats obtenus sont représentés dans le [tableau 12](#), comparant aux d'autres travaux rapportés par [Djifaby et al. \(2012\)](#), les valeurs de CMI du lycopène obtenues dans ce travail étaient similaires contre quelques souches (*E.coli* et *B. cereus*) et plus faible contre la souche *P. aeruginosa*,

L'huile essentielle d'*Ammi visnaga* possède une grande activité antimicrobienne contre toutes les souches testées, avec une valeur de CMI très faible (6,67 µg /ml) pour les souches *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. Ces résultats sont confirmés par les travaux de [Khalfallah et al. \(2011\)](#).

Tableau 12: CMI of lycopene and Essential oil *Ammi visnaga*. L

Souches bactériennes	Lycopène µg /ml	L'huile essentielle µg /ml
<i>K. pneumoniae</i>	62,5	6,67
<i>E. coli</i>	250	0.83
<i>S. aureus</i>	125	3,33
<i>P. aeruginosa</i>	62,5	6,67
<i>B. cereus</i>	125	6,67
<i>C. albicans</i>	500	3,33

III.7.2.2. Effet synergique antimicrobien de la combinaison entrelycopène et l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L.

Les résultats des tests de la combinaison antimicrobienne entre lycopène et l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L contre cinq souches bactériennes et une levure, sont illustrés dans le [tableau 13](#) et par la [figure 22](#). L'interaction de cette combinaison révèle une réaction de synergie, une synergie partielle, antagonisme où aucun effet synergique contre les différentes souches testées. Les interactions synergétique et partiellement synergétique ont été observées contre les souches bactériennes *K. pneumoniae*, *E. coli* et *S. aureus*. Par ailleurs, une synergie totale a été observée contre *K. pneumoniae* ($1/6 \text{ MIC}_{\text{lycopène}}$ et $1/4 \text{ MIC}_{\text{HE}}$) avec FICI de 0,42 et partielle contre les souches *S. aureus* et *E. coli* ($1/6 \text{ MIC}_{\text{lycopène}}$ et $1/3 \text{ MIC}_{\text{HE}}$) avec FICI allant de 0,51 à 0,55 respectivement. Par contre, un effet antagoniste a été généré contre *B. cereus* et *C. albicans* pour la combinaison de $1/6 \text{ MIC}_{\text{lycopène}}$ et $1/1 \text{ MIC}_{\text{HE}}$ avec FICI de 2,06. Tandis que l'union entre lycopène et l'huile essentielle n'a montré aucun effet synergétique contre la souche *P. aeruginosa*. Les valeurs de CMI de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L et du lycopène ont été significativement réduites environ 4 à 6 fois respectivement par cette combinaison dans les interactions synergétiques. Cette capacité des huiles essentielles a amélioré l'efficacité de l'effet antimicrobien du lycopène, peut être expliquer par la considération des huiles essentielles comme des substances hydrophobes capables d'interagir avec les lipides membranaires entraînant une perturbation de la structure cellulaire et la perméabilité membranaire, de sorte que le lycopène puisse facilement traverser la membrane, ce qui renforce leur effet antimicrobien, même avec des doses plus faibles ([Heipieper & Martínez, 2010](#)). La combinaison du lycopène et les huiles essentielles peut être appliquée dans les formulations cosmétique et pharmaceutique contre les souches multirésistantes. ([Bag & Chattopadhyay, 2015](#)).

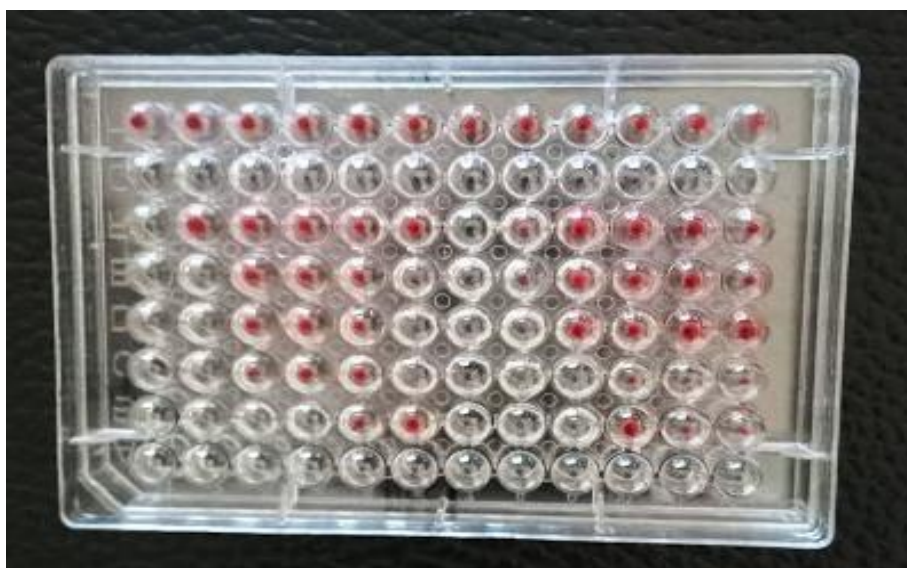


Fig. 22. Microplaque de la combinaison antimicrobienne de lycopène et de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L

Tableau 13 : Effet de la combinaison entre le lycopène et l'huile essentielle contre différentes bactéries

Souches microbiennes	CMI _C lycopene (mg/mL)	CMI _C HE (mg/mL)	CIF _{lycop} ene	CIF _{HE}	'CIF	ICIF	Interaction
<i>K. pneumonia</i>	3.90	1.66	0.0624	0.24	0.30	0.42	Synergies
	3.90	3.33	0.0624	0.49	0.55		total
<i>E. coli</i>	7.81	1.66	0.062	0.49	0.552	0.55	Synergies
	7.81	1.66	0.062	0.49	0.552		partielle
<i>S. aureus</i>	3.25	1.66	0.490	0.026	0.516	0.51	Synergies
	3.25	1.66	0.490	0.026	0.516		partielle
<i>P. aeruginosa</i>	3.90	0.67	0.010	1	1.01	1.01	aucun effet
	3.90	0.67	0.010	1	1.01		
<i>C. albicans</i>	7.81	13.34	0.0625	2	2.062	2.06	Antagonism
	7.81	13.34	0.0625	2	2.062		
<i>B. cereus</i>	125	0.41	2	0.061	2.061	2.06	Antagonism
	3.90	13.34	0.061	2	2.061		

CMI : Concentration minimale inhibitrice du composé individuellement.

CMIC : Concentration minimale inhibitrice du composé en combinaison.

CIF : (concentration inhibitrice fractionnaire). ICIF (indice de concentration inhibitrice fractionnaire).

III.8 Activité biologique *in vivo*

Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est la souche de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. Elle partage avec la bactérie *Escherichia coli* le triste privilège d'être au premier rang des germes responsables des infections nosocomiales. Dans cette étude, nous avons provoqué une prostatite chronique chez les rats wistar par instillation d'une souche pathogène *Staphylococcus aureus* isolée du sperme d'un patient atteint d'une infection urinaire.

III.8.1. Etude de la sensibilité de la souche *staphylococcus aureus* aux antibiotiques standards.

Nous constatons d'après les résultats illustrés dans le [tableau 13](#) et [par la figure 23](#), que la souche *S. aureus* testés est plus au moins sensible à la majorité des antibiotique utilisés, mais à différents degrés. Les diamètres des zones d'inhibition enregistrés varient entre 11 et 36 mm Selon [Ponce et al. \(2003\)](#) et [Moreira et al. \(2005\)](#), la sensibilité des germes a été classée par le diamètre des halos d'inhibition comme suit : non sensible (-) pour les diamètres moins de 8 mm ; sensible (+) pour les diamètres de 9 à 14 mm ; très sensible (++) pour les diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres de plus de 20 mm..

L'antibiogramme de la souche *S. aureus* a révélé des zones d'inhibition importante contre la céphaline (CEP₂₅) avec un diamètre de 36 mm.. Par ailleurs, les antibiotiques qui se sont montrés inactifs contre cette souche sont les suivants : Pénicilline (P₁₀), Ampicilline (AMP), Pipéracilline (PRL₃₀) et Oxacilline (OX₅)

La céfalexine (céphaline) est un antibiotique de la famille des β -lactamines du groupe des céphalosporines de première génération utilisé en Algérie pour le traitement de la prostatite chronique causée par des bactéries Gram positif.

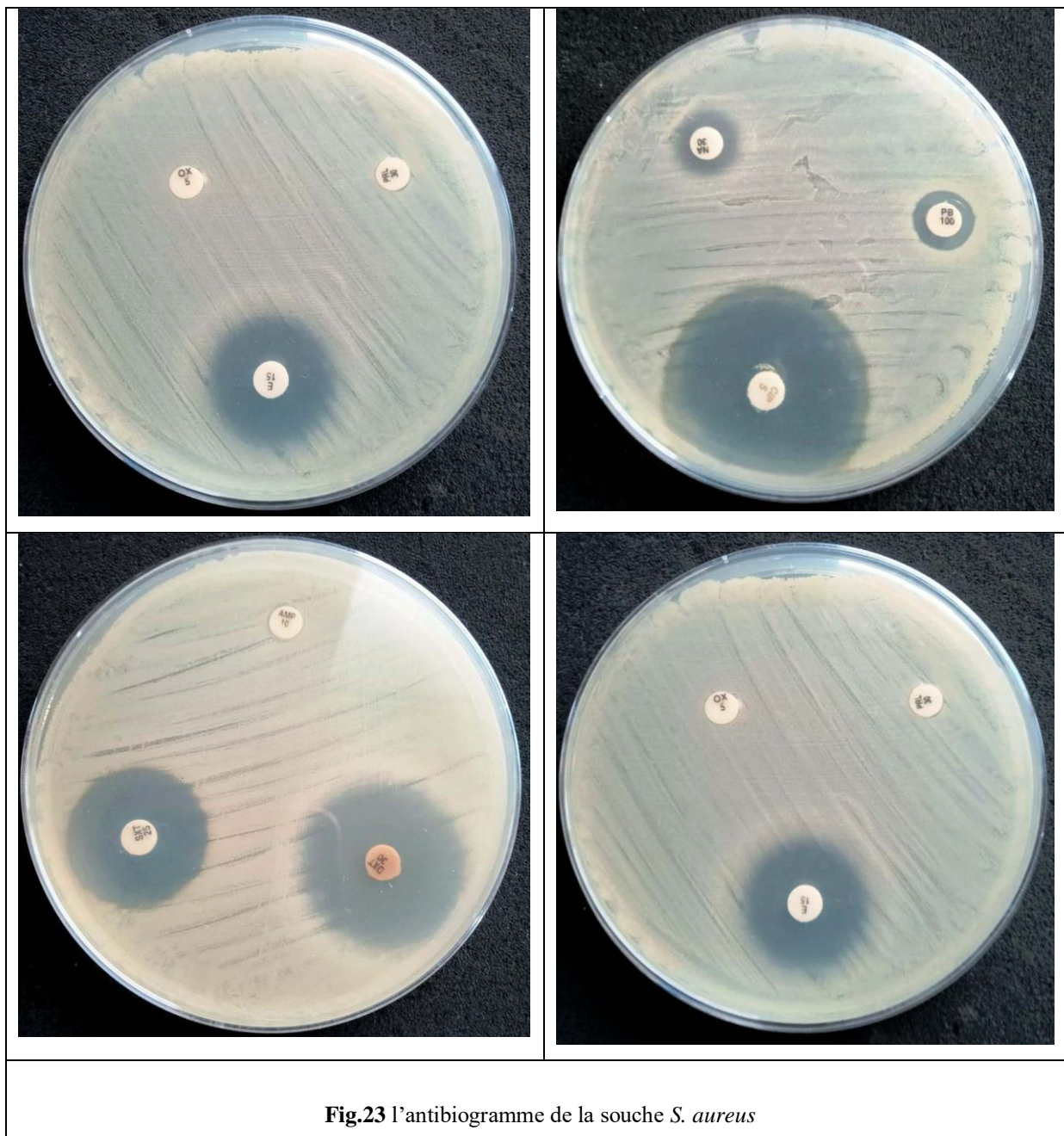


Tableau 14 : Résultats des antibiotiques exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm

N°	ANTIBITIQUE	Zone d'inhibition en mm	La sensibilité
1	P ₁₀	0	-
2	AMX ₂₅	20	+++
3	GEN ¹⁰	31	+++
4	CEP ₂₅	36	+++
5	PB ₁₀₀	11	+
6	NA ₃₀	12	+
7	AMP	0	-
8	SXT ₂₅	24	+++
9	DXT ₃₀	30	+++
10	PRL ₃₀	0	-
11	OX ₅	0	-
13	E ₁₅	25	+++

III.8.2. Modèle prostatite bactérienne chronique CBP

Un modèle de rat reproductible du prostatite chronique bactérien (CBP) a été développé, ce dernier partage de nombreuses similitudes avec CBP humaine (Lee et al., 2001). Dans notre modèle, les bactéries introduites par l'urètre ont pénétré et proliféré dans le canal prostatique, et ont provoqué une infection bactérienne de la prostate. Pour confirmer la mise en place de la CBP, des analyses microbiologiques (uroculture et spermoculture) a été réalisées.

Sur les 25 rats traités, 21 rats représentant 84% du lot ont développé une prostatite bactérienne chronique, ce résultat a été confirmé par les analyses microbiologiques (uroculture et spermoculture). Le dénombrement des *staphylococcus aureus* sur gélose au sang, l'observation d'une hémolyse bêta autour de chaque colonie, ainsi qu'une coloration de gram ont confirmé la présence de cette bactérie Fig.24. La coloration de May-Grünwald Giemsa des frottis de spermes confirme la présence d'un nombre important de leucocytes chez tous les 21 rats atteints de prostatite (Fig.25), chez le rat témoin, rat sain, aucune présence de leucocytes

dans son frotti de sperme (Fig.26). Quatre rats qui n'ont pas pu éjaculer ont été exclus de l'expérience. Le prélèvement du sperme a été réalisé pour éviter les complications de l'intervention chirurgicale de la biopsie prostatique, surtout pour éviter la mort des rats, et pour but d'améliorer le protocole de Han et al. (2008), à l'il y a la mort de 6 rats a la cause des complications suite de l'intervention chirurgicale. Puisque 80% du liquide de spermes provient de prostate, un nombre du leucocyte élevé ainsi la présence de *S. aureus* dans la culture de sperme suffisant pour confirmer l'infection prostatique



Fig.24. Les colonies de *Staphylococcus aureus* sur la gélose au sang (présence d'hémolyse) (a) Coloration de gram de *Staphylococcus aureus* (b)



Fig.25. Observation microscopique d'un frotti de sperme de rat atteint d'une prostatite bactérienne chronique (CBP) par coloration de May-Grünwald Giemsa indique la présence des leucocytes (grossissement x 40).

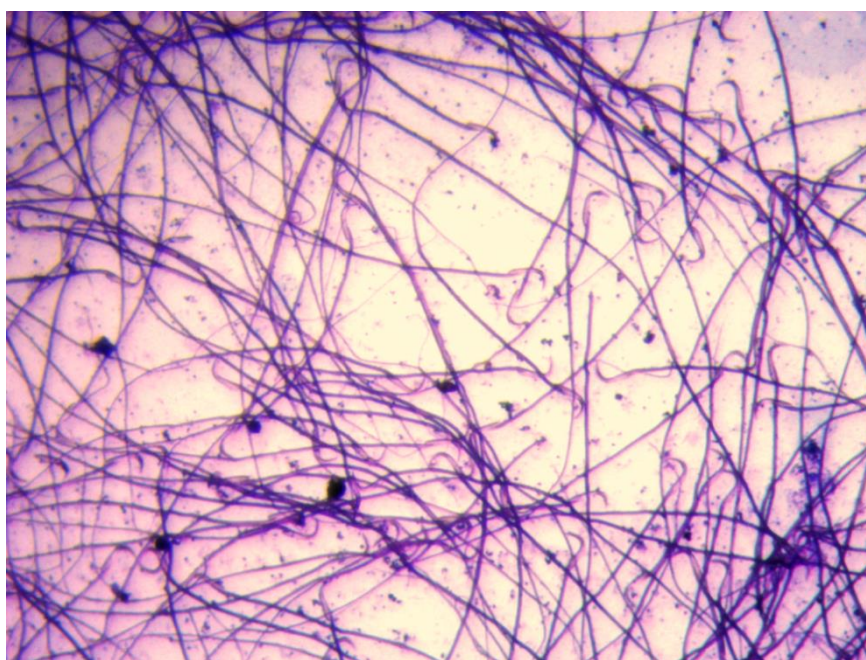


Fig.26. Observation microscopique d'un frotti de sperme d'un rat normal par coloration de May-Grünwald Giemsa (grossissement x 40).

III.8.3. Résultat de l'effet thérapeutique de lycopène seul ou combiné avec céfalexine sur CBP

III.8.3.1. Paramètres anthropométriques et biologiques des rats

Comme le montre le [tableau 14](#), les animaux ont été surveillés et contrôlés pendant les deux semaines du traitement, la CPB induit une diminution significative du poids corporel des animaux du groupe contrôle par rapport aux rats traités. La baisse du poids corporel a été estimée de 39,9g entre le poids des animaux du premier jour ($211,3 \pm 24.85$ g) de l'installation de CBP au dernier jour de la fin du traitement. Alors que les animaux traités soit avec lycopène, soit avec céfalexine ou la combinaison lycopène / céfalexine ont montré une augmentation statistiquement significative du poids corporel par rapport aux groupes CBP témoins positifs et leur poids corporel était respectivement de 218.94 ± 25.95 , de 222.5 ± 11.47 et 275.34 ± 11.47 g, avec une augmentation de 9.54, 18.9 et 59,99g, la diminution du poids corporel chez les rats non traités (groupe contrôle) est causée par la perte d'appétit.

Une diminution statistiquement significative ($P < 0,05$) du poids de la glande prostatique chez le contrôle CBP de 0.34 ± 0.01 g, peut-être expliquée par une atrophie des tissus prostatiques par rapport au groupe traité par le céfalexine et sa combinaison avec lycopène ([Tab. 14](#)).

L'analyse de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) montre aucune différence significative ($P > 0,05$) des concentrations de PSA chez l'ensemble des rats de l'expérimentation, les valeurs de PSA varient entre ($2.84 \pm 0.008 \times 10^{-2}$ ng/mL et $2.62 \pm 0.003 \times 10^{-2}$ ng/mL) ([Tab. 14](#)). L'antigène prostatique (PSA) est une sérine protéase, élaborée par l'épithélium canalaire prostatique est détectable dans le sérum des males. Généralement la concentration du PSA est élevée chez les patients atteints d'adénocarcinome, et même chez nombreuses affections non malignes de la prostate, en particulier l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) ([Tetreault et al., 2016](#)),

Mais pour les prostatites bactériennes selon les études de [Durwood et al. \(1992\)](#), la concentration de PSA peut augmenter que dans la première semaine après l'infection, dans la prostatite aiguë et cette concentration peut diminuer et reste stable dans les deux semaines suivantes (prostatite chronique), ce qui confirme que nos résultats de là ce paramètre sont en accord avec les travaux de [Durwood et al. \(1992\)](#) et que les conditions peuvent prêter à confusion si le PSA doit être utilisé pour le diagnostic et le traitement de prostatite bactérienne chronique.

Tableau 15 : Paramètres anthropométriques et biologiques chez le rat (CBP) traité ou non au lycopène et à la céfloxine.

Groupe des rats	Poids du corps (g) 1 ^{er} d'installation (CBP)	Poids du corps (g) La derrière jour de traitement	Poids prostate (g)	PSA (× 10-2 ng/mL)
Groupe contrôle	211,3± 24.85	171.4 ±38.66	0.34 ± 0.01 ^a	2.64 ±0.008
Groupe traité par lycopène	209,4±37.76 ^a	218.94 ± 25.95 ^a	0.47± 0.12 ^a	2.66 ± 0.003
Groupe traité par céfalexine	203,6±18.66 ^a	222.5 ± 11.46 ^a	0.53± 0.05	2.62± 0.004
Combinaison lycopène / céfalexine	215,01±28.16 ^a	275.34 ± 11.47 ^b	0.55± 0.11	2.84 ± 0.001

Les valeurs sont exprimées en moyenne ±ET. a : Différence significative à P < 0.05; b: Différence hautement significative à P < 0.001.

III.8.3.2. Résultats microbiologiques des tissus prostatiques et cultures d'urine

a) Résultats de l'examen bactériologique des tissus de prostate

Après 2 semaines de traitement, des échantillons d'urines sont prélevés et les rats sont sacrifiés, une petite partie du tissu de la prostate est prélevée dans des conditions aseptique pour le dénombrement, la partie restante de prostate est conservée dans du formol et PBS. Les données microbiologiques des tissus de la prostate en premier lieu avant tout traitement en confirment a priori le développement de la prostatite chez les rats puisque les concentrations bactériennes de *S.aureus* sont très élevées par rapport à la normale. Quatre semaines après l'introduction de *S. aureus*, la CBP s'était développée chez tous les groupes avec des stades d'infections variables. En second lieu, après le traitement avec soit lycopène, soit l'antibiotique où la combinaison des deux, on observe chez tous les groupes une diminution significative des taux de la charge bactérienne de *S.aureus* (Tab. 15). Après la culture des tissus prostatiques des 21 rats, le nombre des colonies (ufc/g) dans le groupe traité par Céfalexine et par le lycopène/ Céfalexine a démontré une diminution significative par rapport à celle du groupe témoin (P < 0,05). Le groupe qui a reçu des doses journalières de lycopène a également montré une tendance cohérente de diminution du nombre de bactéries par rapport

au groupe témoin positif, mais cette diminution n'était pas statistiquement significative en comparaison avec le groupe lycopène/céfalexine. La céfalexine est l'antibiotique le plus utilisé dans les traitements de prostatite chronique dû au *S. aureus* (Baker, et al., 2004 ; Paulson, et al., 1986). C'est un antibiotique de la famille de β -lactamines qui inhibe la production de la paroi cellulaire et parmi un des inhibiteurs sélectifs de la synthèse de peptidoglycanes. Cette perturbation de la structure cellulaire provoque une perméabilité membranaire, de sorte que le lycopène puisse facilement traverser la membrane, ce qui renforce leur effet antimicrobien indiquant qu'il y a une possibilité d'une synergie entre le lycopène et l'antibiotique testé. Le groupe traité par lycopène seul a également montré une tendance cohérente de diminution du nombre d'UFC dans la culture du tissu prostatique par rapport au groupe témoin positif. Cette diminution peut être expliquée par l'effet positif du lycopène sur le système immunitaire, du fait que c'est un antioxydant qui contribue à la protection des globules blancs, doté d'un pouvoir immunostimulant et impliquant des effets anti-inflammatoires (Friedman, et al., 2013).

b) Résultats de l'examen bactériologique des urines

Le résultat quantitatif microbiologique des urines de 21 rats montre qu'il y a une diminution hautement significative du nombre des colonies dans les groupes traités par l'antibiotique céfalexine et dans le groupe de rats recevant un traitement mixte entre lycopène/ céfalexine par rapport au groupe témoin ($P < 0,05$) (Tab. 15). Une tendance à la diminution du nombre de bactéries dans le groupe d'animaux recevant le lycopène a été enregistrée également par rapport au témoin positif, mais cette diminution n'était pas statistiquement significative ($P > 0,05$) (Tab.15). Ces résultats suggèrent que le lycopène pourrait avoir un effet synergique lorsqu'il est utilisé en combinaison avec la céfalexine. Bien que le mécanisme soit incertain, il est suggéré que la thérapie combinée avec la fluoroquinolone et le lycopène pourrait améliorer l'efficacité du traitement de la CBP (Han et al., 2008), mais il faut des études cliniques appropriées pour approuver ces résultats et davantage d'efforts pour les élucider.

Tableau16 : Résultats microbiologiques quantitatifs de la culture des urinaires et tissus prostatiques.

Groupe des rats	Moyenne (\pm ET) log ₁₀ UFC/g du tissu prostatique	Moyenne (\pm ET) log ₁₀ UFC/ 100 μ l d'urine
Controle groupe (n = 6)	6.43 \pm 0.40	5.21 \pm 0.16
Groupe traité par Lycopene (n = 5)	5.48 \pm 0.36	4.66 \pm 0.75
Groupe traité par Cefalexin (n = 5)	3.48 \pm 0.37 ^a	2.92 \pm 0.89 ^a
Combinaison entre Lycopene / cefalexin (n = 5)	1.19 \pm 0.39 ^a	1.08 \pm 0.05 ^a

ET, écart type ; UFC, unité formant colonie. a : P < 0,05 par rapport au groupe contrôle

III.8.3.3. Etude histologiques de la prostate

Dans l'étude histologique, la coloration été réalisée pour observer les structures morphologiques des tissus de la prostate dans le groupe témoin modèle (CBP) et les groupes traités par Lycopène et la céfalexine. Dans le groupe témoin positif, on a observé une infiltration intense des monocytes et des macrophages dans les acini et l'interstitium, une fibrose interstitielle, une congestion vasculaire sévère avec un œdème interstitiel massif dans les tissus de la prostate (Fig 25. a). Chez les groupes traités par lycopène, l'infiltration de cellules inflammatoires avait diminué dans les tissus glandulaires et périglandulaires, avec infiltrations cellulaires légère et focalisé (Fig 25. b), mais cette diminution moins important par rapport au groupe traité par céfalexine au il y a une diminution remarquable de l'infiltration cellulaire, un aspect relativement normale de la acini , mais avec une présence de quelque œdème (Fig 25. c), car l'antibiotique a un effet antibactérien mais n'a pas un effet anti-inflammatoire, Par ailleurs les animaux du groupe traité en combinaison entre lycopène et céfalexine, les acini ont retrouvé leur taille et une légère hyperplasie des cellules épithéliales glandulaires sans destruction ni atrophie ont été observés dans les tissus de la prostate et absence totale d'œdème.

De plus, une diminution importante de l'infiltration des cellules inflammatoires a été observée par rapport au groupe modèle, (Fig 25. e)

Le lycopène est également suggéré dans de nombreuses études pour réduire la production et l'expression de facteurs inflammatoires (Hadad et al.,2012). (Palozza et al.,

1992) a en outre expliqué que le mécanisme possible du Lycopène dans la réduction des facteurs inflammatoires pourrait être que le lycopène était un composé lipophile étroitement associé avec la membrane cellulaire, où les caroténoïdes régulent les activités des facteurs de transcription et des kinases sensibles à l'oxydoréduction. D'autre étude (Zhao et al., 2019) montre que le lycopène a exercé un effet anti-inflammatoire en régulant à la baisse des niveaux des facteurs inflammatoires et exerce également un effet antioxydant

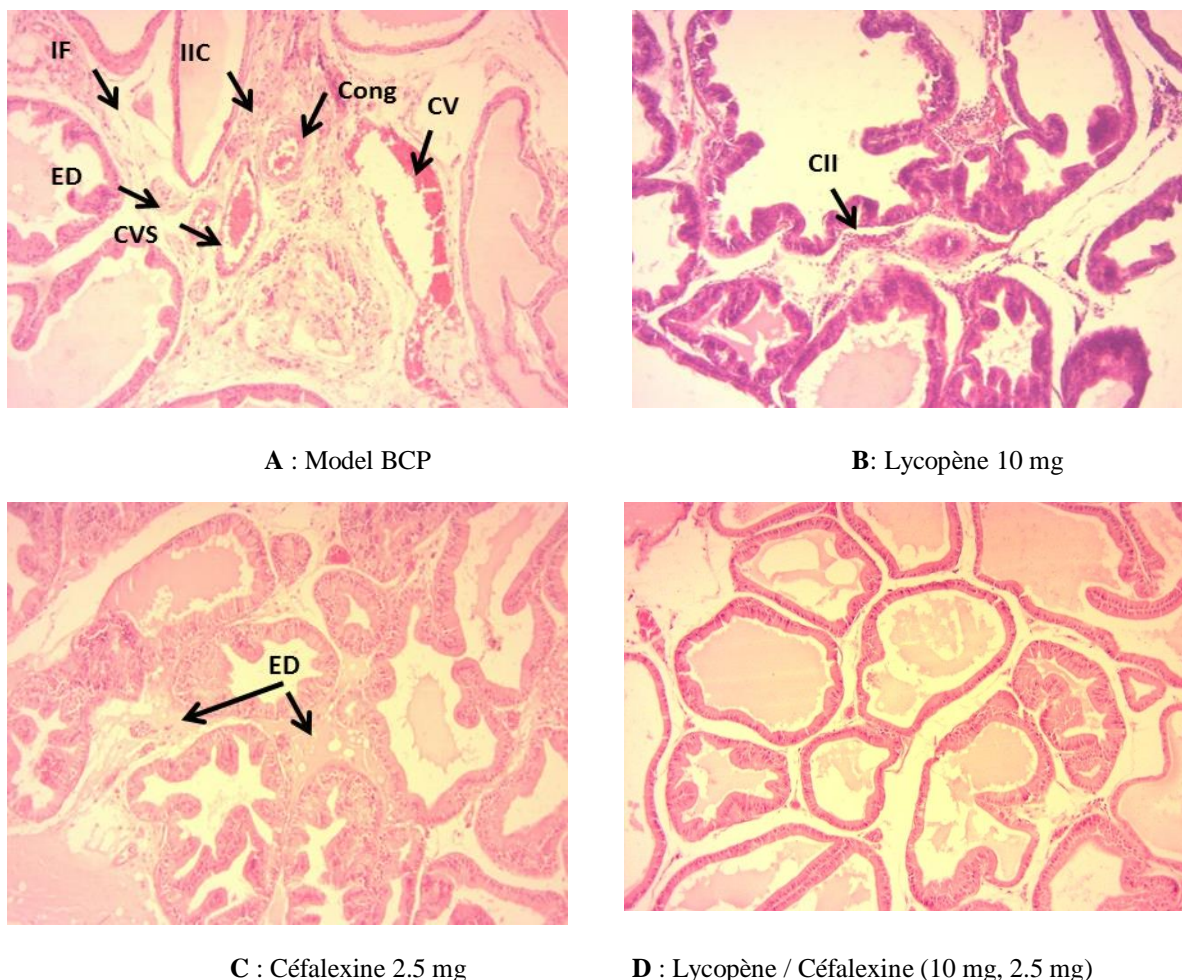


Fig. 27 : Micrographies représentatives de sections de tissu prostatique (H &E x 100) (a) groupe contrôle. (b) groupe traité par lycopène, (c) groupe traité au céfaléxine. (e) le groupe traité avec lycopène / céfaléxine, **IF** : fibrose interstitielle, **IIC** : l'infiltration de cellules inflammatoires, **CVS** : congestion des vaisseaux sanguins, **CV** : congestion vasculaire, **ED** : œdème interstitiel

Conclusion

Conclusion

Dans la présente étude, l'extraction de lycopène a été effectuée à partir de deux sources alimentaires locales, le fruit de pastèque de la variété, *Citrullus lanatus* et le concentré de tomate, qui est un produit local de la marque CAB Amor Ben Amor, Le rendement de l'extraction de lycopène du concentré de tomate et de pastèque est égal à 0,27 % et à 0,18 % respectivement par apport à 100 g de matière première. Ces concentrations, sont largement satisfaisantes.

Le DMSO a été utilisé comme un anti-solvant pour la purification du lycopène par la méthode de recristallisation. Cette purification a été confirmée par les méthodes de caractérisations suivant : UV-vs, CMI, FTIR, HPLC et DRX. Les résultats de la conception du Box-Behnken ont permis de développer un modèle quadratique pour la prédiction du rendement du lycopène pur en fonction de trois paramètres. Sous des conditions optimales de la purification consistant en un volume d'oléorésine 20 ml, une température de 50 °C, un volume anti-solvant le DMSO de 5 mL, une teneur satisfaisante en lycopène pur 2,73 mg /g a été récupérée.

L'étude de solubilité du lycopène dans quelques huiles essentielles (*d'Anethum graveolens*, *d'Ammi visnaga* et l'huile d'orange) comparé à l'huile végétale de son de riz montre que les huiles essentielles ont une grande capacité de solubilité du lycopène par apport à l'huile végétale avec une meilleurs solubilité a était enregistré par l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L (15 mg/g) suivie de celle *d'Anethum graveolens*.L (12,2 ± 0,6 mg/g), en dernier lieu cl'huile d'orange (10,5 ± 0,3 mg/g).

L'étude du pouvoir antioxydant par le test de DPPH a montré que l'extrait de caroténoïdes et du lycopène possédaient une grande activité radicalaire. Ils ont été capables de piéger le radical libre DPPH. Les valeurs de CE50 ont été obtenues respectivement à 122.1 µg. mL⁻¹ et 580 µg. mL⁻¹ pour l'extrait de caroténoïdes et du lycopène. Celle de l'acide ascorbique a été quant à elle, obtenue à 27,3 µg. mL⁻¹

La concentration minimale inhibitrice (CMI) du lycopène a été explorée en testant six souches référencées, les valeurs de CMI obtenues étaient relativement élevées, ce qui se traduit par une faible activité microbienne. Afin de l'améliorer, des interactions synergétiques ont été développées suite à la combinaison du lycopène avec l'huile essentielle *d'Ammi visnaga*. Une synergie totale contre *K. pneumoniae* avec FICI allant de 0.42 et partielle contre les souches *E. coli* et *S. aureus* avec FICI allant de 0,55 et 0,51 respectivement, ont été

CONCLUSION

enregistrées, Ce qui a confirmé que cette huile a non seulement amélioré la solubilité du lycopène, mais a renforcé également son activité antimicrobienne.

Dans la partie *in vivo*, un modèle animal de rat reproductible d'une prostatite chronique bactérienne (CBP) a été développé par introduction de la bactérie *S. aureus* par l'urètre en pénétrant dans le canal prostatique pour induire une infection prostatique, quatre semaines après la prolifération de *S. aureus*, des prélèvements d'urine et des spermatozoaires ont été réalisés. L'uroculture et la spermocultures confirment le modèle (CBP) et sélectionnent les rats positifs. Les rats de modèle (CBP) ont été divisés aléatoirement en quatre groupes traités par le lycopène seul, lycopène / céfalexine, céfalexine seul et un témoin positif. Les résultats montrent que la croissance bactérienne et le degré d'inflammation prostatique chez les rats traités au lycopène seul étaient légèrement inférieurs à ceux des rats témoins, statistiquement non significatives par rapport au témoin. Une réduction significative du nombre de bactéries ainsi qu'une réduction considérable de l'infiltration de cellules inflammatoires, l'œdème interstitiel et la fibrose a été observés chez le groupe recevant le lycopène combiné au céfalexine par rapport au groupe témoin et le groupe traité au céfalexine seul. Ces résultats suggèrent que le lycopène peut avoir un effet supplémentaire (synergique) lorsqu'il est utilisé conjointement avec la céfalexine pour le traitement du CBP causé par *S. aureus*.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette investigation, constitue une première étape dans la recherche des substances bioactives, il serait intéressant d'étayer ce travail en visant comme perspectives les points suivants :

- ☞ Etudier l'effet synergique antioxydant du lycopène avec les huiles essentielles.
- ☞ Etudier les mécanismes d'action de l'effet synergique antimicrobien du lycopène avec les huiles essentielles.
- ☞ Elargir le spectre des propriétés biologiques que peuvent posséder lycopène ou la combinaison avec les huiles essentielles en évaluant d'autres activités *in vitro* et *in vivo* telles que l'activité antitumorale et antivirale.

CONCLUSION

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

-A-

1. Adriany G N, Amorim S, Jessica M T, Santos R C, Gullón B, Oliveira A, Santos L FA, Adamor L E, Mafud A C, Petrilli H M, Yvonne P, Delerue-Matos C, Pintado, Manuela E, Leite, José R S A. (2017). HPLC-DAD, ESI - MS/MS and NMR of Lycopene isolated from *P. guajava* L. and its Biotechnological applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, (1), 1700330–. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700330>
2. Aghel N, Ramezani Z, Amirfakhrian S. (2011). Isolation and quantification of lycopene from tomato cultivated in Dezful, Iran. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 6(1), 9–15.
3. Alda L M, Gogoasa L, Bordean D.-M, Gergen I, Alda S, Moldovan C, Nita L. (2009). Lycopene content of tomatoes and tomato products. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 15(4), 540–542. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/266466884>
4. Amiri R, Atefeh A, Soleiman. (2018). Extraction of lycopene using a lecithin-based olive oil microemulsion. *Food Chemistry*, S0308814618314845–. [doi:10.1016/j.foodchem.2018.08.080](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.080)
5. Amorim AG N, Souza JMT, Santos RC, Gullón B, Oliveira A, Santos LFA, Leite JRSA. (2018). HPLC-DAD, ESI-MS/MS, and NMR of Lycopene Isolated From *P. guajava* L and Its Biotechnological Applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 120(3):17003-30. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700330>
6. Ameret M. (2001). May-Grunwald-Giemsa stain for detection of spermatogenic cells in the ejaculate: a simple predictive parameter for successful testicular sperm retrieval. *Human Reproduction* 16(7): 1427–1432. [doi:10.1093/humrep/16.7.1427](https://doi.org/10.1093/humrep/16.7.1427)

7. Arda E, Çakıroğlu B, Arıkan MG, Gözüküçük R. (2018). Chronic bacterial prostatitis in a Turkish Population: The Microbiological Etiology and Distribution. *JAREM*, 8(3): 153-6. (14) (PDF) *Chronic Bacterial Prostatitis in a Turkish Population: The Microbiological Etiology and Distribution*.
8. Ascenso A. (2012). *Carrier-mediated dermal delivery for prevention or treatment of skin disorders*
9. Ascenso A, Pinho S, Eleutério C, Praça F, Lopes Badra Bentley M V, Oliveira H, Simões S. (2013). Lycopene from tomatoes: Vesicular nanocarrier formulations for dermal delivery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1057 61(30), 7284–7293. <https://doi.org/10.13140/2.1.3833.9524>
10. Auffenberg G B, Helfand B T, McVary K T. (2009). Established medical therapy for benign prostatic hyperplasia. *Urologic Clinics*, 36(4), 443-459.
11. Aust O, Ale-Agha N, Zhang L, Wollersen H, Sies H, Stahl W. (2003). Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food and Chemical Toxicology*, 41(10), 1399–1407. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00148-0)
12. Aydemir G, Kasiri Y, Birta E, Béke G, Garcia A L, Bartók E M, Rühl R. (2013). Lycopene-derived bioactive retinoic acid receptors/retinoid-X receptors-activating metabolites may be relevant for lycopene's anti-cancer potential. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(5), 739–747. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200548>
13. Budavari S, Merck, Whitehouse Station NJ (1996) Édition: 12th ed The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals

14. Bag A, Chattopadhyay R R. (2015) .Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. PLoS ONE 10(7): 1–17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131321>
15. Baker SD, Horger DC, Keane TE. (2004). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prostatic abscess. *Urology*.64(4). [808–810. doi:10.1016/j.urology.2004.05.0810](https://doi.org/10.1016/j.urology.2004.05.0810)
16. Bala N, Saha S, Chakraborty M, Maiti M, Das S, Basu R, Nandy P. (2015). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Hibiscus subdariffa leaf extract: effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity. *RSC Advances*, 5(7), 4993-5003
17. Balakin K V, Ivanenkov Y A, Skorenko A V, Nikolsky Y V, Savchuk N P, Ivashchenko, A A. (2004). In silico estimation of DMSO solubility of organic compounds for bioscreening. *SLAS Discovery*, 9(1), 22-31.
18. Baldermann S, Ropeter K, Köhler N, Fleischmann P. (2008). Isolation of all-trans lycopene by high-speed counter-current chromatography using a temperature-controlled solvent system. *Journal of Chromatography A*, 1192(1), 191-193.
19. Berger P D, Maurer R E, Celli GB (2018): *Experimental Design with Applications in Management, Engineering, and the Sciences*, 2 edn. Springer, Cham (2018)
20. 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. CMITI Sarl Avignon. ISSN 1145-9565.
21. Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C L W T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
22. Breemen van M J, Rombach S M, Dekker N, Poorthuis B J, Linthorst G E, Zwinderman A. H, Hollak C E. (2011). Reduction of elevated plasma globotriaosylsphingosine in

patients with classic Fabry disease following enzyme replacement therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(1), 70-76.

- 23.** Briones-Labarca V, Giovagnoli-Vicuna C, Canas-Sarazua R. (2019). Optimization of extraction yield, flavonoids and lycopene from tomato pulp by high hydrostatic pressure-assisted extraction. *Food chemistry*, 278, 751-759.
- 24.** Britton G. (1995) Structure and Properties of Carotenoids in Relation to Function. *FASEB Journal*, 9, 1551-1558.
- 25.** Bo Shu W Y, Yaping Z, Xiaoyong L. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. , 76(4), 664–669. [doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.062](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.062)
- 26.** Boumendjel M, Houhamdi M, Samar M F, Sabeg H, Boutebba A, Soltane M. (2012). Effet des traitements thermiques d'appertisation sur la qualité biochimique, nutritionnelle et technologique du simple, double et triple concentré de tomate. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 51-59.
- 27.** Box GEP, Behnken DW. (1960). Some New Three Level Design for Study of quantitative variables Box Behnken.pdf. *Technometrics* 2(4):455–475.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00401706.1960.10489912>
- C-**
- 28.** Carbone L, Austin J. (2016). Pain and Laboratory Animals: Publication practices for better data reproducibility and better animal welfare. *PLOS ONE*. 11(5), [e0155001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155001). [doi:10.1371/journal.pone.0155001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155001)
- 29.** Caseiro M, Ascenso A, Costa A, Creagh-Flynn J, Johnson M., Simões S. (2020). Lycopene in human health. *Lwt*, 127, 109323.
- 30.** Campos K K D, Araújo G R, Martins T L, Bandeira A C B, Costa P, Talvani A, Bezerra F S. (2017). The antioxidant and anti-inflammatory properties of

- lycopene in mice lungs exposed to cigarette smoke. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 48, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.06.004>
- 31.**Celli G B, Teixeira A G, Duke T G, Brooks M S L. (2016). Encapsulation of lycopene from watermelon in calcium-alginate microparticles using an optimised inverse-gelation method by response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1523–1529.1097 <https://doi.org/10.1111/ijfs.13114>
- 32.**Chasse G A, Mak M L, Deretey E, Farkas I, Torday L, Papp J G, Rao A V. (2001). An ab initio computational study on selected lycopene isomers. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 571(1-3), 27-37.
- 33.**Chen J S, Cheah Y L, Chen Y T, Jayaprakash N, Madhavi S, Yang Y H, Lou X W. (2009). SnO₂ nanoparticles with controlled carbon nanocoating as high-capacity anode materials for lithium-ion batteries. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(47), 20504-20508.
- 34.**Cillard, J.,Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.
- 35.**Ciriminna R, Fidalgo A, Meneguzzo F, Ilharco LM, Pagliaro M (2016) Lycopene: Emerging Production Methods and Applications of a Valued Carotenoid. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 4(3): 643–650. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01516>
- 36.**Cramer, D. W., Kuper, H., HARlow, B. L., & Titus-Ernstoff, L. (2001). Carotenoids, antioxidants and ovarian cancer risk in pre- and postmenopausal women. *International Journal of Cancer*, 94(1), 128–134. <https://doi.org/10.1002/1435>
- 37.**Coujard J L. (1980). Reproduction et mobilité des structures de production (une approche «démographique» sur onze communes de la Woevre (1945-1979). *Économie rurale*, 162(1), 13-13.

38.Couriol C. (1997) Mise au point du procédé continu de fabrication industrielle de la glycine et optimisation de sa préparation par cristallisation. Thèse de l'université Pierre et Marie Curie. Paris.

-D-

39.Degrou AE, Edouard A, Etude D. (2013). Etude de l'impact des procédés de transformation sur la diffusion des caroténoïdes : cas du lycopené de la tomate.

40.Denis B, Jérôme L, Michel DG. (2002). la substitution des solvants par le diméthylsulfoxyde. IRSST-Direction des communications 505 .boul. de maisonneuve. 116 pages

41.Dhakal M, Sharma P, Ghosh S, Paul B, Bhutia S, Pal P. (2016). Preparation and evaluation of herbal lipsticks using natural pigment lycopene (*Solanum lycopersicum*). *Universal Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2), 23–29.
<https://doi.org/10.21276/UJPSR.2016.02.02.24>

42.Dhuique-Mayer C, Tbatou M, Carail M, Caris-Veyrat C, Dornier M, Amiot M J. (2007). Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4209–4216.

43.Divya P, Anbarasan B, Ramaprabhu S. (2011). International Conference on Nanoscience, Technology and Societal Implications - Preparation and Characterization of beta-Carotene Encapsulated Chitosan, Oleic Acid Coated Fe₃O₄ Nanoparticles. , (), 1–4. [doi:10.1109/nstsi.2011.6111983](https://doi.org/10.1109/nstsi.2011.6111983)

44.Diwadkar-Navsariwala V. Novotny J. A. Gustin D. M, Sosman J. A. Rodvold K A. Crowell J A. Bowen P E. (2003). A physiological pharmacokinetic model describing the disposition of lycopene in healthy men. *Journal of Lipid Research*. 44(10): 1927–1939. [doi:10.1194/jlr.m300130-jlr200](https://doi.org/10.1194/jlr.m300130-jlr200)

- 45.**Djifaby SPA, Yacouba CA, Adama H, Kiessoum K, Marie-Hyacinthe CM, Germaine NO (2012) Carotenoids content and antibacterial activity from galls of guiera senegalensis jf Gmel (combretaceae). *International Journal of Phytomedicine*. 4-44:1-446 <http://www.arjournals.org/index.php/ijpm/index>
- 46.**Dos Santos P P, Paese K, Guterres S S, Pohlmann A R, Costa T H, Jablonski A, Rios A, de O. (2015). Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: Physicochemical characterization and stability study. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2). <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2917-5>
- 48.**Drury R A, Wallington E A. (1980). *Carleton's Histological Techniques*. 5th Ed. Oxford University Press, New York, 195.
- 49.**Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C, Prashast P. (2014). Lycopene and mainfertility. *Asian Journal of Andrology* 16(3):420–425. <https://doi.org/10.4103/1008682X.126384>
- 50.**Durwood E, Neal Jr, Timothy D, Moon S C, DebaSarma. (1992). Prostate specific antigen and prostatitis I. Effect of prostatitis on serum psa in the human and nonhuman primate. , 20(2), 105–111. [doi:10.1002/pros.2990200205](https://doi.org/10.1002/pros.2990200205)

-E-

- 51.**Etminan M, Takkouche B, Caamaño-Isorna F.(2004). The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: A meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 13(3), 340–345

-F-

- 52.**Faisal W, Hora TRO, Driscoll CMO, Griffin BT. (2013) .A novel lipid-based solid dispersion for enhancing oral bioavailability of Lycopene –In vivo evaluation using a pig model. *International Journal of Pharmaceutics*. 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.027>

53. Failla M L, Chitchumroonchokchai C, Ishida B K. (2008). In vitro micellarization and intestinal cell uptake of cis isomers of lycopene exceed those of all-trans lycopene. *The Journal of nutrition*, 138(3), 482-486
54. Faria-Silva C, Ascenso A, Costa A. M, Marto J, Carneiro M, Ribeiro H M, Simões S. (2019). Feeding the skin: A new trend in food and cosmetics convergence. *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/Submitted>
55. Fernández-Bedmar Z, Anter J, Alonso Moraga Á. (2018). Anti/genotoxic, longevity inductive, cytotoxic, and clastogenic-related bioactivities of tomato and lycopene. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59(5), 427–437. <https://doi.org/10.1002/em.22185>
56. Friedman M. (2013). Anticarcinogenic. Cardioprotective. Other Health Benefits of Tomato Compounds Lycopene, α -Tomatine, and Tomatidine in Pure Form and in Fresh and Processed Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(40), 9534–9550. doi:10.1021/jf402654e
- G-**
57. Gao Q, Zhong C, Zhou X, Chen R, Xiong T, Hong M, Hao L. (2019). The association between intake of dietary lycopene and other carotenoids and gestational diabetes mellitus risk during mid-trimester: A cross-sectional study. *British Journal of Nutrition*, 121(12), 1405–1412. <https://doi.org/10.1017/s0007114519000606>
58. Giovannucci E, Rimm E B, Liu Y, Stampfer M J, Willett W C. (2002). prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(5), 391–398. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.5.391>
59. Guo H, Huang Y, Qian J, Gong Q, Tang Y. (2014). Optimization of technological parameters for preparation of lycopene microcapsules. *Journal of Food Science and Technology*, 51(7), 1318–1325. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0600-0>

60. Gutierrez J A, Solenberg P J, Perkins D R, Willency J A, Knierman M D, Jin Z, Hale J E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17), 6320-6325.

61. Grady D, Barrett M, Casey E, Glennon B. (2007). The Effect of Mixing on the Metastable Zone Width and Nucleation Kinetics in the Anti-Solvent Crystallization of Benzoic Acid. , *85(7)*, 945–952. [doi:10.1205/cherd06207](https://doi.org/10.1205/cherd06207)

-H-

62. Hadad N, Levy R. (2012). The synergistic anti-inflammatory effects of lycopene, lutein, β -carotene, and carnolic acid combinations via redox-based inhibition of NF- κ B signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(7), 1381–1391. [doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.078](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.078)

63. Haddouchi F, Lazouni H A, Meziane A, Benmansour A. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science: Revue Internationale Des Sciences Et Technologie*, 5(2).

64. Hamed D, Keddari S, Boufadi M Y, Bessad L. (2022). Lycopene Purification with DMSO anti-solvent: Optimization using Box-Behnken's experimental design and evaluation of the synergic effect between lycopene and *Ammi visnaga*. L essential oil. *Chemical Papers*, 1-13.

65. Han C H, Yang C H, Sohn D W, Kim S W, Kang S H, Cho Y H. (2008). Synergistic effect between lycopene and ciprofloxacin on a chronic bacterial prostatitis rat model. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31, 102–107. [doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.07.016](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.07.016)

66. Heidenreich S, Killmer J F, Millemann J A. (2022). If at first you don't adopt-

Investigating determinants of new product leapfrogging behavior. *Technological Forecasting and Social Change*, 176, 121437.

67. Heipieper HJ, Martínez PM .(2010). Toxicity of Hydrocarbons to Microorganisms. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. 1563: 1573.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_108
68. Hernández-Espinoza A B, Piñón-Muñiz M I, Rascón-Chu A, Santana-Rodríguez, V M, Carvajal-Millan E. (2012). Lycopene/arabinoxylan gels: Rheological and controlled release characteristics. *Molecules*, 17(3), 2428–2436.
<https://doi.org/10.3390/molecules17032428>
69. Hirsch K, Atzmon A, Danilenko M, Levy J, Sharoni Y .(2007) . Lycopene and other carotenoids inhibit estrogenic activity of 17 β -estradiol and genistein in cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 104(2) : 221–230.
<https://doi.org/10.1007/s10549-006-9405-7>
70. Ho K K H Y, Ferruzzi M G, Liceaga A M, San Martín-González, M. F. (2015). Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.061>
71. Hoffman M, Steele G, Yalla S.(2000). Acute bacterial endocarditis secondary to prostatic abscess. *J Urol* 2000;163:245.
72. Holick C N, Michaud D S, Stolzenberg-Solomon R, Mayne S T, Pietinen P, Taylor P R, Albanes D. (2002). Dietary carotenoids, serum β -carotene, and retinol and risk of lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 156(6), 536-547.
73. Honest K N, Zhang H W, Zhang L.(2011). Lycopene: Isomerization effects on bioavailability and bioactivity properties. *Food Reviews International*, 27(3), 248–258. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.563392>

- 74.**Ito, Y., Kurata, M., Hioki, R., Suzuki, K., Ochiai, J., & Aoki, K. (2005). Cancer mortality and serum levels of carotenoids, retinol, and tocopherol: A population-based follow-up study of inhabitants of a rural area of Japan. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 6(1), 10–15. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-123518444380262&partnerID=40&md5=85d0cd9b28a8f4b50a179952b6603f16>
- 75.**Ilic O, Jablan M, Joannopoulos J D, Celanovic I, Soljačić M. (2012). Overcoming the black body limit in plasmonic and graphene near-field thermophotovoltaic systems. *Optics express*, 20(103), A366-A384.
- 76.**Jaswir I, Noviendri Dedi, Hasrini R F, Octavianti F. (2011). Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33), 7119–7131. <https://doi.org/10.5897/jmprx11.011>

-K-

- 77.**Kazim S, Yenice E, Bilir B, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Kucuk O. (2019). Genistein Prevents Development of Spontaneous Ovarian Cancer and Inhibits Tumor Growth in Hen Model Genistein Prevents Development of Ovarian Cancer. *Cancer Prevention Research*, 12(3), 135-146.
- 78.**Kehili M, Sayadi S, Frikha F, Zammel A, Allouche N. (2019). Optimization of lycopene extraction from tomato peels industrial by-product using maceration in refined olive oil. *Food and Bioproducts Processing*, 117, 321-328.
- 79.**Kelkel M, Schumacher M, Dicato M, Diederich M. (2011). Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. *Free Radical Research*, 45(8), 925–940. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.564168>
- 80.**Khalfallah A, Labed A, Semra Z, Ai Kaki B, Kabouche A, Touzani R, Kabouche Z (2011) Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of Ammi

visnaga L. (Apiaceae) from Constantine, Algeria. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 1(3): 302–305.

<http://www.openaccessscience.com/index.php/journals/ijmap/111>

81. Khalil N, Bishr M, Desouky S, Salama O. (2020). *Ammi Visnaga L*, a Potential Medicinal Plant: A Review. *Molecules*, 25(2), 301–. [doi:10.3390/molecules25020301](https://doi.org/10.3390/molecules25020301)

82. Kim J Y, Lee J S, Han Y S, Lee J H, Bae I, Yoon Y M, Lee S H. (2015). Pretreatment with lycopene attenuates oxidative stress-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells. *Biomolecules and Therapeutics*, 23(6), 517–524. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.085>

83. Kishore P, Basha G, Venkat Ratnam, M., AghaKouchak, A., Sun, Q., Velicogna, I., & Ouarda, T. B. J. M. (2022). Anthropogenic influence on the changing risk of heat waves over India. *Scientific reports*, 12(1), 1-8.

84. Kohn RV, Shen, H., Vogelius, M. S., & Weinstein, M. I. (2008). Cloaking via change of variables in electric impedance tomography. *Inverse Problems*, 24(1), 015016.

85. Kong K W, Khoo H.E, Prasad K N, Ismail A, Tan C P, Rajab N F. (2010). Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules*, 15(2), 959–987. <https://doi.org/10.3390/molecules15020959>

86. Krishnaiah D, Nithyanandam R, Sarbatly R. (2014). A critical review on the spray drying of fruit extract: Effect of additives on physicochemical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(4), 449–473. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.587038>

Krinsky N I, Johnson E J. (2005). "Carotenoid actions and their relation to health and disease." *Mol Aspects Med* 26(6): 459-516

87. Kristal A R, Arnold K B, Schenk J M, Neuhouser M. L, Goodman P, Penson D F, Thompson I M. (2008). Dietary patterns, supplement use, and the risk of symptomatic benign prostatic hyperplasia: Results from the prostate cancer

prevention trial. *American Journal of Epidemiology*, 167(8), 925–934.

<https://doi.org/10.1093/aje/kwm389>

89.Kune G, Watson L. (2006). Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folate, methionine, vitamins B6, B12, C, E, selenium, and lycopene. *Nutrition and Cancer*, 56(1), 11–21. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5601_3

90.Kunthakudee N, Sunsandee N, Chutvirasakul B, Ramakul P. (2019). Extraction of lycopene from tomato with environmentally benign solvents: Box-Behnken design and optimization. *Chemical Engineering Communications*, 1–10. [doi:10.1080/00986445.2019.1610882](https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1610882)

-L-

91.Lademann J, Meinke M C, Sterry W, Darvin M E. (2011). Carotenoids in human skin. *Experimental Dermatology*, 20(5), 377–382. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01189.x>

92.Liu Y, Liu J, Chen X, Liu Y, Di D. (2010). Preparative separation and purification of lycopene from tomato skins extracts by macroporous adsorption resins. *Food Chemistry* 123(4): 1027–1034. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.055>

93.Lima L F, Bruno J B, Silva A M S, da Duarte A B G, Figueiredo J R de Rodrigues A P R. (2016). Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. *Reproducao e Climatério*, 31(2), 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.recli.2015.12.005>

94.Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, Pettersen J, Bergman R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemom. Intell. Lab.* 42(1), 3–40

95.López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Valenzuela-Sánchez KP, Núñez-Gastélum JA, Escárcega-Galaz AA, Rodríguez-Ramírez R. (2014). Effect of solvents and methods of stirring in extraction of lycopene, oleoresin and fatty acids from over-ripe tomato.

International Journal of Food Sciences and Nutrition, 65(2), 187–193.

<https://doi.org/10.3109/09637486.2013.839630>

-M-

- 96.**Maataoui M E M. (2006). El Otro entre Nosotros: el musulmán en la prensa. Medios de comunicación e inmigración, 97.
- 97.**Maiani C, Catasta T, Cambrodón B, Granado-Lorencio. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular nutrition & food research*, 53 Suppl 2, S194-218.
- 98.**Manzo N, Santini A, Pizzolongo F, Aiello A, Romano R. (2019). Degradation kinetic (D100) of lycopene during the thermal treatment of concentrated tomato paste. *Natural Product Research*, 33(13), 1835–1841.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1477147>
- 99.**Martínez, A., & Melendez-Martínez, A. J. (2016). Lycopene, oxidative cleavage derivatives and antiradical activity. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1077, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2015.11.001>
- 100.**Marzocco S, Rajeev K, Singla , Anna C (2021) . Multifaceted Effects of Lycopene: A Boulevard to the Multitarget-Based Treatment for Cancer. *Molecules* 26(17): 5333.
[doi: 10.3390/molecules26175333](https://doi.org/10.3390/molecules26175333)
- 101.**McVary K T, Roehrborn C G, Avins A L, Barry M J, Bruskewitz R C, Donnell R F, Wei J T. (2011). Update on AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia. *The Journal of urology*, 185(5), 1793-1803.
- 102.**Milardović S, Iveković D, Grabarić B S. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68(2), 175-180.

- 103.**Michel C M, Murray M M. (2012). Towards the utilization of EEG as a brain imaging tool. *Neuroimage*, 61(2), 371-385.
- 104.**Mirahmadi M, Azimi-Hashemi S, Saburi E, Kamali H, Pishbin M, Hadizadeh F. (2020). Potential inhibitory effect of lycopene on prostate cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 129.110459. [doi:10.1016/j.biopha.2020.110459](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110459)
- 105.**Mohanty B R, Sahoo P K. (2007). Edwardsiellosis in fish: a brief review. *Journal of biosciences*, 32(3), 1331-1344.
- 106.**Moreira M R, Ponce A G, Del Valle C E, Roura S I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38(5), 565-570.
- 107.**Moran N E, Erdman J W, Clinton S K. (2013). Complex interactions between dietary and genetic factors impact lycopene metabolism and distribution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 539(2), 171–180.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.06.017>
- 108.**Moon TD.(1997). Questionnaire survey of urologists and primary care physicians' diagnostic and treatment practices for prostatitis. *Urology* 50: 543–547.

-N-

- 109.**Najafi A, Taheri R A, Mehdipour M, Farnoosh G, Martínez-Pastor F. (2018). Lycopene-loaded nanoliposomes improve the performance of a modified Beltsville extender broiler breeder roosters. *Animal Reproduction Science*, 195, 168–175.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.021>
- 110.**Nam S, Cho H, Han J, Her N, Yoon J. (2017). Photocatalytic Degradation of Acesulfame K : Optimization Using the Box-Behnken Design (BBD). *Process Safety and Environmental Protection*. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.09.002>

111.NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1997, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA

112.Nowee Mostafa S, Ali Abbas Jose A, Romagnoli .(2008). Antisolvent crystallization: Model identification, experimental validation and dynamic simulation. , 63(22), 5457–5467. [doi:10.1016/j.ces.2008.08.003](https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.08.003)

113.Nkondjock A, Ghadirian P, Johnson K C, Krewski D. (2005). Dietary intake of lycopene is associated with reduced pancreatic cancer risk. *The Journal of Nutrition*, 135(3), 592–597. <https://doi.org/10.1093/jn/135.3.592>

114. Nobre B P, Gouveia L, Matos P G S, Cristino A F, Palavra A F, Mendes R L. (2012). Supercritical extraction of lycopene from tomato industrial wastes with ethane. *Molecules*, 17(7), 8397–8407. <https://doi.org/10.3390/molecules17078397>

-O-

115.Oberoi D P S, Sogi D S .(2017). Utilization of watermelon pulp for lycopene extraction by response surface methodology. *Food Chemistry*, 232(), 316-321. [doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.038](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.038)

116.Okonogi S, Riangjanapatee P .(2015) . Physicochemical characterization of lycopene-loaded nanostructured lipid carrier formulations for topical administration. *International Journal of Pharmaceutics* 478(2):726–735. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.002>

117.Olives Barba AI, Cámara Hurtado M, Sánchez Mata MC, Fernández Ruiz V, López Sáenz De Tejada M. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chemistry*. 95(2): 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.028>

- 118.**Oliveira S, López-Muñoz A, Candel S, Pelegrín P, Calado A, Mulero V. (2014). Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 192(12): 5710-9
- 119.**Ollagnier A, Fournier S, Bellot P, Bechet F. (2014). Impact of the nature and size of the training set on performance in the automatic detection of named entities (Impact de la nature et de la taille des corpus d'apprentissage sur les performances dans la détection automatique des entités nommées)[in French]. In Proceedings of TALN 2014 (Volume 2: Short Papers) (pp. 511-516).
- 120.**Ordoñez-Santos L E, Ledezma-Realpe D P. (2013). Lycopene concentration and physico-chemical properties of tropical fruits. *Food and Nutrition Sciences*, 4(7), 758–762. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.47097>

-P-

- 121.**Palozza P. Krinsky N I. (1992). β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 297(1) ;184–187. [doi:10.1016/0003-9861\(92\)90658-j](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90658-j).
- 122.**Palozza P, Parrone N, Catalano A, Simone R. (2010). Tomato lycopene and inflammatory cascade: Basic interactions and clinical implications. *Current Medicinal Chemistry*, 17(23), 2547–2563. <https://doi.org/10.2174/0929867110791556041>
- 123.**Paulson D F, Childs S J, Zinner N R, Love T, Resnick M I, Madsen P O. (1986). Treatment of bacterial prostatitis Comparison of cephalexin and Minocycline. *Urology* 27(4): 379–387. [doi:10.1016/0090-4295\(86\)90321-3](https://doi.org/10.1016/0090-4295(86)90321-3)
- 124.**Pattan V, Parsaik A, Brown J K, Kudva YC, Vlahakis N, Basu A. (2011). Glucose control in Mayo Clinic intensive care units. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 5(6), 1420-1426.
- 125.**Periago MJ, Rincón F, Agüera MD, Ros G .(2004). Mixture Approach for Optimizing

Lycopene Extraction from Tomato and Tomato Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(19), 5796–5802. <https://doi:10.1021/jf049345h>

126.Pei RS, Zhou F, Ji BP, Xu J.(2009).Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against E. coli with an improved method. *Journal of Food Science*. 74(7): 379–383. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x>

127.Petyaev, Ivan M. (2016). Lycopene Deficiency in Ageing and Cardiovascular Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(), 1–6. doi:10.1155/2016/3218605

128.Phan-Thi H, Waché Y. (2014). Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (gac) by moderate heat treatment with UV-Vis spectra as a marker. *Food Chemistry*, 156, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.040>

129.Priam F, Marcelin O, Marcus R, Jô L-F, Smith-Ravin EJ (2017) Lycopene extraction from *Psidium guajava* L. and evaluation of its antioxidant properties using a modified DPPH test. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* 11(4): 67–73. <https://doi.org/10.9790/2402-1104016773>

130.Ponce A G, Fritz R, Del Valle C, Roura S I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.

131.Poojary Mahesha M, Passamonti P.(2015) .Optimization of extraction of high purity all-trans-lycopene from tomato pulp waste. *Food Chemistry*, 188(), 84–91. [doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.133](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.133)

-R-

132.Raikos V, Hayward N, Hayes H, Meroni E, Ranawana V. (2019). Optimising the ratio

of long- to short-chain triglycerides of the lipid phase to enhance physical stability and bioaccessibility of lycopene-loaded beverage emulsions. *International Journal of Food Science and Technology* 54(4): 1355–1362. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14024>

133.Rao P K, Kumar R M, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish H F. (2006). Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(23), 8721-8726.

134.Rodriguez-Amaya D B. (2019). Update on natural food pigments-A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 124, 200-205.

-S-

135.Sachdeva A K, Chopra K. (2015). Lycopene abrogates A β (1–42)-mediated neuroinflammatory cascade in an experimental model of Alzheimer’s disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 26(7), 736-744.

136.Saeid A, Eun JB, Sagor MSA, Rahman A, Akter MS, Ahmed M. (2016). Effects of Extraction and Purification Methods on Degradation Kinetics and Stability of Lycopene from Watermelon under Storage Conditions. *Journal of Food Science* 81(11): C2630–C2638. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13504>

137.Savarirayan S, Shenykin Y, Gerard P, et al. Staphylococcus periprostatic abscess: an unusual cause of acute urinary retention. *Urology* 1995;46:573–4.

138.Selgas M D, García M L, Calvo M M. (2009). Effects of irradiation and storage on the physico-chemical and sensory properties of hamburgers enriched with lycopene. *International journal of food science & technology*, 44(10), 1983-1989.

139.Schaeffer L, Gohlke H, Müller M, Heid I M, Palmer L J, Kompauer I, Heinrich J. (2006). Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Human molecular genetics*, 15(11), 1745-1756.

- 140.**Shariffa YN, Tan TB, Abas F, Mirhosseini H, Nehdi I A, Tan CP. (2016). Producing a lycopene nanodispersion: The effects of emulsifiers. *Food and Bioproducts Processing*, (), S0960308516000262-. [doi:10.1016/j.fbp.2016.01.014](https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.01.014)
- 141.**Sharma K, Guleria S, Razdan VK, Babu V. (2020). Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. *Industrial Crops and Products*, 154(January) 112569. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112569>
- 142.**Shi J, Maguer M L(2000) Lycopene in Tomatoes: *Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing*, 40(1), 1–42. [doi:10.1080/10408690091189275](https://doi.org/10.1080/10408690091189275)
- 143.**Souza A L R, Hidalgo-Chávez DW, Pontes S M, Gomes F S, Cabral L M C, Tonon R V. (2018). Microencapsulation by spray drying of a lycopene-rich tomato concentrate: Characterization and stability. *LWT - Food Science and Technology*, 91, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.053>
- 144.**Song X, Luo Y, Ma L, Hu X, Simal-Gandara J, Wang L-S, Chen F. (2021). Recent trends and advances in the epidemiology, synergism, and delivery system of lycopene as an anti-cancer agent. *Seminars in Cancer Biology*.73, 331–346. [doi:10.1016/j.semcancer.2021.03.028](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.028)
- 145.**Srikanth S, Jung H J, Kim K D, Souda P, Whitelegge J, Gwack Y. (2010). A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nature cell biology*, 12(5), 436-446.
- 146.**Stahl W, Sies H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans?. *Archives of biochemistry and biophysics*, 336(1), 1-9.
- 147.**Story N E E, Kopec R J, Schwartz S, Keith Harris, G. (2010). An update on the health effects of tomato lycopene. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 189–210. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124120>

148.Stojiljkovic N, Ilic S, Jakovljevic V, Stojanovic N, Stojnev S, Kocic H, Stojanovic M, Kocic G .(2018). The encapsulation of lycopene in nanoliposomes enhances its protective potential in methotrexate-induced kidney injury model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2627917>

-T-

149.Takehara M, Nishimura M, Kuwa T, Inoue Y, Kitamura C, Kumagai T, Honda M. (2013). Characterization and Thermal Isomerization of (all-E)-Lycopene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(1): 264–269. <https://doi:10.1021/jf404497k>

150.Talaat I M, Khattab H I, Ahmed A M .(2014). Changes in growth, hormones levels and essential oil content of *Ammi visnaga* L. plants treated with some bioregulators. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(4), 355–365. doi:10.1016/j.sjbs.2013.10.008

151.Tefiani C. (2015). Les propriétés biologiques des huiles essentielles de *Curcuma longa*, *Ammoides verticillata* et *Thymus ciliatus* sp. eu-ciliatus. Thse de Doctorat en sciences de l'universit de Mostaganem.

152.Tetreault A, Crook J M, Hamm J, Pickles T, Keyes M, McKenzie M, Pai H H, Bachand F, Morris W J. (2016). Long-Term Prostate-Specific Antigen Stability and Predictive Factors of Failure After Permanent Seed Prostate Brachytherapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics*. 96(2): S137–. doi:10.1016/j.ijrobp.2016.06.333

153.Tran X T, Parks S E, Roach P D, Golding J B, Nguyen M H. (2016). Effects of maturity on physicochemical properties of Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng.). *Food Science and Nutrition*, 4(2), 305–314. <https://doi.org/10.1002/fsn3.291>

-V-

154. Varma S, Karwe M V, Lee T C. (2010). Effect of high hydrostatic pressure processing on lycopene isomers. *International Journal of Food Engineering*, 6(5). <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1752>
155. Vila E, Hornero-Méndez D, Azziz G, Lareo C, Saravia V. (2019). Carotenoids 1468 from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King George Island, 1469 Antarctica. *Biotechnology Reports*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00306>
156. Vrieling A, Voskuil D W, Bonfrer J M, Korse C M, van Doorn J, Cats A. Kampman, E. (2007). Lycopene supplementation elevates circulating insulin-like growth factor-binding protein-1 and -2 concentrations in persons at greater risk of colorectal cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 86(5):1456–1462.

-W-

157. Weber Evan W, Maus Marcela V, Mackall Crystal L. (2020). The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies. *Cell*, 181(1), 46–62. [doi:10.1016/j.cell.2020.03.001](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.001)
158. Wattiaux M, Robert H, Annie R, Jean C, Bruno H, Jean-Claude I. (1994). Coumarin-induced skin necrosis associated with acquired protein s deficiency and antiphospholipid antibody syndrome. , 37(7), 1096–1100. [doi:10.1002/art.1780370716](https://doi.org/10.1002/art.1780370716)
159. Weinberger M. Cytron S. Sevadio C. Prostatic abscess in the antibiotic era. *Rev Infect Dis* 1988;10:239–49.
160. Wiese M, Bashmakov Y, Chalyk N, Nielsen DS, Krych Ł, Kot W, Klochkov V, Pristensky D, Bandaletova T, Chernyshova M, Kyle N, Petyaev I. (2019). Prebiotic Effect of Lycopene and Dark Chocolate on Gut Microbiome with Systemic Changes in Liver Metabolism, Skeletal Muscles and Skin in Moderately Obese Persons. *BioMed Research International* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4625279>

-Y-

- 161.**Yadigar G S, İsa Sıdır, Halil B, Erol T. (2011). UV-spectral changes for some azo compounds in the presence of different solvents. *Journal of Molecular Liquids* , 162(3), 148–154. [doi:10.1016/j.molliq.2011.07.002](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2011.07.002)
- 162.**Yasmini Silva P A, Ferreira Tânia A P C, Celli Giovana B, Brooks, Marianne S.(2018). Optimization of Lycopene Extraction from Tomato Processing Waste Using an Eco-Friendly Ethyl Lactate–Ethyl Acetate Solvent: A Green Valorization Approach. *Waste and Biomass Valorization*, (), –. [doi:10.1007/s12649-018-0317-7](https://doi.org/10.1007/s12649-018-0317-7)

-Z-

- 163.**Zambelli D , Cunto M, prati f.(2007). Effect of Ketamine and medetomidine administration on quality of electro. ejaculated sperm and sperm flow in the domestic cat.*Theriogenology*. 68. 796-803.
- 164.**Zeng Z, He W, Jia Z, Hao S. (2017). Lycopene improves insulin sensitivity through inhibition of STAT3/Srebp-1c-mediated lipid accumulation and inflammation in mice fed a high-fat diet. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 125(9), 610–617. <https://doi.org/10.1055/s-0043-101919>
- 165.**Zhao Y, Lin J, Talukder M, Zhu SY, Li MZ, Wang HR, Li JL .(2020). Aryl Hydrocarbon Receptor as a Target for Lycopene Preventing DEHP-Induced *Spermatogenic Disorders*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68(15):4355–4366. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07795>
- 166.**Zhao Q, Yang F, Meng L, Chen D, Wang M, Lu X, Chen D, Jiang Y, Xing N. (2020). Lycopene attenuates chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome by inhibiting oxidative stress and inflammation via the interaction of NFκB, MAPKs, and Nrf2 signaling pathways in rats. *Andrology*.; andr.12747–. [doi:10.1111/andr.12747](https://doi.org/10.1111/andr.12747)

- 167.**Zuorro A, Lavecchia R, Medici F, Piga L. (2012). Enzyme-assisted production of tomato seed oil enriched with lycopene from tomato pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3499–3509. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-1003-6>
- 168.**Zumbrunn A, Stone S, Shaw E. (1988). The synthesis and properties of peptidylmethylsulphonium salts with two cationic residues as potential inhibitors of prohormone processing. *Biochemical Journal*, 256(3), 989-994.

ANNEXE

Annexe 01 :

Composition de la nourriture des rats

La nourriture fournie aux rats est composée de dérivés d'origine végétale, céréales, graines, fruits à coque. **Constituants analytiques** : Protéine brute (14%), matières grasses brutes (10%), cellulose brute (13%), cendres brutes (3.6%), phosphore (0.4%), calcium (0.4%), sodium (0.1%). **Additifs nutritionnels/Kg** : 4410 I.E. vitamine A, 677 I.E. vitamine D3, 56 mg vitamine E, 43 mg fer (E1), 0.1 mg iode (E2), 0.1 mg cobalt (E3), 3 mg cuivre (E4), 11 mg manganèse (E5), 8 mg zinc (E6), 0.1 mg sélénium (E8), colorants, antioxydants.

Milieux de culture

Gélose nutritive (GN) (g/l)

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	3 g
Extrait de levure.....	3 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Agar.....	18 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,3 ± 0,2

Mueller Hinton gélosé (M-H) (g/l)

Extrait de viande.....	3 g
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5 g
Amidon.....	1.5 g
Agar.....	16 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,3

Sabouraud additionné de chloramphénicol gélosé (g/l)

Peptone.....	10 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
Chloramphénicol.....	0.5 g
Eau distillée.....	1000 ml

Annexe 02 :

Prélèvement du sang chez les rats



Annexe 03

Les résultats des données de l'optimisation traité par le progiciel Design- Expert® version 11

Warning: The Cubic model is aliased.

Fit Summary

Response : Y Lycopene

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Linear	0,1078	0,0003	0,2512	-0,0404	
2FI	0,9909	0,0002	-0,0166	-1,1706	
Quadratic	< 0.0001	0,1712	0,9991	0,9955	Suggested
Cubic	0,1712		0,9997		Aliased

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	41,14	1	41,14			
Linear vs Mean	2,25	3	0,7489	2,57	0,1078	
2FI vs Linear	0,0405	3	0,0135	0,0340	0,9909	
Quadratic vs 2FI	3,17	3	1,06	3106,80	< 0.0001	Suggested
Cubic vs Quadratic	0,0015	3	0,0005	5,00	0,1712	Aliased
Residual	0,0002	2	0,0001			
Total	46,59	15	3,11			

ANOVA for Quadratic model

Response: Y Lycopene

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	5,46	9	0,6062	1783,03	< 0.0001	significant
1 / Filtrate	0,1800	1	0,1800	529,41	< 0.0001	
2 / Evaporation	2,04	1	2,04	6000,59	< 0.0001	
3 / DMSO	0,0264	1	0,0264	77,79	0,0003	
4	0,0090	1	0,0090	26,54	0,0036	
5	0,0132	1	0,0132	38,90	0,0016	
6	0,0182	1	0,0182	53,60	0,0007	
7	0,0162	1	0,0162	47,66	0,0010	
8	0,1571	1	0,1571	461,96	< 0.0001	
9	3,10	1	3,10	9116,89	< 0.0001	
Residual	0,0017	5	0,0003			
Lack of Fit	0,0015	3	0,0005	5,00	0,1712	not significant
Pure Error	0,0002	2	0,0001			
Total	5,46	14				

Factor coding is **Coded**.

Sum of squares is **Type III - Partial**

The **Model F-value** of 1783,03 implies the model is significant. There is only a 0,01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

P-values less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, C, AB, AC, BC, A², B², C² are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 5,00 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 17,12% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

Fit Statistics

Std. Dev.	0,0184	R ²	0,9997
Mean	1,66	Adjusted R ²	0,9991
C.V. %	1,11	Predicted R ²	0,9955
		Adeq Precision	144,9641

The **Predicted R²** of 0,9955 is in reasonable agreement with the **Adjusted R²** of 0,9991; i.e. the difference is less than 0.2.

Adeq Precision measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 144,964 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space

Coefficients in Terms of Coded Factors

Factor	efficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	2,29	1	0,0106	2,26	2,32	
1 / Filtrate	-0,1500	1	0,0065	-0,1668	-0,1332	1,0000
1 / evaporation	0,5050	1	0,0065	0,4882	0,5218	1,0000
1 / DMSO	0,0575	1	0,0065	0,0407	0,0743	1,0000
	-0,0475	1	0,0092	-0,0712	-0,0238	1,0000
	0,0575	1	0,0092	0,0338	0,0812	1,0000
	-0,0675	1	0,0092	-0,0912	-0,0438	1,0000
	-0,0662	1	0,0096	-0,0909	-0,0416	1,01
	-0,2062	1	0,0096	-0,2309	-0,1816	1,01
	-0,9163	1	0,0096	-0,9409	-0,8916	1,01

Model Comparison Statistics

PRESS	0,0245
-2 Log Likelihood	-93,71
BIC	-66,63
AICc	-18,71

Final Equation in Terms of Coded Factors

$$Y \text{ Lycopene} = -2,29 - 0,1500 A + 0,5050 B + 0,0575 C - 0,0475 AB + 0,0575 AC - 0,0675 BC - 0,0662 A^2 - 0,2062 B^2 - 0,9163 C^2$$

The equation in terms of coded factors can be used to make predictions about the response for given levels of each factor. By default, the high levels of the factors are coded as +1 and the low levels are coded as -1. The coded equation is useful for identifying the relative impact of the factors by comparing the factor coefficients.

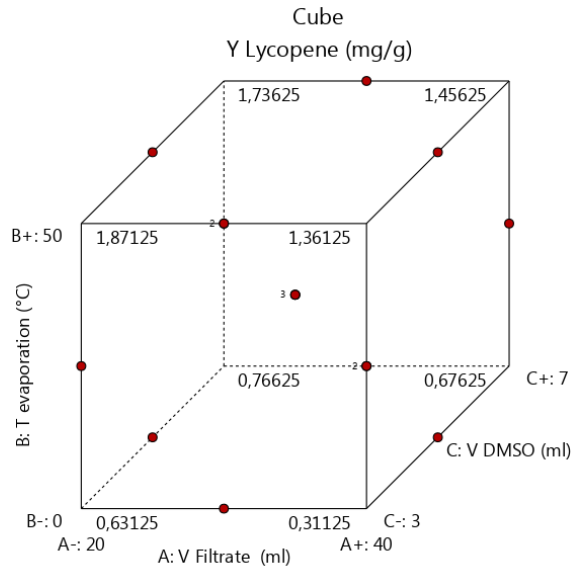
Final Equation in Terms of Actual Factors

Y Lycopene	=
-4,31781	
+0,015125	V Filtrate
+0,049150	T evaporation
+2,26687	V DMSO
-0,000190	V Filtrate * T evaporation
+0,002875	V Filtrate * V DMSO
-0,001350	T evaporation * V DMSO
-0,000663	V Filtrate ²

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Y Lycopene (mg/g)

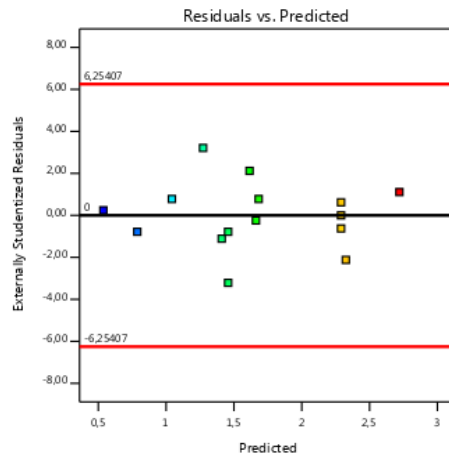
X1 = A: V Filtrate
X2 = B: T evaporation
X3 = C: V DMSO



Design-Expert® Software

Y Lycopene

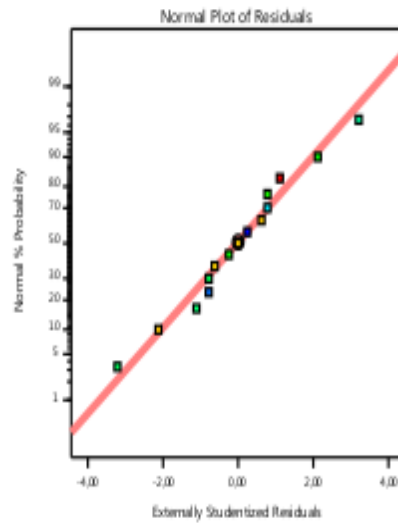
Color points by value of Y Lycopene:



Design-Expert® Software

Y Lycopene

Color points by value of Y Lycopene:



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

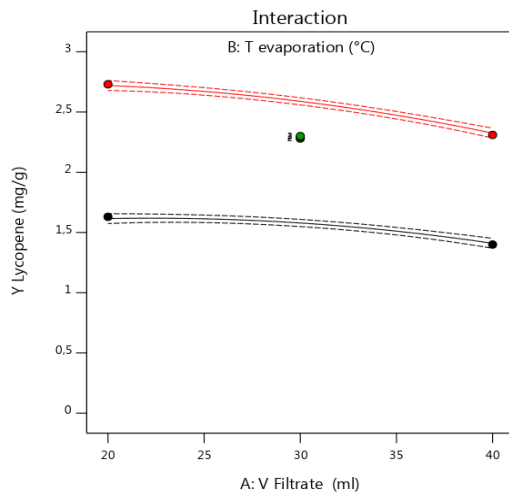
Y Lycopene (mg/g)

● Design Points
-- 95% CI Bands

X1 = A: V Filtrate
X2 = B: T evaporation

Actual Factor
C: V DMSO = 5

B- 0
B+ 50



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

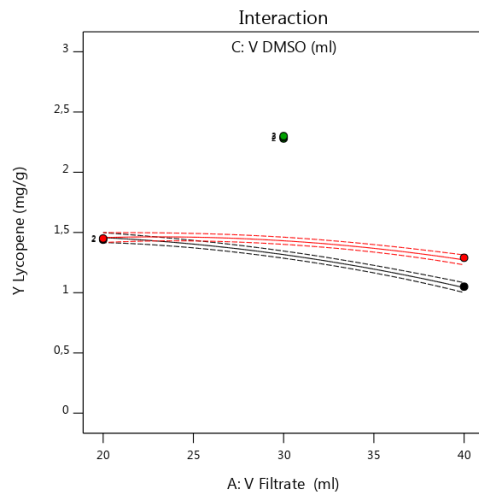
Y Lycopene (mg/g)

● Design Points
-- 95% CI Bands

X1 = A: V Filtrate
X2 = C: V DMSO

Actual Factor
B: T evaporation = 25

C- 3
C+ 7



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

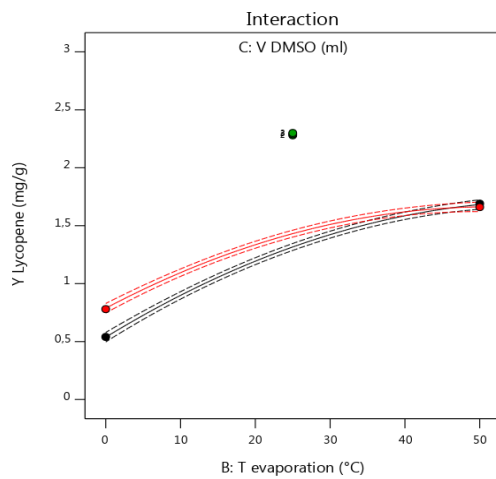
Y Lycopene (mg/g)

● Design Points
-- 95% CI Bands

X1 = B: T evaporation
X2 = C: V DMSO

Actual Factor
A: V Filtrate = 30

C- 3
C+ 7



Publication