

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE
MEMOIRE DE MASTER
SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Extraction, caractérisation et étude pharmacologique
de la Pipérine et de la Capsaïcine**

Présenté par : **ABDELLAOUI Ouiza**

AIT BRAHAM Lilya

Soutenu publiquement, le 27 /06 /2019, devant le Jury composé de :

CHADER	Henni	Professeur	LNCPP	PRESIDENT
TOUZOUIRT	Saida	MCB	UMMTO	ENCADREUR
RAHAL	Foudil	MAA	UMMTO	CO-ENCADREUR
TALBI	Ouarda	MAA	UMMTO	EXAMINATEUR

A la mémoire de mon très cher papa
Je ne saurais exprimer mon grand chagrin en ton absence,
Tu es surement là à veiller sur nous,
J'aurais aimé que tu sois à mes côtés en ce jour,
Que Dieu, le tout puissant, puisse t'avoir en sa sainte miséricorde

A la mémoire de mon beau-frère RACHID
Que Dieu, le tout puissant, puisse t'avoir en sa sainte miséricorde !

A ma très chère maman
Maman, je te remercie pour tout l'amour,
Le soutien que tu m'apportes depuis ma naissance,
J'espère que ta bénédiction m'accompagnera toujours,
Puisse Dieu, t'accorder santé, bonheur et longue vie.
Je t'aime Maman

A mes chers frères
(WAHIB et sa famille, NADJIB ET AHMED)
Qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de
courage et de Générosité. Dieu vous garde pour moi.

A mes très chères sœurs et leurs familles
(SISSA, AMEL, LATIFA, SORAYA, NADIA)
Qui ont toujours été là pour moi avec leur amour inconditionnel et
leurs soutiens sans faille

A mon cher futur conjoint
SOFIANE
Source de tendresse
Pour son soutien, générosité et amour
J'exprime l'immense attachement que je vous témoigne,
Mes reconnaissances et mon profond amour envers vous,

A mes très chères grandes mères
Pour leurs prières,
Qu'ALLAH vous procure santé et longue vie....

A mes tantes, oncle et leurs familles
A mes neveux et nièces
A mon binôme et amie ouïza
A tous mes ami(e)s
Que ce modeste travail soit l'exaucement des vœux tant formulés, et le
fruit d'innombrables

Dédicaces

Tout d'abord, je tiens à remercier le bon Dieu le tout Puissant de m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Je dédie ce travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement

A MON CHER PAPA

Je suis très fière d'être ta fille et de pouvoir enfin réaliser, ce que tu as tant espéré et attendu de moi. Tu n'as jamais cessé de déployer tous tes efforts afin de subvenir à mes besoins, En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Que Dieu te préserve et te procure santé et bonheur.

A MA TRÈS CHERE MAMAN

Si Dieu a mis le paradis sous les pieds des mères, ce n'est pas pour rien. Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.

Puisse Dieu tout puissant, te préserve et t'accorde santé, longue vie et Bonheur.

A MON CHER MARI

Une spéciale dédicace à cette personne qui compte énormément pour moi. Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude, mon amour et mon respect. Ton amour ne m'a procuré que confiance et stabilité. Je remercie le bon Dieu qui a croisé nos chemins.

A TOI NASSIM

A MON CHER PETIT FRÈRE MARZOUK

Puisse Dieu t'accorder la bonne chance et la réussite dans ta vie.

A MES CHERES SŒURS

ZAHIA, farida, SAMIA, NASSIMA, L'YNDIA qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés

A MES CHERS PETITS NEVEUX ET NIECES

Taous, Nada, Arris, Melissa, Massilyene, Malake et Jouba ; aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.

A MES CHERES COPINES

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés ; ATIKA, THINHINANE, FATIMA, HANANE, DALILA, IMANE, KAISSA.

A MA CHERE COPINE, CAMARADE, ET BINOME LILYA ET TOUTE SA FAMILLE

A MON CHER ET SEUL AMI ; KARIM

A LA MEMOIRE DE MA MEILLEURE AMIE ; JASSEMINE

Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

OUIZA

Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous remercions Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la patience, la volonté pour la réalisation de ce travail, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

En guise de reconnaissance, nous tenons à témoigner nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de notre mémoire de fin d'études et à l'élaboration de ce modeste travail.

Les premières personnes qu'on tient à remercier sont nos promoteurs Mlle. TOUZOUIRT Saida, et Mr RAHAL Foudil pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon port. C'est un grand honneur pour nous d'avoir travaillé sous leurs directions.

Un remerciement particulier pour le Pr CHADER du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCPP) de nous avoir accueillir au sein de département toxicopharmacologie afin d'effectuer le test anti inflammatoire. Nous reconnaissons sa grande implication dans ce travail par ses directives, ses remarques et suggestions, et par ses encouragements dans les moments clés de l'élaboration de ce mémoire.

Nos profonds remerciements à Dr BENOUATTAS Hana qui a toujours été à notre disposition et qui nous a aidés de manière très cordiale.

Nos remerciements vont également à Dr ABDOUN, Dr BERSOUTI ainsi qu'aux autres résidents du laboratoire analytique de la faculté de médecine pour leurs aides et leurs disponibilités.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Mme F. AYATI ainsi qu'à monsieur M.BENCHOULEK pour leurs précieux conseils pendant notre travail ainsi que durant notre cursus universitaire.

Nous remercions vivement les membres de l'équipe des laboratoires : organique, cinétique, pharmaceutique du département chimie, de la faculté des sciences.

Nos vifs remerciements aux membres de jury Pr CHADER et Mme TALBI d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

Nos remerciements aussi tout spécialement à l'ensemble des étudiants qui ont égayé nos longues journées au laboratoire parmi : Chaouchi Ouardia, Laradi Thiziri, Ousmer Kathia, Temime Dehbia, Khemar Katia, Zellali Lila, Mohand Saidi Katia, Tafat Hanane ainsi que Feghoul Rosa.

Dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos sincères remerciements vont à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont permis par leurs conseils et leurs compétences la réalisation de ce mémoire.

Résumé :

Le but de notre travail est la valorisation de deux alcaloïdes issus de deux matières végétales différentes pour usage pharmaceutique.

Ainsi, l'extraction de la pipérine et de la capsaïcine, à partir du poivre noir et du piment respectivement, a été réalisée au soxhlet en utilisant l'éthanol 96% comme solvant.

La caractérisation qualitative des extraits a été réalisée par différentes méthodes physicochimique, spectroscopique (UV-V, IR) et chromatographique (HPLC).

L'étude des effets pharmacologique des deux extraits a révélée des résultats importants concernant les tests, antioxydant, antibactérien et anti inflammatoire.

Une formulation à base de la pipérine et de la capsaïcine a été mise au point et l'étude anti-inflammatoire de cette pommade a révélée un effet excellent présentant jusqu'à 85% de réduction d'œdème.

Mots clés : *alcaloïdes, pipérine, capsaïcine, soxhlet, anti-inflammatoire.*

Summary:

The aim of our work is the valorization of two alkaloids from two different plant materials for pharmaceutical use.

Thus, the extraction of piperine and capsaicin, from black pepper and chili pepper, respectively, was carried out with soxhlet using 96% ethanol as solvent. The qualitative characterization of the extracts was carried out by different physicochemical, spectroscopic (UV-V, IR) and chromatographic (HPLC) methods.

The study of the pharmacological effects of the two extracts revealed important results concerning the antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory tests.

A formulation based on piperine and capsaicin has been developed and the anti-inflammatory study of this ointment has shown an excellent effect with up to 85% reduction of edema.

Key words: *alkaloids, piperine, capsaicin, soxhlet, anti-inflammatory.*

المخلص:

الهدف من عملنا هو تثمين اثنين من قلويدات من اثنين من المواد النباتية المختلفة للاستخدام الصيدلاني. في هذا الصدد، تم استخلاص البيبيرين والكابسايسين، من الفلفل الأسود والفلفل الحار على التوالي ، بواسطة جهاز السوكسلت باستخدام الإيثانول 96 ٪ كمذيب.

تم إجراء التوصيف النوعي للمستخلصات بطرق فيزيائية كيميائية مختلفة، طيفية (فوق بنفسجية مرئية، تحت الحمراء) وكروماتوغرافية (الاستشراب السائل عالي الأداء).

كشفت دراسة الآثار الصيدلانية للمستخلصين عن نتائج مهمة فيما يتعلق بالاختبارات المضادة للأكسدة والجراثيم، و كذا الالتهابات .

تم تطوير تركيبة تعتمد على بيبيرين وكابسايسين وأظهرت الدراسة المضادة للالتهابات لهذا المرهم تأثيراً ممتازاً مع تقليل تصل إلى 85٪ من الوذمة.

الكلمات المفتاحية: *قلويدات ، بيبيرين، الكابسايسين ، السوكسلت ، مضاد للالتهابات*

Table des matières

Glossaire	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1	Plantes Medicinales	2
1.1	Métabolites primaires	2
1.2	Métabolites secondaires	2
1.3	Alcaloïdes	2
2	Piment	2
2.1	Généralités	2
2.2	Données botaniques sur le piment (Capsicum Annum L.)	2
2.3	Culture et récolte	3
3	Capsaïcine	3
3.1	Définition et histoire	3
3.2	Propriétés physico-chimiques	4
3.3	Les effets pharmacologiques des capsaïcinoïdes (capsaïcine)	4
3.3.1	Effet antioxydant	4
3.3.2	Capsaïcinoïdes et cancer	4
3.3.3	Effet anti bactérien	4
3.3.4	Effet anti-inflammatoire	5
3.4	Toxicité	5
4	Poivre Noir	5
4.1	Historique et origine	5
4.2	Données botanique sur le poivre noir	5
4.3	Culture et récolte	6
5	Piperine	6
5.1	Définition et histoire	6
5.2	Propriétés physico chimiques	6
5.3	Les effets pharmacologiques de la pipérine	6
5.3.1	Effet Anti oxydant	6
5.3.2	Activité anticancéreuse	7
5.3.3	Effet anti bactérien	7
5.3.4	Effet anti inflammatoire	7
5.4	Toxicité	7
6	Méthodes D'extraction Et De Caractérisation Des Molécules Bioactives	7
6.1	Extraction	7
6.2	Techniques de caractérisation	8
7	Formulation De Pommade Anti-Inflammatoire A Base Des Extraits Végétaux	8
7.1	Inflammation	8
7.2	Anti-inflammatoires	9
7.3	Pommade	9
7.4	Intérêts thérapeutiques des pommades	9
7.5	Excipients	9
7.6	Préparation des pommades	9
7.7	Contrôle de qualité des pommades	10

Table des matières

MATERIELS ET METHODES

1	Materiels Utilises	11
1.1	Matière végétale	11
1.2	Réactifs et équipements.....	11
2	Extraction Des Composes Etudies.....	12
2.1	Identification phytochimiques	12
2.2	Extraction au soxhlet	12
2.2.1	Purification de la Pipérine	13
2.2.2	Purification de la Capsaïcine.....	13
2.2.3	Calcul du rendement	13
3	Caracterisation.....	13
3.1	Caractéristiques physico -chimiques	14
3.1.1	Caractères organoleptiques	14
3.1.2	Solubilité	14
3.1.3	Point de fusion	14
3.2	Caractérisation par spectroscopie	14
3.2.1	Analyse par UV-visible.....	14
3.2.2	Analyse par Infrarouge.....	14
3.2.3	Analyse Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	14
4	Bio-Activites De La Capsaïcine Et De La Piperine	15
4.1	Activité anti oxydante.....	15
4.1.1	Principe	15
4.1.2	Préparation de la solution de DPPH.....	16
4.1.3	Préparation des solutions.....	16
4.1.4	Réalisation de l'essai.....	16
4.2	Activité anti bactérienne.....	16
4.2.1	Préparation du milieu de culture	16
4.2.2	Repiquages des cultures jeunes	16
4.2.3	Préparation de l'inoculum	17
4.2.4	Ensemencement	17
4.2.5	Préparation des solutions et des disques de l'aromatogramme	17
4.2.6	Incubation et lecture	17
4.3	Activité anti-inflammatoire (in vivo)	18
4.3.1	Principe	18
4.3.2	Matériels utilisé.....	18
4.3.3	Préparation des animaux	18
4.3.4	Application.....	19
4.3.5	Confection des disques.....	19
5	Formulation D'une Pommade A Base De La Piperine Et La Capsaïcine.....	19
5.1	Préparation de la pommade	20
5.2	Caractérisation des pommades	20
5.2.1	Caractères macroscopiques	20
5.2.2	Homogénéité	20
5.2.3	Mesure du pH.....	20
5.2.4	Viscosité.....	20

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1	Extraction.....	21
1.1	Test phytochimique (identification des alcaloïdes)	21
1.2	Rendement d'extraction.....	21
2	Caracterisation.....	21

Table des matières

2.1	Caractéristiques physico -chimiques	21
2.1.1	Caractères organoleptiques	21
2.1.2	Solubilité	22
2.1.3	Température de fusion.....	22
2.2	Caractérisation par spectroscopie	23
2.2.1	Analyse par UV	23
2.2.2	Analyse par Infrarouge.....	23
2.2.3	Analyse par HPLC	26
3	Propriétés Biologiques Des Substances (Piperine Et Capsaïcine)	26
3.1	Test antioxydant	26
3.2	Etude antibactérienne	28
3.3	Etude anti-inflammatoire.....	29
4	Caractérisation De La Pommade	33
4.1	Caractères organoleptiques.....	33
4.2	Homogénéité	33
4.3	Potentiel d'hydrogène (pH)	33
4.4	Viscosité	33
4.5	Etude anti-inflammatoire des pommades	34
	Conclusion générale	36
	Bibliographie	

Anti tumorale : Substance ou produit qui permet de lutter contre les tumeurs.

Apex : Extrémité d'une racine ou d'une tige.

Baume : Substance résineuse et odorante qui coule de certains végétaux et qu'on emploie souvent en médecine.

Cytoprotecteur : Processus naturel ou médicamenteux protégeant les cellules gastriques

Dose létale (DL₅₀) : Dose d'un produit toxique qui entraîne la mort de 50% d'une population donnée, pendant un temps donné, dans une expérience donnée.

Escherichia coli : Un bacille gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. Bactérie intestinale des Mammifères, très commune chez l'être humain.

Gélose MUELLER-HINTON : milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques et sulfamides.

Immunomodulatrices : produit qui modifie le déroulement des réactions immunitaires

Inoculum : Échantillon qui contient des germes vivants que l'on introduit dans un milieu favorable en vue de sa multiplication ou de son identification.

Intra-jugulaire : Veine du cou

Intrapéritonéal : Relatif à l'intérieur du péritoine, de la membrane enveloppant la cavité abdominale.

Lutéoline ou **lutéolol** : composé chimique de la famille des flavonoïdes.

Oblongues : Plus longue que large et arrondi aux deux extrémités.

Œdème : enflure non douloureuse, qui est produite par une infiltration séreuse, le plus souvent dans les tissus sous-cutané et sous-muqueux.

Peroxydation de lipide : procédé métabolique qui entraîne la détérioration oxydante des lipides par des espèces réactives de l'oxygène.

Pétiole glabre : Partie rétrécie de certaines feuilles unissant le limbe à la tige sans poils.

Polyarthrite rhumatoïde : maladie dégénérative inflammatoire chronique, caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique.

Phytochimie : discipline scientifique de la biochimie et de la botanique avec la physiologie des végétaux.

Souches bactérienne : regroupe l'ensemble des individus issus de repiquages successifs d'une colonie microbienne (bactéries ou virus).

Tégument : tissu organique qui recouvre le corps des animaux.

Abréviations

DSA : direction du service agricole

G- : gramme négatif

G+ : gramme positif

H. Pylori : Helicobacter pylori

IC₅₀ : Concentration d'inhibition à 50%

IG : Intra-jugulaire

IM : Intramusculaire

IP : Intrapéritonéal

IR : Infra-rouge

IV : Intraveineuse

LNCPP : laboratoire de contrôle de produit pharmaceutique

P : différence significatif du test de student

SC : sous-cutané

UV-V : Ultra-violet-visible

λ_{max} : lambda max (longueur d'onde d'absorption)

Liste des figures

Figure 1 : Montage De L'extraction Par Soxhlet	12
Figure 2 : Protocole De L'extraction Des Substances Actives	13
Figure 3 : Schema Representant Le Principe D'une Reaction De Reduction	15
Figure 4 : Les Principales Etapes De L'etude De L'activite Anti-Inflammatoire	19
Figure 5 : Resultats Des Reactions De Precipitation Avec Les Deux Reactifs.....	21
Figure 6 : Caracteres Organoleptiques Des Deux Extraits.....	22
Figure 7 : Spectre Uv-Visible De La Piperine	23
Figure 8 : Spectre Uv-Visible De La Capsaïcine	23
Figure 9 : Spectre Infrarouge De Piperine.....	24
Figure 10 : Spectre Infrarouge De Capsaïcine	25
Figure 11 : Chromatogramme De L'HPLC De La Piperine.	26
Figure 12 : Chromatogramme De L'HPLC De La Capsaïcine	26
Figure 13 : Inhibition De DPPH En Fonction De La Concentration De L'acide Ascorbique.	27
Figure 14 : Inhibition De DPPH En Fonction De La Concentration De La Piperine.	27
Figure 15 : Inhibition De DPPH En Fonction De La Concentration De Capsaïcine.	27
figure 16 : Photos Prises Par Microscope Optique Pour Les Pommades Formulees.	33

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification Botanique Du Piment	3
Tableau 2 : Classification Botanique Du Poivre Noir	5
Tableau 3 : Matériels Et Produits Utilisés Pour L'extraction Et La Caractérisation Des Substances Étudiées	11
Tableau 4 : Condition d'analyse Par HPLC Pour Capsaïcine Et Piperine.	15
Tableau 5 : Matériels Utilisés Pour L'activité Anti-Inflammatoire	18
Tableau 6 : Composition Des Trois Pommades Préparées	20
Tableau 7 : Caractères Organoleptiques Des Deux Extraits.	22
Tableau 8 : Solubilité Des Deux Extraits Dans Différents Solvants.	22
Tableau 9 : Données Théoriques Sur La Piperine Et La Capsaïcine	23
Tableau 10 : Valeurs De Spectre Infrarouge De La Piperine En cm^{-1}	24
Tableau 11 : Valeurs De Spectre Infrarouge De Capsaïcine En cm^{-1}	25
Tableau 12 Concentrations IC_{50} Des Échantillons.	28
Tableau 13 : Diamètres Des Zones D'inhibitions De Capsaïcine Et Piperine	29
Tableau 14 : Lots Traités Par Le Témoin Négatif (Xylène) Et Témoin Positif (Diclofenac 1%)	30
Tableau 15 : Lots Traités Par La Piperine À Différentes Concentrations.....	30
Tableau 16 : Lots Traités Par La Capsaïcine À Différentes Concentrations.....	31
Tableau 17 : Caractères Macroscopiques Des Différentes Pommades	33
Tableau 18 : Lots Traités Par Les Différentes Pommades Formulées	34

Introduction

Générale

Introduction Générale

Lequel d'entre nous ne connaît pas le poivre noir et le piment rouge ? Nous y avons déjà tous goûté. Indissociables du sel de table, nous les connaissons pour leurs saveurs piquantes et aromatiques, ainsi que pour leurs pouvoirs releveurs de goût. Or, ces deux plantes mondialement connues et longtemps convoitées dans le passé, révèlent de multiples vertus.

De nos jours, les recherches scientifiques ont permis de découvrir de nouvelles facettes de ces épices, leurs compositions en deux substances actives pipérine et capsaïcine.

La pipérine issue de poivre noir et la capsaïcine issue de piment sont deux alcaloïdes très utilisés en phytothérapie comme anti inflammatoires, antioxydants, antibactériens, stimulant pour les fonctions digestives et d'autres effets pharmacologiques pas encore démontrés.

La caractérisation de nouvelles molécules bioactives fait intervenir plusieurs processus longs et coûteux; et dont les trois principales étapes sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt; toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques. Chacune de ces étapes rencontre des défis techniques, liés d'une part à la faible concentration des molécules recherchées, et d'autre part à la complexité du mélange.

L'objectif de cette étude est d'une part ; l'extraction de deux alcaloïdes : pipérine issue de poivre noir et capsaïcine issue de piment rouge (provenant de l'Est de l'Algérie) et l'évaluation de leurs activités biologiques et pharmacologiques. D'autre part, une formulation d'une pommade à base de ces deux extraits possédant une activité pharmacologique commune qui est l'activité anti inflammatoire.

Ce manuscrit est réparti en trois parties; la première partie présente une revue de la littérature sur la structure, les propriétés physico-chimiques et biologiques de la pipérine et de la capsaïcine ; sur les méthodes d'extraction ; et sur les formulations des pommades.

La seconde partie décrit les matériels et les méthodes suivies pour l'extraction, la caractérisation, l'étude des activités biologiques des deux alcaloïdes et la procédure suivie pour formuler une pommade à base des substances extraites.

Enfin, les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés et discutés dans la troisième partie.

Partie

bibliographique

Partie bibliographique

1. Plantes médicinales

Les plantes médicinales constituent une source très riche en molécules bioactives dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps, ces dernières peuvent être des métabolites primaires ou secondaires.

1.1. Métabolites primaires

Ce sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont classés en quatre grandes catégories : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques.

1.2. Métabolites secondaires

Ce sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies[1], mais ils sont produits en faible quantité. Les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes sont des exemples de métabolites secondaires ; qui ont de nombreuses applications pharmaceutiques.

1.3. Alcaloïdes

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début du XIXème. La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winter Stein et Trier en 1910 « Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose » [2].

2. Piment

2.1. Généralités

Le piment (*Capsicum*) appartient à la famille des solanacées, c'est un fruit tropical originaire de l'Amérique, puis disséminé en Europe, en Afrique et en Asie[3].

Le piment est constitué de différents éléments chimiques ; on y retrouve des caroténoïdes, de la vitamine C, de l'huile végétale, des résines, des minéraux, des protides, des glucides, de l'eau, mais surtout un composant chimique essentiel, la capsaïcine [4].

2.2. Données botaniques sur le piment (*Capsicum Annum* L.)

Le piment est une plante, qui appartient au genre *Capsicum* et à la famille des Solanacées. Ce genre comporte plus de 200 variétés regroupées en plus de 30 espèces [5]. Sa classification botanique est donnée par le tableau 1 [6].

Tableau 1 : Classification botanique du piment

Division	Classe	Ordre	Famille	Genre
Magnoliophyta	Magnoliopsida	Solanales	Salonacées	Capsicum

2.3. Culture et récolte

La culture des piments s'effectue en pots ou en caissettes à l'abri de la lumière, à une température comprise de 21 à 26°C. Dès l'apparition de deux belles feuilles, les plants sont prêts pour le repiquage en jardin, en terre chaude.

Les températures exigées sont 20 à 30°C le jour et 15 à 20 °C la nuit. Il s'agit également d'une plante de jours longs, très exigeantes en lumière, tolère un pH de 6.5 à 7, elle est moyennement tolérante en salinité.

Lorsque les conditions climatiques sont adéquates, les piments croissent très rapidement, il est de loin préférable de les cueillir lorsqu'ils sont murs. Il est recommandé de prévoir la récolte entre 50 et 55 jours après la floraison pour les fruits.

Cette espèce est cultivée principalement dans les états du sud des États-Unis, le sud de l'Europe, ainsi que le Nord d'Afrique, l'Amérique centrale et le Brésil[7].

Dans le monde entier, la consommation des fruits de Capsicum, qui sont probablement classés parmi les premiers épices ou additifs alimentaires, ne cesse d'augmenter. L'Algérie est classé neuvième au niveau mondial dans la production de piment avec 426566 milliers de tonnes (MT) en 2012.

3. Capsaïcine

3.1. Définition et histoire

Le goût piquant du piment est dû à un groupe de vanillyl amides connues sous le nom de capsaïcinoïdes, et parmi lesquelles la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine sont prédominantes (plus de 90% des capsaïcinoïdes totaux)[7]. Capsaïcine (8-méthyl-N-vanillyl-6-nonénamide) est un composant actif du piment (Capsicum).

La molécule a été découverte en 1816 par PA Bucholz, et le nom de capsaïcine lui a été donné en 1846 par LT Tresh (entreprise de recherche de chimie anglaise). C'est en 1878, qu'un célèbre médecin hongrois nommé E. Hогyеs démontra que la capsaïcine était responsable de la sensation de brûlure due à l'ingestion de piment et aussi qu'elle

Partie bibliographique

augmentait la sécrétion de liquide gastrique. La capsaïcine fut synthétisée pour la première fois en 1930 par Spath et FS Darling.

3.2. Propriétés physico-chimiques

Les capsaïcinoïdes sont solubles dans les solvants organiques polaires comme le chloroforme, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le chlorure de méthylène, le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile et autres [8].

La capsaïcine est une substance cristalline, non volatile, incolore et sa température de fusion est de 62 à 65 °C. En raison de la présence de la chaîne latérale hydrophobe, la capsaïcine est lipophile, et par conséquent, très soluble dans la graisse, l'huile et l'alcool. Cette molécule a un spectre d'absorption maximale à 230 et 280 nm [9].

3.3. Les effets pharmacologiques des capsaïcinoïdes (capsaïcine)

Les capsaïcinoïdes sont des alcaloïdes possédants des activités biologiques très intéressantes.

3.3.1. Effet antioxydant

Les antioxydants sont des composés qui protègent les cellules du corps des dommages causés par les radicaux libres. Ces derniers sont des molécules très réactives qui seraient impliquées dans le développement des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies liées au vieillissement. Les piments forts renferment plusieurs types d'antioxydants [10]. Dans une étude analysant plusieurs antioxydants du piment, le composé ayant l'activité antioxydante la plus forte était la lutéoline, suivie de la capsaïcine et de la quercétine[11]. La capsaïcine possède une activité antioxydante remarquable [12].

3.3.2. Capsaïcinoïdes et cancer

L'activité anticancéreuse de capsaïcinoïdes (capsaïcine et dihydrocapsaïcine) a été signalée ces dernières années [13]. Les capsaïcinoïdes ont exercé une bonne activité anti-tumorale non seulement "in vitro" mais aussi "in vivo". Dans des cultures cellulaires, la capsaïcine a été capable de bloquer la migration des cellules cancéreuses du sein et de tuer celles de la prostate [11].

3.3.3. Effet anti bactérien

La capsaïcine, l'ingrédient actif du piment, a été mis en cause à la fois comme agent cytoprotecteur et agent nocif pour la muqueuse gastrique. La capsaïcine inhibe la croissance des bactéries à des concentrations supérieures à 10µg/ml, et l'activité

Partie bibliographique

bactéricide est remarquée lors de l'incubation à des valeurs de pH aussi basses que 5,4 [14].

3.3.4. Effet anti-inflammatoire

Il a été démontré que l'utilisation de la capsaïcine par voie orale ou locale peut réduire la chaleur des inflammations et les douleurs de la polyarthrite rhumatoïde ou la fibromyalgie [15]. L'industrie pharmaceutique commercialise la capsaïcine (ajoutée à une concentration égale ou inférieure à 0,075%) comme un baume pour une application externe afin de calmer la douleur des muscles endoloris [16].

3.4. Toxicité

En 1980, T, Glinsukon a étudié le potentiel toxique de capsaïcinoïdes. La dose létale de capsaïcine varie en fonction du mode d'administration : voie intraveineuse : 0.56mg/kg, voie orale 47.2mg/kg.

4. Poivre noir

4.1. Historique et origine

Le poivre fut l'une des premières épices indiennes introduites en occident par Alexander le Grand. Il a été découvert dans les forêts équatoriales, dans le sud-ouest de l'Inde [13].

Le poivre est le fruit du poivrier, du latin "piper", il s'agit d'une plante de la Famille des pipéracées qui croissait, à l'origine, de manière spontanée dans les forêts d'Inde, de Malaisie ou d'Indonésie. Il est considéré depuis l'antiquité, l'une des épices les plus recherchées et les plus utilisées.

4.2. Données botanique sur le poivre noir

Le poivrier possède des feuilles ovales oblongues (long : 10-15 cm, large : 5-9 cm), à la base arrondie, à l'apex aigu, au pétiole glabre (long : 10-20 mm).

Ses fleurs minuscules bisexuées et unisexuées, groupées en épis sont opposées aux feuilles (long : 10-15 cm). Les drupes sont rouges puis noires, globuleuses (diam : 3-4 mm). Ce sont des grains pleins, séchés, de forme ronde avec une surface ridée. Sa classification botanique est donnée par le tableau 2

Tableau 2 : Classification botanique du poivre noir

Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
dicotylédones	Pipérales	pipéracées	Piper	Nigrum

4.3. Culture et récolte

Le poivrier est plutôt exigeant en matière de sol. Pour bien pousser, il a besoin d'un sol riche en nutriments et perméable, d'un endroit semi-ombragé et lumineux et d'une humidité de l'air élevée. Il se multiplie par semis ou bouturage à des températures de 20 à 24°C. Dans de bonnes conditions de culture, on peut escompter une récolte maximale à partir de la septième année. Les infrutescences du *Piper nigrum* sont cueillies avant d'arriver à maturité, dès que les premières baies se colorent en rouge sur les tiges, puis séchées au soleil ou à l'aide d'une source de chaleur artificielle [17].

5. Pipérine

5.1. Définition et histoire

Les fruits de *Piper nigrum* (poivre noir) ont été largement utilisés dans les épices domestiques ainsi que dans divers systèmes de médecine traditionnelle. Le poivre est composé d'alcaloïde de pipérine, de résine piquante, d'huile volatile, de pipéridine et d'amidon. La pipérine est l'alcaloïde majeur du poivre noir de la famille des pipéracées.

Il s'agit de la (2E, 4E)-5-(benzo[d][1,3] dioxol-5-yl)-1-(piperidin-1-yl) penta-2,4-dien-1-one) en nomenclature officielle.

Elle fut isolée la première fois par un savant Danois, Hans Christain Orstedt, mais n'a été étudiée qu'après la seconde guerre mondiale par le pharmacologue Hongrois Nicholas Jancso.

5.2. Propriétés physico chimiques

- ❖ Formule brute : $C_{17}H_{19}NO_3$
- ❖ Masse molaire : $285,3377 \pm 0,016$ g/mol
- ❖ C 71,56 %, H 6,71 %, N 4,91 %, O 16,82 %,
- ❖ T° fusion : 130 °C.
- ❖ Solubilité : Peu soluble dans l'eau ($40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Soluble dans l'alcool, le chloroforme et l'éther.
- ❖ Masse volumique : $1,193 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$.
- ❖ Aspect : solide cristallisé, d'une couleur jaune claire.

5.3. Les effets pharmacologiques de la pipérine

5.3.1. Effet Anti oxydant

La pipérine étudiée in-vitro, a montré une activité anti-oxydante en capturant les radicaux libres et en inhibant la peroxydation des lipides. Cette propriété n'est observée qu'à des

Partie bibliographique

doses faibles de pipérine. En effet, des doses plus élevées entraînent au contraire une surproduction de radicaux libres [18].

5.3.2. Activité anticancéreuse

Une étude de l'activité anti tumorale de la pipérine a été réalisée sur des souris. Les résultats ont montrés que le traitement à la pipérine diminuait remarquablement la croissance tumorale des cellules cancéreuses de la prostate [19].

5.3.3. Effet anti bactérien

La pipérine en général permet de renforcer les globules blancs. Assurant ainsi une meilleure défense de notre organisme. Les bactéries sont inhibées par l'action de la pipérine dans le corps humain.

5.3.4. Effet anti inflammatoire

La propriété anti-inflammatoire fait référence à la capacité d'une substance ou d'un traitement à réduire l'inflammation ou le gonflement. La pipérine standard, ainsi que des extraits à l'hexane et à l'éthanol de piper nigrum L., ont révélé une activité analgésique et anti-inflammatoire remarquable[20]. Les activités anti-inflammatoires de la pipérine ont été confirmées dans de nombreux modèles de rats[21].

La pipérine a montré des effets inhibiteurs profonds sur l'inflammation des voies respiratoires.

5.4. Toxicité

Les valeurs de DL50 pour une administration unique de pipérine par voie IV, IP, SC, IG et IM à des souris mâles adultes étaient respectivement de 15,1 ; 43 ; 200 ; 330 et 400 mg / kg de poids corporel [22].

6. Méthodes d'extraction et de caractérisation des molécules bioactives.

6.1. Extraction

L'extraction de principe actif à haute valeur est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des molécules bioactives naturelles. C'est la séparation sélective des parties actives des tissus végétaux des composants inactifs ou inertes à l'aide des solvants. Parmi les méthodes d'extraction, on cite ; l'extraction par soxhlet, l'hydro-distillation, l'infusion, la décoction, l'extraction assistée par macération et la digestion qui sont des techniques conventionnelles ; et d'autres nouvelles dont on peut évoquer

Partie bibliographique

l'extraction assistée par microondes, l'extraction accélérée par solvants, l'extraction assistée aux ultrasons et l'extraction avec des fluides supercritiques.

6.2. Techniques de caractérisation

Pour analyser un produit synthétisé, on dispose des techniques physiques diverses telles que la chromatographie et la spectroscopie :

❖ La chromatographie :

L'apparition de cette technique remonte à 1903, à laquelle le botaniste russe M.Tswett a réalisé la séparation de pigments végétaux de la chlorophylle. La période d'extension de la chromatographie d'absorption commença en 1930. Les séparations par chromatographie mettent en œuvre des techniques basées sur des propriétés physiques générales des molécules, parmi ces dernières on cite (Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC), chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince (CCM)).

❖ La Spectroscopie (infrarouge, UV-visible et la spectroscopie RMN)

Ces méthodes d'étude physiques des composés organiques mettent en jeu l'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière. Selon le domaine d'énergie impliqué, différentes transitions peuvent être excitées. Le principe consiste en l'enregistrement de l'énergie absorbée ou de l'énergie émise en fonction de la fréquence de l'onde incidente ou de sa longueur d'onde.

7. Formulation de pommade anti-inflammatoire à base des extraits végétaux

7.1. Inflammation

Initialement, l'inflammation peut être considérée comme « une réaction naturelle de défense de l'organisme face à des agressions tissulaires ». Elle est dominée par une vascularisation entraînant la chaleur, la rougeur des téguments atteints, et une augmentation de la perméabilité capillaire responsable d'un œdème s'accompagnant de phénomènes douloureux. Nous pouvons distinguer principalement deux types d'inflammations :

- Une inflammation localisée ou primaire appelée inflammation aiguë,
- Une inflammation généralisée ou secondaire dénommée inflammation chronique

Partie bibliographique

7.2. Anti-inflammatoires

Ce sont des médicaments capables de diminuer ou de supprimer les réactions inflammatoires. Ils constituent un traitement symptomatique de l'inflammation.

7.3. Pommade

Les pommades sont des préparations de consistance molle, obtenues par le mélange d'une substance médicamenteuse avec un excipient approprié ; elles sont appliquées sur la peau soit dans le but d'administrer des médicaments par voie dermique, ou pour obtenir une action locale superficielle.

7.4. Intérêts thérapeutiques des pommades

Les pommades en plus de leurs actions protectrices sur la peau, règlent le potentiel d'hydrogène (pH) cutané à la normale. Elles ont une action générale par voie cutanée sans passer par le foie. En plus de leur application dermique, elles peuvent être appliquées sur les muqueuses rectales et vaginales.

7.5. Excipients

On appelle excipient, toute substance sans activité thérapeutique spéciale permettant l'incorporation des médicaments. Les excipients pour pommades peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Selon la nature de l'excipient, la préparation peut avoir des propriétés hydrophiles ou hydrophobes. Elle peut contenir des additifs appropriés tels que les antimicrobiens, les agents stabilisants, les émulsifiants, les épaississants.

7.6. Préparation des pommades

Selon la pharmacopée française, les pommades doivent être homogènes. Il faut donc préparer un mélange onctueux facilement applicable dans lequel les composants solubles ou insolubles sont parfaitement dispersés et non visibles à l'application.

Le mélange des différents composants est réalisé en fonction du lieu de la préparation et des quantités à préparer. D'une façon générale la préparation des pommades s'effectue en deux temps :

Le mélange des excipients qui se fait le plus souvent en commençant par celui qui a le point de fusion le plus élevé, soit dans l'ordre des quantités croissantes.

L'addition des principes actifs solides ou liquides qui s'effectue en fonction de leur solubilité et de leur état solide insoluble ou liquide.

Partie bibliographique

La préparation des pommades s'effectue généralement par trituration lorsque le principe actif est insoluble dans l'excipient ou dans l'eau.

7.7. Contrôle de qualité des pommades

Plusieurs méthodes sont utilisées pour le contrôle de qualité des pommades. Parmi celles-ci nous pouvons citer :

- L'observation des caractères macroscopiques des pommades surtout la consistance, la couleur, l'odeur et la stabilité ;
- La vérification de l'homogénéité ;
- La mesure du potentiel d'hydrogène (pH)
- Viscosité et comportement rhéologique

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

Cette partie est consacrée à la description des matériels et méthodes utilisés afin de mener à bien la présente étude. Elle englobera trois sous-parties essentielles : La première portera sur la présentation des matières végétales utilisées, la seconde portera sur l'extraction et les différentes techniques d'identification et de caractérisation mises en œuvre ainsi que leurs principes de fonctionnement et enfin dans la dernière partie des applications permettant d'accéder aux activités biologiques des extraits seront détaillées.

1. Matériels utilisés

1.1. Matière végétale

Les plantes, poivre noir et piment, se sont avérés pour posséder des déférentes activités pharmacologiques. Ces composés montrent une gamme de propriétés pharmacologiques ; telles que les effets anti-inflammatoires, antimicrobiens et antioxydants.

- Le poivre noir : importé du Vietnam.
- Le piment : récolté de Magra, wilaya de Msila. (Est de l'Algérie), région caractérisée par un climat semi- aride, sec et froid. La plante a été identifiée au niveau de département de l'agronomie (UMMTO) par le professeur Smail.

1.2. Réactifs et équipements

Ci-dessous (Tableau3), les réactifs et le matériel utilisés pour l'extraction et la caractérisation de nos substances.

Tableau 3 : Matériels et produits utilisés pour l'extraction et la caractérisation des substances étudiées

Equipements		Réactifs		Verreries
Nom	Marque	Nom	Marque	Soxhlet
Balance analytique	Denver	Ethanol 96%	Honeywell Riedel-de Haen	Verre fritté porosité 4
Balance technique	Kern	Acide sulfurique	Sigma-Aldrich	Micropipette et pipette pasteur
Rota vapeur	laborota 4001-efficient Heidolph	Hydroxyde de potassium	Sigma-Aldrich	Emporte-pièce (4mm), Pince, Lame de bistouris stérile,
Appareil de point de fusion	SMP30	Thiosulfate de sodium anhydre	Fluka Chemika	Boite de pétries
Ultra-violet	UV min=i-1240 Shimadzu	Xylène 96%	Sigma-Aldrich	écouvillon stérile
HPLC	Shimadzu Decad II	Ether diéthylique	Honeywell Riedel-de Haen	papier wattman N° 3
Infra rouge	Perkin Elmer	Vaseline blanche	Vaseline blanche	Mortier
Microscope	PHYWE	Huile d'amande	Huile d'amande douce	Bec bunsen

2. Extraction des composés étudiés

2.1. Identification phytochimiques

Pour caractériser les principales familles phytochimiques contenues dans un organe végétal ; il s'agit d'identifier la présence de certaines substances chimiques. Ces dernières sont basées sur des essais de coloration et de précipitation.

Les principaux groupes phytochimiques qui font l'objet de ces tests sont les alcaloïdes.

- **Identification des alcaloïdes**

10g de la poudre végétale ont été macérés dans 10ml de H_2SO_4 à 0.1% pendant 24h à température ambiante. Une filtration est ensuite effectuée à l'aide d'une pompe à vide et le mélange obtenu est ajusté avec de l'eau distillée jusqu'à obtention de 10ml de filtrat.

✚ 1ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de Mayer ➡ l'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes.

✚ 1ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de Wagner ➡ l'apparition d'un précipité brun indique la présence des alcaloïdes.

2.2. Extraction au soxhlet

L'extraction de la pipérine et capsaïcine a été réalisée par extraction solide – liquide en utilisant l'appareil soxhlet. Ce dernier est constitué d'un ballon mono col, d'un réfrigérant et d'un extracteur qui présente un système de tube permettant la vidange du réservoir. Une modification a été apportée à ce montage en remplaçant la cartouche par le coton afin d'économiser le solvant et de réduire le temps d'extraction, (Figure 1).



Figure 1 : Montage de l'extraction par Soxhlet

Le protocole est schématisé par la figure 2.

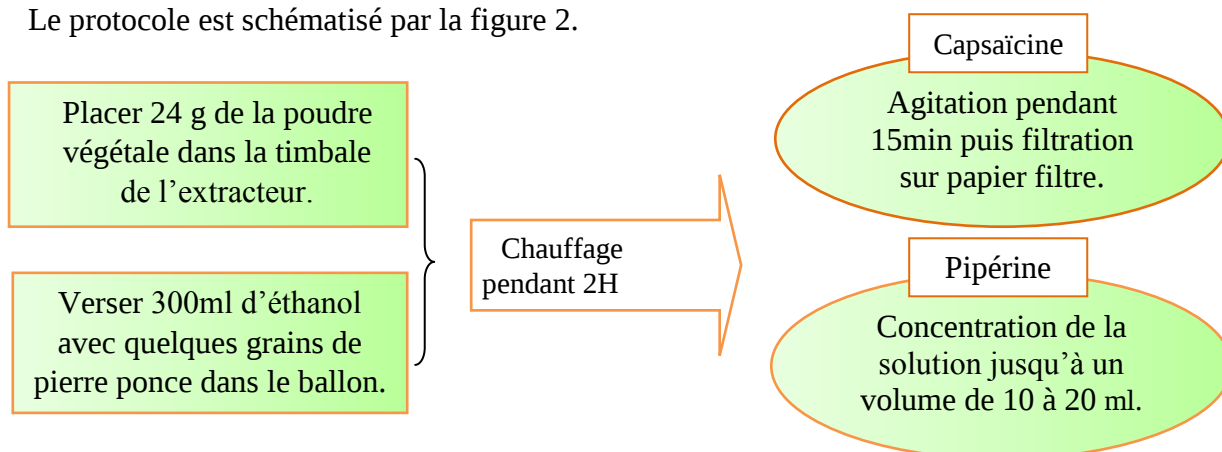


Figure 2 : Protocole de l'extraction des substances actives.

2.2.1. Purification de la Pipérine

À la solution concentrée de la pipérine, ajouter 10ml d'une solution glacée de KOH à 10 % et agiter pendant une heure. Ajouter 100ml d'eau gouttes à gouttes et laisser le mélange se reposer une nuit. Filtrer à l'aide d'un verre fritté de porosité 4 et rincer avec 10ml d'eau glacée puis avec 10ml d'éther glacé [23].

2.2.2. Purification de la Capsaïcine

Ajouter quelques grammes de thiosulfate de sodium anhydre au filtrat et agiter pendant 30min. La capsaïcine est récupérée après élimination du solvant par le rota-vapeur [24].

2.2.3. Calcul du rendement

On pèse la poudre sèche en utilisant une balance analytique puis le rendement sera calculé par la relation :

$$R\% = (M_e / M_g) * 100 \dots\dots(1)$$

R : Rendement des extraits secs

Me : Masse de l'extrait après évaporation du solvant

Mg : Masse de matière végétale utilisée pour l'extraction

3. Caractérisation

La pipérine et la capsaïcine isolées ont été caractérisées par différentes méthodes physico-chimiques, spectroscopiques et chromatographiques.

3.1. Caractéristiques physico -chimiques

3.1.1. Caractères organoleptiques

La pipérine et la capsaïcine ont des caractères organoleptiques caractéristiques : Aspect, Couleur et Odeur.

3.1.2. Solubilité

Des échantillons de 0.1g pipérine et de capsaïcine ont été solubilisés dans 10ml des solvants différents : éthanol, méthanol, chloroforme, l'éther diéthylique, l'eau et l'huile d'amande.

3.1.3. Point de fusion

Un tube capillaire contenant de la pipérine a été introduit dans l'enceinte de l'appareil de point de fusion pour noter la température à laquelle la substance agglomérée devient complètement transparente ; cette température constitue le point de fusion.

3.2. Caractérisation par spectroscopie

3.2.1. Analyse par UV-visible

Des solutions diluées de 0.13mg/ml pour la capsaïcine et de 0.01mg/ml pour pipérine ont été préparées, puis analysées par un spectrophotomètre UV-VIS, pour un domaine d'absorption entre 200 et 800nm ; afin de mener à une analyse qualitative des deux échantillons.

3.2.2. Analyse par Infrarouge

La spectroscopie d'infrarouge permet de déterminer la présence de groupements fonctionnels dans les molécules organiques, et les structures dans certaines molécules simples. Les deux échantillons de la pipérine et de la capsaïcine ont été analysés par IR.

3.2.3. Analyse Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les échantillons ont été dissous dans l'éthanol à des concentrations déterminées. Après filtration, les solutions sont injectées.

Les conditions opératoires suivies pour la réalisation de cette analyse sont décrites dans le tableau 4.

Tableau 4 : Conditions d'analyse par HPLC pour capsaïcine et pipérine.[25]

Conditions d'analyse	Pipérine	Capsaïcine
Colonne	C18	C18
Température	35 C°	30 C°
Concentration	(0,02 mg / ml)	(0,005mg/ml)
Volume d'injection	20 µl	10 µl
Phase mobile solution	dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄). (50 mm, pH 3,5) et de l'acétonurie (40:60 v / v)	Acétonitrile / CH ₃ COOH à 2% (6 : 4 v/v)
Débit	0,6 ml / min	1,0 ml / min
Détection spectrophotomètre	254 nm et 364 nm	280

4. Bio-activités de la capsaïcine et de la pipérine

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des alcaloïdes (pipérine et capsaïcine) a été réalisée au niveau du service Pharmacotoxicologie du Laboratoire National du Contrôle des Produit Pharmaceutiques LNCPP (Dali Brahim, Alger).

4.1. Activité anti oxydante

4.1.1. Principe

Pour l'évaluation de l'activité anti radicalaire des deux extraits, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle), qui est un radical relativement stable, dans ce test, les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1picrylhydrazyle ayant une couleur violette en un composé de couleur moins intense allant jusqu'à la couleur jaune 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine mesurable par spectrophotométrie à une longueur d'onde comprise entre 515-518 nm [27].

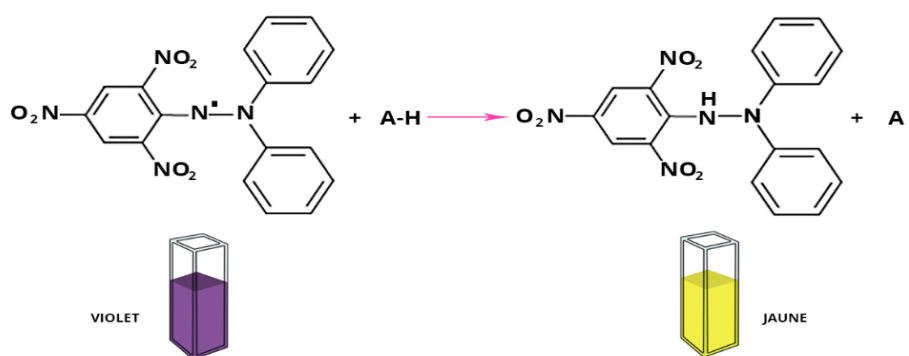


Figure 3 : Schéma représentant le principe d'une réaction de réduction

4.1.2. Préparation de la solution de DPPH

Une solution de DPPH a été préparé à une concentration de 0.032mg/ml afin d'avoir une absorbance comprise entre 0.6 et 1.

4.1.3. Préparation des solutions

Les solutions mères ont été préparées à des concentrations de 2,5mg/ml et 5mg/ml pour la capsaïcine et la pipérine respectivement dans le méthanol. La solution mère du témoin positif (acide ascorbique) a été préparée à une concentration de 1mg/ml dans le même solvant.

Les solutions mères ont été diluées pour aboutir à des solutions filles de concentrations (75, 50, 25, et 12.5) %.

4.1.4. Réalisation de l'essai

Le pouvoir antioxydant des échantillons étudiés et de l'échantillon référence est mis en évidence par le mélange de 50µl de l'échantillon avec 2ml de la solution de DPPH. Pour la capsaïcine et 2ml de l'échantillon avec 2ml de la solution de DPPH pour la pipérine.

4.2. Activité anti bactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisé par la méthode de diffusion sur disque en milieu solide pour la pipérine et la capsaïcine et par la méthode des puits pour les produits fini vis-à-vis de deux souches bactériennes de référence ATCC : Staphylococcus aureus ATCC 25923, et Escherichia coli ATCC 25922.

La réalisation de cette activité s'effectue en plusieurs étapes[26].

4.2.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture a été préparé par répartition de la gélose Muller-Hinton dans des boites de pétris stériles d'un diamètre de neuf centimètres et d'une épaisseur de quatre millimètres de gélose.

4.2.2. Repiquages des cultures jeunes

La revivification des souches a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure.

Elle consiste à ensemencer en stries quelques colonies de souches conservées à la surface de la gélose préalablement coulée et solidifiée dans des boites de pétri puis les incuber dans une étuve à température allant de 35 à 37°C.

4.2.3. Préparation de l'inoculum

A partir des cultures bactériennes jeunes, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont inoculées dans le but de préparer des suspensions bactériennes. Ces colonies ont subis au préalable une culture pure de 18 à 24 heures. Ces bactéries sont mises dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile dans des écouvillons.

4.2.4. Ensemencement

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne en le pressant fermement contre la paroi interne de tube, afin de le décharger au maximum. L'écouvillon est frotté sur la surface gélosée séchée, de haut en bas et de gauche à droite en stries serrées. A la fin de cet ensemencement, l'écouvillon doit être passé sur toute la périphérie de la gélose contenue dans la boîte de pétri.

4.2.5. Préparation des solutions et des disques de l'aromatogramme

Deux solutions ont été préparées par la dissolution de 51.2 mg de la pipérine et de la capsaïcine dans 10ml de DMSO.

Les disques ont été préparés à partir de papier wattman N° 3, ils doivent avoir un diamètre de 6mm, et stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

À l'aide d'une pince stérilisée, les disques sont déposés sur la surface gélosée MH pour chaque boîte de pétri, on dépose au maximum 6 disques. Chaque disque a été imbibé de 5µl des solutions préparées.

4.2.6. Incubation et lecture

Les boîtes de pétries sont ensuite fermées et incubées à 37°C pendant 24 heures. La lecture se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour du disque de la prolifération bactérienne à l'aide d'un pied à coulisse.

Le calcul du pourcentage d'inhibition se fait suivant comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = (D_{\text{test}} / D_{\text{boite}}) * 100 \dots (2)$$

Avec :

D_{test} : Diamètre de la zone d'inhibition.

D_{boite} : Diamètre de la boîte de pétrie.

4.3. Activité anti-inflammatoire (in vivo)

Neufs échantillons ont été étudiés:

- Pipérine à des concentrations de 10mg/ml, 1mg/ml, et 0.1mg/ml ;
- Capsaïcine à des concentrations de 0.13g/ml ; 0.0975g/ml ; et 1.3mg/ml
- Pommades à base de la pipérine, de la capsaïcine et du mélange pipérine et capsaïcine.

4.3.1. Principe

L'effet anti-inflammatoire de la substance testé est exprimé par la capacité de cette dernière à réduire le pourcentage de réduction d'œdème au niveau de l'oreille droit sur laquelle sont appliqué de façon topique 30 µl de xylène.

Le poids de l'œdème auriculaire qui apparait chez les souris est déduit en calculant la différence de poids des disques auriculaire de 4 mm de diamètre prélevé respectivement sur l'oreille droit traité par le xylène et oreille gauche non traité. Le pourcentage de réduction de l'œdème est déterminé après avoir appliqué préalablement la substance a testé avant l'induction de l'œdème par le xylène. Un lot témoin de souris non traité par la substance a testé, mais recevant le xylène est constitué.

La différence entre le poids moyen d'œdème du lot témoin non traité et le poids moyen traité par la substance a testé est apprécié comme étant un effet anti-œdémateux correspondant à l'activité anti-inflammatoire exercé par la substance a testé.

4.3.2. Matériels utilisé

Les réactifs et équipements ainsi que les matériels utilisés pour l'étude anti-inflammatoire sont données dans le tableau suivant

Tableau 5 : Matériels utilisés pour l'activité anti-inflammatoire

Réactifs chimique	Réactif animal	Equipement	Petit matériel	Consommable
Xylène	Souris BLBC	Balance pour la pesé des souris	Paire de ciseau	Seringue
Ether de pétrole		Balance analytique pour la pesé des disques	Maillet	Embout
			Emporte pièce	
			Paire de pince	

4.3.3. Préparation des animaux

Les souris ont été pesées et marqué de 1 à 10 puis remit dans une cage sous forme d'un lot.

Lot 1 : Sur lequel est appliqué le produit de référence (Diclofénac 1%)

Lot 2 : œdème témoin

Lot 3 : Sur lequel est appliqué l'échantillon à étudier

4.3.4. Application

A T_0 : Lot 1 : On applique 100 μ L de Diclofénac sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris.

Lot 2 : témoin (rien n'est appliqué)

Lot 3 : On applique 100 μ L d'échantillon sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris.

A T_0+1h : On applique sur tous les lots 30 μ L de xylène (provoque une inflammation) sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris.

Après 4h : Les souris ont été sacrifiées par asphyxie dans une enceinte fermée en utilisant l'éther de pétrole.

4.3.5. Confection des disques

Les deux oreilles droite et gauche des souris ont été coupées à l'aide d'une paire de ciseaux afin de confectionner des disques à l'aide d'un emporte-pièce et un marteau sur la phase interne de chaque oreille. Les disques ont été pesés avec une balance analytique.



Figure 4 : Les principales étapes de l'étude de l'activité anti-inflammatoire

5. Formulation d'une pommade à base de la pipérine et la capsaïcine

Pour bien exploiter les deux substances actives extraites pipérine et capsaïcine, nous avons procédé à la formulation des pommades à base de ces extraits vue leurs propriétés pharmacologiques.

5.1. Préparation de la pommade

À l'aide d'un mortier en porcelaine, le PA dissout dans l'huile d'amande douce est mélangé avec la vaseline blanche. Cette dernière doit être rajouté petit à petit et triturer jusqu'à obtention d'une pommade homogène.

Trois pommades ont été préparées avec les proportions décrites dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Composition des trois pommades préparées

A base de pipérine	A base de capsaïcine	A base de pipérine et capsaïcine
-PA : pipérine : 0.1%	-PA : capsaïcine : 10%	-PA : pipérine et capsaïcine
-Vaseline blanche : 80%	-Vaseline blanche : 80%	0.1% et 10% respectivement
-Huile d'amande douce : 19.9%	-Huile d'amande douce : 10%	-Vaseline blanche : 80%
		-Huile d'amande douce : 9.9%

5.2. Caractérisation des pommades

5.2.1. Caractères macroscopiques

L'observation de la couleur, la consistance et l'odeur de chaque pommade.

5.2.2. Homogénéité

L'homogénéité des pommades a été vérifiée en étalant une couche mince sur une surface plane à l'aide d'une spatule. La répartition régulière ou non des extraits dans les excipients a été notée.

5.2.3. Mesure du pH

Le pH a été déterminé à l'aide d'un pH mètre après dilution des pommades au dixième dans de l'eau distillée chaude.

5.2.4. Viscosité

La viscosité des différentes pommades est déterminée à l'aide d'un viscosimètre on utilisant le mobile S64 avec une vitesse de rotation de 100 tours/min à une température de 28C°.

Résultats et discussions

Résultats et discussions

1 Extraction

1.1 Test phytochimique (identification des alcaloïdes)

L'analyse phytochimique des deux plantes (piment et poivre noir) a révélé la présence d'alcaloïdes, par des réactions de précipitation avec les deux réactifs de Mayer et de Wagner, (Figure 5).



Figure 5 : Résultats des réactions de précipitation avec les deux réactifs.

1.2 Rendement d'extraction

- ❖ Extrait de poivre noir

$$R\% = \frac{0.8}{24} \times 100 = 3.33\%$$

- ❖ Extrait du piment rouge

$$R\% = \frac{3.5}{24} \times 100 = 14.58\%$$

Le rendement d'extraction des principes actifs des deux plantes révèlent différent d'une espèce à l'autre. En effet il est difficile de comparer les valeurs de nos rendements avec d'autre études, car le rendement n'est que relative et semble être lié aux propriétés génétiques des plantes, l'origine géographique, conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. (Nature du solvant et méthode d'extraction...).

2 Caractérisation

2.1 Caractéristiques physico -chimiques

2.1.1 Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques des deux extraits sont donnés par le tableau 7 et la figure 6.

Résultats et discussions

Tableau 7 : Les caractères organoleptiques des deux extraits.

Caractères organoleptiques	Extrait de Poivre noir	Extrait de piment
Aspect	Cristaux	Visqueux
Couleur	Jaune Claire	Rouge orangé
Odeur	Piquante et aromatique	Piquante et aromatique

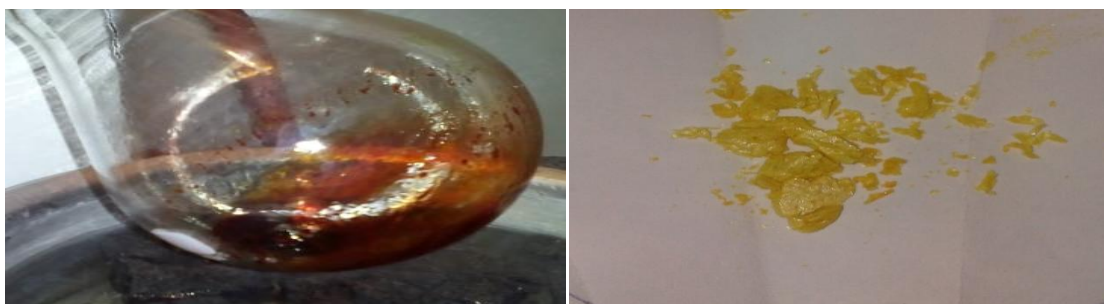


Figure 6 : Caractères organoleptiques des deux extraits

2.1.2 Solubilité

La solubilité des extraits étudiés est donnée par le tableau 8.

Tableau 8 : Solubilité des deux extraits dans différent solvants.

Solvants	Extrait de Poivre noir	Extrait de piment
Chloroforme	Soluble	Soluble
Ethanol	Très soluble	Soluble
Méthanol	Très soluble	Soluble
Huile d'amande	Soluble	Très soluble
Eau	Faiblement soluble	Insoluble
Ether diéthylique	Soluble	Soluble

Les deux extraits sont soluble dans la pluparts des solvants organiques polaires comme les alcools et les huiles mais insoluble dans l'eau.

2.1.3 Température de fusion

L'extrait de poivre noir se fond à une température de 127°C.

D'après cette caractérisation physico-chimique, nous pouvons pré conclure que les extraits sont probablement ; la pipérine et la capsaïcine. Les caractéristiques de la pipérine et de la capsaïcine données par la théorie sont résumées par le tableau 9.

Résultats et discussions

Tableau 9 : Données théoriques sur la pipérine et la capsaïcine [9, 15]

	Pipérine	Capsaïcine
Caractères organoleptiques	Solide cristallin jaune claire d'une odeur piquante et aromatique	Substance cristalline, incolore Et d'une odeur piquante
Solubilité	Soluble dans le chloroforme, l'éther, l'alcool et peu soluble dans l'eau.	Très soluble la graisse, l'huile et alcool.
Point de fusion	129C°	62 à 65 C°

Pour confirmer ce résultat, nous avons réalisé une caractérisation par spectroscopie.

2.2 Caractérisation par spectroscopie

2.2.1 Analyse par UV

Un balayage a été réalisé pour déterminer la longueur d'onde d'absorption des extraits comme les figures 7 et 8 le montre.

✚ Pour la pipérine : $\lambda_{\max} = 343 \text{ nm}$, norme : 343-344nm [28]

✚ Pour la capsaïcine : $\lambda_{\max} = 282 \text{ nm}$, norme : 281nm [29]

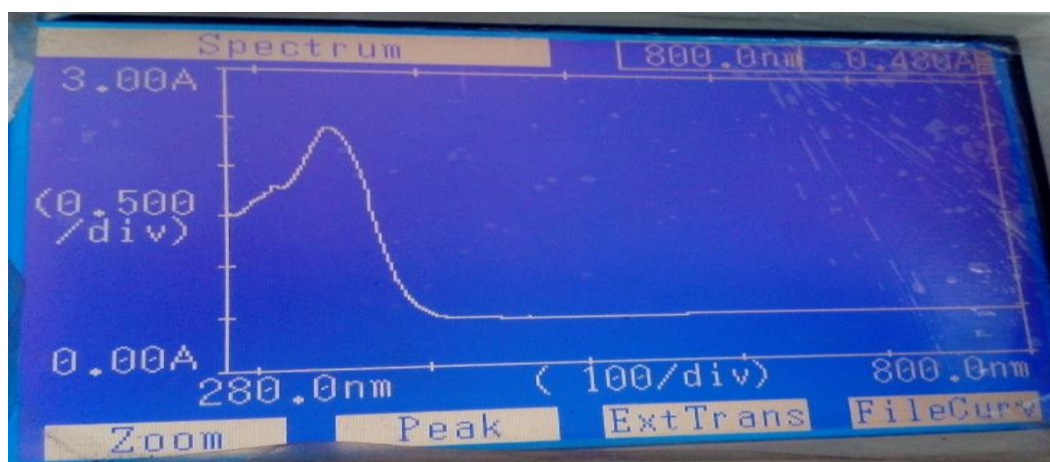


Figure 7 : Spectre UV-Visible de la pipérine

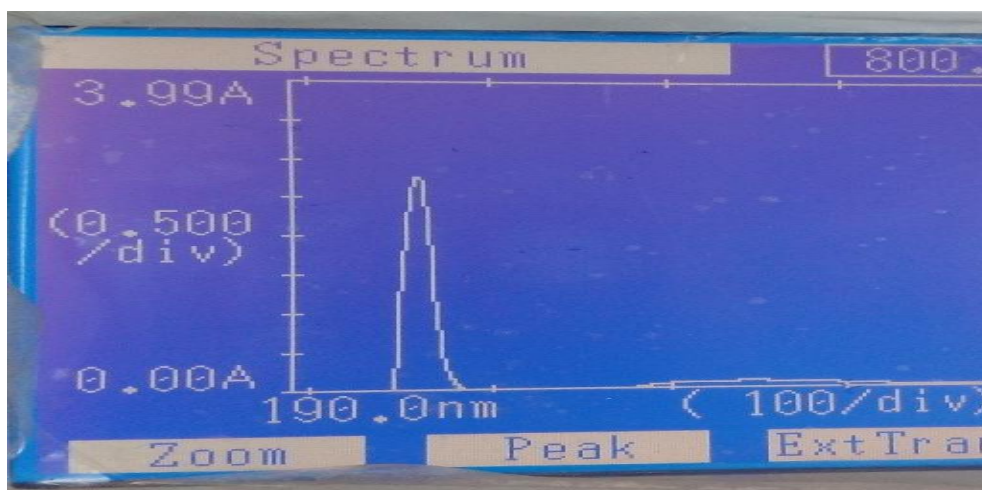


Figure 8 : spectre UV-Visible de la capsaïcine

Résultats et discussions

2.2.2 Analyse par Infrarouge

Pipérine

Les pics du spectre sont interprétés par comparaison aux tables Infrarouge, et les résultats sont présentés par le tableau 10.

Tableau 10 : Valeurs de spectre infrarouge de la pipérine en cm^{-1}

Groupe	Valeurs standards (cm^{-1})	Valeurs observés (cm^{-1})
Alcane C-H stretch.	3000-2850	2929
Aromatique C-H stretch.	3150-3050	3468
Aromatique C-H Bend.	900-690	828
C-O stretch.	1300-1000	1249
Asymétrique =C-O-C stretch.	1250-1190	1249
Symétrique =C-O-C	1030	1032
Aromatique C-C benzène	1600 et 1475	1564
C-C (diène)	1680-1600	1608
-CO-N- stretch.	1680-1630	1656
C-N (Amine)	1350-1000	1019

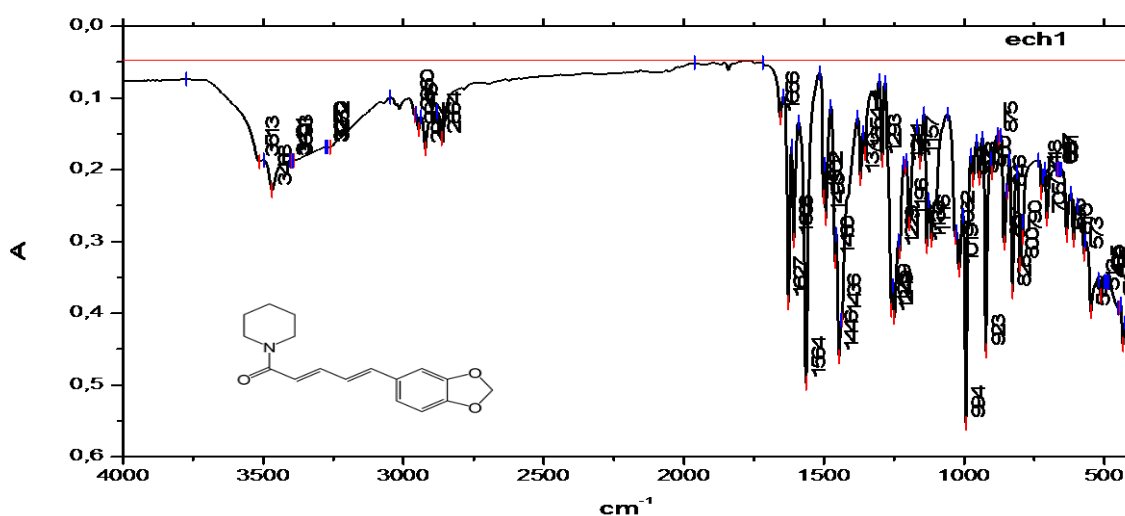


Figure 9 : Spectre infrarouge de pipérine

D'après le spectre IR (figure 9), un pic intense est observé à 1656 cm^{-1} indiquant la présence du groupement carbonyle amide (N-C=O). [28]

Capsaïcine

Les pics du spectre sont interprétés par comparaison aux tables Infrarouge, et les résultats sont présentés par le tableau 11.

Résultats et discussions

Tableau 11 : Valeurs de spectre infrarouge de capsaïcine en cm^{-1} .

Groupelements	Valeurs standards (cm^{-1})	Valeurs observés (cm^{-1})
C-OH aromatique	1150-1300	1238
C-H alcane	2850-3000	2923
= C-O-C	1250-1190	1190
C-N amine	1350-1000	1160
C=O	1650-1740	1744
C-N amide	3050-3500	3009
C-H aromatique	700-750	722

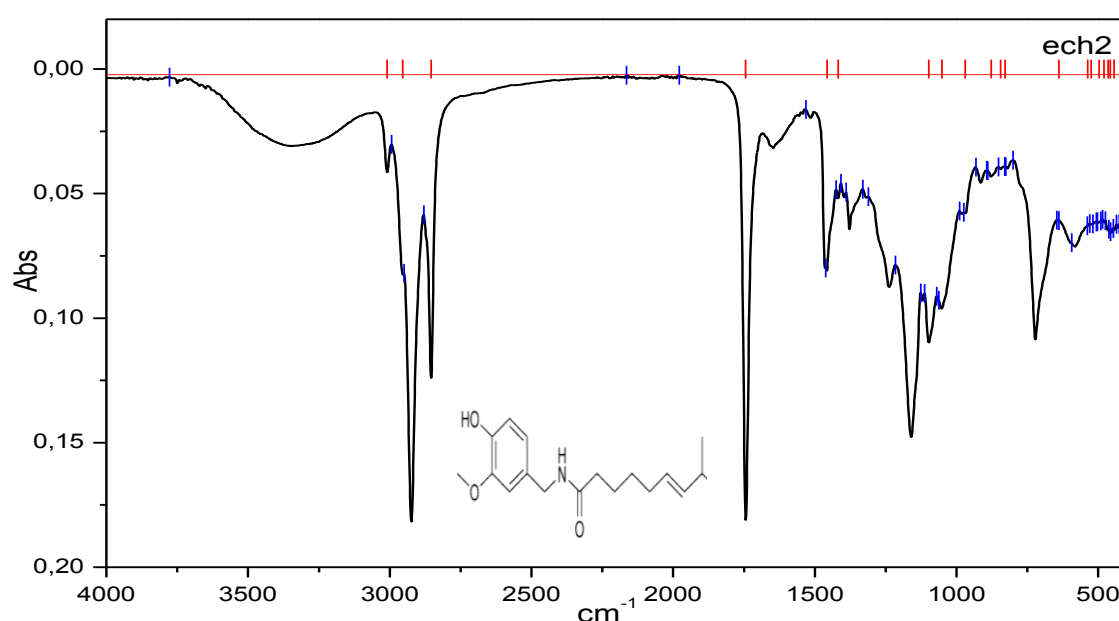


Figure 10 : Spectre infrarouge de capsaïcine

D'après le spectre IR (figure 10), un pic intense est observé à 1744 cm^{-1} indiquant la présence du groupement carbonyle (C=O), un autre pic intense de 1160 cm^{-1} indiquant la présence d'un groupement aromatique (C-OH).

Par comparaison entre les résultats de la caractérisation IR des extraits du poivre noir et du piment donnés par les tableaux 10 et 11 respectivement ; et les structures de la pipérine et de la capsaïcine insérées dans les figures 9 et 10, nous pouvons constater que les substances extraites (pipérine et capsaïcine) révèlent les mêmes fonctions organiques que la pipérine et capsaïcine.

Résultats et discussions

2.2.3 Analyse par HPLC

Les résultats de l'analyse HPLC pour la pipérine et la capsaïcine sont présentés par les figures 11 et 12 respectivement.

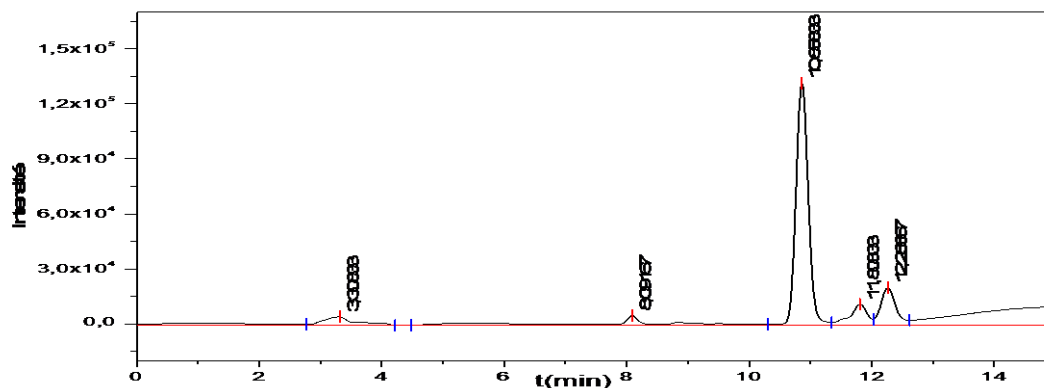


Figure 11 : Chromatogramme de l'HPLC de la pipérine.

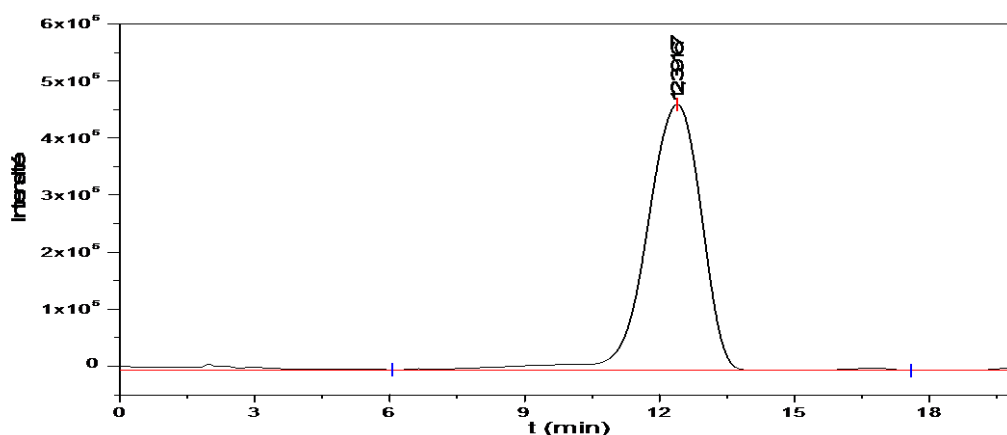


Figure 12 : Chromatogramme de l'HPLC de la capsaïcine

Les temps de rétention T_r (min) sont : 10.85 pour la pipérine et 12.39 pour la Capsaïcine.

Les résultats de ces paramètres de caractérisation étaient en bon accord avec la littérature. Nous pouvons donc confirmer que la substance extraite du poivre noir est la pipérine et celle extraite du piment est bien la capsaïcine.

Une fois les substances extraites sont identifier, nous passons à l'étude bioactive de ces substances.

3 Propriétés biologiques des substances (pipérine et capsaïcine)

3.1 Test antioxydant

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire par le test du DPPH sont présentés sous forme de courbes représentant les variations des % d'inhibition en fonction des concentrations :

Résultats et discussions

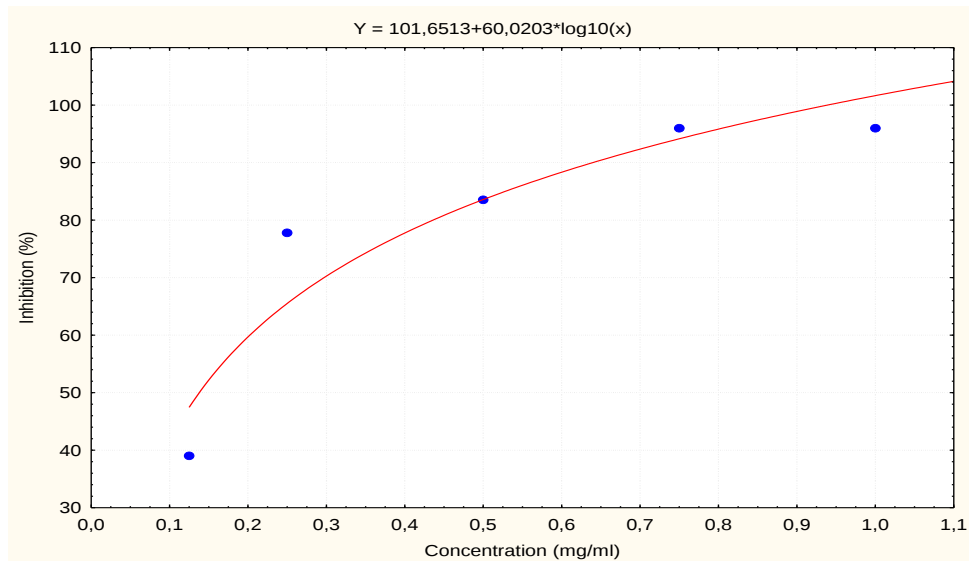


Figure 13 : Inhibition de DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

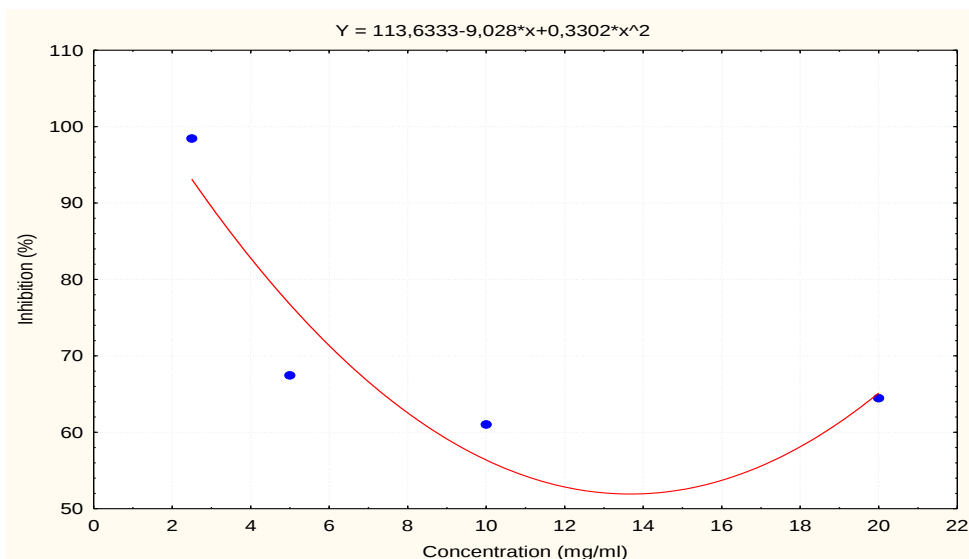


Figure 14 : Inhibition de DPPH en fonction de la concentration de la pipérine.

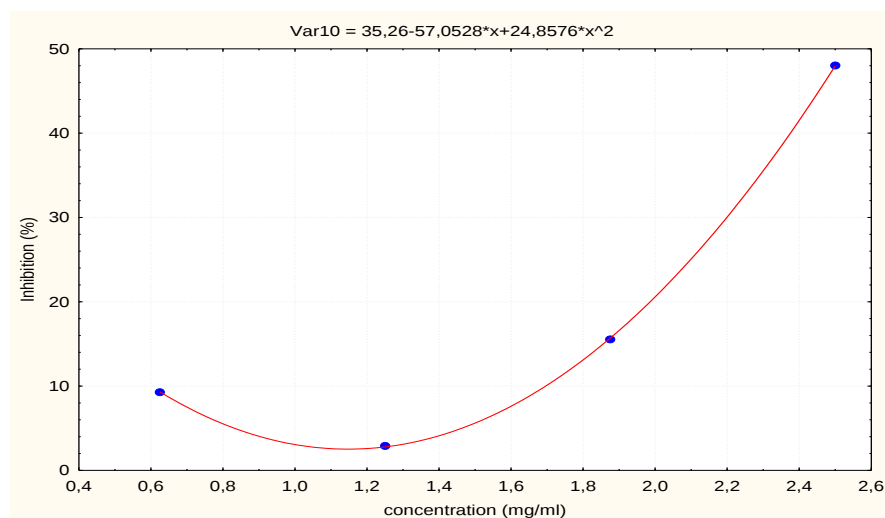


Figure 15 : Inhibition de DPPH en fonction de la concentration de capsaïcine.

Résultats et discussions

Les concentrations de neutralisation de 50% des radicaux libres (IC_{50}) des différents échantillons sont exprimées dans le tableau 12.

Tableau 12 : Concentrations IC_{50} des échantillons.

Echantillon	IC_{50} mg/ml
Acide ascorbique	0.1378
Capsaïcine	2.53

Le pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique avec IC_{50} de 0.137mg/ml reste supérieur à celui de la capsaïcine mais, le profil d'activité antioxydante obtenu révèle que les extraits du piment possèdent une activité anti radicalaire, le pourcentage de cette dernière augmente en fonction des concentrations avec une IC_{50} de 2.53mg/ml.

Cette activité antioxydante de la capsaïcine est déjà démontrée dans plusieurs études. Des recherches ont indiquées aussi que la capsaïcine inhibe potentiellement différents peroxydations lipidiques, piège les différents radicaux toxiques, et empêche l'accumulation des espèces actives de l'oxygène [30].

Le pouvoir antioxydant de la pipérine est important. A une concentration de 2.5mg/ml nous avons obtenu un pourcentage de 98.44% d'inhibition des radicaux et avec une concentration de 20mg/ml nous avons obtenu une inhibition de 64.48%. Ces résultats sont conformes aux études déjà réalisées sur l'activité anti oxydante de la pipérine.

D'après Zarai et al.[25], cette propriété n'est observée qu'à des doses faibles de pipérine. Des doses plus élevées entraînent au contraire une surproduction de radicaux libres.

3.2 Etude antibactérienne

L'activité antibactérienne des deux extraits capsaïcine et pipérine vis-à-vis des bactéries ont été réalisées par la méthode de diffusion par disque.

Le pouvoir antibactérien a été mis en évidence en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de la pipérine et de la capsaïcine vis-à-vis des souches testés :

L'échelle de l'estimation de l'activité antibactérienne est donnée par Mutai et al. (2009) ;

Ils ont classé les zones d'inhibitions de la croissance en 5 classes :

- ✓ $D \geq 30\text{mm}$: Très fortement inhibitrice.
- ✓ $21\text{mm} \leq D \leq 29\text{mm}$: Fortement inhibitrice.
- ✓ $16\text{mm} \leq D \leq 20\text{mm}$: Modérément inhibitrice.
- ✓ $10\text{mm} \leq D \leq 16\text{mm}$: Légèrement inhibitrice.

Résultats et discussions

✓ D < 10mm : Non inhibitrice.

Les résultats de l'étude sont donnés par le tableau 13.

Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibitions de capsaïcine et pipérine

Souche bactérienne	D Capsaïcine (mm)	D Pipérine (mm)
Escherichia coli (G-)	0	3.9
Staphylococcus aureus (G+)	0	4

D : diamètre d'inhibition

D'après les résultats on constate que l'activité antibactérienne est absente pour les deux substances.

Concernant la capsaïcine ces résultats concordent avec la théorie qui démontre que cette substance ne possède aucune activité vis-à-vis des souches bactériennes utilisées [14].

Pour la pipérine, le résultat montre une zone d'inhibition d'un diamètre de 3.9mm et 4mm pour Escherichia coli (G-) et Staphylococcus aureus (G+) respectivement, pour une concentration de 5.12mg/ml.

La faible zone d'inhibition par rapport à la concentration étudiée est en accord avec les résultats trouvés par Zahraa Mohammad Kaho et al. qui expliquent que la zone d'inhibition est proportionnelle à la concentration de l'échantillon testé [31].

3.3 Etude anti-inflammatoire

L'analyse de l'activité anti-inflammatoire portée sur le modèle d'œdème de l'oreille induit par le xylène, chez la souris, a été évaluée par comparaison de la moyenne des différents poids des oreilles droites par rapport aux oreilles gauches des souris des lots tests par rapport aux lots témoins.

✚ Le poids d'œdème de l'oreille a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Le poids d'œdème} = \frac{\sum(POD - POG)}{N} \dots\dots\dots(3)$$

N : nombre de souris (N=10) ;

POD : poids d'oreille droite ;

POG : poids d'oreille gauche

✚ Le pourcentage de réduction d'œdème chez les souris traitées a été calculé par rapport aux groupes témoins selon la formule suivante :

$$\% \text{ Réduction d'œdème} = \frac{\overline{PD}_T - \overline{PD}_E}{\overline{PD}_T} \times 100 \dots\dots\dots(4)$$

Résultats et discussions

$\overline{PD}_T$: Poids moyen d'œdème témoin

$\overline{PD}_E$: Poids moyen d'œdème essais

Les poids et les pourcentages de réduction d'œdème observés pour les témoins et les substances étudiées sont donnés par les tableaux suivant :

Tableau 14 : lots traités par le témoin négatif (xylène) et témoin positif (Diclofénac 1%)

Lot témoin (xylène)			Lot Diclofénac		
POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)	POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)
2.9	2.1	0.8	2.8	2.4	0.4
4.9	2.2	2.7	4	2.3	1.7
2.5	1.9	0.6	5	2.9	2.1
3.7	1.8	1.9	3.2	2.6	0.6
3	2	1	3.7	2.3	1.4
3.8	2.1	1.7	3.9	2.5	1.4
6	2.9	3.1	3.2	2.2	1
4.7	2	2.7	2.4	2.4	0
6.8	2.8	4	3.9	3.4	0.5
3.5	2.7	0.8	3.3	3	0.5
poids d'œdème témoin = 1.93mg			poids d'œdème = 0.94mg		
			% réduction d'œdème = 51.29%		

Tableau 15 : Lots traités par la pipérine à différentes concentrations

Pipérine 10mg/ml			Pipérine 1mg/ml			Pipérine 0.1mg/ml		
POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)	POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)	POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)
4	3	1	2.5	2.3	0.2	3.6	1.8	1.8
3.5	3	0.5	3.6	2.6	1	4.5	2	2.5
3.8	2.7	1.1	2.7	4.2	-1.5	4	2.2	1.8
3.5	3	0.5	2.5	2.4	0.1	4.5	2.4	2.1
2.6	2.3	0.3	3.4	3.1	0.3	4.1	1.5	2.6
2.9	2.7	0.2	4.5	2.2	2.3	3.4	2.2	1.2
4.1	2.6	1.5	2.8	2.4	0.4	2.4	2.4	0
3.4	2.8	0.6	3.0	2.3	0.7	2.3	2	0.3
3.6	2.8	0.8	3.1	2.4	0.7	3.5	2.2	1.3
3.9	2.2	1.7	3.1	2.4	0.7	2.4	1.2	1.2
poids d'œdème = 0.82mg			poids d'œdème = 0.49mg			poids d'œdème = 1.48mg		
% réduction d'œdème = 57.51%			% réduction d'œdème = 74.61%			% réduction d'œdème = 23.32%		

Résultats et discussions

Tableau 16 : Lots traités par la capsaïcine à différentes concentrations

Capsaïcine à 0.13g/ml			Capsaïcine à 0.0975g/ml			Capsaïcine à 1.3mg/ml		
POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)	POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)	POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)
2.6	1.8	0.8	3.1	1.9	1.2	3	2.3	0.7
2.3	2.1	0.2	4.5	2.6	1.9	3	2.1	0.9
2.5	2.4	0.1	2.8	2.1	0.7	4.2	2.3	1.9
3	1.8	1.2	4.6	2.3	2.3	3.4	2.5	0.9
2	1.8	0.2	2.6	2.2	0.4	3.2	2.2	1
2.1	1.4	0.7	3	2.2	0.8	3.3	2.2	1.1
2.1	2.1	0	2.8	2	0.8	4.2	1.8	2.4
2	2	0	2.7	2.4	1.3	2.8	1.4	1.4
3.3	1.7	1.6	2.8	2.3	0.5	2.8	2.1	0.7
2	2	0	3.6	2.5	1.1	2.8	1.5	1.3
poids d'œdème = 0.48mg			poids d'œdème = 1.1mg			poids d'œdème = 1.23 mg		
% réduction d'œdème = 75.13%			% réduction d'œdème = 43%			% réduction d'œdème = 36.26%		

Pipérine extraite du poivre noir

Le pourcentage de réduction d'œdème de l'oreille obtenu lors de l'analyse de l'activité anti-inflammatoire de pipérine issus de poivre noir à des concentrations de 10mg/ml, 1mg/ml et 0.1mg/ml sont respectivement 57.51%, 74.61% et 23.32%.

Nous avons constaté que le pourcentage d'inhibition d'œdème obtenu avec une concentration de 1mg/ml en pipérine est supérieur à celui obtenu avec une concentration de 10mg/ml. Ceci qui peut être expliqué par le fait que la substance pipérine a une activité anti inflammatoire à des concentrations faibles ; le même phénomène est observé lors de l'évaluation de l'activité anti oxydante de la pipérine, l'activité est meilleur à des concentrations faibles [32].

Une très légère diminution du poids d'œdème a été constatée entre le poids moyen de l'œdème témoin et le poids moyen de l'œdème traité avec l'extrait de pipérine à 1%, mais aucune différence significatif n'a été décelée ($P=0.34>0.05$).

Tandis que pour les lots ayant subi un traitement par l'extrait de la pipérine à 1mg/ml et à 10mg/ml, une très importante diminution ($P=<0.05$) du poids d'œdème a été enregistrée. Le poids moyen d'œdème est passé de 1.93mg à 0.82mg (57.51% de réduction d'œdème) pour la pipérine à 10mg/ml et de 1.93mg à 0.49mg (74.61% de réduction d'œdème) pour la

Résultats et discussions

pipérine à 1mg/ml ; contre un pourcentage de réduction de 51.29% pour la référence (Diclofénac 1%). Le test de Student indique que la différence est significative dans le cas de la pipérine à 10mg/ml et à 1mg/ml ($P < 0.05$), alors qu'elle est non significative dans le cas de la pipérine à 0.1mg/ml.

Tous ces résultats démontrent que la pipérine issue de poivre noir est dotée d'une activité anti-inflammatoire ; cette activité a été confirmée dans de nombreux modèles de rats [21].

Capsaïcine extraite du piment rouge.

Le pourcentage de réduction d'œdème de l'oreille obtenu lors de l'analyse de l'activité anti-inflammatoire de la capsaïcine issus de piment rouge à des doses 0.13g/ml, 0.0975g/ml et 1.3mg/ml sont respectivement 75.13%, 43% et 36.26%.

On a constaté que le pourcentage d'inhibition d'œdème obtenu avec une concentration de 0.13g/ml en capsaïcine est supérieur à celui obtenu avec une concentration de 0.0975g/ml, ce dernier est également supérieur à au pourcentage de réduction obtenu avec une concentration de 1.3mg/ml en capsaïcine.

Une très légère diminution du poids d'œdème a été constatée entre le poids moyen de l'œdème témoin et le poids moyen de l'œdème traité par la capsaïcine à 1.3mg/ml (de 1.93mg à 1.23mg), soit 36.26% de réduction. Cette différence n'est pas significatif ($P = 0.1 > 0.05$).

Concernant le lot traité avec capsaïcine à 0.0975g/ml, une légère diminution du poids moyen d'œdème a été détectée par rapport au poids moyen d'œdème témoin, ce dernier est passé de 1.93mg à 1.1mg soit 43 % de réduction. Cette dernière reste statistiquement non significative ($P = 0.06 > 0.05$).

Tandis que pour les lots ayant subi un traitement par la capsaïcine à 0.13g/ml, une très importante diminution du poids d'œdème a été enregistrée. Le poids moyen d'œdème est passé de 1.93mg à 0.48mg, soit 75.13% de réduction. Ainsi le pouvoir de réduction d'œdème de capsaïcine à 0.13g/ml est meilleur par rapport à celui du Diclofénac 1%. Cette différence est statistiquement significative ($P = 0.002 < 0.05$).

Ces résultats montrent que la capsaïcine possède une activité anti inflammatoire très importante vue le pourcentage de réduction de poids d'œdème observé à 0.13g/ml.

Les résultats sont conformes aux études déjà réalisées sur l'activité anti inflammatoire de la capsaïcine [9, 16].

 Les doses des PA des pommades formulées sont choisies à base de ces résultats.

Résultats et discussions

4 Caractérisation de la pommade

4.1 Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques des pommades formulées à base de la pipérine, de la capsaïcine et du mélange pipérine et capsaïcine sont représentés par le tableau 17.

Tableau 17 : Caractères macroscopiques des différentes pommades

Aspect	Pipérine pommade	Capsaïcine pommade	Pipérine +capsaïcine pommade
Couleur	Blanche	Orange	Orange
Odeur	Aromatique	Aromatique	Aromatique
Consistance	Molle	Molle	Molle

La couleur orange des pommades à base de la capsaïcine et du mélange pipérine et capsaïcine est liée à la couleur de la capsaïcine.

4.2 Homogénéité

D'après les photos prise par le microscope optique (figure 19), les pommades formulées sont homogènes.

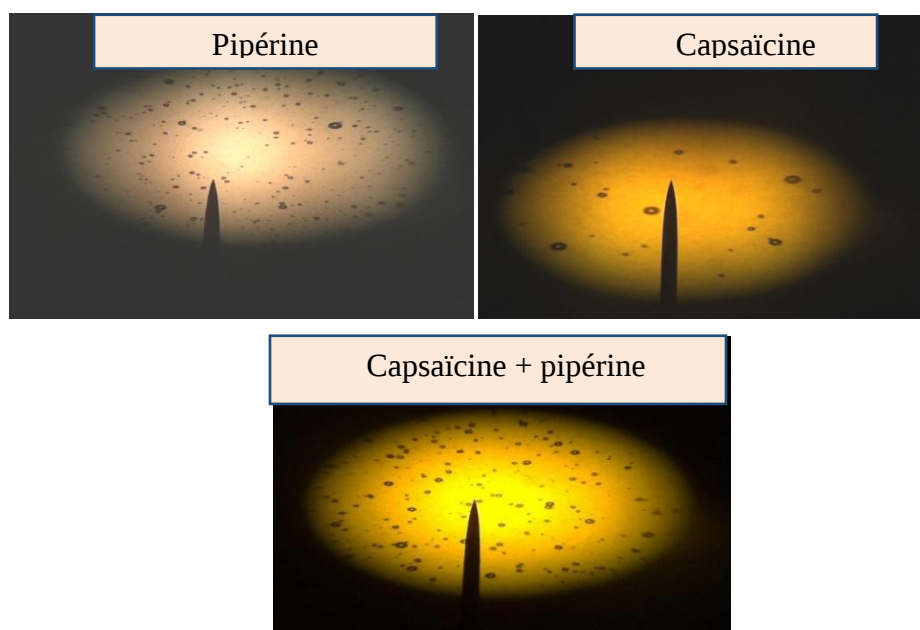


Figure 16 : Photos prises par microscope optique pour les pommades formulées.

4.3 Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH des pommades formulées est de 7 – 7.5.

4.4 Viscosité

Les pommades présentent une viscosité importante, elle est de l'ordre de 6000 cP.

Résultats et discussions

4.5 Etude anti-inflammatoire des pommades

Les résultats de l'étude anti-inflammatoire des pommades formulées à base de la pipérine, de la capsaïcine et du mélange pipérine et capsaïcine sont donnés par le tableau 18.

Tableau 18 : lots traités par les différentes pommades formulées

Pipérine pommade			Capsaïcine pommade			Pommade pipérine + capsaïcine		
POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)	POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)	POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)
2.4	2.7	-0.3	2.2	3.2	-1	1.8	1.8	0
2.4	2	0.4	1.4	2	-0.6	1.7	1.4	0.3
2.3	2.2	0.1	2.3	2.2	0.1	1.8	1.5	0.3
1.7	1.6	0.1	1.2	1.2	0	1.6	1.5	0.1
4.9	2	2.9	2.9	1.4	1.5	2.4	1.7	0.7
3.8	2.1	1.7	0.8	1.2	-0.4	1.9	1.6	0.3
2.2	1.9	0.3	1.9	2.3	-0.4	2.7	1.9	0.8
2.6	1.8	0.8	2.4	2.1	0.3	3	2.3	0.7
2.5	2.6	-0.1	3.1	2.6	0.	2.1	2.3	-0.2
2.9	2.3	0.6	2.2	1.4	0.8	2.9	3	-0.1
poids d'œdème = 0.65mg			poids d'œdème = 0.3mg			poids d'œdème = 0.29mg		
% réduction d'œdème = 68.91%			% réduction d'œdème = 84.46%			% réduction d'œdème = 84.97%		

🌸 Pommade à base de la pipérine

Le pourcentage de réduction d'œdème de l'oreille obtenu lors de l'analyse de l'activité anti-inflammatoire de la pommade est de 68.91%. Le poids moyen d'œdème est passé de 1.93mg à 0.65g ; le pouvoir de réduction d'œdème de la pommade est meilleur que celui de Diclofénac 1% ; cette différence a été jugé significative par le test de Student ($P=0.015<0.05$).

🌸 Pommade à base de la capsaïcine

Le pourcentage de réduction d'œdème de l'oreille obtenu lors de l'analyse de l'activité anti-inflammatoire avec la pommade est 84.46 %. Le poids moyen d'œdème est passé de 1.93mg à 0.3mg ; le pouvoir de réduction d'œdème de la pommade est meilleur à celui de Diclofénac 1% cette différence a été également jugé significative par le test de Student ($P=0,0004<<<0.05$).

Nous avons remarqué que la pommade à base de la capsaïcine a donnée un effet anti inflammatoire supérieur que celui donné par la capsaïcine seule. Nous pouvons expliquer

Résultats et discussions

ce phénomène par la solubilité de la capsaïcine qui est meilleur dans l'huile d'amande et la vaseline (excipients de la pommade) que dans l'éthanol. En raison de la présence de la chaîne latérale hydrophobe, la capsaïcine est lipophile, et par conséquent, très soluble dans la graisse et les huiles [9]. La capsaïcine a été solubilisée dans l'éthanol pour l'application locale.

Pommade formulé avec deux substances actives pipérine et capsaïcine

Pour le mélange des deux substances, le pourcentage de réduction d'œdème de l'analyse de l'activité anti-inflammatoire est 84.97 %. Le poids moyen d'œdème est passé de 1.93mg à 0.29mg ; le pouvoir de réduction d'œdème de la pommade est meilleur que celui de Diclofénac 1%. Cette différence a également ($P = 0.0003 \ll 0.05$).

Nous avons remarqué que le pourcentage de réduction d'œdème de l'analyse de l'activité anti inflammatoire de cette pommade formulé avec deux substances actives pipérine et capsaïcine est le même que celui donner par la pommade à base de la capsaïcine. Dans ce cas, nous ne pouvons pas parler d'une synergie d'effet puisque l'effet donné par la pommade est dû à la capsaïcine.

Conclusion

Générale

Conclusion et perspectives

Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant pour des applications dans plusieurs domaines agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Le but de ce travail était d'examiner l'efficacité d'extraction des principaux composés de Poivre noir et de piment, traditionnellement utilisés pour leurs propriétés médicinales, et d'évaluer les activités antioxydante, antibactérienne et anti-inflammatoire des deux extraits (pipérine et capsaïcine).

A la lumière des résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons conclure que :

- Dans le cas de la pipérine, les activités anti-oxydante et anti-inflammatoire sont inversement proportionnelles à la concentration ;
- La capsaïcine possède des très bonnes activités anti-oxydante et anti-inflammatoire ;
- Les pommades formulées à base de la pipérine et de la capsaïcine présentent des pourcentages de réduction d'œdème très élevés (68.91% et 84.46%), et donc un effet anti-inflammatoire excellent, beaucoup plus important que celui donné par la référence ;
- L'activité antibactérienne est absente pour les deux substances étudiées ;
- Absence de l'effet de synergie lors de la combinaison des deux PA.

Il serait intéressant :

- D'utiliser de nouvelles techniques d'extraction telle que l'ultrason et la micro-onde pour un meilleur rendement ;
- De réaliser des études de toxicité telle que le test d'irritation cutanée et le test de la toxicité aigüe ;
- D'effectuer le test de la cytotoxicité cellulaire ;
- D'incorporer la pipérine et la capsaïcine dans d'autres formes galéniques pour administration orale.

1. T. Hartmann, *From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism*. Phytochemistry, 2007. **68**(22-24): p. 2831-46.
2. J. Bruneton, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3ème édition, PP 783- 785. 3ème ed. 1999.
3. J. O. Lopez-Hernandez, et al, *Chemical composition of Padron peppers (Capsicum annuum L.) grown in Galicia (N.W. Spain)* Food Chemistry, 1997. **57**(4): p. 557 - 559.
4. J. F. Leroy, *Les Piments*. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée, 1943: p. 196-218.
5. F. Menichini, et al., *The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of Capsicum chinense Jacq. cv Habanero*. Food Chemistry, 2009. **114**(2): p. 553-560.
6. D. J. Clifton, *Capsicum. The Genus Capsicum. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*. 2006, BioOne.
7. V. Lefebvre, et al., *Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: Comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data*. Vol. 102. 2001. 741-750.
8. C. D. Bernardo-Gil, *Supercritical fluid extraction of redpepper (Capsicum frutescens L.)* Journal of Supercritical Fluids, 2004. **30** p. 155 - 161.
9. J. Chen, et al., *The preparation of capsaicin-chitosan microspheres (CCMS) enteric coated tablets*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(12): p. 24305-19.
10. J.K. Willcox, et al., *Antioxidants and prevention of chronic disease*. Crit Rev Food Sci Nutr 44, 275-295. Vol. 44. 2004. 275-95.
11. Y. Lee, et al., *Flavonoids and Antioxidant Activity of Fresh Pepper (Capsicum annuum) Cultivars*. Journal of Food Science, 1995. **60**(3): p. 473-476.
12. M. Materska, et I. Perucka, *Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (Capsicum annuum L.)*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(5): p. 1750-6.
13. Y. J. Surh, *More Than Spice: Capsaicin in Hot Chili Peppers Makes Tumor Cells Commit Suicide*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2002. **94**(17): p. 1263-1265.
14. N. L. Jones, S. Shabib, et P.M. Sherman, *Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett, 1997. **146**(2): p. 223-7.
15. L. Fraenkel, et al., *Treatment options in knee osteoarthritis: the patient's perspective*. Arch Intern Med, 2004. **164**(12): p. 1299-304.

Bibliographie

16. H. Knotkova, M. Pappagallo, et A. Szallasi, *Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival?* Clin J Pain, 2008. **24**(2): p. 142-54.
17. B. Djacqueline, *piper nigrum : aspect botanique, chimique et pharmacologique*, in Pharmacy. 2007.
18. J. M. Lecerf, *Effets métaboliques du Curcumin (obésité, lipides circulants, insulino-résistance, diabète et athérosclérose)*. Phytothérapie, 2012. **10**(2): p. 100-104.
19. S. Vincent, *Elaboration des nanocristaux de cellulose fonctionnalisés pour la vectorisation d'agents anticancéreux et pour la transfection de gènes*. 2015, Limoges.
20. K. Selvendiran, J. P. Vijeya Singh, et D. Sakthisekaran, *In vivo effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice*. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2006. **19**(2): p. 107-111.
21. R. Venkatasamy, et al., *Effects of piperine analogs on stimulation of melanocyte proliferation and melanocyte differentiation*. Vol. 12. 2004. 1905-20.
22. P. Piyachaturawat, T. Glinsukon, et C. Toskulkao, *Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters*. Toxicology letters, 1983. **16**(3-4): p. 351-359.
23. V. C. Verma, et al., *Piperine production by endophytic fungus Periconia sp. isolated from Piper longum L*. The Journal of antibiotics, 2011. **64**(6): p. 427.
24. F. S. Martins, et al., *Novel approaches to extraction methods in recovery of capsaicin from habanero pepper (CNPH 15.192)*. Pharmacognosy magazine, 2017. **13**(Suppl 2): p. S375.
25. Z. Zarai, et al., *Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from Piper nigrum*. LWT-Food Science and Technology, 2013. **50**(2): p. 634-641.
26. F. Visioli, G. Bellomo, et C. Galli, *Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols*. Biochemical and biophysical research communications, 1998. **247**(1): p. 60-64.
27. A. Khebichat, *Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des cendres de bois du chêne vert «Kourriche ou Ballout»(Quercus ilex)*.
28. R. Darshitha, et al., *A Study On The Extraction, Isolation And Characterization Of Piperine From Piper Nigrum* World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences, 2018. **7**(5): p. 763-770.
29. D. Ashwini, et al. *Extraction Of Capsaicin From Capsicum Frutescens.L And Its Estimation By Rp-Hplc Method*. World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences, 2015. **4**(9): p. 839-848.

Bibliographie

30. K. Kogure, et al., *Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1573**(1): p. 84-92.
31. Z. M. Kaho, *Evaluation of Antibacterial Activity of Piper nigrum Extract against Streptococcus mutans and Escherichia coli*, Journal of pharmaceutical science and research. **11**(2): p. 367-370.
32. V. C. Filho, *Produits naturels en tant que source de molécules à potentiel thérapeutique*, ed. C. Springer. 2014.