

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

Obtention d'un extrait alcoolique du piment : Optimisation du rendement, caractérisation et étude biologique de l'extrait et de la capsaïcine purifiée

Présenté par : **DJOUZI Nabila**
 BOUDIA Razika

Soutenu publiquement, le 30 / 11 / 2020, *devant le Jury composé de :*

MECHOUET	MOURAD	MCA	UMMTO	PRESIDENT
RAHAL	FOUDIL	MAA	UMMTO	ENCADREUR
TOUZOUIRT	SAIDA	MCB	UMBB	Co-ENCADREUR
BENCHOUAK	MOUNIR	MAA	UMMTO	EXAMINATEUR

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude

A ma mère, à qui je dois la réussite, pour l'éducation qu'elle m'a prodiguée ; l'affection et la bienveillance qu'elle m'a toujours donnée ; toutes les sacrifices qu'elle a consentis à mon égard, pour le sens du devoir qu'elle m'a enseignée depuis mon enfance et qu'elle m'enseigne jusqu'à présent ; pour tout le temps qu'elle passe à prier pour moi. Maman quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit .ta présence à mes côtés est ma source de force et la lumière du bonheur.

A mon père, l'épaule solide ; l'œil attentif compréhensif. Celui qui a sacrifié pour m'offrir la volonté et le courage d'aller de l'avant. Papa aucune dédicace ne sera à la hauteur pour te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi.

Que ce travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et qu'il vous offre une des meilleure place dans son vaste paradis.

A mes très chers frères et sœur HAMID, FAROUK, MADJID, RACHID, TAOUS, DJAMILA, En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse, amour et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A mes adorables neveux et nièces, mes oncles et mes tantes, belles sœurs et beaux-frères. Merci pour l'importance et l'aide que vous avez consacrez pour moi.

A mes meilleures amies NORA, KATHIA, En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

Une spéciale dédicace à cette personne qui compte énormément pour moi, qui ma soutenue au long du chemin et à qui je porte beaucoup de tendresse et de respect. A toi ADEL, merci pour tout ce que tu as fait pour moi.

A ma binôme et ma meilleure amie, travailler avec toi ma donner la chance de t'estimer de plus en plus, pas seulement pour notre compatibilité mais surtout pour la personne que tu es. Je te remercie pour ta patience, ta compréhension et le plus important ton respect. Que dieu te protège et te guide vers le bonheur et la réussite.

A la famille de ma binôme, exceptionnellement ses chers adorables parents. Merci à vous.

A mes amis et ma promotion très spéciale que je n'oublierai jamais et à toutes personnes qui a contribué à l'élaboration de ce travail.

NABILA

Je tiens à dédier ce modeste travail

À mes très chers Parents,

*La source de tendresse et l'exemple du dévouement, qui n'ont pas cessé de
m'encourager et de prier pour moi.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous
méritez pour tous l'amour et les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner
depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

Que Dieu vous protège et vous garde pour moi.

À ma chère sœur Naïma,

*qui a toujours été présente pour moi. Merci pour tes encouragements et ton amour, tu
es*

une deuxième maman pour moi, je t'aime beaucoup.

À mes chers frères Hakim, Hocine, Farid, Jugurtha et Chafik

*Qui ont toujours été présents pour moi. Merci pour votre encouragement et votre
confiance.*

À mon beau-frère Amar

À mes belles sœurs Nassima et Lydia,

Qui ont été comme des vraies sœurs pour moi.

À mes chères nièces Ines, Chanez, Sila et Léa

À mes chers neveux Moumoh, Imad, Hysan et Yari

À mes chères cousines Tina, Nadia, Ghénima, Fatma et Wissam

À ma chère copine et sœur Kathia

*Qui a été là pour moi dans les moments les plus difficiles et avec qui j'ai partagé mes
plus beaux jours à l'université*

À mon très cher ami Omar,

*Qui a été toujours là pour me soutenir et me donner le courage et la volonté d'avancer
dans les moments difficiles.*

À ma chère copine et binôme Nabila,

*Avec qui j'ai partagé les bons moments et qui m'a soutenu dans les moments de
faiblesse, je t'aime ma chérie.*

À toute la famille de ma binôme.

À tous mes ami(e)s et camarades de ma promotion.

Remerciements

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage qu'il nous a donné pour mener ce travail à terme.

Nous exprimons nos profondes reconnaissances et nos vifs remerciements à nos promoteurs **Mme TOUZOUIRT Saida** et **Mr RAHAL Foudil** qui nous ont honorés en acceptant de diriger ce travail, pour leurs encouragements, leurs conseils et leurs confiances. Merci de nous avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant de temps et d'énergie pour la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier vivement **Mr MECHOUET MOURAD** d'avoir accepté la présidence du jury de notre travail, qu'il trouve ici toutes nos expressions respectueuses.

Nous sommes très reconnaissantes envers **Mr BENCHOULAK Mounir** d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de notre travail. Nous tenons à vous remercier pour l'intérêt et l'apport scientifique que vous avez apporté pour le travail réalisé et durant notre cursus universitaire. Vous avez su faire partager votre expérience et nous guider dans le monde de la recherche scientifique.

Un grand merci aux membres d'équipes des Laboratoires de chimie des surfaces et catalyse, pharmaceutique, organique et chimie appliquée, ainsi que le personnel du service microbiologique du CHU Tizi-Ouzou pour leurs accueilles chaleureux et d'avoir mis à notre disposition le matériel demandé. Un remerciement à tous ceux qui nous ont aidés de manière très cordiale.

Un grand merci également à Mme BENAMAR-MANSOUR Malika pour son aide, sa compréhension et surtout sa confiance.

Nous exprimons notre entière reconnaissance à Mme ABDELLAOUI Ouiza pour ses directives, son aide et pour le temps consacré durant l'élaboration ce travail.

Une pensée à tous les enseignants rencontrés lors de nos études, pour les connaissances et le savoir qu'ils nous ont apporté.

Nous tenons à remercier aussi tous ceux qui ont travaillé à nos côtés et qui ont contribué à créer une ambiance agréable au laboratoire. Avec qui on a partagé les bonnes blagues, les fou-rires et les histoires drôles pendant les pauses-café.

Enfin, nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail.

Résumé

L'Algérie constitue un véritable réservoir polygénétique, elle possède une flore médicinale très variable qui est méconnue jusqu'à nos jours.

Le but de ce travail est de valoriser les plantes médicinales algériennes par une optimisation du rendement d'extraction de certaine substance bioactive de piment rouge (*Capsicum annuum L*) issue de la région de Magra (M'sila) ainsi que la purification de la capsaïcine, caractérisation, et l'évaluation des propriétés biologiques des extraits obtenus.

L'extrait de piment (capsaïcine, bêta-carotène) a été obtenu par le procédé d'extraction solide-liquide au mode Soxhlet. L'optimisation du rendement de cette extraction a été réalisée à l'aide de la méthodologie des plans d'expériences en utilisant le logiciel Modde 6.

En ce qui concerne la purification de la capsaïcine, une décantation avec l'huile de ricin a été réalisée en se basant sur la solubilité de la capsaïcine et du bêta-carotène dans les solvants choisis. La caractérisation qualitative des extraits a été effectuée par différentes méthodes physicochimique et spectroscopique (UV-V, IR).

L'étude biologique de l'extrait de piment et de Capsaïcine a révélé une forte activité antibactérienne pour l'extrait de piment (capsaïcine, bêta-carotène) et un faible pouvoir antioxydant pour la capsaïcine.

Mots clés : Piment, Capsaïcine, Bêta-carotène, Soxhlet, Purification, Optimisation, Activité antioxydante, Activité antibactérienne.

Abstract

Algeria is a true polygenetic reservoir; it has a very variable medicinal flora that are unknown until today.

The aim of this work is to enhance the value of Algerian medicinal plants by optimizing the extraction yield of certain bioactive substance of red pepper (*Capsicum annuum L*) from the Magra region (M'sila) as well as the purification of capsaicin, characterization, and evaluation of the biological properties of the extracted material.

The pepper extract (capsaicin, beta-carotene) was obtained from the solid-liquid extraction process in the Soxhlet mode. The optimization of the performance of this extraction was carried out using the methodology of the experimental plans using the software Modde 6.

For the purification of capsaicin, a decantation with castor oil was carried out based on the solubility of capsaicin and beta-carotene in the selected solvents. The qualitative

characterization of the extracts was carried out by different physicochemical and spectroscopic methods (UV-V, IR).

The biological study of the pepper extract and capsicum revealed a high antibacterial activity of the pepper extract (capsaicin, beta-carotene) and a low antioxidant power of capsaicin.

Keywords: Pepper, Capsaicin, Beta-carotene, Soxhlet, Purification, Optimization, Antioxidant activity, Antibacterial activity.

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

Synthèse bibliographique

1. Phytothérapie.....	2
2. Famille des solanacées	2
3. Piment.....	2
3.1. Définition du piment.....	3
3.2. Composition	3
3.3. Classification	4
3.4. Culture et récolte	5
4. Capsaïcinoides.....	5
4.1. Capsaïcine.....	5
4.1.1. Historique	5
4.1.2. Définition	5
4.1.3. Propriétés physico-chimiques de la capsaïcine	6
4.1.4. Mécanisme d'action de la capsaïcine	6
4.2. Effets pharmacologiques de la capsaïcine	7
4.2.1. Anticancéreux.....	7
4.2.2. Prévention des maladies cardiovasculaires	7
4.2.3. Anti-inflammatoire.....	7
4.2.4. Autres	7
4.3. Effets biologiques de la capsaïcine.....	8
4.3.1. Antioxydant.....	8
4.3.2. Antibactérien	8
4.4. Effets indésirables de la capsaïcine	8
5. Caroténoïdes.....	8
5.1. Bêta-carotène	9
5.1.1. Historique.....	9

Table des matières

5.1.2.	Définition	9
5.1.3.	Propriétés physicochimiques du bêta-carotène	9
5.2.	Effets pharmacologiques du bêta-carotène	10
5.2.1.	Anticancéreux.....	10
5.2.2.	Provitamine	10
5.3.	Effets biologiques du bêta-carotène	11
5.3.1.	Antioxydant.....	11
5.3.2.	Antibactérien	11
5.4.	Effets indésirables du bêta-carotène	11
6.	Extraction	12
7.	Purification.....	14
8.	Caractérisation.....	15
8.1.	Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	15
8.2.	Chromatographie sur couche mince	15
8.3.	Spectroscopie Infrarouge (IR)	15
8.4.	Spectroscopie UV-Visible	15
9.	Optimisation.....	16

Matériels et méthodes

1.	Matériels utilisés	16
1.1.	Nature et origine de la matière végétale	16
1.2.	Réactifs	16
1.3.	Equipement et verrerie.....	17
2.	Extraction de la capsaïcine et du bêta-carotène	17
2.1.	Identification phytochimique.....	17
2.2.	Optimisation	19
2.3.1.	Construction des plans d'expériences	19
2.3.2.	Choix des facteurs	19
2.3.3.	Choix des réponses.....	19
2.3.4.	Construction du plan factoriel.....	19
2.3.	Extraction au Soxhlet	20
2.4.	Rendement d'extraction.....	21
3.	Caractérisation.....	22
3.1.	Caractérisation physicochimique.....	22

3.1.1.	Propriétés organoleptiques	22
3.1.2.	Solubilité	22
3.2.	Caractérisation spectroscopique	22
3.2.1.	UV-Visible	22
3.2.2.	Infrarouge (IR)	23
4.	Etude biologique	23
4.1.	Activité Antioxydant	23
4.2.	Activité antibactérienne	24

Résultats et discussion

1.	Extraction de la capsaïcine et du bêta-carotène	25
1.1.	Identification phytochimique.....	25
1.2.	Comparaison de la composition de différents piments.....	25
1.3.	Optimisation du rendement d'extraction	26
1.3.1.	Etude statistique des résultats.....	26
1.3.2.	Validation du modèle	27
1.3.3.	Modélisation à l'aide du logiciel Modde 6.....	30
1.3.4.	Optimisation de l'extraction.....	30
1.3.5.	Rendement d'extraction	31
2.	Séparation du bêta-carotène de la capsaïcine	33
3.	Purification de la capsaïcine.....	33
4.	Caractérisation.....	34
4.1.	Caractérisation physico-chimique	34
4.1.1.	Propriétés organoleptiques	34
4.1.2.	Solubilité	35
4.2.	Caractérisation par spectroscopie	36
4.2.1.	Analyse par UV-visible	36
4.2.2.	Analyse par Infrarouge.....	37
5.	Etude biologique	39
5.1.	Test antioxydant	39
5.2.	Test antibactérien.....	40

Abstraction d'hydrogène : L'abstraction est l'élimination d'un atome ou d'une molécule par des radicaux, dans ce cas, l'hydrogène.

Adsorption : Rétention à la surface d'un solide des molécules d'un gaz ou d'une substance en solution ou en suspension.

Affinité : Action physique responsable de la combinaison des corps entre eux.

Anti-radicalaires : Sont les actifs permettent de limiter les signes du vieillissement cutané.

Apoptose : Processus physiologique de mort cellulaire programmée.

Bronchoconstriction : Correspond à un rétrécissement des bronches pouvant occasionner une gêne respiratoire.

Chloroplastes : Sont des organites présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes photosynthétiques (plantes, algues).

Optimum : État le plus favorable pour atteindre un but ou par rapport à une situation.

Placenta : Partie d'un carpelle où sont insérés les ovules.

Pro-oxydants : Sont des produits chimiques qui induisent un stress oxydatif, soit en générant des espèces réactives de l'oxygène, soit en inhibant les systèmes antioxydants.

Abs : Absorbance.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ATCC: American Type Culture Collection.

BHIB : Brain Heart Infusion Broth (Bouillon d'infusion cerveau-cœur).

CCM : Chromatographie sur couche mince.

DI : Diamètre d'inhibition.

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

G⁻ : Gram négatif.

G⁺ : Gram positif.

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

IR : Spectroscopie Infrarouge.

Ph : Phényle

TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloïde 1 (récepteur membranaire vanilloïde sous-type1).

UV : Ultraviolet.

T(%) : Transmittance.

Figure 1: Différents espèces du piment.	3
Figure 2: Structure de capsaïcine.....	6
Figure 3: Structure du bêta-carotène.....	9
Figure 4: Méthodes d'extraction conventionnelles et alternatives	13
Figure 5: Analyse phytochimique	18
Figure 6: Installation de soxhlet adaptée pour l'extraction.....	21
Figure 7: Réduction du DPPH.....	23
Figure 8: Résultats de l'analyse phytochimique de la poudre végétale.	25
Figure 9: Résultats de l'analyse phytochimique du piment rouge frais et séché et du piment vert frais.	26
Figure 10: Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites du rendement.....	28
Figure 11: Histogramme de l'influence des facteurs sur le rendement.....	28
Figure 12: Evaluation des résidus en fonction des valeurs prévues pour le rendement.....	30
Figure 13: Rendement en fonction du nombre de cycles et le rapport masse/solvant.	32
Figure 14: Infusion de la poudre du piment.	33
Figure 15: Décantation à l'huile de ricin.....	34
Figure 16: L'aspect des trois extraits.....	35
Figure 17: Test de solubilité du le bêta-carotène et de la capsaïcine.....	36
Figure 18: Spectre UV-visible de l'extrait de piment.	36
Figure 19: Spectre UV-visible de la capsaïcine purifiée.	37
Figure 20: Spectre infrarouge de l'extrait du piment.	38
Figure 21: Spectre infrarouge de la capsaïcine.....	39
Figure 22: Zone d'inhibition de la croissance bactérienne.	40

Liste des tableaux

Tableau 1: Différents constituants du piment	3
Tableau 2: Table simplifiée de l'échelle Scoville.....	4
Tableau 3: Caractéristiques physicochimiques de la capsaïcine.....	6
Tableau 4: Caractéristiques physicochimiques du bêta-carotène.....	10
Tableau 5: Réactifs utilisés pour l'étude des deux substances.	16
Tableau 6: Equipements et verrerie utilisés pour l'étude des deux substances.	17
Tableau 7: Facteurs étudiés et leurs niveaux exprimés en valeurs codés et réelles.	19
Tableau 8: Résultats des tests phytochimiques des différentes sortes de piment étudiées.	25
Tableau 9: Matrice d'expérience et les résultats des mesures effectuées	27
Tableau 10: Valeurs des coefficients R^2 , R^2_{adj} et Q^2 pour l'étude de rendement.....	27
Tableau 11: Analyse de la variance pour l'étude du rendement.....	29
Tableau 12: Conditions souhaitables pour l'extraction.....	30
Tableau 13: Résolutions procurées par le logiciel Modde 6.....	31
Tableau 14 : Caractères organoleptiques des extraits.	34
Tableau 15: Solubilité de la capsaïcine et du bêta-carotène.....	35
Tableau 16: Bandes principales du spectre infrarouge de l'extrait de piment.....	38
Tableau 17: Zones d'inhibition de la croissance et la sensibilité bactérienne	40
Tableau 18: Diamètre des zones d'inhibition des extraits	41

Introduction

générale

Depuis la nuit des temps, les grandes civilisations ont eues recours aux plantes médicinales pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, agro-alimentaires et industrielles.

Actuellement, la médication, par les plantes, connaît un regain d'intérêt notable, et c'est grâce aux études scientifiques basées sur les méthodes analytiques et les expérimentations nouvelles, que le monde médical découvre de plus en plus, le bien fondé des prescriptions empiriques des plantes médicinales.

Le piment est une plante que l'on peut trouver sous différentes couleurs : vert, rouge, jaune, orange, violet, il est utilisé comme éléments décoratif dans les plats pour sa saveur. Aujourd'hui il est classé comme l'épice la plus utilisée dans le monde. Il est, en effet un élément très riche en substances bioactives qui engendrent ses activités antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne et anticancéreuse. Les substances principales parmi ses composés bioactifs qui ont fait l'objet de plusieurs études sont la capsaïcine qui est un alcaloïde responsable sur la sensation de brûlure du piment, et le bêta-carotène qui est un pigment naturel liposoluble de la famille des caroténoïdes, considéré comme une provitamine pour la vitamine A.

La Caractérisation de nouvelles molécules bioactives fait intervenir plusieurs processus longs et coûteux, dont les 3 principales étapes sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt. Elles sont 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 la complexité du mélange.

L'objectif de ce travail est l'optimisation d'extraction, la séparation du bêta-carotène de la capsaïcine et ainsi la purification de la capsaïcine. Il a l'intérêt aussi de caractériser les extraits obtenus et évaluer leurs activités biologiques.

Ce mémoire est reparti en trois chapitres, le premier chapitre sera consacré à la revue bibliographique mettant l'accent sur des généralités sur le piment, les propriétés chimiques et biologiques des capsaïcinoïdes et des caroténoïdes. Le second chapitre décrit les techniques expérimentales utilisées au cours de ce travail. Enfin, les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés et discutés dans le troisième chapitre.

Synthèse
bibliographique

1. Phytothérapie

La phytothérapie est l'art d'utiliser les plantes pour se soigner. Du grec « phyton » qui signifie plante et « therapein » qui signifie soigner, il s'agit donc d'une thérapie allopathique destinée à prévenir et traiter des pathologies bénignes.

Les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne, dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes peuvent avoir également des usages alimentaires ou condimentaires. Pour ces diverses utilisations, il s'agit soit des mêmes parties de plantes, soit des parties différentes.

Une phytothérapie efficace repose sur la qualité de l'extrait, la teneur et la richesse en composé actifs qui dépendent de la plante utilisée : plante fraîche, sèche ou issue de l'Agriculture Biologique. De plus, pour qu'un produit à base de plante ait une efficacité optimale, une attention particulière doit être portée au procédé utilisé pour l'extraction des composés [1].

Plusieurs plantes de la famille des Solanacées sont utilisées en phytothérapie, dont le piment fait partie. Il est étudié pour sa richesse en substances actifs et ses propriétés pharmacologiques très remarquables.

2. Famille des solanacées

Solanacées est subdivisée en trois sous-familles, les Solanoideae, les Cestroideae et les Nolanoideae. La tribu des Solaneae, qui appartient à la sous famille des Solanoideae comprend plusieurs genres desquels Capsicum (piment), Lycopersicon (la tomate) et Solanum (pomme de terre et aubergine). Par ailleurs, cette famille botanique est l'une des plantes les plus importantes car 2300 espèces y sont dénombrées [2].

3. Piment

Le piment est originaire d'Amérique tropicale, il fait partie de la famille des solanacées. Consommé depuis plus de 9000 ans, il a été cultivé par les civilisations précolombiennes sous le nom de chili (en langue nahuatl) et découvert par Christophe Colomb en 1494. Il fait partie des premiers végétaux à la fois alimentaires et médicinaux car il présente des propriétés antioxydantes, anti-cancéreuses et de nombreuses autres activités. La grande consommation des fruits de capsicum dans le monde entier lui permet d'être parmi les premiers épices, en 2012 l'Algérie est classé neuvième au niveau mondial dans la production du piment avec 426566 milliers de tonnes (MT)[3,4].

3.1. Définition du piment

Il appartient au genre *Capsicum*, du grec kapsa qui signifie capsule ou bien du latin 'capsa' qui signifie boîte / coffret, en référence à la forme creuse du fruit du piment qui fait penser à une petite boîte contenant le placenta sur lequel sont disposées les graines. Il existe plusieurs espèces de piments (*Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* et *Capsicum pubescens*) qui se présentent sous des formes, tailles, couleurs et saveurs différentes[5,6].



Figure 1: Différents espèces du piment.

3.2. Composition

Le piment est caractérisé par la variété de son apport en nutriments, il est constitué de différents composés qui sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1: Différents constituants du piment [7].

Colorants	Capsanthrine, Capsorubin, Bêta-carotène
Vitamines	Vitamine A,C,E,B1,B2
Sels minéraux	Ca, Mg, P, K
Huile essentielle	Mélange d'un long hydrocarbure avec des acides gras et du méthyle ester d'acides gras
Flavonoïdes	Lutéoline, Quercétin
Alcaloïdes	Capsaïcinoïdes
Autre	résine, protides, glucides, l'eau

3.3. Classification

La classification des piments se fait selon l'indice de force ou l'échelle Scoville, qui sert à se renseigner sur la teneur en capsaïcine. Une table simplifiée de cette échelle est donnée par le tableau 2.

Tableau 2: Table simplifiée de l'échelle Scoville[8].

Noms	Types de piments	Espèces	Unité Scoville
Habanero orange	Habanero	<i>C. chinense</i>	210 000
Habanero rouge	Habanero	<i>C. chinense</i>	150 000
Tabasco	Tabasco	<i>C. frutescens</i>	120 000
Tepin	Tepin	<i>C. annuum</i>	75 000
Chiltepin	Tepin	<i>C. annuum</i>	70 000
Thai piquant	Asien	<i>C. annuum</i>	60 000
Jalapeño M	Jalapeño	<i>C. annuum</i>	25 000
Cayenne long et mince	Cayenne	<i>C. annuum</i>	23 000
Milta	Jalapeño	<i>C. annuum</i>	22 000
Santa Fe Grande	Hungarien	<i>C. annuum</i>	21 000
Aji Escabeche	Aji	<i>C. baccatum</i>	17 000
Cayenne long et	Cayenne	<i>C. annuum</i>	8 500
Cayenne	Cayenne	<i>C. annuum</i>	8 000
Pasilla	Pasilla	<i>C. annuum</i>	5 500
Primavera	Jalapeño	<i>C. annuum</i>	5 000
Sandia	New Mexicain	<i>C. annuum</i>	5 000
NuMex Joe E. Parker	New Mexicain	<i>C. annuum</i>	4 500
Serrano	Serrano	<i>C. annuum</i>	4 000
Mulato	Ancho	<i>C. annuum</i>	1 000
Bell	Bell	<i>C. annuum</i>	0

3.4. Culture et récolte

Les piments apprécient un sol léger, meublé, bien drainé et bien enrichi en matière organique (compost et engrais). Ils ne doivent pas être plantés trop serrés. Les plants sont installés dans un endroit ensoleillé et bien chaud, à l'abri des courants d'air, ils nécessitent un arrosage régulier en évitant de mouiller les feuilles.

Les piments s'épanouissent sous des températures supérieures à 20°C ou même 25°C. La récolte commence, 120 jours après le semis. Celle-ci a lieu au stade fruits vert et rouge à maturité. La récolte se fait à la main de manière échelonnée de fin août jusqu'au 30 Décembre. Elle s'effectue en plusieurs fois au fur et à mesure que les fruits arrivent à maturité après avoir atteint leurs intensité maximale de coloration, ce qui indique une forte teneur en pigments naturels et une faible teneur en eau[9] .

4. Capsaïcinoïdes

Le goût piquant du piment est dû à un groupe de vanillyl amides connues sous le nom de capsaïcinoïdes, parmi lesquelles la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine sont prédominantes (plus de 90% des capsaïcinoïdes totaux) ; alors que la nordihydrocapsaïcine, l'homodihydrocapsaïcine et l'homocapsaïcine sont en faibles concentrations. Les capsaïcinoïdes sont synthétisés au niveau de la jonction du placenta (partie blanche supportant les graines au centre du fruit) et de la paroi de la gousse [10–12].

4.1. Capsaïcine

4.1.1. Historique

Cet alcaloïde a été découvert et isolé en 1816 par P.A. Bucholz, il fut baptisé capsaïcine trente ans plus tard par L. T. Thresh. En 1878, E. Hogyes, un médecin hongrois, démontra que celui-ci cause non seulement un effet d'irritation en bouche, mais aussi augmente la sécrétion de liquide gastrique. La capsaïcine fut synthétisée pour la première fois en 1930 par E. Spath et F. S.Darling. En 1958, la dihydrocapsaïcine fut découverte et nommée capsaïcine 2. En 1961, d'autres alcaloïdes similaires furent isolés du piment par les chimistes japonais S. Kosuge et Y. Inagaki, qui créèrent la famille des capsaïcinoïdes [13,14].

4.1.2. Définition

La capsaïcine (8-méthyl-N-vanillyl-6-nonénamide) est un composé chimique appartenant à la famille des alcaloïdes, composant actif du piment (*Capsicum*). C'est un irritant de l'épithélium des cellules des mammifères ; il produit une sensation de brûlure dans la bouche, ce qui peut être considéré comme un élément gustatif intéressant. Du point de vue

biologique, ce composé permet aux fruits, et donc aux graines de la plante qui les produit d'être moins exposés à la prédation. La molécule est de taille raisonnable ne comporte que quatre éléments, du carbone, de l'hydrogène, de l'azote et de l'oxygène, elle est classée parmi les métabolites secondaires [15].

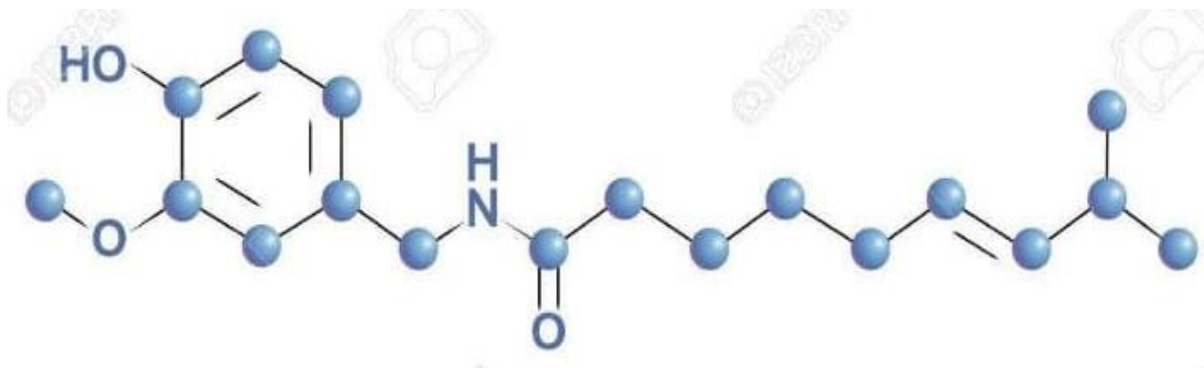


Figure 2: Structure de capsaïcine.

4.1.3. Propriétés physico-chimiques de la capsaïcine

La capsaïcine est généralement une substance issue des extraits végétaux. Elle possède de nombreuses propriétés physico-chimiques présentées par le tableau 3 [16].

Tableau 3: Caractéristiques physicochimiques de la capsaïcine.

Aspect physique	Substance cristalline, inodore, incolore
Formule brute	$C_{18}H_{27}NO_3$
Masse moléculaire	305.4119 g/mol
Spectre d'absorption	Entre 230nm et 280nm
Stabilité	Stable
Température de fusion	62-65°C
Température d'ébullition	Entre 210°C et 220°C
Point d'éclair	112.18°C
Solubilité	Faiblement soluble dans l'eau, soluble dans l'alcool, le benzène, l'éther, l'acétone et le chloroforme.

4.1.4. Mécanisme d'action de la capsaïcine

Les sensations de brûlures et les douleurs associées à la capsaïcine résultent de l'activation des neurones sensoriels des bourgeons gustatifs. La capsaïcine se lie au récepteur membranaire vanilloïde sous-type 1 (TRPV1). Ceci induit une dépolarisation de la

membrane plasmique par entrée calcique et sodique. La capsaïcine active le TRPV1 car elle est un analogue structurel des métabolites d'acides linoléiques oxydés, substance endogène synthétisée lors de brûlures [15].

4.2. Effets pharmacologiques de la capsaïcine

La capsaïcine est une substance bioactive qui possède divers activités thérapeutiques

4.2.1. Anticancéreux

Les capsaïcinoïdes exercent une bonne activité anti-tumorale non seulement "in vitro" mais aussi "in vivo". Récemment, la capsaïcine a été indiquée pour induire efficacement l'apoptose dans certains types de cellules, y compris les cellules humaines de cancer du sein, de prostate, de l'hépatocarcinome, de gliome, de la leucémie et celles du carcinome épidermoïde de l'œsophage [17].

4.2.2. Prévention des maladies cardiovasculaires

Il a été rapporté que les capsaïcinoïdes ont des effets bénéfiques potentiels sur le système cardiovasculaire. Il est bien connu que ce dernier est riche en nerfs sensoriels sensibles à la capsaïcine, qui jouent un rôle considérable dans la régulation de la fonction cardiovasculaire par la libération de plusieurs neurotransmetteurs. Par ailleurs, la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine inhibent l'agrégation plaquettaire et l'activité des facteurs de coagulation VIII et IX, une propriété qui peut contribuer à la prévention de l'apparition et / ou la réduction de l'incidence des maladies cardio-vasculaires [17].

4.2.3. Anti-inflammatoire

Il a été démontré que l'utilisation de la capsaïcine par voie orale ou locale peut réduire la chaleur des inflammations, les douleurs de la polyarthrite rhumatoïde ou la fibromyalgie et procure un soulagement de l'arthrose.

La capsaïcine est également utilisée pour des études neuropharmacologiques concernant le traitement de la douleur et pour la thermorégulation [17].

4.2.4. Autres

La capsaïcine possède d'autres activités pharmacologiques secondaires telles que :

- Anti-infectieux intestinal,
- Brûleur de graisse et favorise l'assimilation des nutriments,
- Elle fait baisser la glycémie en activant la sécrétion d'insuline par le pancréas,
- Elle protège la paroi de l'estomac de certaines formes d'ulcères [18].

4.3. Effets biologiques de la capsaïcine

4.3.1. Antioxydant

L'antioxydant est une substance capable de neutraliser ou de réduire les dommages causés par l'oxygène ou les radicaux libres dans l'organisme. Ces antioxydants sont définis aussi comme des agents redox qui réagissent avec les oxydants afin de stopper ou ralentir le processus d'oxydation, et ainsi ajuster l'équilibre redox cellulaire. L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes : neutralisation des radicaux libres et la destruction d'hydroperoxydes.

Dans le piment le composé ayant l'activité antioxydante la plus forte est la lutéoline, suivie de la capsaïcine et de la quercétine. Une étude a mis en évidence une corrélation positive entre la forte teneur en capsaïcine et son activité antioxydante. Lors des tests in vitro, les extraits issus des piments les plus piquants ont ainsi montré un fort potentiel pour le piégeage des radicaux libres, impliqués dans le cancer ou le vieillissement des tissus [18].

4.3.2. Antibactérien

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 de certaines bactéries pathologiques d'origine alimentaire en provoquant une perturbation membranaire [20,21].

4.4. Effets indésirables de la capsaïcine

Comme toutes substances bioactives, la capsaïcine possède certain effets indésirables tels que :

- L'irritation de la peau, des muqueuses, des yeux et des voies digestive et respiratoire,
- L'inhalation de ces poussières peut causer de la toux et une bronchoconstriction passagère, celle-ci augmente avec la concentration inhalée et la dure d'exposition,
- Le supplément en capsaïcine peut déclencher une inflammation [19,22].

5. Caroténoïdes

Les caroténoïdes représentent les deuxièmes pigments naturels les plus abondants sur terre, avec plus de 750 membres, mais seulement 40 sont présents dans l'alimentation humaine, et approximativement 20 ont été identifiés dans le sang et les tissus humains. Ce sont des métabolites secondaires des plantes, appartient à la famille des terpénoïdes. Ces composés sont des isoprénoides polyènes formés par la condensation de 8 unités isoprènes (C5), dont cet arrangement des unités est réservé pour le centre de la molécule [17].

5.1. Bêta-carotène

5.1.1. Historique

Au cours des années 80 les pigments alimentaires sont étudiés de manière détaillée, les flavonoïdes et les caroténoïdes sont ainsi isolés. Cependant en 1881 le bêta-carotène a été séparé pour la première fois des carotènes par Wackenroder. Ce n'est qu'en 1907 que la formule empirique du bêta-carotène a été établie par Willstatter et Mieg, puis synthétisé en 1950 par Karrer, Inhoffen et Milas [23].

5.1.2. Définition

Le bêta-carotène est un pigment végétal résulte d'un métabolite secondaire, synthétisé par les plantes appartenant à la famille des caroténoïdes, il est considéré comme une provitamine A. La molécule de bêta-carotène de formule $C_{40}H_{56}$ est une chaîne constituée de huit unités isopréniques, avec une série de onze doubles liaisons conjuguées. Il possède deux structures cycliques à chaque extrémité de sa chaîne [24].

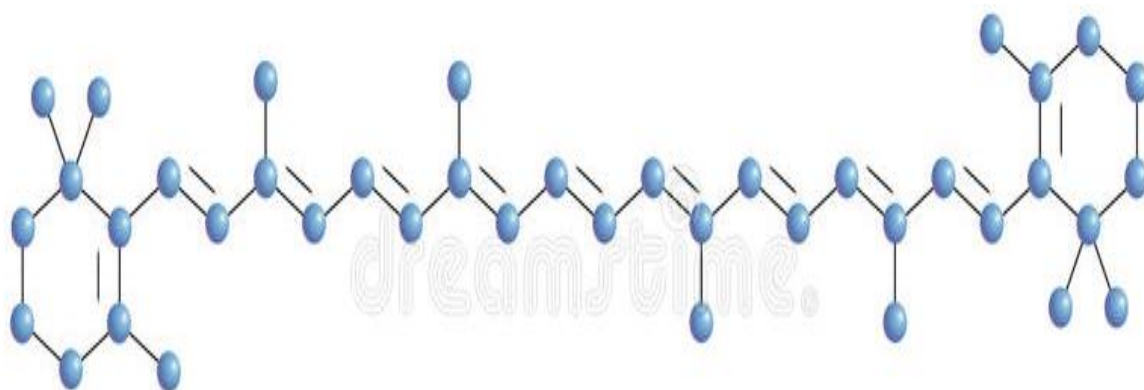


Figure 3: Structure du bêta-carotène.

5.1.3. Propriétés physicochimiques du bêta-carotène

Le tableau ci-dessous (tableau 4) présente les propriétés physico-chimiques du bêta-carotène.

Tableau 4: Caractéristiques physicochimiques du bêta-carotène [24–26].

Aspect physique	Solide cristallin, orange et inodore
Formule brute	$C_{40}H_{56}$
Masse molaire	536.88 g/mol
Domaine d'absorption UV-visible	[400-500] nm
Point de fusion	183.00°C
Solubilité	<ul style="list-style-type: none">- Peu soluble dans l'eau, dans les milieux aqueux ou les solvants polaires hydratés.- Solubles dans les solvants apolaires comme le chloroforme, le benzène, le bisulfate de carbone.- Modérément solubles dans l'éther, l'éther de pétrole, l'hexane et l'huile.- Parcimonieusement soluble dans l'éthanol et le méthanol.

5.2. Effets pharmacologiques du bêta-carotène

Le bêta-carotène est une substance connue par la variété de ces activités thérapeutiques :

5.2.1. Anticancéreux

L'action du bêta-carotène dans la prévention contre les cancers est liée en particulier à son pouvoir anti-radicalaire. En effet son mécanisme d'action est le piégeage des radicaux libres qui permet aussi une protection contre les maladies cardiovasculaires [27,28].

5.2.2. Provitamine

Le β -carotène est le plus répondu et le plus actif en provitamine A des caroténoïdes. De structure symétrique, il peut être scindé en 2 molécules de rétinol par une enzyme dont l'activité étroitement régulée évite tout risque d'hypervitaminose A. Cela lui permet de traiter efficacement les symptômes d'une carence en vitamine A, l'amélioration de la vision nocturne, la régulation du système immunitaire et de la croissance osseuse et plusieurs autres propriétés identiques à celles de la vitamine A [29].

5.3. Effets biologiques du bêta-carotène

5.3.1. Antioxydant

Le bêta-carotène possède principalement une activité antioxydante puissante. Il est capable de capter l'oxygène singulier et de piéger les radicaux libres formés dans les tissus. Ces derniers sont responsables des réactions destructives, notamment la peroxydation des lipides, de la structure cellulaire en détériorant l'ADN, les protéines et les membranes lipidiques.

La propriété du bêta-carotène à piéger les radicaux libres est basée sur quatre mécanismes principaux : oxydation, réduction, abstraction d'hydrogène et addition [30].

5.3.2. Antibactérien

Les carotènes, possèdent une valeur nutritionnelle élevée, ils jouent un rôle important dans la photoprotection et ont également une efficacité antibactérienne importante.

Principalement Le bêta-carotène a fait l'objet de divers recherches et il s'est avéré qu'il possède un pouvoir antibactérien très élevé contre plusieurs bactéries (exemple : *Helicobacter pylori*) [31,32].

5.4. Effets indésirables du bêta-carotène

En plus des activités pharmacologiques du bêta-carotène, il possède certains effets indésirables.

- Une très grande consommation de caroténoïdes peut provoquer une caroténodermie (Effet chronique).
- Irritation de la peau et des yeux (effet aigus).
- Une très grande consommation du bêta-carotène en complément alimentaire chez les fumeurs ou les ex-fumeurs augmente le risque de cancer du poumon. Ce risque est lié au changement du statut antioxydant du bêta-carotène au pouvoir pro-oxydant lorsqu'il est dans des conditions de forte pression en oxygène, condition existante au niveau des poumons.
- La consommation des suppléments du bêta-carotène peut inclure des maux de tête, des ronflements, des selles molles, des ecchymoses, des douleurs articulaires.
- Le bêta-carotène peut entrer dans des interactions médicamenteuses avec les médicaments anti-cholestérol, des antibiotiques, des anticoagulants et les inhibiteurs de la pompe à protons, de l'orlistat ou des stérols végétaux [24,33,34].

6. Extraction

Il existe plusieurs techniques d'extraction des substances bioactives de la matière végétale. Les méthodes envisagées sont celles de l'extraction solide-liquide, il existe des techniques classiques dites conventionnelles et d'autres nouvelles dites alternatives. Quelques exemples sont cités dans la figure 04.

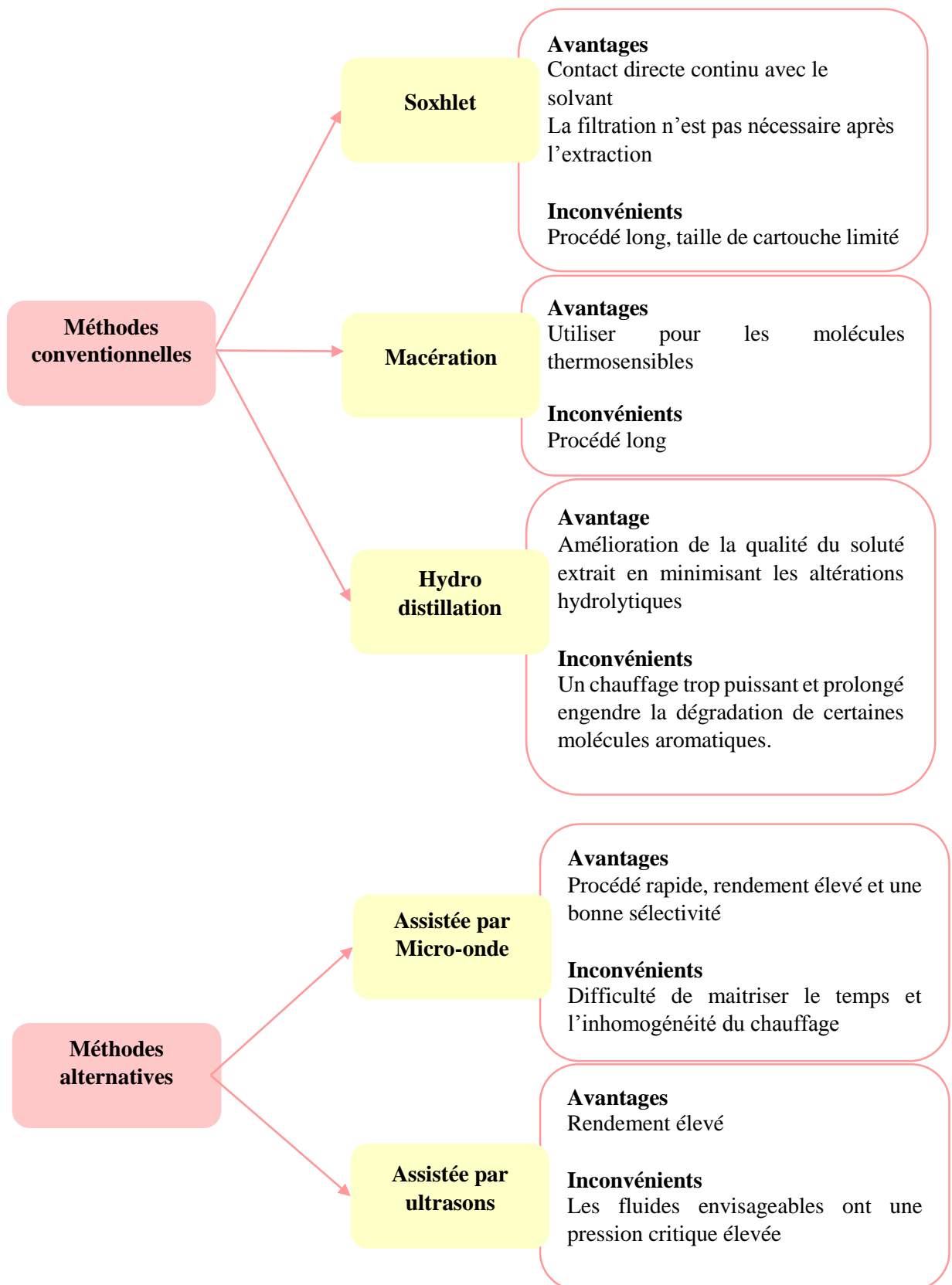


Figure 4: Méthodes d'extraction conventionnelles et alternatives [35–37].

L'extraction de la capsaïcine et le bêta-carotène est généralement réalisée par la méthode de soxhlet car les conditions de ce procédé sont relativement les plus adéquats avec les propriétés des deux substances. L'extraction au Soxhlet permet d'avoir un rendement meilleur avec une petite quantité de solvant car ce dernier il est en contact continu avec la matière végétale, elle permet aussi de réaliser la filtration parallèlement à l'extraction. Elle est considérée comme un procédé long car la taille des cartouches est limitée d'où la nécessité de la réalisation des extractions successives.

7. Purification

La purification est la séparation des substances chimiques dans le but d'éliminer les impuretés. Elle peut se réaliser selon plusieurs procédés mécanique et chimique dont on distingue :

- La filtration, définie comme l'action ou le processus de filtrage d'un liquide ou d'un gaz à travers un filtre afin d'éliminer les particules solides [38].
- La recristallisation, désigne l'extraction du Cristal pure (après cristallisation) d'un mélange impur par la propriété qu'a le composé à purifier d'avoir une solubilité différente que les impuretés dans le solvant [39].
- La décantation la séparation, sous l'effet de la gravitation, de plusieurs phases non-miscibles, dont l'une au moins est liquide ou gazeuse. On peut ainsi séparer soit plusieurs liquides non-miscibles de densités différentes, soit des solides insolubles en suspension dans un liquide ou un gaz.[40].
- Chromatographie sur colonne : Pour la purification de la capsaïcine du bêta-carotène la méthode la plus répandue est la chromatographie sur colonne qui est une méthode préparatoire ; elle permet la séparation et la purification des constituants d'un mélange et leurs isolements à partir d'échantillons, dont la masse peut atteindre plusieurs grammes, contrairement aux méthodes chromatographiques qui sont utilisées pour l'analyse et la séparation des faibles quantités du produit. Cette technique exploite la différence de polarité entre les composés. En revanche, elle présente quelques inconvénients car elle nécessite des grandes quantités de solvant, la durée de l'élution est généralement très grande et la détection des composés exige une attention constante [41].

8. Caractérisation

La caractérisation est un processus analytique afin d'identifier, classer et quantifier les extraits végétaux.

8.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

C'est une technique de séparation analytique, une forme de chromatographie sur colonne qui pompe à haute pression un échantillon (analyte) dissous dans un solvant (phase mobile) à travers une colonne avec un matériau de remplissage chromatographique immobilisé (phase stationnaire), la fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants [42].

8.2. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince CCM repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire (gel de silice, polyamide, cellulose...). Cette technique utilisée sous sa forme préparatoire, est souvent très avantageuse car la transposition à partir de CCM analytique est facile. Le procédé est rapide et permet d'isoler des quantités de substances suffisantes pour des analyses de structures. Cette méthode permet la plupart du temps d'obtenir des produits purs [43].

8.3. Spectroscopie Infrarouge (IR)

Les liaisons internes des molécules permettent aux atomes de vibrer autour d'une position moyenne. La spectroscopie infrarouge est basée sur l'association d'une fréquence de vibration à un groupe moléculaire particulier (mode de vibration, voie de rotation). La technique consiste à envoyer un faisceau de radiations infrarouges sur le matériau à analyser et enregistrer l'énergie infrarouge transmise en fonction de la fréquence de radiation incidente. L'étude infrarouge donne des informations sur la géométrie moléculaire, sur les forces de liaisons, sur les distances intermoléculaires et sur les groupes fonctionnels [44].

8.4. Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible est une technique mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (200 nm – 400 nm), du visible (400 nm – 750 nm) ou du proche infrarouge (750 nm -1 400 nm). Lorsqu'un rayonnement appartient à cette gamme de longueurs d'onde traverse des molécules, des ions ou des complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transitions électroniques. Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais

peuvent également être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide. Le spectre électronique est la fonction qui relie l'intensité lumineuse absorbée par l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde[45]

9. Optimisation

Optimiser consiste à identifier une configuration optimale, ou un optimum d'un système, au sens large du terme. Elle utilise les plans d'expériences qui constituent essentiellement une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique.

Le principe des plans d'expériences consiste à faire varier simultanément les niveaux de un ou plusieurs facteurs (qui sont des variables discrètes ou continues) à chaque essai. Ceci va permettre d'une part, de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés et d'autre part, à détecter les interactions entre les facteurs et la détermination du réglage dit optimal de ces facteurs par rapport à une réponse. Il existe actuellement un nombre important de plans différents, chacun, par ses propriétés permet de résoudre certains problèmes particuliers. Cependant, les plans d'expériences se divisent en deux grandes catégories : les plans pour étudier (estimer et comparer) les effets des paramètres et les plans pour régler les paramètres afin d'atteindre un optimum [46,47].

*Matériels et
méthodes*

Ce chapitre est présenté afin de mettre en évidence l'expérimentation effectuée dans cette étude. Il comporte les matériels et les méthodes utilisées englobées dans trois parties essentielles : la première partie est consacrée à la présentation de la matière végétale et des matériels utilisés, la deuxième portera sur l'optimisation de l'extraction ainsi que la réalisation de cette dernière et les différentes techniques d'identification et de caractérisation mises en œuvre. Enfin, la dernière partie résume les applications adaptées pour l'étude pharmacologique des extraits.

1. Matériels utilisés

1.1. Nature et origine de la matière végétale

Le piment provient de Magra de La wilaya de M'Sila Est d'Algérie, récolté en septembre 2019. La plante a été séchée et subi un traitement préliminaire (broyage et conservation).

Le Séchage du piment est effectué par un procédé classique qui consiste à étaler les plantes à l'air libre, ils passent peu à peu d'une couleur rouge à une couleur rouge-brun. Ce mode de séchage décuple la saveur du piment qui se déshydrate lentement tout en poursuivant sa maturation.

1.2. Réactifs

Les réactifs utilisés pour l'extraction et la caractérisation de nos substances (capsaïcine et bêta-carotène) sont présentés dans le tableau 5

Tableau 5: Réactifs utilisés pour l'étude des deux substances.

Réactifs	Réactifs
Réactif de Mayer	Acide chlorhydrique
Réactif de Wagner	Ethanol
Chloroforme	L'huile de ricin
Hydroxyde de sodium	Benzène
Acide sulfurique	Méthanol
Nitrate d'argent	Ether de pétrole
Copeaux de magnésium	Acétone
Oxalate d'ammonium	Acétate d'éthyle

1.3. Equipement et verrerie

Les équipements et la verrerie utilisée pour l'étude de nos substances sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6: Equipements et verrerie utilisés pour l'étude des deux substances.

Équipements	Marque	Verrerie
Moulin à café	Moulinex	Mortier
Balance analytique	Denver	Soxhlet
Balance technique	Kern	Micropipette et pipette pasteur
Evaporateur rotatif	Laborota 4001- efficient Heidolph	Papier wattman N° 3
Ultra-violet	UV-1601 SHIMADZU	Ecouvillon stérile, boîtes de pétries
Infra-rouge	IRAFFINITY-1S SHIMADZU	Emporte-pièce (4mm), Pince, Bec bunsen

2. Extraction de la capsaïcine et du bêta-carotène

2.1. Identification phytochimique

Les extraits végétaux du piment sont riches en diverses substances ayant des activités biologiques. Les réactions de colorations et de précipitations sont la base sur laquelle s'appuie l'étude phyto-chimique pour identifier ces substances.

La matière végétale étudiée (piment) a été broyée avec un moulin à café pour obtenir une poudre moyenne.

- **Préparation de l'extrait à analyser**

- Macération à l'éthanol

Dans un Erlenmeyer, mettre 10g du matériel végétal avec 200 ml d'éthanol, sous agitation, à une température ambiante, pendant 15 min. Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

- Infusion à l'eau pour l'identification des alcaloïdes

Dans un Erlenmeyer, mettre 2.5g de poudre végétale avec 50ml d'eau distillée bouillante. Laisser refroidir et filtrer.

- **Réactions d'identification**

La figure 5 résume les protocoles suivis pour l'identification des différents composés, Alcaloïdes, Terpénoïdes, Flavonoïdes et quelques sels minéraux.

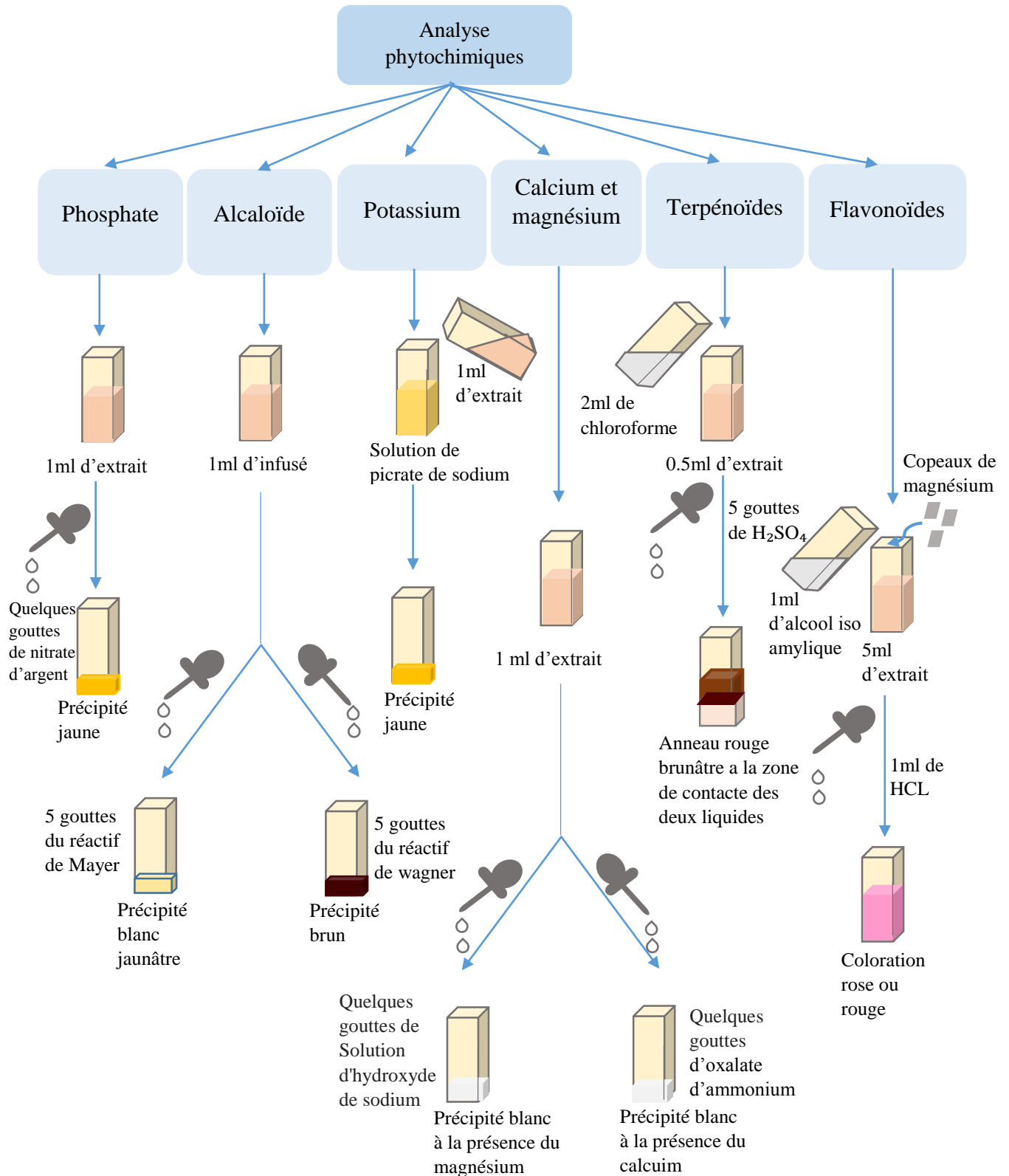


Figure 5: Analyse phytochimique

2.2. Optimisation

2.3.1. Construction des plans d'expériences

Dans le but d'optimiser le rendement d'extraction de la capsaïcine, l'utilisation de la méthode des plans d'expériences est indispensable. La méthodologie linéaire du plan factoriel est adaptée dans cette étude. Ce plan est précisément destiné à résoudre les problèmes à plusieurs variables et mettre en évidence, non seulement leurs effets respectifs, mais aussi leurs éventuelles interactions [47].

2.3.2. Choix des facteurs

Le choix des facteurs influents le rendement d'extraction est basé sur les différentes propriétés de la substance. Le tableau suivant représente respectivement les facteurs étudiés, leurs types et leurs niveaux exprimés à la fois en valeur codées et en valeurs réelles.

Tableau 7: Facteurs étudiés et leurs niveaux exprimés en valeurs codées et réelles.

Facteurs	Types	Niveaux		
Nombre de cycle d'extraction	Variable quantitative	-1	0	+1
		2	3	4
Rapport poids de matière / volume du solvant	Variable quantitative	-1	0	+1
		1\8	1\10	1\12
Procédé d'extraction	Variable qualitative	-1	0	+1
		EAI	ESI	ESI

EAI : Extraction après infusion. ESI : Extraction sans infusion.

2.3.3. Choix des réponses

Dans le but d'évaluer l'influence des facteurs fixés pour l'optimisation de l'extraction, la réponse choisie est le rendement.

2.3.4. Construction du plan factoriel

Dans notre étude, le nombre de facteurs (k) est égal à trois. Le nombre d'essais à réaliser est égal aux essais du plan factoriel (N_F) auquel on ajoute trois essais supplémentaires au centre (N_0) pour évaluer la répétabilité des résultats expérimentales [47].

$$N = N_F + N_0 = 2^K + 3 = 2^3 + 3 = 11.....(1)$$

2.3. Extraction au Soxhlet

L'extraction au Soxhlet est une méthode d'extraction solide-liquide d'un composé d'intérêt par un solvant à chaud. La capsaïcine et le bêta-carotène furent extraits par cycle d'extraction avec l'éthanol dans le but d'avoir le meilleur rendement.

- **Principe**

L'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant.

Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant.

- **Protocole**

10g de la poudre végétale ont été placés entre deux morceaux de coton pour remplacer la cartouche comme présenter par la figure 6. Le volume V d'éthanol utilisé est calculé pour chaque essai selon le rapport donné par la matrice expérimentale (tableau 7). Le mélange a été chauffé afin d'avoir le nombre de cycles nécessaire pour chaque essai.

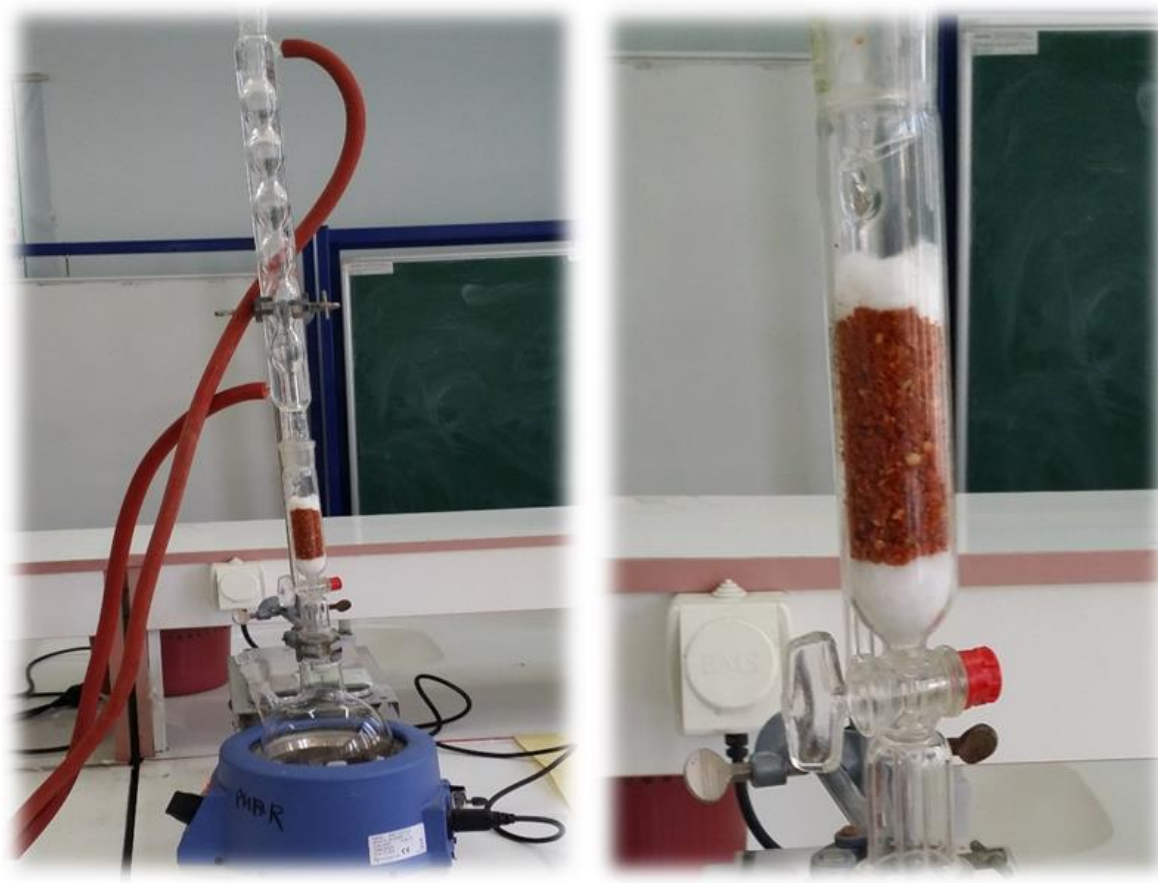


Figure 6: Installation de soxhlet adaptée pour l'extraction.

2.4. Rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction des substances a été exprimé en pourcentage et donné par la formule suivante :

$$R(\%) = \left(\frac{M_1}{M_0} \right) \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

R : rendement d'extraction en %.

M₁ : masse en gramme de l'extrait final.

M₀ : masse en gramme de la matière végétale initiale.

2.5. Séparation du bêta-carotène de la capsaïcine

Lorsque le bêta-carotène est associé à des chloroplastes (organites), sa solubilité dans l'eau est plus élevée, en raison de son association avec des lipoprotéines[48]. La capsaïcine est pratiquement insoluble dans l'eau car elle renferme une chaîne latérale hydrophobe [16,49]. Cela nous a guidé vers le choix du procédé d'infusion à l'eau afin de réaliser la séparation.

- **Protocole**

Un volume d'eau bouillante est versé sur 10g de la poudre du piment rouge, mélanger et laisser refroidir puis filtrer de manière à récupérer le solide et le filtrat.

2.6. Purification

Afin de purifier la capsaïcine, une décantation avec l'huile de ricin a été utilisée. Le choix de ce procédé est basé sur la solubilité de chacun des composés (capsaïcine et bêta-carotène) dans l'huile. Les molécules du bêta carotène présentent une grande lipophilie en raison de leurs structures symétriques comprenant un grand nombre de carbones et peu de groupements fonctionnels [50]. La capsaïcine est très soluble dans l'alcool en raison de la présence des groupements polaires dans sa structure[16,49].

- **Protocole**

Dans une ampoule à décanter mélanger 5ml de l'extrait alcoolique avec 10ml d'huile de ricin, ajouter quelques gouttes d'eau distillée, mélanger et dégazer 3 fois puis laisser décanter pendant 30 minutes.

3. Caractérisation

L'identification et la caractérisation des substances étudiées ont été effectuées par plusieurs méthodes.

3.1. Caractérisation physicochimique

3.1.1. Propriétés organoleptiques

Les principaux éléments contribuant à la qualité organoleptique sont : L'aspect visuel (forme, couleur,...), la texture, l'odeur et le goût.

3.1.2. Solubilité

La solubilité correspond à la quantité maximale d'une substance dissoute dans un certain volume de solvant.

Des échantillons de la capsaïcine et du bêta-carotène ont été dissous dans des solvants divers : chloroforme, benzène, huile de ricin, l'acétate d'éthyle et l'éther du pétrole.

3.2. Caractérisation spectroscopique

3.2.1. UV-Visible

Les solutions de la capsaïcine et du bêta-carotène ont été diluées, puis analysées par un spectrophotomètre UV-Visible, dans un domaine d'absorption variant entre 200 et 800nm.

3.2.2. Infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge est utilisée pour déterminer les différents groupements fonctionnels présents dans la molécule organique et quelques structures des molécules simples. La préparation de l'échantillon diffère suivant la nature du composé (solide ou liquide).

Selon le système FTIR, l'échantillon liquide a été déposé entre deux pastilles de chlorure de sodium monocristallin comprimées, de manière à obtenir un film fin. Enfin l'analyse des deux échantillons d'extrait de piment et de la capsaïcine a été réalisée par IR.

4. Etude biologique

Afin d'évaluer les activités pharmacologiques de la capsaïcine plusieurs tests ont été réalisés.

4.1. Activité Antioxydant

➤ Principe

L'utilisation du radical DPPH permet l'évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits de piment. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical libre stable compatible avec tous les solvants. Le piégeage et la réduction de ce dernier se traduit par le changement de la couleur de la solution « violet » à une couleur « jaune », ce qui permet de suivre la décoloration par spectrophotométrie à une absorbance au voisinage de 517nm ainsi que la capacité antioxydante des extraits [17].

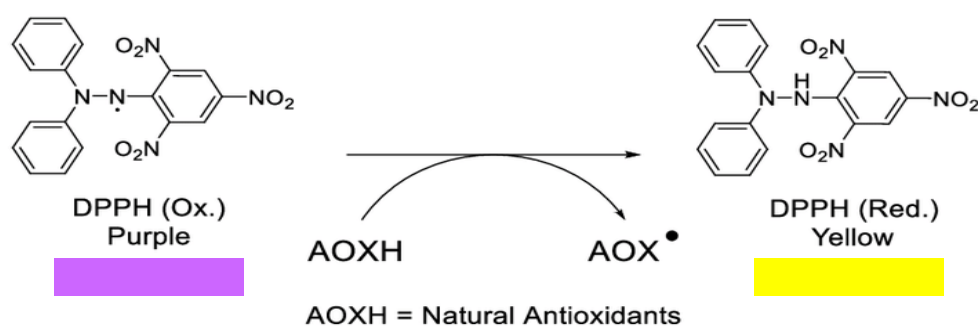


Figure 7: Réduction du DPPH.

➤ Test

Un volume de 50 µl de concentration de 20,89 mg/ml de l'extrait méthanoïque a été introduit dans un tube, suivi par l'ajout de 1.5 ml de la solution de DPPH (0.1mg /ml). Après 30 min de réaction, l'absorbance a été mesurée au voisinage de 516 nm. Le même protocole a été suivi pour la solution témoin (acide ascorbique).

4.2. Activité antibactérienne

Pour évaluer l'effet antibactérien de nos extraits (l'extrait de piment et de la capsaïcine), nous avons optés pour la méthode de diffusion en puits sur milieu gélosé.

- **Préparation de l'inoculum**

- **Préparation de pré-culture**

Les tests antibactériens sont réalisés à partir de cultures jeunes (18 à 24h) en phase de croissance exponentielle. La revivification des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide (BHIB : Bouillon d'infusion cerveau-cœur). Après incubation pendant 24h à 37°C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de pétri contenant les milieux de cultures appropriés pour chaque souche puis, incubées à 37°C pendant 18h.

- **Préparation de la suspension bactérienne**

A partir des cultures jeunes sur gélose, à l'aide d'une pipette pasteur on prélève quelques colonies bien isolées puis les introduire dans 5ml d'eau physiologique stérile et agiter quelques secondes.

- **Disposition de l'inoculum**

Le milieu de culture utilisé est Mueller Hinton, il a été coulé dans des boîtes de pétrie appropriés à chaque souche. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse puis, les suspensions bactériennes (*Escherichia coli* G⁻, *Bacilles* G⁻, *Proteus* G⁻, *Pseudomonas aeruginosa* G⁻, *Bacteroides fragilis* G⁻, *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus* G⁺) ont été étalées sur la surface à l'aide d'un écouvillon.

- **Dépôt des disques d'antibiotique vierges**

Deux disques d'antibiotique vierges de 9mm sont déposés par boîte de pétri sur la gélose à l'aide d'une pince stérile.

- **Dépôt des échantillons**

5µl de chaque extrait sont déposés sur les disques.

- **Lecture**

Après une incubation de 24h à 37°C, la lecture se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour de chaque disque et les valeurs sont exprimées en mm.

*Résultats et
discussion*

1. Extraction de la capsaïcine et du bêta-carotène

1.1. Identification phytochimique

L'analyse phytochimique du piment rouge séché a montré la présence des alcaloïdes, des terpénoïdes et des flavonoïdes ainsi que le calcium et le phosphate.



Figure 8: Résultats de l'analyse phytochimique de la poudre végétale.

1.2. Comparaison de la composition de différents piments

Cette comparaison a été effectuée en réalisant des tests phytochimiques pour le piment rouge frais, le piment rouge séché et le piment vert frais. Les résultats sont présentés dans le tableau 8 et la figure 9.

Tableau 8: Résultats des tests phytochimiques des différentes sortes de piment étudiées.

Tests	Piment vert	Piment rouge frais	Piment rouge séché
Flavonoïdes	+	++	+++
Alcaloïdes	++	++	++
Terpénoïdes	+++	+++	+++
Calcium	+	++	+++
Phosphate	++	++	++
Magnésium	-	-	-

+ : Faible concentration. ++ : Concentration moyenne. +++ : Forte concentration. - : Absence du composé.

Une simple lecture du tableau, indique clairement que les trois sortes de piments étudiés ont la même composition avec des teneurs différentes. La teneur des composés analysés est liée à l'intensité de la couleur et la quantité de précipité obtenu. Les trois échantillons de piment présentent pratiquement la même teneur en alcaloïdes, terpénoïdes et en phosphate. Par contre, nous remarquons une différence de teneur en flavonoïdes et en Calcium ou le piment rouge séché présent une quantité élevée par rapport au piment rouge frais et au piment vert. Le magnésium a été jugé absent pour les trois échantillons. La figure 9 illustre les résultats obtenus pour les tests réalisés.

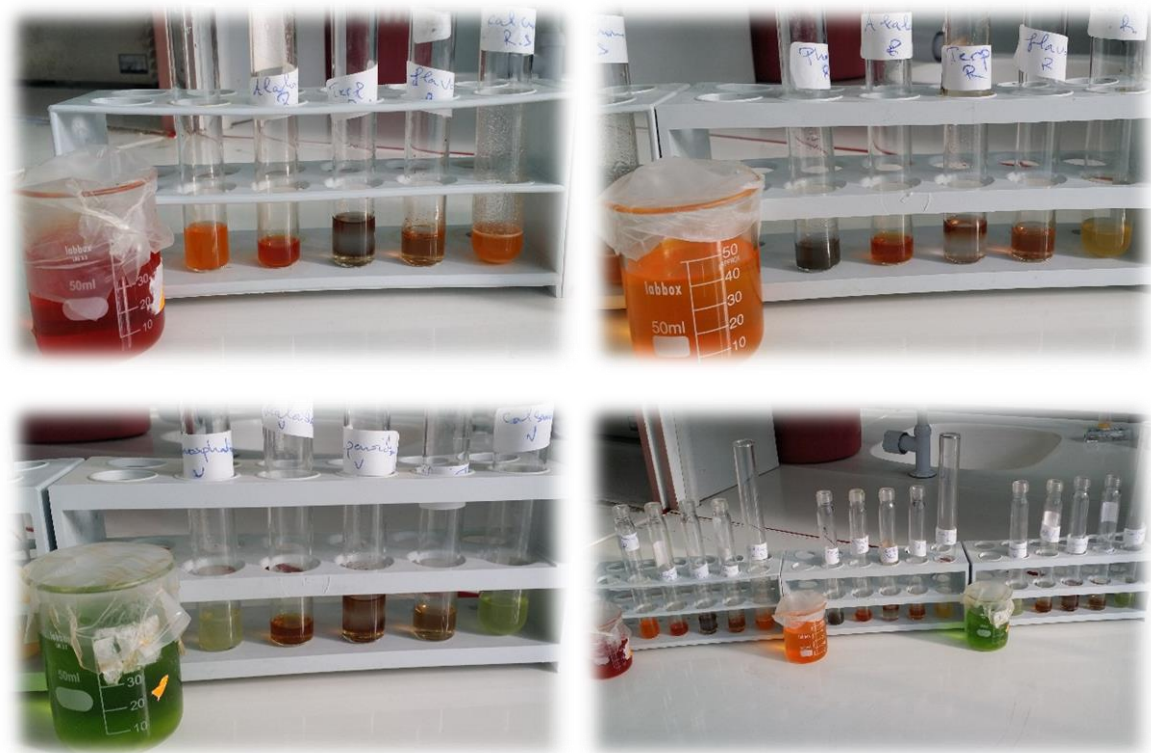


Figure 9: Résultats de l'analyse phytochimique du piment rouge frais et séché et du piment vert frais.

1.3. Optimisation du rendement d'extraction

1.3.1. Etude statistique des résultats

La matrice d'expérience ainsi que les résultats des mesures effectuées pour l'optimisation de l'extraction sont présentés dans le tableau 9.

Le rendement d'extraction a été calculé par la relation (2).

Tableau 9: Matrice d'expérience et les résultats des mesures effectuées

N° d'expériences	Nombre de cycles	Rapport masse(g)/solvant (ml)	Méthode d'extraction	Rendement (%)
01	-1	-1	Avec infusion	14.4
02	1	-1	Sans infusion	27.1
03	-1	1	Avec infusion	17.3
04	1	1	Avec infusion	13.2
05	-1	-1	Sans infusion	13.3
06	1	-1	Sans infusion	32.3
07	-1	1	Sans infusion	9.3
08	1	1	Sans infusion	23.1
09	0	0	Sans infusion	18.9
10	0	0	Sans infusion	18.5
11	0	0	Sans infusion	21.4

1.3.2. Validation du modèle

La validation du modèle repose sur la vérification de l'adéquation du modèle mathématique et l'analyse des coefficients de ce modèle. Cette étape permet de déterminer les facteurs significatifs, une fois le modèle est établi, la dernière étape de la validation, consiste à analyser la variance et les résidus [47].

1.3.2.1. Adéquation du modèle

La qualité du modèle adapté est appréciée par le coefficient de détermination multiple (R^2) et le coefficient de détermination (Q^2).

Pour avoir un bon ajustement de la réponse, R^2 doit être supérieur à 0,8 ainsi que pour avoir une bonne traduction de la réponse (Q^2) doit être supérieure à 0.5 [43]. Ceci est illustré dans le tableau 10.

Tableau 10: Valeurs des coefficients R^2 , R^2_{adj} et Q^2 pour l'étude de rendement.

	R^2	R^2_{adj}	Q^2
Rendement	0.957	0.892	0.815

Les valeurs des coefficients R^2 et Q^2 indiquent une bonne qualité descriptive du modèle, cela est illustré dans la figure 10.

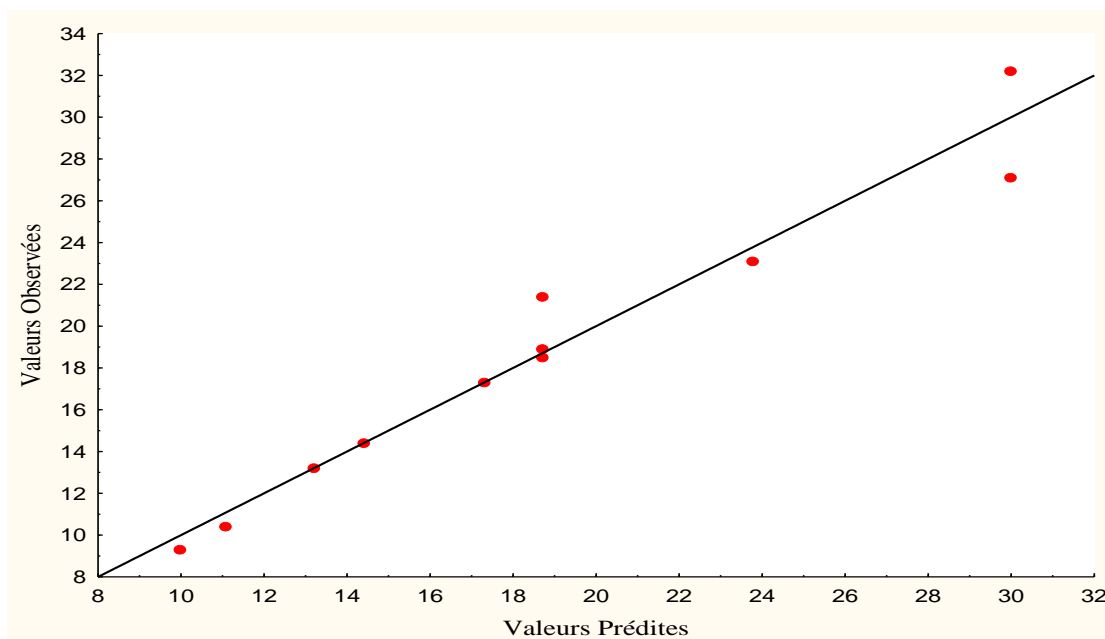


Figure 10: Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites du rendement.

D'après le graph, plusieurs points sont superposés à la diagonal et d'autres sont proches ce qui signifie que les valeurs expérimentales sont proches aux valeurs théoriques, et donc une bonne adéquation du modèle choisi.

1.3.2.2. Facteurs significatifs

L'effet d'un facteur est estimé par la variation d'une réponse lorsque ce facteur passe du niveau inférieur (-1) à son niveau supérieur (1), les autres étant fixés à leurs niveaux moyens (0). Le coefficient est significatif lorsque l'intervalle de confiance ne coupe pas l'axe horizontal (zéro) [47]. La figure 11 présente l'influence des facteurs sur le rendement.

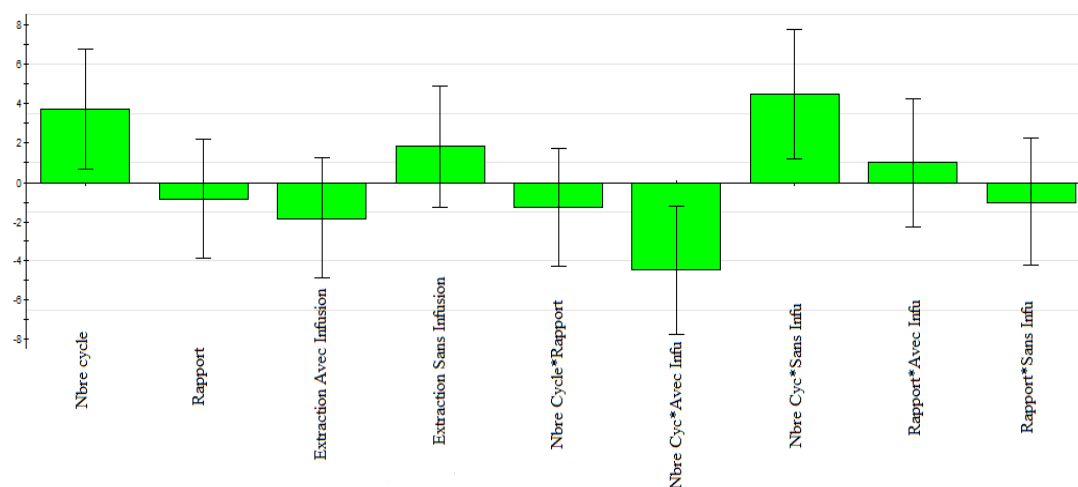


Figure 11: Histogramme de l'influence des facteurs sur le rendement.

Les facteurs significatifs pour le rendement sont le nombre de cycle d'extraction et l'interaction entre le nombre de cycle et la méthode adaptée pour l'extraction. Le rendement est influencé positivement par le nombre de cycle car ce dernier il représente la durée de contact entre le solvant d'extraction est la poudre végétale. Plus le temps de contact est long plus le rendement est élevé.

1.3.2.3. Analyse de la variance

Les modèles appropriés pour l'étude d'une réponse sont ceux avec les valeurs de la probabilité des coefficients (p-value) proches de zéro, au autrement dit peu significatifs.

La valeur F de Fisher se calcule par le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus. Ce paramètre permet de calculer la probabilité que ces deux carrés ne soient pas égaux. Si F de Fisher expérimental (F_{obs}) est supérieur à F de Fisher donné par les tables (F_{crit}), les variations des réponses mesurées sont bien dues aux variations des facteurs, et le modèle est jugé valide [47].

D'après la table de Fisher,

$$F_{crit} = F \left(\frac{\text{régression}}{\text{résiduelle}} \right) = F(6, 4, 0.05) = 4,53 \dots\dots\dots(3)$$

La valeur de p-value est égale à 0,011 et Fobs est supérieure à Fcrit d'où le modèle est validé. Les résultats de l'analyse de la variance sont illustrés dans le tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11: Analyse de la variance pour l'étude du rendement

	Sommes des carrés	DDL	Carrés moyens	Fobs	Fcrit	p-value
Régression	430.117	6	71.6862	14.7208	4.53	0.011
Résidus	19.4789	4	4.86972			
Total	4413	11	401.128			

1.3.2.4. L'étude des résidus

La dispersion aléatoire des résidus signifie que leurs importance est négligeable ce qui signifie que le modèle choisi est approprié. Cette étape est la phase complémentaire pour l'analyse statistique du modèle (figure12).

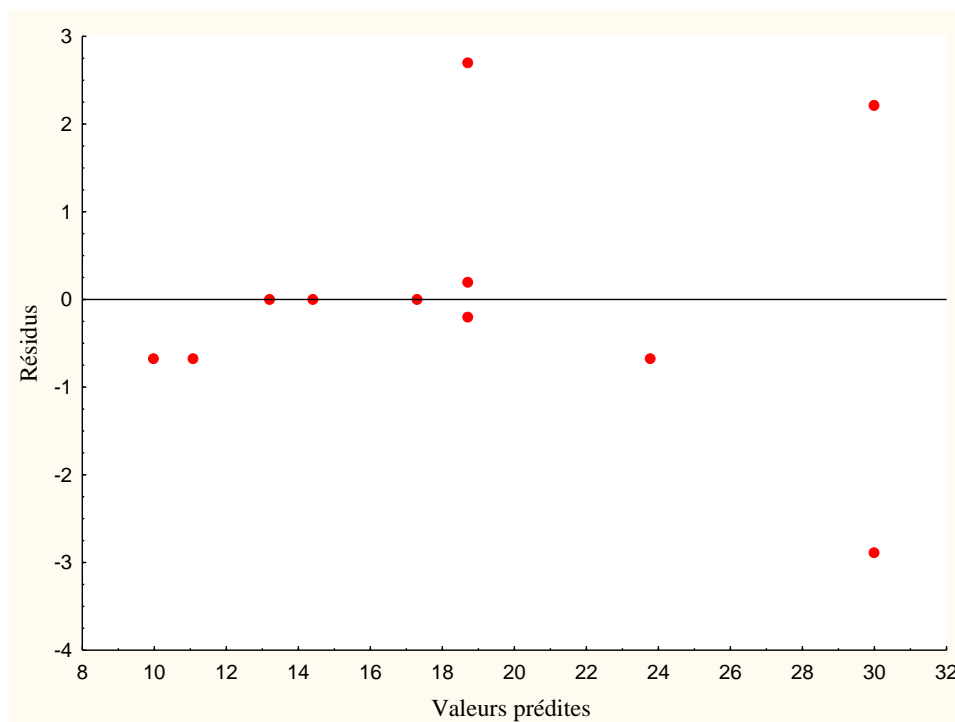


Figure 12: Evaluation des résidus en fonction des valeurs prévus pour le rendement

On remarque que le nuage des points est aligné le long d’une droite qui correspond à la distribution normale des résidus.

Après l’interprétation des résultats obtenus, on conclut que le modèle est statistiquement validé.

1.3.3. Modélisation à l’aide du logiciel Modde 6

Le rendement peut être décrit par le modèle ci-dessous, Celui-ci ne fait apparaitre que les facteurs significatifs.

$$R(\%) = 16.7774 + 3.03255 \times Nbre_{cycle} \times Meth_{(avec\ infusion)} + 4.475 \times Meth_{(sans\ infusion)} \dots\dots\dots(4)$$

1.3.4. Optimisation de l’extraction

L’optimisation de l’extraction a été faite avec le logiciel Modde 6 en utilisant le module « Optimiser ».Les conditions optimales pour l’extraction sont illustrées dans le tableau 12.

Tableau 12: Conditions souhaitables pour l’extraction

Réponse	Critère	Min	Valeur cible
Rendement (%)	maximum	28.8583	29.8698

L'ensemble des résolutions procurées par le modèle ainsi que l'écart global avec la réponse ciblée mesuré avec le paramètre (Log D) sont présentées dans le tableau 13.

Tableau 13: Résolutions procurées par le logiciel Modde 6.

	Nombre de cycles	Rapport masse(g)/solvant (ml)	Méthode	Rendements	Log(D)
01	1	-0.9999	Sans infusion	29.8695	-0.6018
02	1	-1	Sans infusion	29.8698	-0.6021
03	-1	1	Avec infusion	17.3	1.6539
04	1	-0.9999	Sans infusion	29.8695	-0.6018
05	1	-0.9999	Sans infusion	29.8695	-0.6018
06	1	-1	Sans infusion	29.8698	-0.6021
07	1	-1	Sans infusion	29.8698	-0.6021
08	1	-0.9999	Sans infusion	29.8695	0.6018

La résolution optimale indique que le meilleur rendement est obtenu en utilisant un rapport masse(g)/solvant (ml) de 1g/8ml avec 4 cycle d'extraction directe (sans infusion).

1.3.5. Rendement d'extraction

La variation du rendement en fonction du nombre de cycle et le rapport masse/solvant est illustrée par la figure 13.

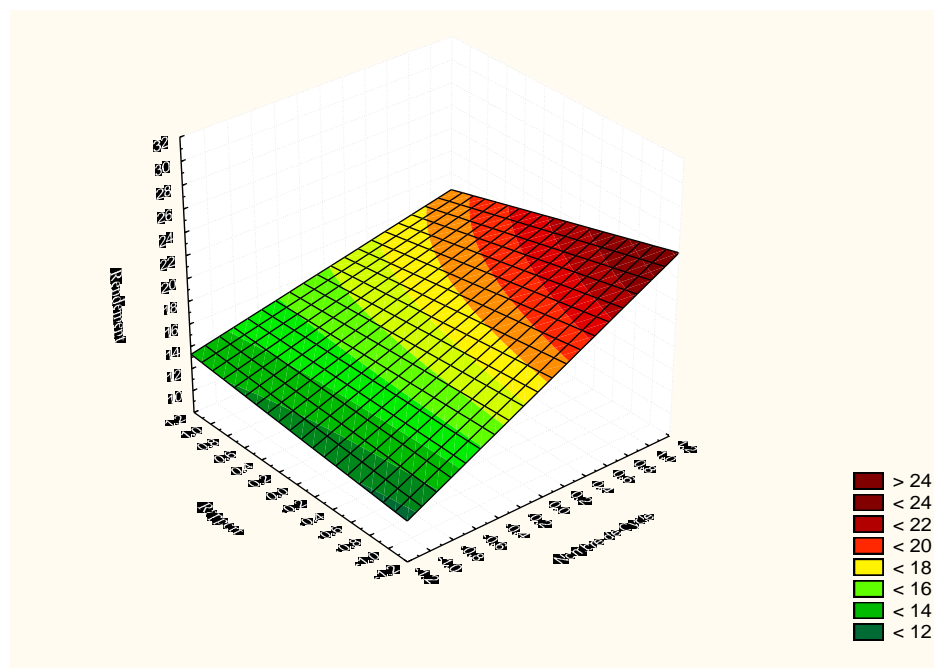


Figure 13: Rendement en fonction du nombre de cycle et le rapport masse/solvant.

D'après la figure ci-dessus, le rendement optimal est localisé dans une zone caractérisée avec des coordonnées élevées pour le nombre de cycle et des coordonnées basses pour le rapport masse/solvant étudié. Cette localisation permet de constater que le rendement varie proportionnellement avec le nombre de cycle et inversement proportionnel au rapport masse/solvant.

Afin de confirmer le rendement donné par l'optimum, une extraction a été effectuée en appliquant les conditions optimales décrites par le Modèle 6. Le rendement de cette extraction est le suivant :

$$R(\%) = \frac{2.12}{10} \times 100$$

$$R(\%) = 21.2\%$$

L'écart remarquable entre le rendement obtenu expérimentalement et le rendement optimal (29.87%) est dû aux quantités de solvant restantes dans les extraits lors de l'évaporation au sein du rote-à-vapeur.

Remarque : La réalisation d'une extraction à l'éthanol récupéré par évaporateur rotatif avec les conditions optimales a été effectuée afin d'évaluer son pouvoir solubilisant. Le rendement obtenu est de 15.80%, ce rendement est inférieur par rapport à la valeur optimale d'où on déduit que l'éthanol recyclé est réutilisable mais son pouvoir solubilisant a diminué.

2. Séparation du bêta-carotène de la capsaïcine

Le procédé direct d'extraction (sans infusion) donne un extrait composé de Capsaïcine et du bêta-carotène (Extrait mou de piment). Pour atteindre notre objectif principal, d'extraire la Capsaïcine pure, nous avons procédé au traitement de la matière végétale pour éliminer au maximum le bêta-Carotène.

Des infusions à l'eau ont été effectuées (la figure 14). Le bêta-carotène est récupéré dans la phase aqueuse, car il est soluble dans l'eau. La capsaïcine est pratiquement insoluble dans l'eau ce qui lui permet de rester dans la poudre végétale.

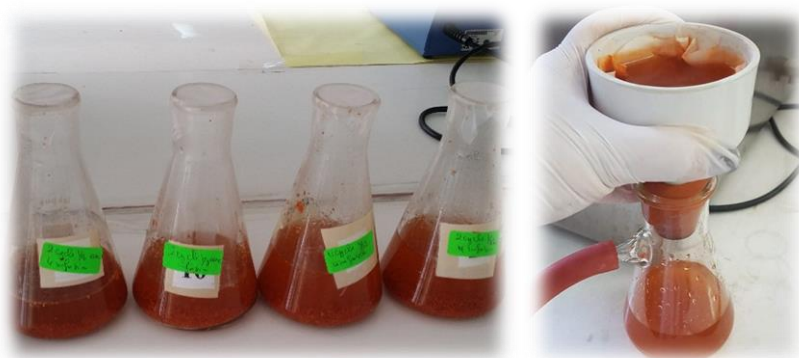


Figure 14: Infusion de la poudre de piment.

L'analyse UV-visible de l'extraction faite pour la poudre après infusion a révélé la présence du bêta-carotène à une faible quantité ce qui est illustré dans la figure 18. Une purification de la capsaïcine est nécessaire afin d'éliminer les traces du bêta-carotène restantes.

3. Purification de la capsaïcine

La purification a été réalisée par une décantation à huile de ricin (voir figure 15), le bêta-carotène a été piégé dans la phase huileuse (visqueuse) car c'est une molécule très volumineuse qui ne contient aucun groupement polaire [50]. La capsaïcine est récupérée dans la phase organique car elle est de nature polaire et elle présente une affinité majeure pour le solvant d'extraction (l'éthanol).

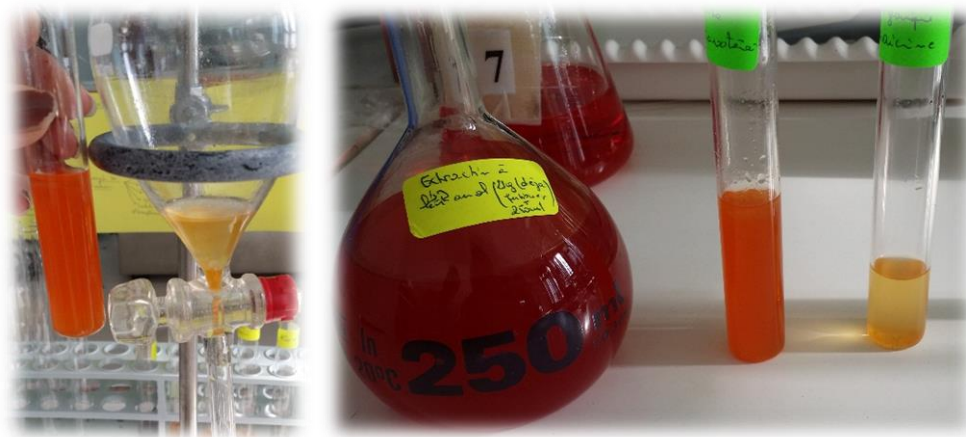


Figure 15: Décantation à l'huile de ricin.

La faible miscibilité de l'éthanol à l'huile de ricin nous a pas permet d'avoir deux phases assez distinctes. L'ajout de quelques gouttes d'eau au mélange de décantation a amélioré la séparation des deux phases grâce à la grande miscibilité de l'éthanol à l'eau et la non miscibilité de l'eau aux huiles. Ce procédé nous a permet d'avoir un extrait alcoolique de Capsaïcine pure ceci est confirmé par la présence d'un seul pic dans l'analyse UV-visible. (Voir figure 19)

4. Caractérisation

4.1. Caractérisation physico-chimique

4.1.1. Propriétés organoleptiques

Après évaporation du solvant d'extraction de la phase organique et du filtrat aqueux, les caractères organoleptiques sont déterminés et présentés dans la figure 16 et le tableau 14.

Tableau 14 : Caractères organoleptiques des extraits.

Propriétés organoleptiques	Extrait du piment	Phase organique (capsaïcine)	Phase huileuse (bêta-carotène)	Filtrat aqueux (bêta-carotène)
Texture	visqueuse	visqueuse	Visqueuse	Très visqueuse
Couleur	Rouge brun	Blanc jaunâtre	Rouge orangé	Rouge bourgogne
Odeur	Piquante et aromatique	Piquante	Aromatique	Aromatique
Saveur	Piquante	Piquante	Amère	Amère

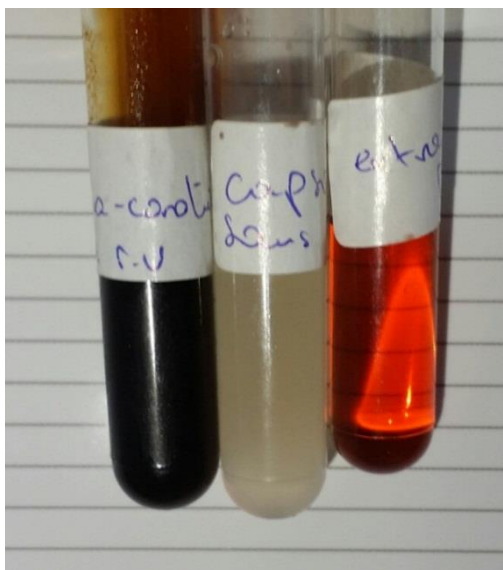


Figure 16: L'aspect des trois extraits.

4.1.2. Solubilité

Les tests de solubilité dans différents solvants pour les extraits bruts de la capsaïcine et du bêta- carotène ont révélés les résultats présentés dans le tableau 15 et la figure 17.

Tableau 15: Solubilité de la capsaïcine et du bêta-carotène

Solvants	Capsaïcine	Bêta-carotène
Chloroforme	+	+
Benzène	+++	-
Acétate d'éthyle	+++	-
Méthanol	+++	+
Ether de pétrole	-	-
Huile de ricin	+	+++

+ : Partiellement soluble. +++ : Très soluble. - : insoluble

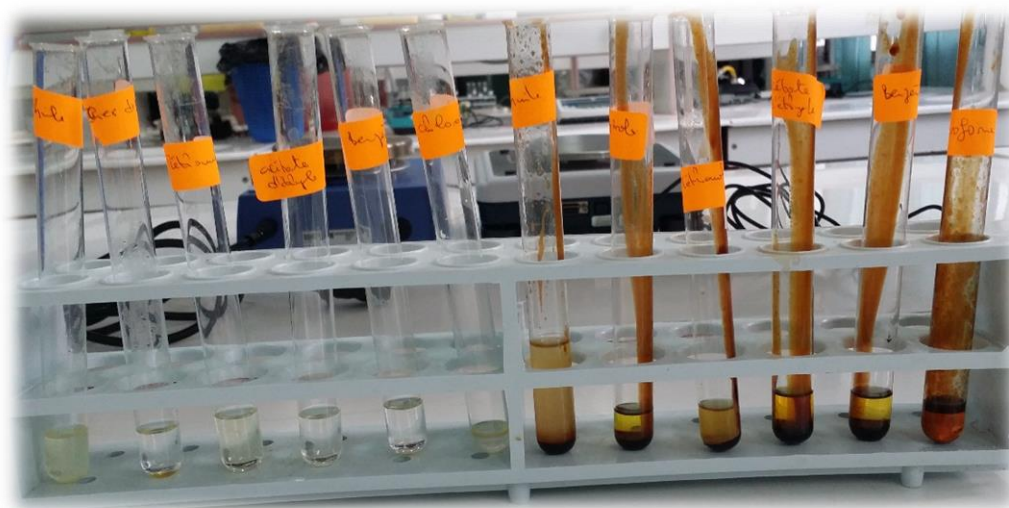


Figure 17: Test de solubilité du le bêta-carotène et de la capsaïcine.

La capsaïcine extraite est soluble avec des proportions différentes dans la plupart des solvants organiques testés. Le bêta-carotène montre une faible solubilité pour le chloroforme et le méthanol et une forte solubilité pour l'huile de ricin.

4.2. Caractérisation par spectroscopie

4.2.1. Analyse par UV-visible

Les longueurs d'ondes d'absorption des composants d'extrait du piment ont été obtenus en réalisant un balayage UV-visible. Les résultats de l'analyse sont présentés dans la figure 18.

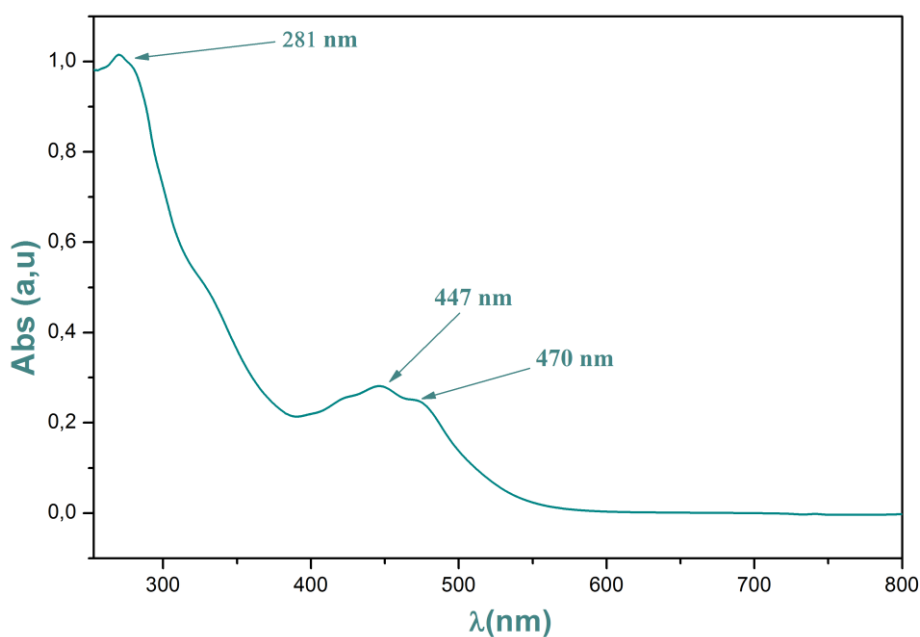


Figure 18: Spectre UV-visible de l'extrait de piment.

D'après le spectre d'absorption, on constate la présence de trois pics dont les absorptions sont repérées à $\lambda = 281$ nm attribuée à la capsaïcine et à $\lambda = 447$ et 470 nm qui sont attribuées au bêta-carotène, en se référant aux normes publiées [51].

L'analyse UV-visible de l'extrait de la capsaïcine obtenu après purification à l'huile de ricin a donné le spectre présenté dans la figure ci-dessous.

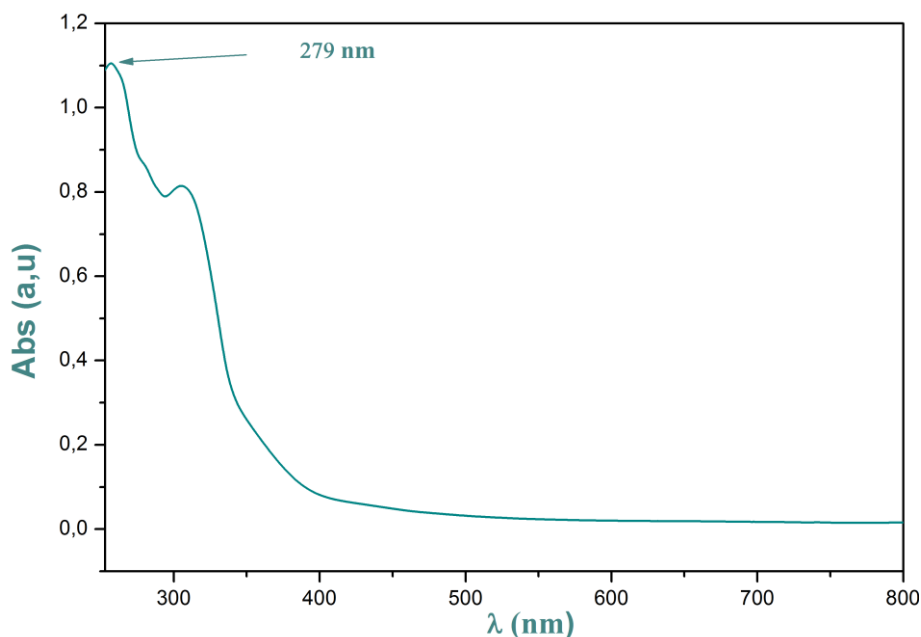


Figure 19: Spectre UV-visible de la capsaïcine purifiée.

Le spectre montre la présence d'un pic à 279 nm de la capsaïcine et l'absence du pic du bêta-carotène ce qui implique l'efficacité du procédé adapté pour la purification. L'apparition du deuxième pic est due à la présence des traces de l'huile de ricin restante lors de la décantation.

4.2.2. Analyse par Infrarouge

Lorsqu'une molécule est bombardée par un flux lumineux d'infrarouge, les atomes qui la composent se mettent à vibrer. Chaque vibration est caractéristique d'une liaison atomique selon sa fréquence et son intensité. On peut se servir de table d'infrarouge afin d'interpréter les spectres obtenus pour identifier les fonctions principales de la molécule.

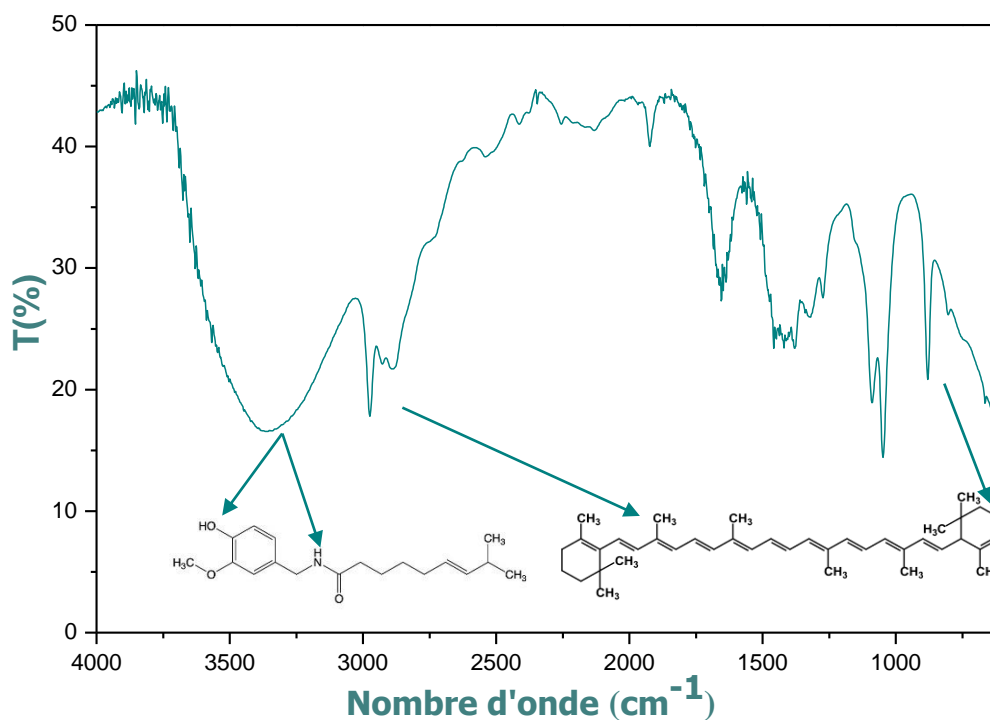


Figure 20: Spectre infrarouge de l'extrait du piment.

Le spectre ci-dessus a révélé plusieurs bandes qui sont présentées dans le tableau 16.

Tableau 16: Bandes principales du spectre infrarouge de l'extrait de piment.

Groupements	Nombres d'onde standards (cm^{-1})	Nombres d'ondes observées (cm^{-1})
O-H	3500-3100	3365
C=O	1710-1630	1681
Amine secondaire	3350-3310	3319
Ph-O-C	1300-1170	1276
C=C Aromatique	1600-1500	1458
C-H Aromatique	860-800	881
C-H Aliphatique	3000-2850	2975

On constate que les bandes observés dans le spectre infrarouge de la figure 20 correspondent aux groupements fonctionnels des molécules de la capsaïcine et du bêta-carotène, on conclut donc que les deux substances sont présentes dans l'extrait du piment [52].

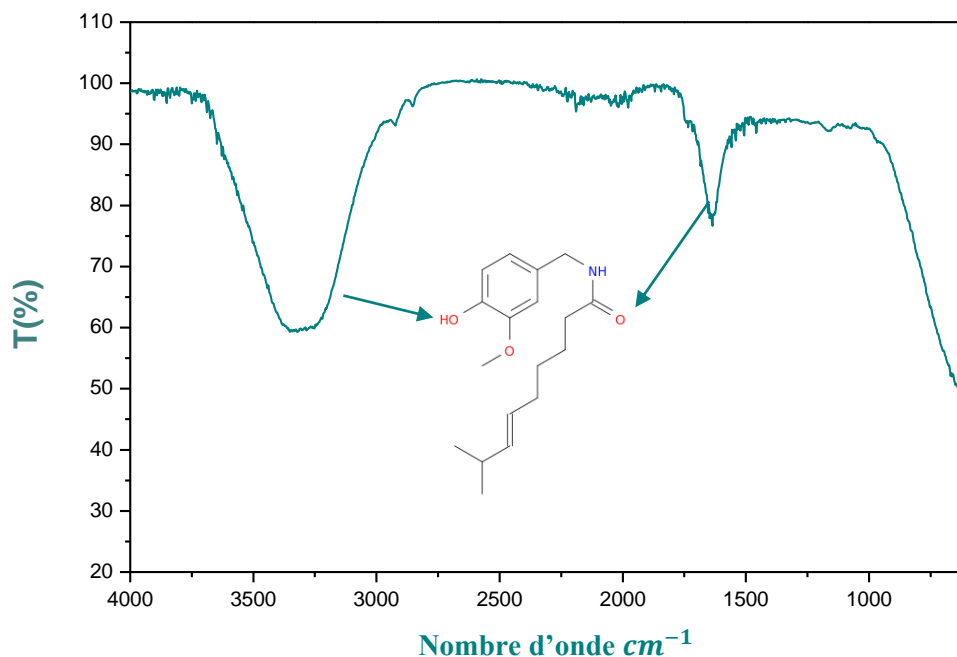


Figure 21: Spectre infrarouge de la capsaïcine.

Le spectre ci-dessus est dominé par une bande large caractéristique des deux groupes O-H et N-H secondaire respectivement vers 3356 cm^{-1} et 3317 cm^{-1} , une bande moyenne vers 1635 cm^{-1} correspond au groupement C=O. La liaison aliphatique C-H donne la petite bande vers 2920 cm^{-1} [53].

Les bandes C-H aliphatique et C=C aromatique sont plus intenses dans le spectre infrarouge de l'extrait de piment (figure 20) que dans le spectre infrarouge de la capsaïcine (figure 21), cela est dû à l'absence des molécules du bêta-carotène qui sont riches en liaisons C-H et C=C [24].

5. Etude biologique

5.1. Test antioxydant

La solution du DPPH de 0.1 mg/ml a donné une absorption de 0.823 à une longueur d'onde de 516 nm . Cette absorbance a été réduite à 0.676 par la solution mère de la capsaïcine de concentration de 20.89 mg/ml , ce qui est traduit par une réduction de 17% du DPPH. La réduction obtenue par la solution mère est jugée faible par rapport à la réduction de la solution témoin (acide ascorbique) qui est de 95.96% . C'est pour cette raison qu'on n'a pas procédé aux tests avec des solutions dilués.

Ces résultats ont prouvé que le pouvoir antioxydant de la capsaïcine est faible [18].

5.2. Test antibactérien

L'activité antibactérienne de l'extrait de piment et de la capsaïcine a été mise en évidence par la méthode de diffusion sur disques (Aromatogramme) vis-à-vis de sept souches bactériennes. La sensibilité de ces souches est classée selon les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne qui sont présentées dans le tableau 17.

Tableau 17: Zones d'inhibition de la croissance et la sensibilité bactérienne[54].

Diamètre d'inhibition	Signification
Diamètre \leq 8mm	Résistante
9mm \leq Diamètre \leq 14mm	Sensible
15mm \leq Diamètre \leq 19mm	Très sensible
Diamètre \geq 20mm	Extrêmement sensible

Les zones d'inhibition de la croissance bactérienne des souches testées pour nos extraits ont révélées les résultats sont illustrés dans la figure 22 et le tableau 18.

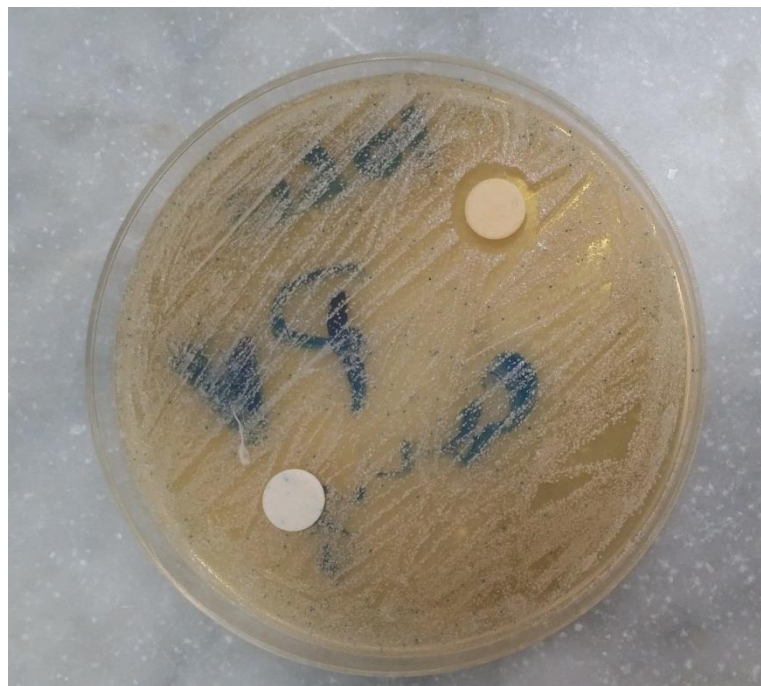


Figure 22: Zone d'inhibition de la croissance bactérienne.

Tableau 18: Diamètre des zones d'inhibition des extraits

Souches bactériennes	DI de l'extrait de piment (mm)	DI la capsaïcine (mm)
Escherichia coli G ⁻ ATCC 10536	13	-
Bacilles G ⁻ ATCC 10552	13	-
Proteus G ⁻ ATCC 10550	12	-
Pseudomonas aeruginosa G ⁻ ATCC 10554	-	-
Bacteroides fragilis G ⁻ ATCC 10584	12.5	-
Lactobacillus ATCC 2797	12.7	-
Staphylococcus aureus G ⁺ ATCC 25923	10	-

- : Absence de zone d'inhibition.

D'après ces résultats l'activité antibactérienne a été mise en évidence pour l'extrait de piment (capsaïcine et bêta-carotène) pour l'Escherichia coli G⁻, Bacilles G⁻, Proteus G⁻, Bacteroides fragilis G⁻, Lactobacillus, Staphylococcus aureus G⁺. Cette activité a été jugé absente pour l'extrait de la capsaïcine vis-à-vis les souches testées dans les conditions expérimentales adaptés.

L'inhibition de la croissance bactérienne remarquée pour l'extrait de piment est révélée par la présence du bêta-carotène qui a un pouvoir antibactérien très élevé [31,32].

Remarque : Les tests antioxydants et antibactériens non pas été réalisés pour l'extrait mou du bêta-carotène car ce derniers a été dégradé en raison de sa grande sensibilité à la lumière, oxygène et chaleur.

Conclusion

générale

Actuellement, un grand nombre des plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir la médecine et la pharmacie.

Les deux objectifs principaux de cette étude à savoir l'optimisation du rendement d'extraction de l'extrait de piment (*Capsicum annum L*), ainsi que la purification de l'extrait de Capsaïcine ont été atteints

Les principaux résultats expérimentaux obtenus à travers cette étude permettent de dégager les conclusions générales suivantes :

- L'extraction au soxhlet de la capsaïcine en appliquant les conditions de l'optimisation réalisée par le logiciel Modde 6, a permis un rendement de 32,3%.
- La réalisation des infusions à l'eau pour la poudre du piment rouge avant l'extraction au soxhlet a été une étape nécessaire pour diminuer la quantité du bêta-carotène dans la matière végétale afin de faciliter la purification
- Une bonne purification de capsaïcine est obtenue avec le procédé de décantation avec l'huile de ricin pure.
- L'analyse de l'extrait de piment par UV-visible, a montrée l'existence d'une bande d'absorption caractérisée par une longueur d'onde maximale de 281nm, identifiant la capsaïcine et une deuxième bande dont la longueur d'onde est de 447 nm, caractérisant le bêta-carotène.
- L'analyse UV-visible de l'extrait de la capsaïcine obtenu après purification, a montré la présence d'une seule bande d'absorption environ 279 nm qui caractérise la longueur d'onde maximale de la capsaïcine et qui valide l'efficacité du procédé de purification.
- La technique d'analyse d'absorption d'infrarouge, confirme les résultats obtenus par l'UV-Visible.
- L'évaluation de l'activité antioxydante de la capsaïcine avec le test de DPPH montre que la capacité de la substance à réduire les radicaux libres est faible.
- Le test antibactérien de l'extrait de piment et l'extrait de Capsaïcine vis-à-vis des sept souches étudiés a montré la capacité de l'extrait de piment à inhiber la croissance de la majorité des souches bactériennes contrairement à la capsaïcine qui a révélé l'absence de l'activité antibactérienne. Ce résultat prouve que le bêta-carotène possède une bonne activité antibactérienne.

En termes de perspectives et dans le but de compléter ce travail à l'avenir, il serait intéressant de :

- Remplacer les infusions à l'eau par des macérations afin de protéger le bêta-carotène de la dégradation thermique et minimiser la perte de la capsaïcine dans l'infusé issu de l'amélioration de sa solubilité dans l'eau à des températures élevées.
- Fournir des conditions de conservation adaptées pour le bêta-carotène afin d'éviter sa dégradation, car c'est une substance très sensible à la lumière, à l'oxygène et la chaleur.
- Trouver un bon solvant qui va permettre de récupérer le bêta-carotène de la phase huileuse issu du procédé de décantation.

References

1. DE BONNEVAL, Patrice. *L'herboristerie: manuel pratique de la santé par les plantes pour l'homme et l'animal: phytothérapie, aromathérapie, oligothérapie, vitaminothérapie*. Éditions DésIris, 2006.
2. CHIARINI, Franco E. et MENTZ, Lilian Auler. A new species of *Solanum* sect. *Acanthophora* (Solanaceae) from Argentina and Brazil. *PhytoKeys*, 2012, no 18, p. 1.
3. KHAN, Nadra, AHMED, Muhammad Jamil, et SHAH, Syed Zulfiqar Ali. 33. Comparative analysis of mineral content and proximate composition from chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) germplasm. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 2019, vol. 8, no 2, p. 1338-1347.
4. FAO. Organisation des nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, 2015.
5. J, Bosland PW (2002) Genetic diversity of a *Capsicum* germplasm collection from Nepal as determined by randomly amplified polymorphic DNA markers. *J Amer Soc Hort Sci* 127:316- 324.
6. Lopez-Hernandez J, Oruna-Concha M.J, Simal-Lozano J, Vazquez-Blanco et Gonzalez-Castro. (1996). Chemical composition of Padron peppers (*Capsicum annuum* L.) grown in Galicia (N.W. Spain). *Food chem*, 57(4): 557-559.
7. Leroy J-F., 1943. Les Piments. In: *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 23^e année, bulletin n°263-265 :196-218.
8. VOTAVA, Eric J., BARAL, Jit B., et BOSLAND, Paul W. Genetic diversity of chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from northern New Mexico, Colorado, and Mexico. *Economic Botany*, 2005, vol. 59, no 1, p. 8-17.
9. FONDIO, L., N'ZI, J. C., et KOBENAN, K. Comportement agronomique et sanitaire de nouvelles lignées de piment (*Capsicum* sp) dans le Sud de la Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 2015, vol. 92, p. 8595-8609.
10. Perkins, B., Bushway, R., Guthrie, K., Fan, T., Stewart, B., Prince, A., Williams, M. (2002). Determination of capsaicinoids in salsa by liquid chromatography and enzyme immunoassay. *J. AOAC Int* , 85: 82–85.
11. Wahyuni, Y., Ballester, A.R., Tikunov, Y., de Vos, R., Pelgrom, K., Maharijaya, A., Sudarmonowati, E., Bino, R., Bovy, A. (2013). Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. *Metabolomics*, 9(1):130–144.
12. Schneider, D.J., Seus-Baum, I., Schlich, E. (2014). Relationship between pungency and food components – A comparison of chemical and sensory evaluations. *Food Qual Prefer*, 38: 98–106.

13. KOSUGE, SADAYOSHI et TAKEUCHI, TOKUO. Studies on the Pungent Principles of Red Pepper. Part XII. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 1962, vol. 9, no 2, p. 69-73.
14. KOSUGE, SADAYOSHI et INAGAKI, YUKIO. Studies on the Pungent Principles of Red Pepper. Part X. *Journal for the Utilization of Agricultural Products*, 1961, vol. 8, no 6, p. 297-302.
15. CLIFF, Margaret et HEYMANN, Hildegard. DESCRIPTIVE ANALYSIS OF ORAL PUNGENCY 1. *Journal of Sensory Studies*, 1992, vol. 7, no 4, p. 279-290.
16. REYES-ESCOGIDO, Maria De Lourdes, GONZALEZ-MONDRAGON, Edith G., et VAZQUEZ-TZOMPANTZI, Erika. Aspects chimiques et pharmacologiques de la capsaïcine. *Molecules*, 2011, vol. 16, n ° 2, p. 1253-1270.
17. MOKHTAR, Mérièm. *Identification et propriétés biologiques des principes actifs du piment (Capsicum annuum L)*. 2015. Thèse de doctorat. Thèse de Doctorat en Sciences, Univ. Mostaganem.
18. MAROUF, Abderrazak et TREMBLIN, Gérard. *Abrégé de biochimie appliquée*. EDP sciences, 2015.
19. BRUNET, F. et RIMLINGER, C.-A. Capsaïcine et nécrose cutanée. *Douleurs: Évaluation-Diagnostic-Traitement*, 2020.
20. KOUASSI, C. KOFFI-NEVRY, Rose. Evaluation de la connaissance et utilisation des variétés de piment (Capsicum) cultivées en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2012, vol. 6, no 1, p. 175-185.
21. KAPPEL, Virginia D., COSTA, Geison M., SCOLA, Gustavo, *et al*. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. *Journal of Medicinal Food*, 2008, vol. 11, no 2, p. 267-274.
22. OIKAWA, Shinji, NAGAO, Emiko, SAKANO, Katsuhisa, *et al*. Mechanism of oxidative DNA damage induced by capsaicin, a principal ingredient of hot chili pepper. *Free radical research*, 2006, vol. 40, no 9, p. 966-973.
23. ISLER, Otto. History and industrial application of carotenoids and vitamin A (1). In : *Carotenoids* C 5. Pergamon, 1979. p. 447-462.
24. GOURANTON, Erwan. *Effets du lycopène et du β -carotène sur la physiologie du tissu adipeux: un impact globalement positif sur les désordres physiopathologiques associés à l'obésité?*. 2010. Thèse de doctorat. Aix-Marseille 2.
25. ZUMBRUNN, Albrecht, UEBELHART, Peter, et EUGSTER, Conrad Hans. HPLC von

- Carotènes mit ψ - Endgruppen und (Z) -Konfiguration an terminalen konjugierten Doppelbindungen; Isolierung von (5Z) -Lycopin aus Tomaten. *Helvetica chimica acta* , 1985, vol. 68, n ° 6, p. 1540-1542.
26. BUDAVARI, S., O'NEIL, M. J., SMITH, A., *et al.* The Merck index, An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, Whitehouse Station, NY: Merck Research Laboratories Division of Merck & Co. Inc. *Monograph*, 1996, vol. 4175.
27. BOON, Caitlin S., MCCLEMENTS, D. Julian, WEISS, Jochen, *et al.* Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2010, vol. 50, no 6, p. 515-532.
28. MATA-GÓMEZ, Luis Carlos, MONTAÑEZ, Julio César, MÉNDEZ-ZAVALA, Alejandro, *et al.* Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial cell factories*, 2014, vol. 13, no 1, p. 12.
29. VIDAILHET, M., RIEU, D., FEILLET, F., *et al.* La vitamine A en pédiatrie: un point du comité de nutrition de la Société française de pédiatrie. *Archives de Pédiatrie* , 2017, vol. 24, n ° 3, p. 288-297.
30. CHARLES, Denys J. *Propriétés antioxydantes des épices, herbes et autres sources* . Springer Science & Business Media, 2012.
31. Cucco, M., Guasco, B., Malacarne, G., et Ottonelli, R. (2007). Effets du β -carotène sur l'état immunitaire de l'adulte et l'activité antibactérienne dans les œufs de la perdrix grise, *Perdix perdix*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* , 147 (4), 1038-1046.
32. PRAKASH, Bhanu, KUMAR, Akshay, SINGH, Prem Pratap, *et al.* Propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des composés phytochimiques: état actuel et perspectives futures. Dans: *Propriétés fonctionnelles et conservatrices des composés phytochimiques* . Presse académique, 2020. p. 1-45.
33. ALBANES, Demetrius, HEINONEN, Olli P., TAYLOR, Philip R., *et al.* Suppléments d' α -tocophérol et de β -carotène et incidence du cancer du poumon dans l'étude sur la prévention du cancer de l' α -tocophérol et du β -carotène: effets des caractéristiques de base et conformité de l'étude. *JNCI: Journal de l'Institut national du cancer* , 1996, vol. 88, n ° 21, p. 1560-1570.
34. BOUCHE, L. A. Canthaxanthine: Utilisations, Effets secondaires, Interactions, Posologies et Avertissements-Vitamines-Suppléments-2020.
35. MAHMOUDI, Souhila, KHALI, Mustapha, et MAHMOUDI, Nacéra. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara*

scolymus L.). *Nature & Technology*, 2013, no 9, p. 35.

36. CHATOT, G., CASTEGNARO, M., ROCHE, J. L., *et al.* Etude comparee des ultra-sons et du soxhlet dans l'extraction des hydrocarbures polycycliques atmospheriques. *Analytica Chimica Acta*, 1971, vol. 53, no 2, p. 259-265.

37. BARRIADA-PEREIRA, M., CONCHA-GRANA, E., GONZALEZ-CASTRO, M. J., *et al.* Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants. *Journal of chromatography A*, 2003, vol. 1008, no 1, p. 115-122.

38. VOLODINA, Elena V. et NAGOLKIN, Alexandr V. *Appareil de purification biologique et de filtration de l'air*. Brevet américain n ° 5,474,600, 12 déc. 1995.

39. PASSARET, M., TOUDIC, Y., REGRENY, A., *et al.* Recristallisation de TiO₂, GeO₂, Si_{1-x}GexO₂ en solutions hydrothermales fluorées. *Journal of Crystal Growth*, 1972, vol. 13, p. 524-529.

40. RICHARDSON, John Francis et HARKER, John Hadlett. *Chemical engineering- Volume 2: Particle Technology and Separation Processes*. Butterworth-Heinemann, 2002.

41. LABOUREL, G. et PÉAUD-LENOEL, C. Separation par Chromatographie sur colonne de silice des glucofructosanes de la série inuline de DP entre 1 et 20. *Chem. zvesti*, 1969, vol. 23, p. 765-769.

42. PETROVA, Olga E. et SAUER, Karin. High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP. In : *c-di-GMP Signaling*. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 33-43.

43. HUC, A. Y., ROUCACHÉ, J., BERNON, M., *et al.* Application de la chromatographie sur couche mince à l'étude quantitative et qualitative des extraits de roches et des huiles. *Revue de l'Institut français du pétrole*, 1976, vol. 31, no 1, p. 67-98.

44. CIURCZAK, Emil W. et IGNE, Benoit. *Pharmaceutical and medical applications of near-infrared spectroscopy*. CRC Press, 2014.

45. PERKAMPUS, Heinz-Helmut. *Spectroscopie UV-VIS et ses applications*. Springer Science & Business Media, 2013.

46. HANSEN, Pierre. Les procédures d'optimisation par séparation : présentation générale. *JORBEL-Belgian Journal of Operations Research, Statistics, and Computer Science*, 1971, vol. 11, no 3, p. 35-60.

47. GOUPY, Jacques. *La méthode des plans d'expériences*. Dunod, Paris, 1988.

48. HOROWITZ, Gail. Undergraduate separations utilizing flash chromatography. *Journal of Chemical Education*, 2000, vol. 77, no 2, p. 263.

- 49.** KLEIN, Jean-Paul, BOISTELLE, Roland, et DUGUA, Jacques. Cristallisation industrielle. aspects pratiques. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 1994, vol. 3, no J2788, p. J2788. 1-J2788. 31.
- 50.** Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H., & Gotoh, N. (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1322S-1326S.
- 51.** Cornacchia, L. et Roos, YH (2011). État du support lipidique dispersé et de la composition de l'interface en tant que déterminants de la stabilité du bêta-carotène dans les émulsions huile-dans-eau. *Journal of food science* , 76 (8), C1211-C1218.
- 52.** Suica-Bunghes, IR et Ion, RM (2020). CARACTÉRISATION, ACTIVITÉ PHYTOCHIMIQUE ET ANTIOXYDANTE DE TROIS TYPES DE POIVRE CHAUD (CAPSICUM ANNUUM L.). *Journal of Science and Arts* , 20 (2), 443-450.
- 53.** EL KAABY EKHLAS, A., AL HATTAB ZAHRA, N., et AI-ANNY JENAN, A. FT-IR Identification of Capsaicin from callus and seedling of chilli pepper plants *Capsicum annuum* L. in vitro. *Int. J. of Multidisciplinary and Current research*, 2016, vol. 4.
- 54.** CELIKEL, Nazan, KAVAS, Goekhan, *et al.* Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Sciences-UZPI (Czech Republic)*, 2008.

Annexes

Annexe 1: Table de Fisher-Snedecor ($\alpha=5\%$)

$\nu_2 \backslash \nu_1$	1	2	3	4	5	6	8	12	24	>25
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	238.9	243.9	249.0	254.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.37	19.41	19.45	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.84	8.74	8.64	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.04	5.91	5.77	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.82	4.68	4.53	4.36
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.15	4.00	3.84	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.73	3.57	3.41	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.44	3.28	3.12	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.23	3.07	2.90	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.07	2.91	2.74	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	2.95	2.79	2.61	2.40
12	4.75	3.88	3.49	3.26	3.11	3.00	2.85	2.69	2.50	2.30
13	4.67	3.80	3.41	3.18	3.02	2.92	2.77	2.60	2.42	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.70	2.53	2.35	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.64	2.48	2.29	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.59	2.42	2.24	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.55	2.38	2.19	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.51	2.34	2.15	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.48	2.31	2.11	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.45	2.28	2.08	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.42	2.25	2.05	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.40	2.23	2.03	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.38	2.20	2.00	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.36	2.18	1.98	1.73
25	4.24	3.38	2.99	2.76	2.60	2.49	2.34	2.16	1.96	1.71
26	4.22	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.32	2.15	1.95	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.30	2.13	1.93	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.44	2.29	2.12	1.91	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.54	2.43	2.28	2.10	1.90	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.27	2.09	1.89	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.18	2.00	1.79	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.52	2.37	2.25	2.10	1.92	1.70	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.02	1.83	1.61	1.25
>120	3.84	2.99	2.60	2.37	2.21	2.10	1.94	1.75	1.52	1.00