

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



THESE

Présentée à

L'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

Spécialité : **Nutrition et santé**

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR EN SCIENCES
De l'université de Mostaganem

Par

Mérièm Mokhtar

**Identification et propriétés biologiques des principes
actifs du piment (*Capsicum annuum* L.)**

Soutenu le 15 / 06 / 2015 devant le jury d'examen composé de :

Président du jury : Mr. Berkani Abdellah, Professeur, Univ. Mostaganem.

Examineurs : Mme. Merzoug Hafida, Professeur, Univ. Tlemcen.
Mr. Benali Mohamed, Professeur, Univ. Sidi-Bel-abbès.
Mr. Abouni Bouziane, Professeur, Univ. Sidi-Bel-abbès.
Mr. Slimani Miloud, Professeur, Univ. Saida.

Directeur de thèse : Mr. Riazi Ali, Professeur, Univ. Mostaganem.

Invité : Mr. Mondello Luigi, Professeur, Univ. Messina. Italie.

Année Universitaire : 2014/2015

Dédicaces

A mes très chers parents

Qui m'ont toujours soutenu

Pendant ces longues années,

A la mémoire de ceux qui nous ont quittés

Que dieu puisse leur accorder sa miséricorde

Et les accueillir dans son vaste paradis.

A tous ceux qui de près ou de loin

Ont participé à l'aboutissement de ce travail,

A tous ceux que j'aime.....

Mérièm

Avant-propos

La présente thèse a été réalisée conjointement au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels (LMBAFS) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, et le Laboratoire de « Analytical-Food chemistry division », ainsi le Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Messine, Italie. Ce travail a été financé par le programme ERASMUS MUNDUS – UE MARE NOSTRUM, Université de Murcia, Espagne.

Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de mon directeur de thèse, Professeur A. Riazi, Directeur du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS). Je suis honorée d'avoir travaillé en sa compagnie durant tous mon parcours scientifique. Je voudrais le remercier pour le temps, le soutien et les conseils qu'il m'a accordés tout au long de ces années et surtout d'avoir cru en mes capacités. Merci pour tout.

Je tiens à témoigner ma gratitude au Professeur L. Mondello, directeur du Laboratoire de « Analytical-Food chemistry division » de m'avoir accueilli dans son laboratoire et initiée à la chimie analytique. Je vous serai toujours reconnaissante d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail. Grazie mille per tutto.

Mes respectueux remerciements s'adressent à Mr.Berkani, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, merci d'avoir accepté de donner de votre temps pour présider mon jury et juger ce travail malgré votre responsabilité scientifique et administrative. Vos conseils me seront précieux.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme H. Merzouk, Professeur à l'université Abou bakr Belkaid à Tlemcen, d'avoir aimablement accepté d'apporter ses critiques à ce travail.

Je suis très honorée par la participation de Mr. Benali, Professeur à l'université de Djillali Liabes à Sidi-Bel-Abbes, que je remercie d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie aussi Professeur M. Slimani de l'université Moulay Tahar de Saida de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements sont également adressés à Mr. Abouni Bouziane, Professeur à l'université de Djillali Liabes à Sidi-Bel-Abbes, pour avoir accepté d'apporter sa touche de critiques scientifiques à cette étude.

Je tiens à remercier chaleureusement Paola Donato, Paola Dugo, Francesco Cacciola, Marina Russo, Germana Torres, Nermeen Fawzy, Giovanna Genestra et Angella Filocamo et tous les membres du laboratoire « Analytical-Food chemistry division » ainsi mes collègues de LMBAFS pour leur aide.

Mostaganem le 01 Avril 2015

Mokhtar Mérièm

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

AA : Acide acétique

ABTS : Acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

AC caf : Acide caféique

ACN : Acetonitrile

ADN: Acide désoxyribonucléique

AF: Acide formique

APCI: atmospheric pressure chemical ionization

ARN: Acide ribonucléique

AT3: Acyltransférase 3

B. subtilis: *Bacillus subtilis*

Bb12 : *Bifidobacterium animalis* sbsp *lactis*

BCMO1: β - β -carotène 15,15'-monooxygénase 1

BHT: Butylated hydroxytoluene

C : Coumarine

Cap: Capsaïcine

Car : Caroténoïdes

CGRP: Calcitonin Gene Related Peptide

Chl : Chlorophylle

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CS: Capsaïcine Synthase

DAD: Diode array detector

DHC: Dihydrocapsaïcine

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

E. coli : *Escherichia coli*

E. hirae : *Enterococcus hirae*

EC: Extrait capsaïcinoïdes

ECa : Equivalent de b-carotène

EGa : Equivalent Gallic acid

EP : Extrait phénolique

EQ: Equivalent Quercetin

ESI: Electrospray ionization

EtOH: Ethanol

FIC: Fractional Inhibitory Concentration

FRAP: Ferric Ion Reducing Antioxidant Power

g: Gramme

h : Heure.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂SO₄: Acide sulfurique.

H₃PM₀₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique

HCl: Chlorure d'hydrogène.

HCT116: Human Colon Tumor 116

hn : énergie lumineuse

HOCl : Hypochlorous acid

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

INST : Institut National des Standards et de la Technologie

IR : Infrarouge

K : Kaempférol

K. pneumonia: *Klebsiella pneumoniae*

kg : kilogramme

L : Litre

L. monocytogenes : *Listeria monocytogenes*

Lb. rhamnosus : *Lactobacillus rhamnosus*

LC-MS: Liquid chromatography–mass spectrometry.

LC-MS/MS: Liquid Chromatography Coupled to tandem Mass Spectrometry

LOD: Limit Of Detection

MH : Mueller Hinton

MHB : Mueller Hinton broth

MTBE : Méthyl tert-butyl éther

MeOH : Méthanol

mg : Milligramme

min : Minute

ml : Millilitre

mm : Millimètre

mM : Millimole

Mo₈O₂₃ : Oxyde de molybdène

MP : Macular Pigment

N : Narangine

NK : Natural Killer

nm: Nanomètre

NO : Monoxyde d'azote

NOS: oxyde nitrique synthase ou monoxyde d'azote synthase.

O₂^{•-} : Anion superoxyde.

OH : Ion hydroxyde.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

P. mirabilis : *Proteus mirabilis*

P/V : Poids / Volume.

pAMT : Putatif aminotransférase

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

PDA : Photodiode Array

pH: Potentiel d'hydrogène.

PLE : Pressurized Liquid Extraction

ppm : Particules Par Million.

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

Pun1 : Pungency1

Q : Quercétine

R : Rutine

R•: Radical peroxyde.

RO• : Radical alkoxyde

ROO• : Radicaux peroxyde

ROS: Reactive Oxygen Species.

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

Rt : Temps de Rétention

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S. typhimurium : *Salmonella typhimurium*

SHU : Scoville Heat Unit

SVF: Sérum de veau foetal

Te : Trolox equivalent

TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity

TG : Triglycérides

TPTZ : 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine

U937 : Lignée cellulaire cancéreuse

UFC : Unité Formant Colonie

µL: Microlitre

µm: Micromètre

UV : Ultraviolet

V/V: Volume/Volume

WAT: White adipose tissue

W8O23 : Oxyde de tungstène

Liste des tableaux

Chapitre I : Le piment : Composition et intérêts santé

Tableau 1 :	Production du piment dans le monde (FAO, 2012).....	4
Tableau 2 :	Sources principales de quelques caroténoïdes ayant une importance nutritionnelle (Britton et al., 2009).....	21

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Tableau 3 :	Les conditions d'analyse des capsaïcinoïdes	28
Tableau 4 :	Les conditions d'analyse pour l'optimisation de la phase mobile.....	34

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 5 :	Contenu en capsaïcinoïdes dans le péricarpe, le placenta et les graines du <i>Capsicum annuum</i> ($\mu\text{g/g MS}$).....	54
Tableau 6 :	Capsaïcinoïdes totaux et Unités Scoville du péricarpe, placenta et les graines du piment.....	56
Tableau 7 :	Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux.....	57
Tableau 8 :	Identification et quantification des polyphénols par HPLC-DAD-ESI-MS.....	73
Tableau 9 :	Quantification des caroténoïdes de piment.....	81
Tableau 10 :	Pouvoir antioxydant des polyphénols, caroténoïdes et capsaïcinoïdes du piment...	82
Tableau 11 :	Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus avec les différentes souches.....	87
Tableau 12 :	Concentration minimales inhibitrice (mg/ml) de l'extrait phénolique, capsaïcinoïdes, acide caféique, quercétine et kaempférol.....	94
Tableau 13 :	Etude de la synergie entre la quercétine et le kaempférol contre <i>S. aureus</i>	98
Tableau 14 :	Etude de la synergie entre l'acide caféique et le Kaempférol contre <i>S. aureus</i> ..	100
Tableau 15 :	Etude de la synergie entre l'acide caféique et la quercétine contre <i>S. aureus</i> ...	101
Tableau 16 :	Etude de la synergie entre la quercétine et le kaempférol contre <i>P. aeruginosa</i>	103

Tableau 17 : Etude de la synergie entre l'acide caféique et le kaempférol contre *P.aeruginosa* **105**

Tableau 18 : Etude de la synergie entre l'acide caféique et la quercétine contre *P. aeruginosa* **106**

Liste des figures

Chapitre I : Le piment : Composition et intérêts santé

Figure 1:	Anatomie du fruit de <i>Capsicum</i> (Bosland et Votava, 2000).....	5
Figure 2:	Structure des capsaïcinoïdes (Kehie et al., 2014).....	6
Figure 3:	Structures de la capsaïcine et capsiate (Wahyuni et al., 2013).....	6
Figure 4 :	Caractéristiques physico-chimiques de la capsaïcine (Pegon, 2009).....	7
Figure 5:	Biosynthèse de la capsaïcine (Chayapathy et al., 2006).....	8
Figure 6:	Les principales classes de composés phénoliques (Ferrazzano et al., 2011).....	12
Figure 7:	Quelques stilbènes retrouvés dans les tissus des arbres (Stevanovic et Perrin, 2009)	13
Figure 8:	Structure de base des lignanes (Garcia Pérez, 2012)	13
Figure 9:	benzo-2-pyrone (Muanda, 2010).....	14
Figure 10:	Structure des flavonoïdes (aglycones) et position des principaux substituants (Stoclet et Chini-Kerth, 2011).....	16
Figure 11:	Polyphénols à effets santé (Bennetau-Pelissero, 2014).....	18
Figure 12:	Polyphénols à effet antimicrobien (Daglia, 2012).....	19
Figure 13:	Structure de base des caroténoïdes (Reynaud, 2009).....	22
Figure 14:	Structures chimiques de quelques caroténoïdes (Borel et al., 2005).....	22
Figure 15:	La voie de biosynthèse des caroténoïdes (Bulvestre, 2007).....	23

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Figure 16:	Structure des standards étudiés.....	31
-------------------	--------------------------------------	----

Chapitre III : Résultats et discussion

Figure 17:	Chromatogrammes des capsaïcinoïdes (1 : Capsaïcine, 2 : Dihydrocapsaïcine) avec (A) : Méthanol, (B) : Acétonitrile comme phase mobile.....	45
-------------------	---	----

Figure 18:	Courbe d'étalonnage de (A) : Capsaïcine, (B) : Dihydrocapsaïcine.....	46
Figure 19:	Influence du solvant sur l'extraction de la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine.....	48
Figure 20:	Chromatogrammes de capsaïcinoïdes obtenus avec (A) : Méthanol, (B) : Éthanol, (C) : Acétone, (D) : Isopropanol, (E): Acétate d'éthyle, (F) : Acétonitrile.....	49
Figure 21:	Influence d'addition de différentes concentrations d'eau dans le solvant sur l'extraction des capsaïcinoïdes	50
Figure 22:	Effet de la température sur l'extraction de la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine.....	51
Figure 23:	Les capsaïcinoïdes identifiés par HPLC-DAD-ESI-MS.....	53
Figure 24:	Courbe d'étalonnage de (A) : Acide gallique, (B) : Quercétine.....	58
Figure 25:	Séparation des standards de polyphénols avec (A) : phase mobile A : H ₂ O, phase mobile B : MeOH ; (B) : phase mobile A : H ₂ O, phase mobile B : ACN.....	61
Figure 26:	Séparation des standards de polyphénols avec (A) : phase mobile A : H ₂ O, phase mobile B : ACN ; (B) : phase mobile A : H ₂ O + AF, phase mobile B : ACN+ AF ; (C) : phase mobile A : H ₂ O + AA, phase mobile B : ACN+ AA.....	62
Figure 27:	Séparation des standards de polyphénols avec (A) : C18 15x2.1; 2.7 um ; (B) : C18 15x4.6; 2.7 um ; (C) : RP-Amide C18 15x2.1, 2.7 um.....	65
Figure 28:	Ordre d'élution (A) : C18,15x4.6; 2.7 um, (B) : RP-Amide C18,15x2.1, 2.7 um.....	66
Figure 29:	Séparation des standards phénoliques avec colonne RP-Amide C18 15x2.1, 2.7 um et méthanol comme modificateur organique.....	67
Figure 30:	Le profil phénolique du piment (<i>Capsicum annuum</i> L.) par HPLC-DAD-ESI-MS.....	69
Figure 31:	Courbes d'étalonnage des standards étudiés.....	70
Figure 32:	Courbe d'étalonnage de la daphnétine	75
Figure 33:	Courbe d'étalonnage de la b-carotène.....	76
Figure 34:	Séparation des caroténoïdes de piment par (A) : C18 ; (B) : C30.....	78
Figure 35:	Identification des caroténoïdes par HPLC-DAD-APCI-MS.....	80
Figure 36:	Courbe d'étalonnage de la b-carotène obtenue par HPLC.....	80
Figure 37:	Courbe d'étalonnage de trolox dans le test de DPPH.....	83
Figure 38:	Identification des caroténoïdes par HPLC-DAD-APCI-MS.....	83

Figure 39:	Courbe d'étalonnage de l'acide capsaïcique obtenue par HPLC.....	984
Figure 40:	Isobologramme de la combinaison quercétine-kaempférol contre <i>S. aureus</i>	99
Figure 41:	Isobologramme de la combinaison acide caféique-kaempférol contre <i>S. aureus</i>	100
Figure 42:	Isobologramme de la combinaison acide caféique-quercétine contre <i>S. aureus</i>	102
Figure 43:	Isobologramme de la combinaison quercétine-kaempférol contre <i>P. aeruginosa</i>	104
Figure 44:	Isobologramme de la combinaison acide caféique-kaempférol contre <i>P. aeruginosa</i>	105
Figure 45:	Isobologramme de la combinaison acide caféique-quercétine contre <i>P. aeruginosa</i>	106
Figure 46:	Cytotoxicité des polyphénols (A), capsaïcinoïdes (B) et caroténoïdes (C) du piment....	108

Résumé

Le but de ce travail est la détermination de la composition chimique des principes actifs du piment et l'évaluation de leurs propriétés biologiques. Une méthode LC-MS a été développée et nous a permis d'identifier 19 composés phénoliques où les dérivés de la quercétine sont les plus dominants avec un taux de 113.46 µg/g, suivis des dérivés du kaempférol (30.86 µg/g) et la rutine (18.30 µg/g). En ce qui concerne les capsaïcinoïdes, une méthode d'extraction a été optimisée et cinq capsaïcinoïdes ont été identifiés, dont la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine représentent 59.83% et 33.12%, respectivement. Nos résultats montrent que le placenta est le tissu le plus riche en capsaïcinoïdes, suivi des graines et enfin du péricarpe ; ce qui confirme que les capsaïcinoïdes sont synthétisés dans le placenta. L'analyse qualitative des caroténoïdes du piment a révélé la prédominance de la lutéine qui représente 13.42 µg/g soit 54.40%, suivie de la zéaxanthine (4.32 µg/g, soit 17.53%) et du β-carotène (4.20 µg/g ; soit 17.03%). L'activité antioxydante des trois extraits (polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes) a été évaluée avec les tests suivant : DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (Acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) et FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power). Les résultats obtenus ont révélé que le pouvoir antioxydant des caroténoïdes est plus élevé que celui des polyphénols et des flavonoïdes, selon les tests DPPH (2.78, 0.52 et 0.050 mM Te/g), ABTS (3.379, 0.069 et 0.065 mM Te/g) et FRAP (5.885, 0.109 et 0.094 mMol Fe²⁺ e/g). En ce qui concerne l'activité antimicrobienne, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des substances du piment les plus notables ont été celles de l'acide caféique (0.25 à 2 mg/mL), de la quercétine (0.00195 à 0.5 mg/mL) et du kaempférol (0.0078 à 0.25 mg/ml). La synergie entre ces trois composées phénoliques a été étudiée vis-à-vis d'une souche à gram positif, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, et une autre à gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La meilleure synergie d'effet antimicrobien vis-à-vis de *S. aureus* a été observée avec la combinaison de l'acide caféique et de la quercétine avec un indice de FIC (Fractional Inhibitory Concentration) de l'ordre de 0,37 ; alors que celle vis-à-vis de *P. aeruginosa* l'a été lorsque la quercétine fut combinée au kaempférol (indice de FIC de l'ordre de 0.31). Le potentiel anti-cancéreux des polyphénols, capsaïcinoïdes et des caroténoïdes de piment sur deux lignées cellulaires, PBMCs et U937, a été examiné. L'effet des trois extraits était dose-dépendant, et les caroténoïdes ont manifesté le plus grand pouvoir anti-tumoral avec une diminution de 41.74% des U937 à une dose de 25 µg/mL seulement. Cependant, il est à noter que l'extrait phénolique-affichait le mode d'action le plus sélectif.

Mots clefs : Piment- Composition chimique – Capsaïcinoïdes - Polyphénols- Caroténoïdes -

Activité antioxydante - Activité antimicrobienne - Pouvoir anti-cancéreux.

Abstract

The aim of this study was to determine the chemical composition of pepper and evaluate its biological properties. The profile of polyphenols was determined with a developed LC-MS method, the derivatives of quercetin, kaempferol and rutin (113.46, 30.86 and 18.30 $\mu\text{g/g}$ respectively) were the major compounds. For the study of capsaicinoids, an extraction method was optimized. After identification, it appeared that capsaicin and dihydrocapsaicin represent 59.83% and 33.12% of the total capsaicinoids. The placenta was the major site of capsaicinoids followed by seeds then the pericarp. After identification of carotenoids of peppers, lutein was found to represent 54.40% of total carotenoids (13.42 $\mu\text{g/g}$), Zeaxanthin (17.53%; 4.32 $\mu\text{g/g}$) and b-carotene (17.03%; 4.20 $\mu\text{g/g}$). The antioxidant activity of the three extracts (polyphenols, capsaicinoids and carotenoids) was evaluated with DPPH, ABTS and FRAP tests. According to the results, carotenoids are the most powerful antioxidants compared to polyphenols and capsaicinoids (2.78, 0.052 and 0.050 mM Te/g), (3.379, 0.069 and 0.065 mM Te/g) and (5.885, 0.109 and 0.094 mmol Fe^{2+} e/g) respectively. The antimicrobial activity of the polyphenols, capsaicinoids and the main identified compounds was investigated. Caffeic acid, quercetin and kaempferol were the most actives with MICS values range of (0.25-2 mg/ml), (0.00195-0.5 mg/ml) and (0.0078- 0.25 mg/ml) respectively. In order to see if a possible synergy exists between these phenolic compounds, the FIC index was calculated with a gram positive strain *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P and another gram negative *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The best combination for *S. aureus* was caffeic acid and quercetin (FIC=0.37), quercetin and kaempferol for *P. aeruginosa* (FIC=0.31). The cytotoxicity of the polyphenols, capsaicinoids and carotenoids of pepper was evaluated against PBMCs and U937 cell lines. The carotenoids had the highest antitumoral effect with a decrease of 41.74% of U937 at only a concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$, but the phenolic extract had the most selective effect.

Keywords : Pepper, chemical composition, polyphenols, capsaicinoids, carotenoids, antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity.

Table des matières

Identification et propriétés biologiques des principes actifs du piment

(*Capsicum annuum* L.)

Dédicace

Avant propos

Résumé

ABSTRACT

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Table des matières

Introduction..... 1

Chapitre I : Le piment : Composition et intérêts santé

I.1. Données botaniques sur le piment (<i>Capsicum annuum</i> L.)	3
I.2. Constituants d'intérêt du piment.....	4
I. 2.1. Les capsaïcinoïdes.....	4
I.2.1.1. Structure chimique des différents capsaïcinoïdes.....	5
I.2.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	7
I.2.1.3. Biosynthèse des capsaïcinoïdes	7
I.2.1.3. Intérêts santé des capsaïcinoïdes	8
- Traitement de la douleur.....	9
- Capsaïcinoïdes et cancer.....	9
- Capsaïcinoïdes et perte de poids.....	10

- Capsaïcinoïdes et maladies cardiovasculaires.....	10
I. 2.2. Les polyphénols.....	10
I.2.2.1. Place des polyphénols dans le piment.....	11
I.2.2.2. Différents types de polyphénols	11
- Les acides phénoliques.....	11
- Les stilbènes	12
- Les lignanes	13
- Les coumarines	14
- Les tanins.....	14
- Les flavonoïdes.....	15
I.2.2.3. Propriétés physico-chimiques des polyphénols.....	16
I.2.2.3. Intérêts santé.....	17
- Propriétés antioxydantes.....	17
- Propriétés antimicrobiennes.....	18
- Polyphénols et maladies cardiovasculaires	19
- Polyphénols et cancer.....	20
I.2.3. Les caroténoïdes.....	20
I.2.3.1. Structure chimique.....	22
I.2.3.2. Biosynthèse des caroténoïdes.....	23
I.2.3.3. Propriétés physico-chimiques.....	23
I.2.3.4. Intérêts santé.....	24
- Caroténoïdes et vision.....	24
- Caroténoïdes, activité anti-radicalaire et système antioxydant.....	25
- Caroténoïdes et cancer	26
- Caroténoïdes et système immunitaire.....	26

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1. Méthodes d'étude des capsaïcinoïdes.....	27
II.1. 1. Solvants et standards.....	27
II.1. 2. Préparation des standards et des courbes d'étalonnage.....	27
II.1. 3. Sélection de la phase mobile.....	27
II.1. 4. Optimisation de l'extraction des capsaïcinoïdes.....	27
II.1. 4.1. Sélection du solvant d'extraction.....	28
II.1. 4.2. Effet de l'eau dans le solvant.....	28
II.1. 4.3. Sélection de la température.....	29
II.1. 4.4. Sélection du temps	29
II.1. 5. Identification et quantification des capsaïcinoïdes	29
II.1. 6. Rendement.....	29
II.2. Méthodes d'étude des polyphénols de piment.....	30
II.2.1.2. Solvants et standards.....	30
II.2.2. Extraction et dosage colorimétrique des polyphénols et des flavonoïdes.....	32
II.2.2.1. Extraction des polyphénols.....	32
II.2.2.2. Dosage colorimétrique des polyphénols totaux.....	32
II.2.2.3. Dosage colorimétrique des flavonoïdes totaux.....	33
II.2.3. Optimisation des conditions chromatographiques.....	33
II.2.3.1. Appareil HPLC.....	33
II.2.3.2. La phase mobile.....	34
II.2.3.3. La phase stationnaire.....	35
II.2.3.4. Gradient d'élution.....	35
II.2.4. Identification des polyphénols par HPLC-DAD-ESI-MS.....	35
II.2.5. Quantification des polyphénols.....	35
II.2.5. Rendement	36

II.3. Méthodes d'étude des caroténoïdes.....	36
II.3.1. Solvants et standards.....	36
II.3.2. Extraction des caroténoïdes.....	36
II.3.3. Dosage colorimétrique des caroténoïdes totaux.....	37
II.3.4. Sélection de la phase stationnaire.....	37
II.3.5. Identification et quantification des caroténoïdes par HPLC-DAD-APCI-MS....	37
II.3.6. Rendement.....	38
II.4. Méthodes d'étude des propriétés biologiques des extraits de piment.....	38
II.4.1. Détermination du potentiel antioxydant des extraits de piment.....	38
II.4.1. 1. Test de réduction du radical stable DPPH°.....	38
II.4.1. 2. Test de réduction du radical-cation (ABTS ^{•+} ou TEAC).....	39
II.4.1. 3. Test de réduction du fer (FRAP)	39
II.4.2. Mise en évidence et détermination de l'activité antimicrobienne des extraits de piment.....	40
II.4.2. 1. Nature et origine des souches testées.....	40
- Les souches bénéfiques.....	40
- Les souches pathogènes	40
II.4.2. 2. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur milieu gélose.....	40
II.4.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	41
II.5.2.4. Etude de la synergie d'action des substances actives contenues dans les extraits de piment.....	41
II.4.3. Détermination de la cytotoxicité des extraits de piment.....	42
II.4.3. 1. Les lignés cellulaires utilisées.....	42
II.4.3. 2. Evaluation de la toxicité.....	43
II.5. Traitement statistique des résultats	43

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Résultats de l'approche analytique des capsaïcinoïdes.....	44
III.1.1. Observations liées au choix de la phase mobile.....	44
III.1. 2. Courbes d'étalonnage des capsaïcinoïdes.....	46
III.1.3.Optimisation de l'extraction des capsaïcinoïdes de piment.....	47
III.1.3.1. Influence de la nature du solvant d'extraction.....	47
III.1. 3. 2. Influence de la présence d'eau dans le solvant d'extraction.....	48
III.1. 3. 3. Influence de la température sur l'extraction des capsaïcinoïdes.....	51
III.1. 3. 3. Effet du temps d'extraction.....	52
III.1.4. Identification et quantification des capsaïcinoïdes par HPLC-DAD-ESI-MS....	52
III.1.5. Calcul du rendement de l'extraction.....	57
III.2. Analyse des polyphénols de piment.....	57
III.2.1. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux du piment évalués par colorimétrie	57
III.2.2. Optimisation des conditions chromatographiques.....	59
III.2.2.1. Choix de la phase mobile.....	59
III.2.2.2. Phase stationnaire	63
III.2.3. Identification et quantification des polyphénols de piment.....	68
III.2.4. Rendement.....	75
III.3. Analyse des caroténoïdes de piment.....	76
III.3. 1. Teneur en caroténoïdes totaux du piment.....	76
III.3. 2. Choix de la phase stationnaire.....	77
III.3.3. Résultats d'identification et de quantification des caroténoïdes par HPLC- DAD- APCI-MS.....	79
III.3.4. Rendement d'extraction des caroténoïdes.....	81
III.4. Propriétés biologiques des substances d'intérêt (polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes) du piment.....	81

III.4.1. Activité antioxydante.....	81
III.4.2. Activité antimicrobienne.....	85
III.4.2.1. Diamètres des zones d'inhibition.....	85
III.4.2.2. Concentration minimale d'inhibition.....	93
III.4.2.3. Effets synergiques entre les composés phénoliques.....	96
III.4.2.3. 1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.....	98
- Quercétine et Kaempférol	98
- Acide caféique et Kaempférol	99
- Acide caféique et Quercétine	101
III.4.2.3. 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	102
- Quercétine et Kaempférol	102
- Acide caféique et Kaempférol	104
- Acide caféique et Quercétine	106
III.4.3. Cytotoxicité des constituants d'intérêt du piment (polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes) vis-à-vis des cellules cancéreuses.....	107
Conclusion.....	113
Références bibliographiques.....	115
Publication	

Introduction

Introduction

Au cours des dernières années, beaucoup de recherches ont été menées sur les substances naturelles en vue d'exploiter leurs propriétés biologiques dans des domaines divers tels que l'industrie pharmaceutique, agro-alimentaire ou encore cosmétique. Ces efforts de recherche ont été déployés pour répondre à la méfiance, de plus en plus grandissante, des consommateurs vis-à-vis des molécules de synthèse chimique utilisées à l'échelle industrielle par les acteurs de ces filières.

Les plantes constituent une source très riche en molécules bioactives dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Parmi ces substances naturelles, les métabolites secondaires comme les composés phénoliques, les alcaloïdes et les caroténoïdes sont connus pour leurs bienfaits sur la santé.

Parmi ces plantes il y a le piment qui appartient au genre *Capsicum* et à la famille des Solanacées. Ce genre comporte plus de 200 variétés regroupées en plus de 30 espèces, dont cinq sont domestiqués: *C. pubescens*, *C. baccatum*, *C. annum*, *C. chinense* et *C. frutescens* (Lopez-Hernandez et al., 1996; González-Zamora et al., 2015).

Plusieurs peuples anciens utilisaient traditionnellement le piment, probablement en raison des bénéfices santé qu'ils pouvaient en tirer. En effet, le piment joue plusieurs rôles importants dans la santé de l'être humain. De nos jours, les divers composés du piment (acide ascorbique, caroténoïdes, tocophérols, flavonoïdes et capsaïcinoïdes) sont utilisés comme remède thérapeutique, arôme alimentaire ou agent colorant. Ce fruit est utilisé soit à l'état frais, soit après une transformation lui permettant une plus longue conservation (Marti et al., 2011).

Le développement de nouveaux outils analytiques comme les techniques chromatographiques et la spectrométrie de masse a permis une meilleure connaissance de la composition des plantes et a facilité l'identification et la quantification des molécules bioactives qu'elles renferment, afin d'explorer leurs propriétés biologiques. La caractérisation de nouvelles molécules bioactives fait intervenir plusieurs processus longs et coûteux ; et dont les 3 principales étapes sont l'extraction, le fractionnement et l'identification

des composés d'intérêt ; toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques. Chacune de ces étapes rencontre des défis techniques, liés d'une part à la faible concentration des molécules recherchées, et d'autre part à la complexité du mélange.

L'objectif de cette thèse est d'identifier les substances actives du piment (*Capsicum annuum* L.) appartenant à la famille des polyphénols, caroténoïdes et des capsaïcinoïdes et l'évaluation de leurs potentielles propriétés biologiques.

Dans un premier temps, une méthode d'extraction des capsaïcinoïdes a été optimisée, avant qu'ils soient identifiés et quantifiés dans chaque tissu du piment par des méthodes chromatographiques. Dans un deuxième temps, une méthode a été développée pour la séparation et l'identification des composés phénoliques avec LC-MS. Cette méthode nous a permis l'identification et la quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes du piment. Une autre famille importante de métabolites secondaires est représentée par les caroténoïdes qui sont dotés d'une grande activité antioxydante. Les caroténoïdes du piment ont été, également identifiés et quantifiés. Dans un troisième temps, les propriétés biologiques de ces trois familles ont été étudiées.

La première partie de cette thèse présente une revue de la littérature sur la structure, les propriétés chimiques et biologiques des capsaïcinoïdes, polyphénols et des caroténoïdes. La seconde partie décrit les techniques expérimentales utilisées au cours de ce travail. Enfin, les résultats obtenus au cours de cette thèse sont présentés et discutés dans la troisième partie.

Chapitre I : Le piment :
Composition et intérêts santé

Chapitre I : Le piment : Composition et intérêts santé

I.1. Données botaniques sur le piment (*Capsicum annuum* L.)

Le piment (*Capsicum*) appartient à la famille des solanacées, laquelle inclue beaucoup de plantes à grand intérêt économique tels que les tomates, la pomme de terre et les aubergines (Coon, 2003 ; González-Zamora et al., 2015 ; Romero-Castillo et al., 2015). C'est un fruit tropical originaire de l'Amérique (Sud et Centrale), puis disséminé en Europe, en Afrique et en Asie (Menichini et al., 2009 ; Zimmer et al., 2012).

Il comporte plus de 200 variétés regroupées en plus de 30 espèces, dont cinq sont domestiqués: *C. pubescens*, *C. baccatum*, *C. annuum*, *C. chinense* et *C. frutescens* (Lopez-Hernandez et al., 1996; González-Zamora et al., 2015). *Capsicum annuum* est l'espèce la plus cultivée dans le monde, elle comporte beaucoup de variétés allant des plus douces aux plus fortes (Kumar et al., 2009).

Cette espèce est cultivée principalement dans les états du sud des États-Unis (notamment la Californie), le sud de l'Europe (plus particulièrement la Hongrie, l'Espagne, l'Italie, l'ex-Yougoslavie, la Bulgarie et la Roumanie), ainsi que le Nord d'Afrique, l'Amérique centrale et le Brésil (Lefebvre et al., 2002; Teuscher et al., 2005).

Règne: Plantae

Division: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Solanales

Genre : *Capsicum* (De, 2003)

Dans le monde entier, la consommation des fruits de *Capsicum*, qui sont probablement classés parmi les premiers épices ou additifs alimentaires, ne cesse d'augmenter (Kouassi et Koffi-Nevry, 2012). L'Algérie est classé neuvième au niveau mondial dans la production de piment avec 426566 milliers de tonnes (MT) en 2012 (FAO, 2015) (tableau 1).

Tableau 1 : Production du piment dans le monde (FAO, 2015).

Position	Pays	Production en milliers de dollars américains (1000\$)	Production en milliers de tonnes (MT)
1	Chine	7532128	1600000000
2	Mexique	1120279	2379736
3	Turquie	975472	2072132
4	Indonésie	779864	1656615
5	États-Unis d'Amérique	501263	1064800
6	Espagne	481914	1023700
7	Égypte	306018	650054
8	Nigéria	235379	500000
9	Algérie	200809	426566
10	Éthiopie	198296	402109
11	Tunisie	175483	372768
12	Pays-Bas	162411	345000
13	République de Corée	142175	302015
14	Palestine	113347	240776
15	Roumanie	97480	207072
16	Italie	90080	191351
17	Ukraine	89302	189700
18	Maroc	85014	180591
19	Grèce	79040	167900
20	Macédoine	78262	166247

I.2. Constituants d'intérêt du piment

I. 2.1. Les capsaïcinoïdes

Le goût piquant du piment est dû à un groupe de vanillyl amides connues sous le nom de capsaïcinoïdes, et parmi lesquelles la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine sont prédominantes (plus de 90% des capsaïcinoïdes totaux); alors que la nordihydrocapsaïcine, l'homodihydrocapsaïcine, et l'homocapsaïcine sont en faibles concentrations (Perkins *et al.*, 2002 ; Wahyuni *et al.*, 2013 ; Schneider *et al.*, 2014). Ces

alcaloïdes, responsables de la sensation de brûlure, n'existent dans aucune autre famille de plantes (Jolicoeur, 2001 ; Tewksbury *et al.*, 2006). Les capsaïcinoïdes sont synthétisés par des structures situées à la jonction du placenta (partie blanche supportant les graines au centre du fruit) et de la paroi de la gousse (fig.1) (Estrada *et al.*, 2002; Cisneros-Pineda *et al.*, 2007; Tewksbury *et al.*, 2008).

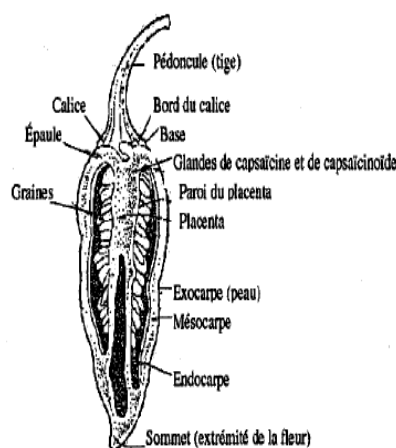


Figure 1: Anatomie du fruit de *Capsicum* (Bosland et Votava, 2000).

Bosland et Votava (2000) rapportent que le niveau d'âcreté des piments dépend de la génétique de la plante et des facteurs environnementaux. La concentration de capsaïcine change selon la variété de piment, l'origine géographique et les conditions climatiques sous lesquelles les piments sont cultivés. La capsaïcine est aussi disponible sous forme synthétique (Jolicoeur, 2001; Garcs-Claver *et al.*, 2007).

I.2.1.1. Structure chimique des différents capsaïcinoïdes

La capsaïcine est le principe actif principal présent dans le fruit de plusieurs variétés de *Capsicum* : poivron, paprika, chili, piment fort, etc.... (Bosland et Votava, 2000). C'est une amide de formule : 8-méthyle N-vanillyle 6-nonénamide qui appartient à la famille des capsaïcinoïdes, des alcaloïdes responsables de la saveur piquante des piments forts (fig. 2) (De, 2003; Ornelas-Paza *et al.*, 2010 ; Ricard *et al.*, 2013). Toute variation dans la structure chimique des capsaïcinoïdes, y compris la structure du fragment acyle, affecte le degré et le niveau de l'âcreté (Wang, 2011 ; Wahyuni *et al.*, 2013).

La plupart des capsaïcinoïdes sont piquants, mais il existe aussi des substances non piquantes comme l' ω -hydroxycapsaïcine (Ochi *et al.*, 2003; Wahyuni *et al.*, 2013). En

outre, un autre groupe de capsaïcinoïdes, non piquants, nommés capsinoïdes, a été retrouvé dans le piment doux *C. annuum* CH-19 (Kobata *et al.*, 1998).

compound	typical relative amount	scoville heat units (SHU)	chemical structure
capsaicin	69%	15,000,000	
dihydrocapsaicin	22%	15,000,000	
nordihydrocapsaicin	7%	9,100,000	
homodihydrocapsaicin	1%	8,600,000	
homocapsaicin	1%	8,600,000	
ω -hydroxycapsaicin	---	---	
capsiate	---	---	
dihydrocapsiate	---	---	
nordihydrocapsiate	---	---	

Figure 2 : Structure des capsaïcinoïdes (Kehie *et al.*, 2014).

Les capsinoïdes ont la même structure que les capsaïcinoïdes, sauf qu'ils ont un ester à la place de la fonction amide (fig.3). Selon la structure de leur fragment d'acide gras, ces analogues ont été classés en capsiate, dihydrocapsiate et nordihydrocapsiate (Eich, 2008).

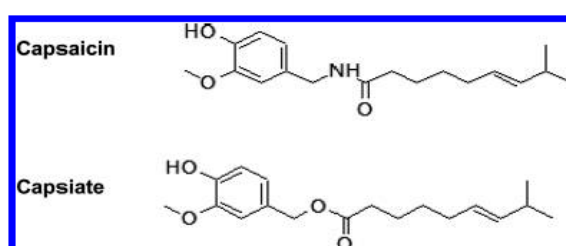


Figure 3 : Structure de la capsaïcine et du capsiate (Wahyuni *et al.*, 2013).

La production des capsinoïdes à la place des capsaïcinoïdes chez la variété de piment CH-19 est due à une mutation au niveau du gène putatif aminotransférase (pAMT) qui induit la perte de sa fonction de catalyseur de la formation de vanillylamine à partir de vanilline dans la voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes (Lang *et al.*, 2009).

I.2.1.2. Propriétés physico-chimiques

Les capsaïcinoïdes sont solubles dans les solvants organiques polaires comme le chloroforme, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le chlorure de méthylène, le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile et autres (fig.4) (Duarte et al., 2004; Santamaria et al., 2000 ; Juangsamoot et al., 2012).

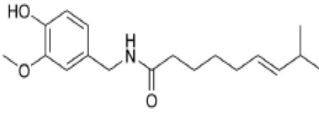
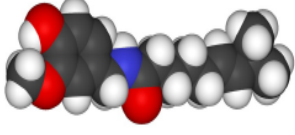
Capsaïcine	
Structure	 
Nom IUPAC	8-Methyl-N-vanillyl-trans-6-nonenamide
Formule brute	$C_{18}H_{27}NO_3$
Masse molaire	305,412613 g/mol
Température de fusion	62 - 65 °C
Température de vaporisation	210 - 220 °C
Solubilité	Faiblement soluble dans l'eau. Soluble dans l'alcool, l'éther, le benzène et le chloroforme.

Figure 4: Caractéristiques physico-chimiques de la capsaïcine (Pegon, 2009).

La capsaïcine est une substance cristalline, non volatile, incolore et inodore d'une masse moléculaire de 305,46 g/mol et une température de fusion de 62 à 65 °C (Reyes-Escogido et al., 2011). En raison de la présence de la chaîne latérale hydrophobe, la capsaïcine est lipophile, et par conséquent, très soluble dans la graisse, l'huile et l'alcool (Reyes-Escogido et al., 2011 ; Amruthraj et al., 2015). Cette molécule a un spectre d'absorption maximale à 230 et 280 nm (Chen et al., 2013).

I.2.1.3. Biosynthèse des capsaïcinoïdes

Les capsaïcinoïdes sont synthétisées au sein du placenta du fruit par une condensation enzymatique de la vanillylamine et des acides gras à chaîne moyenne (Fig. 5) (Curry et al., 1999 ; Mazourek et al., 2009). La concentration de capsaïcine augmente

progressivement au cours du développement du fruit atteignant des niveaux maximaux au bout de 40 à 50 jours (Contreras-Padilla et Yahia, 1998 ; Reyes-Escogido et al., 2011) ; après quoi, elle a tendance à se dégrader en composés secondaires sous l'action de la peroxydase (Bernal et Ros Barceló, 1996). Le locus Pun1 code pour l'enzyme acyltransférase AT3. Les piments forts (piquants) ont un allèle de capsaïcine synthase (CS) fonctionnel (Pun1), tandis que pour les piments doux (non piquants), une délétion au niveau du promoteur de l'allèle prédominant pun1-1 et du premier intron du gène AT3 supprime la biosynthèse de la capsaïcine (Stewart et al., 2005 ; Lee et al., 2005).

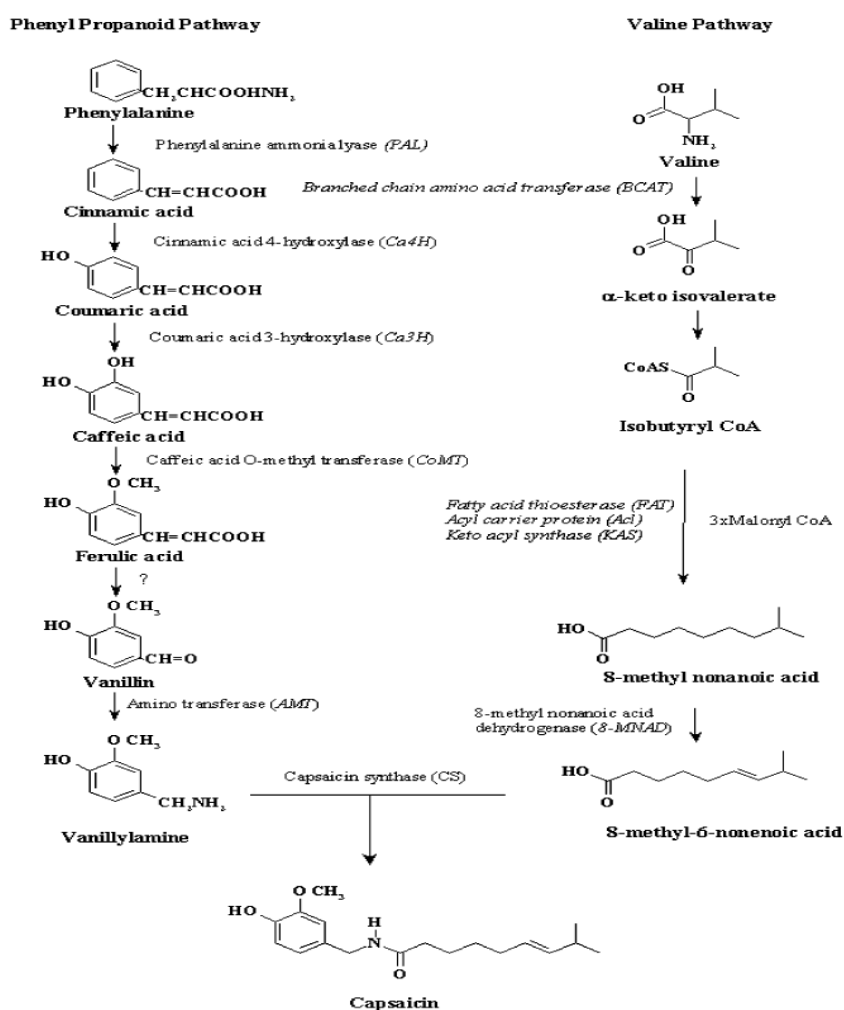


Figure 5: Biosynthèse de la capsaïcine (Prasad et al., 2006).

I.2.1.3. Intérêts santé des capsaïcinoïdes

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

- Traitement de la douleur

Le capsaïcinoïde le plus étudié pour le soulagement de la douleur est la capsaïcine. Il a été démontré que l'utilisation de la capsaïcine par voie orale ou locale peut réduire la chaleur des inflammations et les douleurs de la polyarthrite rhumatoïde ou la fibromyalgie (Fraenkel et al., 2004 ; Luo et al., 2011). En outre, la capsaïcine procure un soulagement de l'arthrose (De Silva et al., 2011).

L'industrie pharmaceutique commercialise la capsaïcine (ajoutée à une concentration égale ou inférieure à 0,075%) comme un baume pour une application externe afin de calmer la douleur des muscles endoloris (Knotkova et al., 2008). La capsaïcine est également utilisée pour des études neuropharmacologiques concernant le traitement de la douleur et pour la thermorégulation. Les crèmes contenant de la capsaïcine peuvent aussi aider à réduire la douleur post-opératoire pour les patients ayant subi une mastectomie (Zachariah et al., 2008 ; Wahyuni et al., 2013 ; Zis et al., 2014).

- Capsaïcinoïdes et cancer

L'activité anticancéreuse de capsaïcinoïdes (capsaïcine et dihydrocapsaïcine) a été signalée ces dernières années (Surh, 2002). Les capsaïcinoïdes ont exercé une bonne activité anti-tumorale non seulement "in vitro" mais aussi "in vivo". Dans des cultures cellulaires, la capsaïcine a été capable de bloquer la migration des cellules cancéreuses du sein et de tuer celles de la prostate ; alors que la dihydrocapsaïcine a induit l'autophagie dans les cellules cancéreuses du côlon humain HCT116 (Oh et al., 2008; Thoennissen et al., 2010; Yang et al., 2010; Luo et al., 2011).

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 (Tuoya et al., 2006 ; Lau et al., 2014), de prostate (Jankovic et al., 2010), de l'hépatocarcinome (Jung et al., 2001), de gliome (Qiao et al., 2005), de la leucémie (Tsou et al., 2006 ; Jin et al., 2014) et celles du carcinome épidermoïde de l'œsophage (Wu et al., 2006). Cependant, le mécanisme par lequel la capsaïcine induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses est encore mal connu (Sanchez et al., 2007).

- Capsaïcinoïdes et perte de poids

Plusieurs études ont montré que la capsaïcine retarde la prise de poids corporel chez le rat par l'augmentation de la thermogénèse dans le tissu adipeux blanc grâce à l'amélioration de la sécrétion de catécholamines, la stimulation de la lipomobilisation, l'abaissement de la triglycéridémie, et la réduction de la consommation d'énergie en augmentant l'activité du système nerveux sympathique, plutôt que l'aversion gustative (Joo *et al.*, 2010; Mun *et al.*, 2014).

Dans une autre étude, la capsaïcine administrée en capsules à des sujets présentant une surcharge pondérale modérée a aidé à augmenter leur satiété ainsi qu'à diminuer leurs apports caloriques et de matière grasse (Westerterp-Plantenga. *et al.*, 2005 ; Borys *et al.*, 2012). Selon Date *et al.* (2002), l'administration de la capsaïcine favoriserait la perte de poids en réduisant la sécrétion d'une hormone orexigène, la ghréline.

- Capsaïcinoïdes et maladies cardiovasculaires

La maladie coronarienne, l'infarctus du myocarde, l'hypertension et l'athérosclérose sont les principales maladies cardiovasculaires représentant une menace potentielle pour la santé humaine. Il a été rapporté que les capsaïcinoïdes ont des effets bénéfiques potentiels sur le système cardiovasculaire (Harada et Okajima, 2009; Peng et Li, 2010). Il est bien connu que le système cardiovasculaire 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 tels que le peptide relié au gène calcitonine (CGRP) et substance P (SP) (Zvara *et al.*, 2006 ; Peng et Li, 2010).

Par ailleurs, la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine inhibent l'agrégation plaquettaire et l'activité des facteurs de coagulation VIII et IX (Adams *et al.*, 2009), une propriété qui peut contribuer à la prévention de l'apparition et / ou la réduction de l'incidence des maladies cardio-vasculaires (Luo *et al.*, 2011) .

I. 2.2. Les polyphénols

Les plantes sont connues pour produire un grand nombre de composés à faible poids moléculaire dont la structure ne fut que récemment déterminée ; et ceci malgré leur

exploitation et leur utilisation ancestrale, comme médicaments ou aliments (Garcia- Pérez, 2008). Parmi ces molécules on a les polyphénols, qui sont un groupe de composés phytochimiques, présents en grande quantité dans les fruits, les légumes et les produits naturels (Vauzour, 2014).

L'expression « composés phénoliques » est utilisée pour toute substance chimique possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (–OH) (Bloor, 2001, Bennetau-Pelissero, 2014).

I.2.2.1. Place des polyphénols dans le piment

Jusqu'à présent, la plupart des études réalisées sur le piment ont été consacrées à l'analyse des capsaïcinoïdes, qui sont responsables de l'âcreté de ce fruit, mais peu de recherches ont été menées sur le profil phénolique.

Plusieurs auteurs ont rapporté que le piment est une source très riche en polyphénols (Marin et al., 2004 ; Materska et Perucka, 2005 ; Wahyuni et al., 2011 ; Materska, 2014). Parmi ces composées, les acides hydroxycinnamiques (acide trans-ferulique et trans-sinapique) et les flavonoïdes (quercétine, lutéoline et apigénine sous leurs formes glycosides) sont les plus représentés (Marin et al., 2004 ; Materska et Perucka, 2005). Le contenu en polyphénols varie selon la variété et la maturité du piment. Le taux des flavonoïdes varie de 1 à 852 mg/kg dans les différents types de piment en fonction des facteurs génétiques de la plante et des conditions environnementales (Lee et al., 1995).

I.2.2.2. Différents types de polyphénols

Il existe plus de 8000 composés phénoliques classés en plusieurs classes dont les plus représentatives sont celles des acides phénoliques et des flavonoïdes (fig.6) (Robards et al., 1999).

- Les acides phénoliques

Les acides phénoliques les plus courants ne sont pas présents dans les plantes à l'état libre, mais plutôt sous forme d'esters de glucose, d'acide tartrique ou d'acide

quinique (Herrmann, 1989 ; Vauzour, 2014). L'acide caféique est l'acide phénolique le plus abondant et existe principalement sous forme d'ester quinique (e.g. acide chlorogénique) que l'on retrouve principalement dans les myrtilles, les kiwis, les prunes, les pommes et le café (Macheix et Fleuriet, 1998; Manach *et al.*, 2004; Grigoras, 2012; Vauzour, 2014).

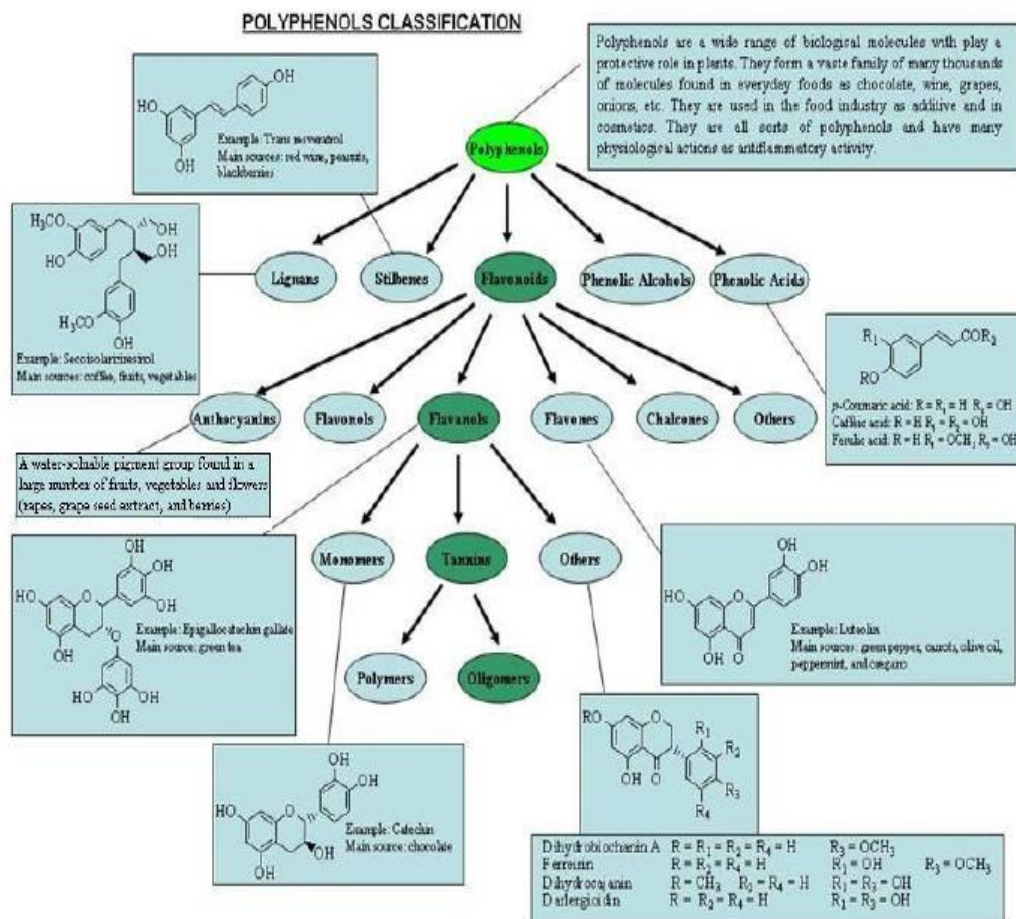


Figure 6 : Les principales classes de composés phénoliques (Ferrazzano *et al.*, 2011).

- Les stilbènes

Les stilbènes sont synthétisés par l'addition de 1 à 3 molécules de malonyl-CoA aux acides cinnamiques, qui dérivent de la voie de biosynthèse des phénylpropanes. La forme monomère stilbène est, par définition, le 1,2-diphényléthène. Les stilbènes, quant à eux, représentent les dérivés hydroxylés ou autres du stilbène et sont fréquemment retrouvés dans les plantes. Le regroupement des stilbènes avec les bibenzyles, qui ont aussi

un squelette C6-C2-C6, forme la famille des stilbénoides (fig.7) (Shibutani *et al.*, 2004; Stevanovic et Perrin, 2009; Vauzour, 2014).

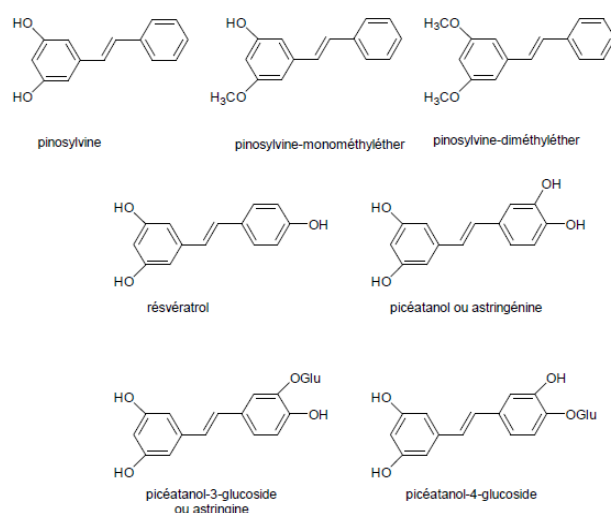


Figure 7 : Quelques stilbènes retrouvés dans les tissus des arbres (Stevanovic et Perrin, 2009).

- Les lignanes

Ces composés de haut poids moléculaire contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation (co-polymérisation) de trois alcools phénylpropéniques (fig.8) (Nkhili, 2009).

Leur synthèse est contrôlée enzymatiquement et donne des liaisons différentes entre les carbones des chaînes propane. Lorsque les unités phénylpropane sont liées par des liaisons C-C au niveau des positions 8 et 8', le composé est considéré comme un lignane, alors que si ces derniers sont liés autrement que par les liaisons C-C 8- 8', il s'agit d'un néolignane (Moss, 2000). Ainsi, on trouve des néolignanes contenant les liaisons 8-O-4', 3-O-4' (oxynéolignanes), 3-3', 8-3', 1-3' etc, (Moss, 2000 ; Garcia-Pérez, 2008).

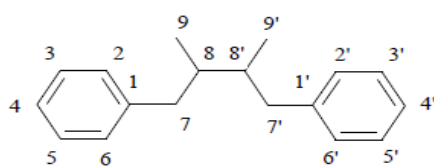


Figure 8 : Structure de base des lignanes (Garcia-Pérez, 2008).

- Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (fig.9). Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes.

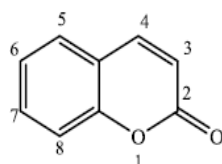


Figure 9 : benzo-2-pyrone (Muanda, 2010).

Dans les plantes, on les rencontre chez les Apiacées, les Astéracées, les Fabacées, les Rosacées, les Rubiacées, les Rutacées et les Solanacées. Du point de vue structural, ils sont classés en coumarines simples avec des substituants sur le cycle du benzène, furanocoumarines, pyranocoumarines, et en coumarines substitués en position 3 et/ou 4. Le dernier groupe serait celui des dimères (Sakagami *et al.*, 2005 ; Muanda, 2010).

- Les tanins

Ils représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse et concise car il n'y a pas de structure chimique de base. Leur structure chimique est, en effet, variable, et ils sont rassemblés en famille en fonction d'activités communes. De ce fait, toute classification chimique des tanins est forcément arbitraire (Nkhili, 2009). Cependant, on se réfère souvent à une distinction entre tanins hydrolysables et tanins condensés.

- Tanins hydrolysables : ils sont constitués par une molécule de sucre (le glucose le plus souvent) estérifiée par l'acide gallique ou l'un de ses dérivés (acide ellagique, chébulique ou valonique). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.
- Tanins condensés : ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines). Ils sont aussi désignés aussi sous le nom de « tanins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides.

- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés polyphénoliques les plus abondants contenus dans les végétaux. Leur structure comprend un squelette composé de deux cycles aromatiques (A et B) porteurs de plusieurs fonctions phénol et réunis par une chaîne de trois atomes de carbone ; ces derniers étant le plus souvent engagés dans un hétérocycle avec un atome d'oxygène (Stoclet et Schini-Kerth, 2011).

Il existe dans les aliments plusieurs centaines de polyphénols (plus de 500 y ont été caractérisés aujourd'hui), principalement des flavonoïdes (Scalbert et Williamson, 2000 ; Manach *et al.*, 2004 ; Stoclet et Schini-Kerth, 2011). Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes. Dans les aliments, ils sont souvent présents sous forme d'hétérosides (Guignard, 1996).

Selon le nombre, la position et la nature des substituants des deux cycles aromatiques et du degré d'oxydation et de substitution de la position 3 du cycle C, on distingue six sous-groupes de flavonoïdes (fig.10) :

- Les flavonols (par ex. kaempférol, quercétine), qui sont abondants dans les oignons, les poireaux et le brocoli.
- Les flavones (par ex. apigénine, lutéoline), qui sont retrouvés dans le persil et le céleri
- Les isoflavones (par ex. daidzéine, génistéine), majoritaires dans les produits issus du soja
- Les flavanones (par ex. hespéretine, naringénine), qui sont particulièrement abondants dans les agrumes et les tomates
- Les flavanols (par ex. (+)-catéchine, (-)-épicatéchin, épigallocatechine, épigallocatechine gallate (EGCG), qui sont retrouvés dans le thé vert, le vin rouge, le chocolat
- Les anthocyanes (par ex. pélargonidine, cyanidine, malvidine), dont les sources incluent le vin rouge et les baies.

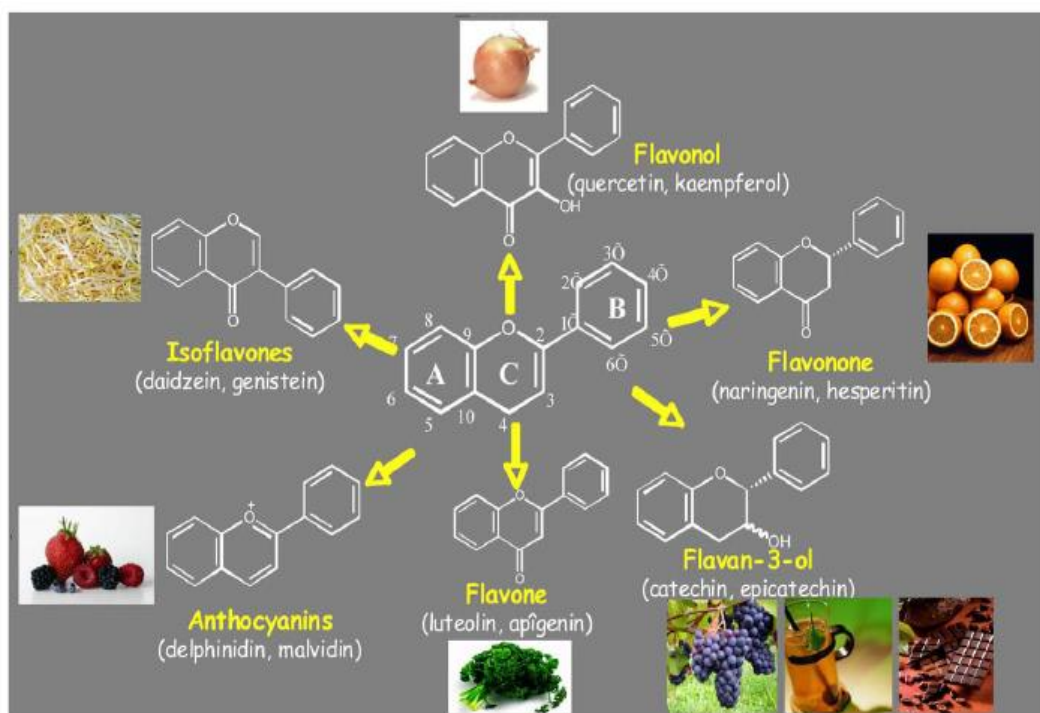


Figure 10 : Structure des flavonoïdes (aglycones) et position des principaux substituants (Stoclet et Schini-Kerth, 2011).

I.2.2.3. Propriétés physico-chimiques des polyphénols

Comme l'ensemble des dérivés hydroxylés, les phénols sont des molécules associées par des liaisons hydrogène, donc peu volatiles (Simirgiotis et Schmeda-Hirschmann, 2010 ; Petigny *et al.*, 2014). Les groupements OH en position para et ortho des noyaux phénoliques de polyphénols présentent un caractère acide renforcé, ce qui permet une dissociation au moins partielle à pH neutre. Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques, particulièrement des substituants à effet mésomère attracteur d'électrons (-M) et substituants à effet mésomère donneur (+M) (Dangles, 1999).

La solubilité des flavonoïdes dans l'eau et dans des solvants très apolaires est faible et dépendante du pH. En effet, à un pH 1.5, la solubilité dans l'eau de l'hesperitine et de la naringénine est respectivement de 6 et de 25 mg/L, alors qu'à un pH 8 la solubilité est quatre fois plus élevée. D'autre part, la solubilité de la rutine, de la naringine et de la quercétine dans l'eau à 20°C est respectivement de l'ordre de 125 mg/L, 0,5 g/L et < 10

mg/L (13, 14). Benavente-Garcia *et al.* (2001) ont évalué la solubilité de la néohesperidine dihydrochalcone dans différents mélanges eau/éthanol. La solubilité de ce composé à 20°C dans l'eau, l'éthanol et le mélange eau/éthanol (1/1) est respectivement de 0,4 g/L, 12 g/L et 123 g/L (Anthoni, 2007).

Les acides phénoliques sont généralement caractérisés par des maximums d'absorption entre 254-320 nm. Par exemple, l'acide vanillique et anisique peuvent être détectés à 254 nm, l'acide gallique et syringique à 275 nm, l'acide salicylique à 305 nm tandis que les acides chlorogénique, caféique, gentisique, sinapique, p-coumarique, férulique et rosmarinique sont caractérisés par une absorption maximale à 320 nm (Wen *et al.*, 2005 ; Garcia-Perez, 2008). Les spectres UV des flavonoïdes permettent d'observer deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300-395 nm) due à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau B) du flavonoïde et de la bande II (240-280 nm) qui est associée à l'absorption de la partie benzoyle (Harborne *et Williams*, 2000).

La lumière, le pH, la température, la nature du solvant, la présence d'enzyme, d'ion métallique et d'oxydant ont été décrits comme des paramètres influençant la stabilité des polyphénols (Anthoni, 2007).

I.2.2.3. Intérêts santé des polyphénols

Les composés phénoliques sont dotés d'un grand nombre de propriétés biologiques qui sont exploitées dans de nombreux domaines thérapeutiques et pharmaceutiques (fig.11).

- Propriétés antioxydantes

Historiquement, les actions biologiques des polyphénols ont été attribuées à leurs propriétés antioxydantes, que ce soit par leur capacité réductrice intrinsèque ou par leur influence sur le statut redox intracellulaire (Visioli *et al.*, 1998 ; Halliwell, 2006). Les polyphénols, et, en particulier, les flavonoïdes sont d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène (O_2^* , HO^* , NO^* , H_2O_2 , $HOCl$, RO^* et ROO^*) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN). Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien

direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives. Les radicaux libres seraient aussi impliqués dans le processus de vieillissement (Quideau *et al.*, 2011).

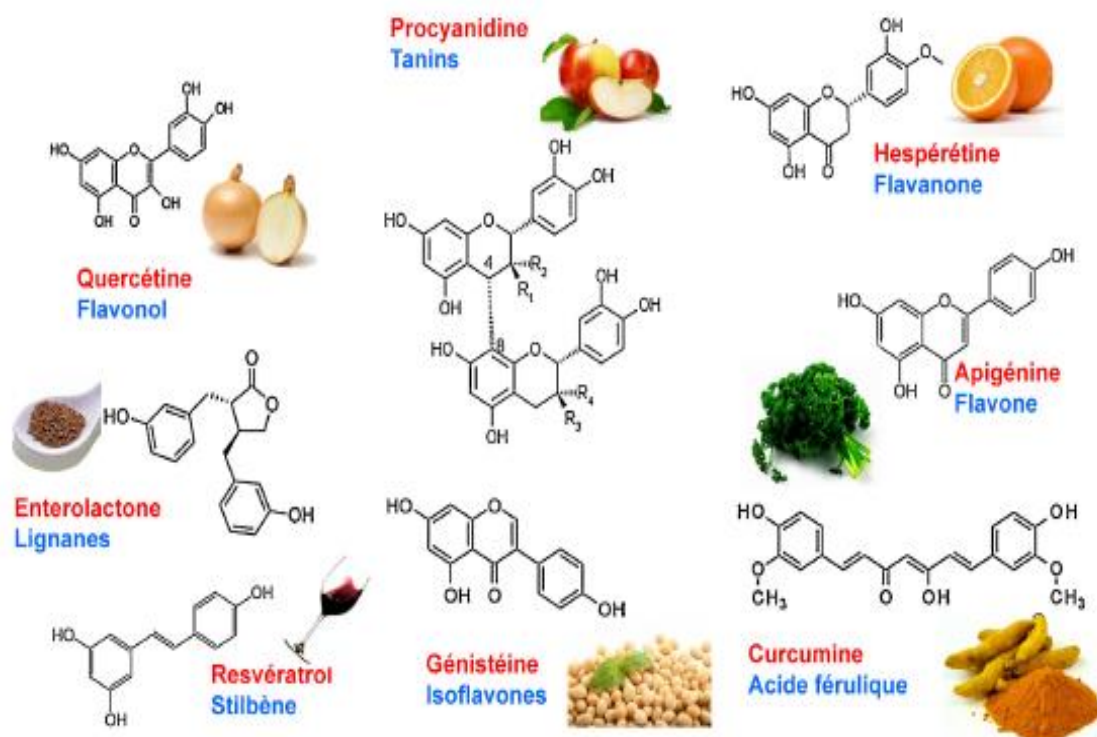


Figure 11 : Polyphénols à effets santé. **Quercétine** : anti-inflammatoire ; **procyanidine** : vasculo-protectrice ; **hespérétine** : neuroprotectrice et vasculo-protectrice ; **entérolactone** : vasculo-protecteur et protecteur osseux ; **resvératrol** : anticancéreux ; **génistéine** : anti-bouffées de chaleur et protectrice osseuse ; **curcumine** : anticancéreuse (Bennetau-Pelissero, 2014).

- Propriétés antimicrobiennes

La figure 12 représente les différentes classes des polyphénols à activité antimicrobienne. Les propriétés antimicrobiennes de certaines classes de polyphénols ont été proposées soit pour développer de nouveaux conservateurs alimentaires naturels (Rodriguez Vaquero *et al.*, 2010), soit pour la mise au point de thérapies innovantes en matière de traitement de diverses infections microbiennes (Daglia, 2012 ; Kortei *et al.*, 2014).

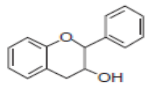
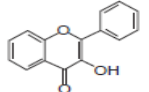
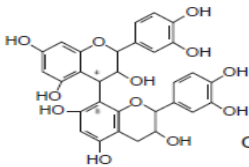
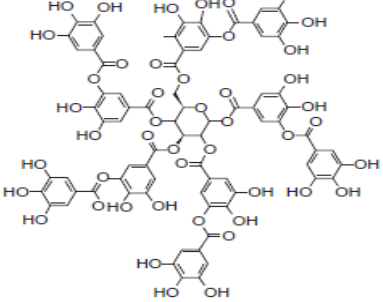
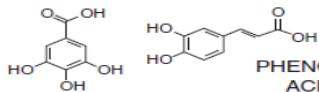
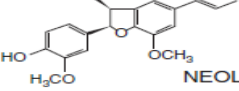
 FLAVAN-3-OL	ANTIBACTERIAL ANTIVIRAL	<i>V.cholerae</i> - <i>S.mutans</i> - <i>C.jejuni</i> <i>C.perfringes</i> - <i>E.coli</i> - <i>B.Cereus</i> <i>H.pylori</i> - <i>S.aureus</i> - <i>L.acidophilus</i> <i>A.naestlundii</i> - <i>Poralis</i> - <i>P.gingivalis</i> <i>P.melaninogenica</i> - <i>F.nucleatum</i> - <i>C.pneumonia</i> Adenovirus- Enterovirus -Flu virus
 FLAVONOL	ANTIFUNGAL	<i>Candida albicans</i> <i>Microsporum gypseum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i>
 CONDENSED TANNIN	ANTIBACTERIAL ANTIVIRAL	<i>S.mutans</i> <i>E.coli</i> <i>S.aureus</i> influenza A virus type -1 herpes simplex virus (HSV)
 HYDROLYSABLE TANNIN	ANTIBACTERIAL ANTIVIRAL ANTIFUNGAL	Different strains of : <i>Salmonella</i> - <i>Staphylococcus</i> <i>Helicobacter</i> - <i>E.coli</i> - <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> - <i>Campylobacter</i> <i>Listeria</i> Epstein-Barr virus Herpes virus HSV -1 and HSV -2, <i>Candida parapsilosis</i>
 PHENOLIC ACID	ANTIBACTERIAL	<i>S.aureus</i> - <i>L.monocytogenes</i> <i>E.coli</i> - <i>Raeruginosa</i>
 NEOLIGNAN	ANTIBACTERIAL	Different strains of : <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Figure 12 : Polyphénols à effet antimicrobien (Daglia, 2012).

- Polyphénols et maladies cardiovasculaires

De nombreuses études épidémiologiques (Lijima *et al.*, 2000 ; Orallo *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2003 ; Schroeter *et al.*, 2005 ; Perez-Vizcaino *et al.*, 2006 ; Auger et Schini-Kerth, 2014) ont montré qu'il existait une association inverse entre la morbi-mortalité cardiovasculaire et la consommation de produits riches en polyphénols tels que les fruits, les légumes, le vin rouge, le cacao et le thé.

L'effet bénéfique des polyphénols sur la santé cardiovasculaire a été attribué en partie à leur effet direct sur les vaisseaux sanguins et plus particulièrement sur l'endothélium. En effet, des études expérimentales et cliniques ont révélé que les polyphénols sont capables d'augmenter la formation endothéliale de facteurs vasoprotecteurs comme le monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur et un inhibiteur de réponses pro-inflammatoires et

pro-thrombotiques, et d'améliorer la dysfonction endothéliale et le stress oxydant vasculaire qui contribuent au développement des pathologies cardiovasculaires majeures comme l'hypertension artérielle (Auger et Schini-Kerth, 2014).

- Polyphénols et cancer

Plusieurs études menées *in vitro* sur des lignées de cellules cancéreuses (Yang et al., 2010 ; Tabaczar et al., 2014 ; Pan et al., 2015 ; Pavan et al., 2015) ou *in vivo* à l'aide de modèles animaux (Lee et al., 2006 ; Alonso-Castro et al., 2013 ; Thangavel et Vaiyapuri 2013) ont rapporté que les composés phénoliques possèdent une activité anti-carcinogène. Les flavonoïdes ont montré des effets protecteurs contre les cancers de la prostate, du côlon et du poumon (Duthie, 2000 ; Nkhili, 2009).

Plusieurs mécanismes d'action ont été identifiés : activité pro- ou anti-oestrogénique, effets antiprolifératifs, induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose, prévention de l'oxydation, activité anti-inflammatoire, modification de la signalisation cellulaire (Garcia Lafuente et al., 2009). Les études *in vitro* (Lee et al., 2006 ; Chen et Chen, 2013) ont montré que les polyphénols pouvaient agir sur les voies de signalisation impliquées dans les phénomènes de prolifération et de différenciation.

I.2 3. Les caroténoïdes

Le terme caroténoïde dérive de "*Daucus Carota*" qui est le nom latin de la carotte, de laquelle le β -carotène fut extrait et isolé, pour la première fois, en 1831 par Wackenroder. Plus de 700 membres de cette famille sont aujourd'hui connus et la structure chimique de 500 d'entre eux est pleinement élucidée (Britton, 2004 ; Reynaud, 2009) (tableau 2).

Les caroténoïdes représentent un groupe de micronutriments qui peuvent se trouver dans plusieurs fruits et légumes ou ils sont à l'origine de leur coloration qui varie du jaune au rouge violacé (Maiani et al., 2009). Dans les tissus verts, la couleur des caroténoïdes est masquée par celle de la chlorophylle. Elle devient visible lors de la disparition de celle-ci durant l'automne (Sy et al., 2011). Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés des aliments riches en caroténoïdes (Lemmens et al., 2014).

Les caroténoïdes sont des métabolites secondaires principalement synthétisés par les végétaux et, dans une moindre mesure, par des levures, champignons, algues marines, microalgues ou certaines espèces bactériennes (Duc, Fraser *et al.*, 2006 ; Sy *et al.*, 2011). La couleur de certains crustacés (Homard, langouste), de poissons (saumon) ou d'oiseaux (flamant, cardinal) est due à des caroténoïdes présents dans leur alimentation. Lorsqu'un caroténoïde est associé à une protéine, la coloration peut être bleue ou verte (Reynaud, 2009).

Ils sont synthétisés et localisés dans les chromoplastes (organites dérivés des chloroplastes lors du murissement des fruits), au niveau de diverses structures : des gouttelettes lipidiques sphériques, les plastoglobules (où, à de fortes concentrations, les caroténoïdes cristallisent) et des chromoplastes tubulaires (dans lesquels se trouvent des superstructures de caroténoïdes, dont des esters de xanthophylles).

Tableau 2: Sources principales de quelques caroténoïdes ayant une importance nutritionnelle (Britton *et al.*, 2009).

Caroténoïde	Sources alimentaires	Teneur*
β-Carotène	Abricot, brocoli, carotte, chou, mangue, huile de palme, épinard, patate douce	++++
	Chou de Bruxelles, mangue, pêche, poivron	+++
	Goyave, laitue, orange, papaye, petits pois, courge, tomate	++
	Beurre, pamplemousse, mandarine	+
β-Cryptoxanthine	Kaki, cerise de cayenne	+++
	Papaye, poivron, courge, mandarine	++
Lutéine	Brocoli, légumes-feuilles, poivron	++++
	Jaune d'oeuf, courge	++
Lycopène	Tomate, pastèque	++++
	Carotte, goyave	+++
	Pamplemousse rose, papaye,	++
	Abricot, kaki	+
Zéaxanthine	Poivron	++++
	Kaki, courge, maïs	++

* +++++ : teneur très élevée (>2 mg/100g de matière fraîche) ; +++ : teneur élevée (0,5 à 2 mg/100g) ; ++ : teneur modérée (0,1 à 0,5 mg/100g) ; + : faible teneur (0 à 0,1 mg/100g)

I.2.3.1. Structure chimique

Les caroténoïdes représentent une famille de pigments naturels largement répandus dans le monde vivant (végétaux, animaux, bactéries et champignons). Ce sont des molécules lipidiques appartenant à la famille des terpènes. Ce sont des composés chimiques généralement en C₄₀ constitués par 8 unités isopréniques (CS) jointes de façon à ce que la séquence soit inversée au centre. L'organisme humain est incapable de les synthétiser, ils sont fournis par l'alimentation (fig.13) (Reynaud, 2009 ; Mata-Gómez *et al.*, 2014).

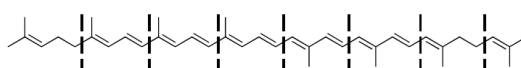


Figure 13: Structure de base des caroténoïdes (Reynaud, 2009).

Les caroténoïdes se divisent en deux classes de structure chimique différente : les carotènes, hydrocarbures insaturés, et les xanthophylles, dérivés oxygénés (Rodriguez-Amaya, 1999; Rodriguez-Amaya et Benjamin, 2003 ; Simonovska *et al.*, 2013). Le lycopène est une molécule linéaire (C₄₀H₅₆) qui représente le point de départ dont tous les caroténoïdes qui en dérivent par cyclisation, oxydation et déshydrogénation (Tanaka *et al.*, 2008; Cazzonelli, 2011). La structure des caroténoïdes les plus courants est illustrée par la figure 14.

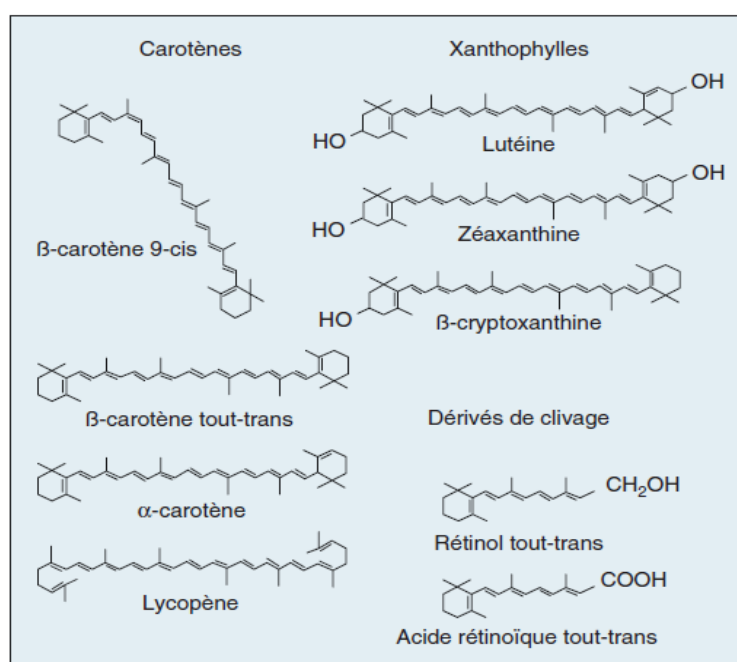


Figure 14: Structure chimique de quelques caroténoïdes (Borel *et al.*, 2005).

I.2.3.2. Biosynthèse des caroténoïdes

La biosynthèse des caroténoïdes s'effectue exclusivement par les microorganismes, les champignons, les algues et les plantes supérieures. Elle dérive de la biosynthèse générale des isoprénoïdes, l'embranchement de ces deux voies se fait au niveau du phytoène. Le schéma de biosynthèse des caroténoïdes est divisé en cinq étapes (fig.15).

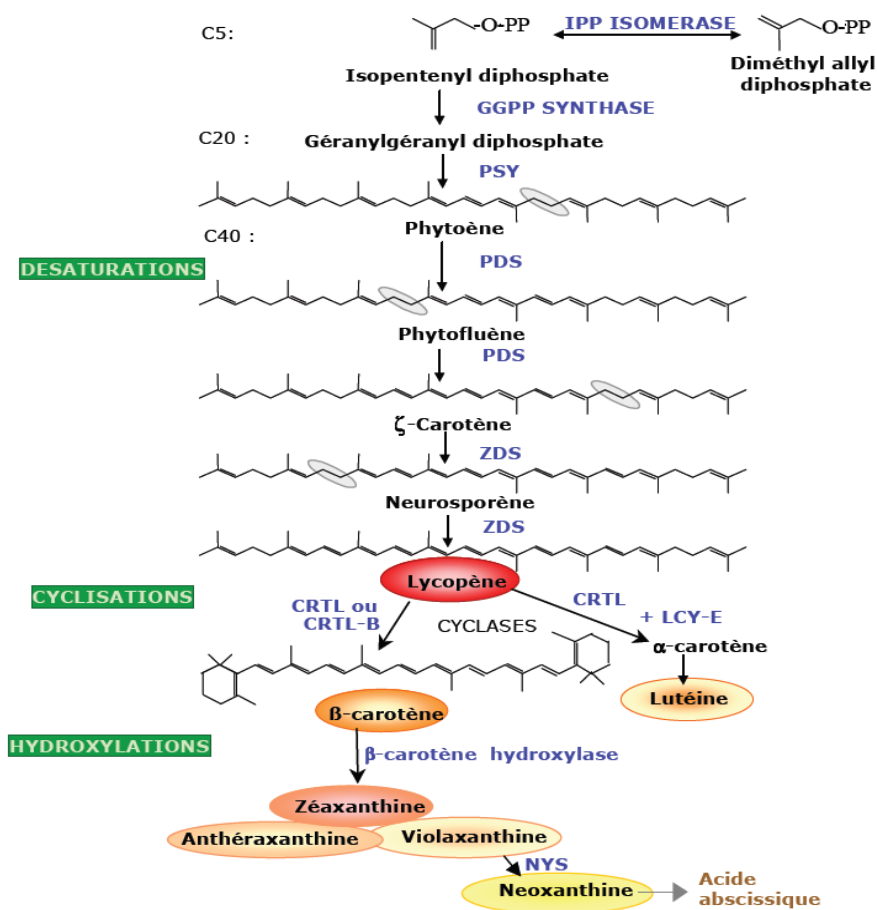


Figure 15: La voie de biosynthèse des caroténoïdes (Bulvestre, 2007).

I.2.3.3. Propriétés physico-chimiques

Les caroténoïdes sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants apolaires et également dans les graisses alimentaires. Toutefois, lorsque ces caroténoïdes sont associés à des chloroplastes, leur solubilité dans l'eau est plus élevée, en raison de leur association avec des lipoprotéines (Van Boekel et al., 2010). De par leur caractère fortement hydrophobe, les caroténoïdes ont tendance à s'agréger et à cristalliser, en particulier dans des milieux aqueux (Kohn et al., 2008).

La structure symétrique de ces molécules, comprenant un grand nombre de carbones et peu de groupements fonctionnels explique bien leur grande lipophilie et leur très faible solubilité, non seulement dans l'eau mais aussi dans des solvants organiques peu apolaires comme le méthanol, l'acétonitrile et l'hexane. Selon les groupements fonctionnels on distingue les xanthophylles (lutéine, zéaxanthine, canthaxanthine) relativement moins apolaires car porteurs de fonctions oxygénées, et les carotènes (cryptoxanthines, lycopène, α - et β -carotène) exclusivement hydrocarbonés et donc extrêmement apolaires (Borel *et al.*, 2005).

Le spectre d'un caroténoïde possède trois maxima, de longueur d'onde généralement comprise entre 400 et 700 nm, selon le nombre de liaisons conjuguées (Frigaard, 2008 ; Da Costa Cardoso, 2008). Les doubles liaisons sont responsables du caractère chromophore des caroténoïdes ainsi leur coloration. Leur caractère insaturé les rend vulnérables vis-à-vis de la chaleur, la lumière, pH et de l'oxygène (Faure *et al.*, 1999 ; Maiani *et al.*, 2009; Simonovska, *et al.*, 2013) générant une grande variété de produits de dégradation (Caris-Veyrat *et al.*, 2001).

I.2.3.4. Intérêts santé des caroténoïdes

- Caroténoïdes et vision

La vitamine A est une vitamine liposoluble essentielle à la croissance et au développement. Elle existe dans l'organisme sous différentes formes : le rétinol, le rétinal, l'acide rétinoïque et le rétinyl phosphate regroupés sous le nom de rétinoïdes. Ces rétinoïdes sont importants pour le maintien de divers processus physiologiques essentiels tels que la croissance, la vision, la reproduction, l'immunité et le maintien de l'intégrité des barrières épithéliales (Turfkruyer, 2014).

Certains caroténoïdes libèrent du rétinol (vitamine A) après clivage enzymatique, c'est pourquoi on les appelle provitamine A (Yeum et Russell, 2002). Plusieurs enzymes sont spécialisées dans cette conversion des caroténoïdes ; il s'agit de la β - β -carotène 15,15'-monooxygénase 1 (BCMO1) et la β - β -carotène 9',10'-dioxygénase 2 (Basu et Donaldson, 2003 ; Lietz *et al.*, 2012 ; Courraud, 2013).

La lutéine et la zéaxanthine sont les principaux caroténoïdes alimentaires trouvés dans la rétine humaine, ils protègent la macula des dommages causés par la lumière bleue, améliorent l'acuité visuelle et participe dans le piégeage de l'oxygène réactif dangereux. La lutéine et la zéaxanthine avec leur métabolite commun, la méso-zéaxanthine, sont appelées pigments maculaires (MP) (Tapiero *et al.*, 2004; Krinsky et Johnson, 2005; Stahl et Sies 2003; Rock, 2009 ; Abdel-Aal *et al.*, 2013).

- Caroténoïdes, activité anti-radicalaire et système antioxydant

Les caroténoïdes, grâce à leurs longue chaîne polyinsaturée, sont de bons piègeurs de radicaux libres ; leur pouvoir réducteur (antioxydant) est, par contre, beaucoup moins évident puisqu'ils ne portent pas de groupement réducteur et ne sont pas des donneurs d'électrons. À propos des caroténoïdes, le terme d'antioxydant ne paraît donc pas approprié, on devrait plutôt parler de pouvoir anti-radicalaire, ou mieux encore, de pouvoir anti-espèces activées (Faure *et al.*, 1999 ; Cutting, 2008 ; Mata-Gómez *et al.*, 2014) .

Les caroténoïdes sont particulièrement efficaces contre $^1\text{O}_2$. Di Mascio *et al.* (1992) ont calculé des constantes de réaction entre les caroténoïdes biologiques et $^1\text{O}_2$. Le lycopène est le plus actif suivi par la canthaxanthine et le β -carotène. L'activité anti- $^1\text{O}_2$ dépend du nombre de doubles liaisons, de l'extrémité cyclique ou non et des substituants sur les cycles (Stahl et Sies, 1996 ; Gerster, 1997). Ce processus physique laisse intactes les molécules de caroténoïdes qui peuvent donc intervenir dans plusieurs cycles successifs de captation de $^1\text{O}_2$.

Les caroténoïdes n'agissent non seulement sur $^1\text{O}_2$; mais aussi sur les radicaux $^*\text{NO}_2$, thiyl et sulfonyl (Everett *et al.*, 1996 ; Mortensen *et al.*, 1997). Woodall *et al.* (1997) notent que les caroténoïdes sont diversement sensibles aux radicaux libres (formés par une réaction de Fenton modifiée ou aux radicaux peroxytes). En fonction des conditions expérimentales, les auteurs classent la réactivité des caroténoïdes dans l'ordre décroissant suivant : lycopène > β -carotène > zéaxanthine > échinénone, isozéaxanthine > astaxanthine, canthaxanthine.

- Caroténoïdes et cancer

L'action des caroténoïdes dans la prévention de ces maladies serait liée en particulier à leur pouvoir anti-radicalaire (Boon *et al.*, 2010). Les caroténoïdes semblent jouer un rôle de protection contre les cancers et les maladies cardiovasculaires ; un mécanisme possible de leur action est le piégeage des radicaux libres (Mata-Gómez *et al.*, 2014).

Les caroténoïdes en synergie avec d'autres micronutriments interviendraient dans de nombreux processus biologiques permettant la réduction de maladies, notamment les cancers dont les plus importants sont les poumons, la gorge, le colorectal et de la prostate (Reynaud, 2009). En effet des études *in vitro* (Ajila *et Brar*, 2012; Haddad *et al.*, 2013 ; Gloria *et al.*,2014) ont montré que les caroténoïdes inhiberaient la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses, interviendraient dans la communication intercellulaire et pourraient jouer un rôle dans la modulation de l'expression de certains gènes. Tous ces facteurs auraient un effet protecteur contre la cardiogénèse (Krinsky *et al.*, 2005).

-Caroténoïdes et système immunitaire

Les caroténoïdes semblent aussi agir sur le système immunitaire indépendamment de leur transformation en vitamine A. Il faut noter que la plupart des expériences concernant le rôle des caroténoïdes dans l'immunité a été faite *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal et l'homme avec le β -carotène. Ce dernier est impliqué dans la prolifération des cellules T et B, il augmente le nombre et la cytotoxicité des cellules *natural killer* (NK), il agirait sur la sécrétion des cytokines et modulerait les défenses non spécifiques (Faure *et al.*, 1999) .

Chapitre II :
Matériels et Méthodes

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1. Méthodes d'étude des capsaïcinoïdes

II.1. 1. Solvants et standards

Tous les solvants (méthanol, éthanol, acétate d'éthyle, acétone, isopropanol et acétonitrile) et les standards des capsaïcinoïdes (capsaïcine pure à 97% et dihydrocapsaïcine pure à 90%) utilisés dans cette étude proviennent de chez Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

II.1. 2. Préparation des standards et des courbes d'étalonnage

Des solutions mères à 1000 ppm de capsaïcine et de dihydrocapsaïcine ont été préparées dans le méthanol, et à partir desquelles un mélange contenant 25% (V/V) de chacune des deux solutions fut opéré pour le choix de la phase mobile. Les courbes d'étalonnage ont été réalisées avec des solutions filles de capsaïcine et de dihydrocapsaïcine, chacune de concentrations de 0.1, 1, 5, 10, 25 et 50 ppm.

II.1. 3. Choix de la phase mobile

Selon la littérature, deux solvants peuvent être utilisés comme phase mobile pour l'analyse chromatographique des capsaïcinoïdes, le méthanol et l'acétonitrile. Des essais chromatographiques ont été effectués au préalable pour dégager le meilleur solvant mobile dans les conditions- présentées dans le [tableau 3](#).

II.1. 4. Optimisation de l'extraction des capsaïcinoïdes

L'extraction est influencée par plusieurs facteurs tels que la méthode d'extraction, le solvant, le pH, la température, le rapport poids de matière / volume du solvant et les intervalles de temps.

Tableau 3 : Les conditions d'analyse chromatographique des capsaïcinoïdes.

Phase mobile (A)	Eau + acide acétique (pH=3)
Phase mobile (B)	Méthanol + acide acétique (pH=3) ou Acétonitrile + acide acétique (pH=3)
Colonne	Ascentis Express C18 15x4.6, 2.7 μ m (USHW005391) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
Débit	1 mL/min
Longueur d'onde	280 nm
Gradient	60% B
Volume injecté	2 μ L

- Sélection du solvant d'extraction

Le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'isopropanol et l'acétonitrile sont les six solvants testés dans l'extraction des capsaïcinoïdes qui a été réalisée selon le protocole de [Barbero et al \(2008\)](#) avec quelques modifications sur un échantillon de 2g de piment mélangé à 50 ml de solvant et mis sous agitation pendant 20 min à une température de 50°C.

- Effet de l'eau dans le solvant

L'effet de différentes concentrations d'eau sur le pouvoir d'extraction des capsaïcinoïdes du solvant sélectionné a été exploré. Les concentrations utilisées étaient : 0, 5, 10, 25 et 50% (V/V) d'eau.

- Sélection du temps et de la température d'extraction

Différents temps (20, 40 et 60 min) et températures (50, 75, 100 et 120 °C) d'extraction ont été testés en présence du solvant et du pourcentage d'eau sélectionnés.

II.1. 5. Identification et quantification des capsaïcinoïdes

L'extraction des capsaïcinoïdes a été effectuée à partir de 2g de différents tissus de piment (péricarpe, placenta et graines) à l'état frais et sec (séchage à température ambiante pendant 72h) dans les mêmes conditions déjà optimisés.

L'identification des capsaïcinoïdes a été réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse HPLC-DAD-ESI-MS. La quantification de la capsaïcine, la dihydrocapsaïcine, la nordihydrocapsaïcine, l'homocapsaïcine et la homodihydrocapsaïcine (en µg/g matière sèche) a été faite grâce aux courbes d'étalonnage de la capsaïcine et dihydrocapsaïcine.

Le contenu en capsaïcinoïdes a été, également, exprimé en unités Scoville calculées à partir du contenu en mg/kg de matière sèche de l'échantillon multiplié par le facteur 16.1 (Todd et al., 1977).

II.1. 6. Rendement

Pour calculer le rendement de l'extraction des capsaïcinoïdes, 25µL de chaque solution standard (capsaïcine et dihydrocapsaïcine) d'une concentration de 1000 ppm a été homogénéisée avec 10g de piment 24h avant l'extraction ; ce qui donne une concentration de 2.5 µg/g de chaque standard. Après l'extraction et l'analyse par HPLC, le taux de capsaïcine et dihydrocapsaïcine a été quantifié grâce aux courbes d'étalonnage et le rendement de l'extraction a été calculé en prenant en compte la quantité de capsaïcine et dihydrocapsaïcine déjà présente dans l'échantillon.

$$\text{Rendement} = [(C - C_p)/C_0] \times 100$$

C : Concentration de capsaïcine ou dihydrocapsaïcine calculée après l'extraction

C_p : Concentration de capsaïcine ou dihydrocapsaïcine dans le piment

C_0 : Concentration de capsaïcine ou dihydrocapsaïcine ajoutée (5 ppm)

II.2. Méthodes d'étude des polyphénols de piment

II.2.1. Solvants et standards

Les solvants utilisés dans cette étude (méthanol, acétonitrile et l'acétate d'éthyle) proviennent de Sigma-Aldrich (Germany) ; alors que l'eau, l'acide acétique et l'acide formique ont été fournis par Riedel De Haën (Seelze, Germany). Les formules chimiques des standards utilisés sont représentées dans la [figure 18](#).

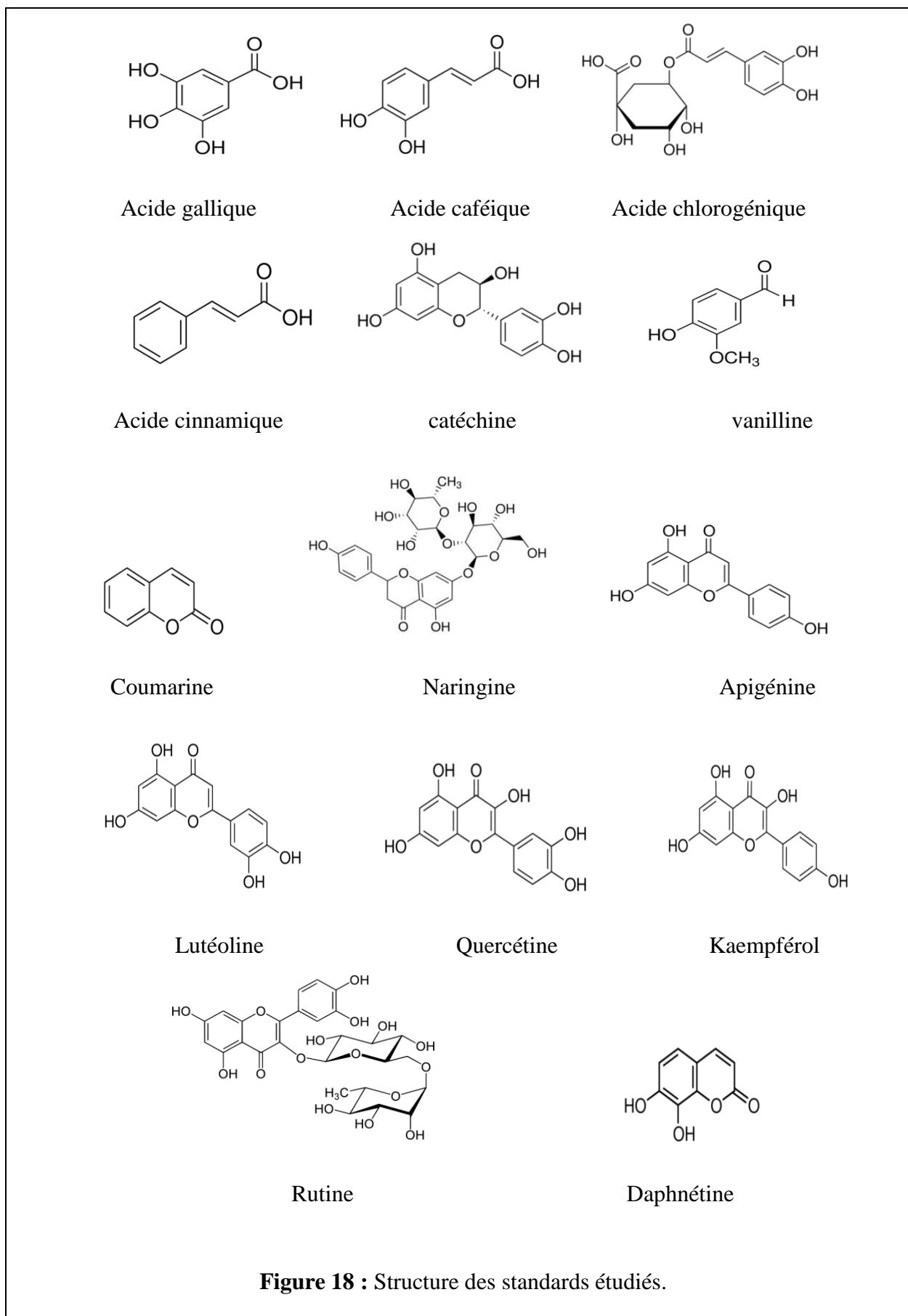
Les acides gallique, chlorogénique, cinnamique et caféique, ainsi que les catéchines, la vanilline, la daphnéline, les coumarines et la naringine proviennent de chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) ; alors que l'apigénine, la lutéoline, la quercétine, le kaempférol et la rutine ont été fournis par la firme « Extrasynthèse » (Genay, France).

Dans le but d'optimiser la méthode HPLC, des solutions mères d'une concentration égale à 1000 ppm de chacun des standards (cités précédemment) ont été utilisées pour préparer une solution à une concentration finale de 78 ppm de chaque standard.

II.2.2. Extraction et dosage colorimétrique des polyphénols et des flavonoïdes

II.2.2.1. Extraction des polyphénols

Le piment utilisé dans cette étude a été acheté du marché de Mostaganem (Algérie). L'extraction des polyphénols a été effectuée à l'obscurité selon la méthode d'[Arnok et al. \(2012\)](#) avec quelques modifications. 2g de piment broyé a été mis en contact avec 50 mL d'un mélange d'HCl 0.05% (V/V) et de solvant (3 types de solvants ont été testés : méthanol, acétate d'éthyle et le mélange des deux) (10V/90V) dans un sonicateur pendant 30 min. Après quoi, l'extrait a été filtré sur papier Whatman (No. Z146374-100EA). L'extraction a été répétée deux fois, et les deux extraits ont été réunis pour éliminer les solvants par évaporation à 40°C au rotavapor. Après évaporation, les polyphénols ont été solubilisés dans 2 ml de méthanol et filtrés avec un microfiltre de 0.45 µm pour éliminer toute impureté.



II.2.2.2. Dosage colorimétrique des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux des trois extraits a été déterminé selon la méthode colorimétrique de [Gutfinger \(1981\)](#) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. En milieu alcalin, les polyphénols réduisent l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) de ce réactif en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) dont l'absorbance est maximale à $\lambda = 725$ nm.

La procédure consiste à compléter 100 μ L d'extrait de piment ou de standard à un volume de 5 mL avec l'eau distillée et auxquels, on ajoute 0.5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min, 1 mL de solution de carbonate de sodium à 35% (P/V) est additionnée avant de compléter tout ce mélange à 10 mL avec de l'eau distillée pour le laisser réagir pendant 30 min à l'obscurité. Après quoi, l'absorbance est mesurée à 725 nm. Les teneurs en phénols totaux des extraits sont déterminées par extrapolation sur une droite étalon et exprimés en termes d'équivalent d'acide gallique (mg /g d'extrait).

II.2.2.3. Dosage colorimétrique des flavonoïdes totaux

Le taux des flavonoïdes totaux a été estimé selon la méthode de [Dowd](#) adaptée par [Arvouet-Grand et al., \(1994\)](#). Elle se base sur les propriétés chélatrices de l'ion aluminium. 500 μ L de chaque extrait ont été mélangés avec le même volume du chlorure d'aluminium à 2% (P/V). Après 10 min de réaction, l'absorbance a été mesurée à 415 nm contre un blanc qui contient l'échantillon sans le chlorure d'aluminium. Le taux des flavonoïdes, exprimé par mg d'équivalent de quercétine / g d'extrait, a été obtenu par extrapolation des mesures sur une droite étalon de différentes concentrations de quercétine.

II.2.3. Optimisation des conditions chromatographiques

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (appelée aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la

colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases – stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR) (Penchev, 2010).

La vaste gamme de polarité des molécules à analyser constitue le problème majeur rencontré lors des multiples chromatographies réalisées et qui est représenté par les co-élutions des pics. Cet événement peut être évité en modifiant la phase mobile, l'acidité, la phase stationnaire ainsi que le gradient.

II.2.3.1. Appareil HPLC

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'une HPLC-DAD-ESI-MS (Kyoto, Japan) composé de deux pompes LC-20ADxr, un auto-échantillonneur SIL-20ACxr, un four CTO-20AC, un détecteur SPD-M20A PDA et un système contrôleur CBM-20A, couplé à un spectromètre de masse avec une source ESI (electrospray ionization) MS-2020 (Shimadzu, Kyoto, Japon). Les polyphénols ont été identifiés selon le temps de rétention, le système de détection PDA, la spectrométrie de masse et la littérature. La quantification de chaque composé a été déterminée en utilisant les courbes d'étalonnages des standards.

II.2.3.2. La phase mobile

La phase mobile représente un enjeu important du développement de méthode car elle joue plusieurs rôles clefs. Elle a une grande influence sur la séparation et affecte l'ionisation des molécules et de ce fait la sensibilité du détecteur (Hercegovà, 2007, El Merabet, 2008).

Pour l'optimisation de ce paramètre, nous avons utilisé plusieurs combinaisons de la phase mobile. Selon la littérature, deux solvants organiques sont utilisés lors de l'analyse des polyphénols, le méthanol (MeOH) et l'acétonitrile (ACN). En ce qui concerne l'influence de la séparation par les acides pouvant être présents dans la phase mobile, les acides acétique (AA) et formique (AF) ont été testés (tableau 4).

Tableau 4 : Les conditions d'analyse pour l'optimisation de la phase mobile.

Phase mobile (A)	1- Eau 2- Eau + acide acétique (pH=3) 3- Eau + acide formique (pH=3)
Phase mobile (B)	1- Acétonitrile ou méthanol 2- Acétonitrile ou méthanol + acide acétique (pH=3) 3- Acétonitrile ou méthanol + acide formique (pH=3)
Colonne	Ascentis Express C18 15x2.1; 2.7 μ m (USWM002260) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
Débit	0.5 mL/min
Longueur d'onde	280 nm
Volume injecté	5 μ L

II.2.3.3. La phase stationnaire

Lors du développement d'une méthode d'analyse, le choix de la colonne appropriée capable d'assurer une bonne séparation pour notre échantillon représente un réel défi. Pour la sélection de la phase stationnaire, trois colonnes ont été utilisés :

- Ascentis Express C18 15x2.1, 2.7 μ m (USWM002260) (Supelco, Bellefonte, PA, USA); débit = 0.5 mL/min
- Ascentis Express C18 15x4.6, 2.7 μ m (USHW005381) (Supelco, Bellefonte, PA, USA); débit = 1.0 mL/min
- Ascentis Express RP-Amide C18 15x2.1, 2.7 μ m (USQX001307) (Supelco, Bellefonte, PA, USA); débit = 0.5 mL/min

II.2.3.4. Gradient d'élution

En phase inverse et même dans les autres types de chromatographies liquides, l'élution des composés peut se faire en mode isocratique ou par l'utilisation de gradients de concentration. Cette dernière technique consiste à modifier la composition de la phase mobile au cours du processus chromatographique. Ceci permet, entre autres, de diminuer les temps d'élutions des composés et d'augmenter significativement la résolution des pics (Montpas, 1999). Après la sélection des phases mobiles et stationnaire, un gradient d'élution a été mis en œuvre afin d'assurer au mieux la séparation des composés les plus retenus.

II.2.4. Identification des polyphénols par HPLC-DAD-ESI-MS

Après l'optimisation des conditions d'analyse HPLC pour assurer une meilleure séparation des polyphénols, l'extrait qui a présenté le meilleur taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux a été choisi pour l'identification de ses divers constituants.

II.2.5. Quantification des polyphénols

Les polyphénols identifiés ont été quantifiés grâce aux courbes d'étalonnages des standards suivants en utilisant les conditions optimisées : acide gallique, acide chlorogénique, acide cinnamique, acide caféique, daphnétine, apigénine, lutéoline, quercétine, kaempférol, Naringine, rutine, coumarine, vanilline et catéchine. Des concentrations de l'ordre de 5, 10, 50 et 100 ppm ont été préparées et injectées afin d'être analysées dans les mêmes conditions d'HPLC optimisés.

II.2.5. Rendement

Le rendement de l'extraction des polyphénols a été calculé en utilisant le standard de la daphnétine, un polyphénol qui ne se trouve que dans la plante *Daphne Korean Nakai*, seulement. La daphnétine (60 ppm) a été mélangée avec le piment broyé (2g) 24h avant l'extraction. Après l'analyse HPLC, la daphnétine a été quantifiée à partir de la courbe d'étalonnage et le rendement de l'extraction a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Rendement} = (C/C_0) \times 100$$

C : concentration de daphnétine calculée après l'extraction

C₀ : Concentration de daphnétine ajoutée (60 ppm).

II.3. Méthodes d'étude des caroténoïdes

II.3.1. Solvants et standards

Tous les solvants utilisés dans cette étude ainsi que le Butylated hydroxytoluene (BHT) ont été obtenus de chez Sigma–Aldrich (Milan, Italy). Le β -carotène a été obtenu auprès de la firme « Extrasynthèse » (Genay, France).

II.3.2. Extraction des caroténoïdes

L'extraction des caroténoïdes de piment a été effectuée selon la méthode de [Dugo et al. \(2008\)](#). 100 g de piment broyé ont été traités 4 fois avec 300 ml d'un mélange de solvants méthanol/ acétate d'éthyle/ éther de pétrole (V/V/V : 1:1:1). Après extraction, l'échantillon est centrifugé à 1500g pendant 15 min et le surnageant a été gardée. 2 mg de BHT ont été ajoutés avant l'évaporation des solvants à une température de 35°C jusqu'à séchage total.

II.3.3. Dosage colorimétrique des caroténoïdes totaux

La teneur en caroténoïdes totaux a été déterminée selon la méthode de [Talcott et Howard \(1999\)](#) par des méthodes spectrophotométriques où l'absorbance a été mesurée à 470 nm. Les résultats exprimés en mg d'équivalent de β -carotène / g de piment ont été obtenus par extrapolation sur une droite étalon de β -carotène (0.375–5 ppm).

II.3.4. Sélection de la phase stationnaire

Deux colonnes ont été testées pour l'obtention d'une bonne résolution :

- La colonne Ascentis Express C18: 25x4.6mm, 5 μ m; (Supelco, Bellefonte, PA, USA); débit = 0.8 mL/min
- La colonne YMC C30: 25 x 4.6 mm, 5 μ m; (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Germany) ; débit = 0.8 mL/min

Les phases mobiles utilisées selon [Giuffrida et al. \(2013\)](#) sont: Phase mobile (A): Méthanol/ MTBE /eau (83:15:2, v/v/v) ; Phase mobile (B) : Méthanol/ MTBE /water (8:90:2, v/v/v). Le gradient de solvant appliqué aux différents intervalles est : 0 -20 min: 0% B; 20-160 min: 0-100% B. Le volume d'injection était de 20 μ l.

II.3.5. Identification et quantification des caroténoïdes par HPLC-DAD-APCI-MS

Après la sélection de la colonne, les caroténoïdes du piment ont été identifiés par HPLC-DAD-APCI-MS. Le spectre UV-Vis était compris dans un intervalle de 250-700 nm et les chromatogrammes ont été obtenus à 450 nm. Pour la spectrométrie de masse (MS), l'APCI (atmospheric pressure chemical ionization) a été utilisée en mode positif et négatif, le débit du gaz à 2.5 L/min, le voltage 0.8 kV; gamme de masse allant de 200 à 1200 m/z; Interface Voltage: 4.5 kV; température: 350 °C. La quantification a été réalisée grâce à la droite étalon de β -carotène (0.05, 0.1, 1, 10, 25, 50 et 100 ppm).

II.3.6. Rendement

Le rendement de l'extraction des caroténoïdes a été calculé de la même façon que pour les flavonoïdes. Pour ce faire, 20 μ l d'une solution de 1000 ppm de β -carotène a été homogénéisée avec 2g de piment broyé 24h avant l'extraction. Après l'extraction et l'évaporation, les caroténoïdes ont été dissous dans 7.5 mL de méthanol, ce qui donne une concentration de 2.67 ppm de β -carotène. Après l'analyse par HPLC, le taux de β -carotène a été quantifié grâce à la droite étalon β -carotène et le rendement de l'extraction a été calculé en prenant en compte la quantité de β -carotène déjà présente dans l'échantillon.

$$\text{Rendement} = [(C - C_p)/C_0] \times 100$$

C : Concentration de β -carotène calculée après l'extraction

C_p : Concentration de β -carotène dans le piment

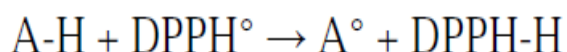
C₀ : Concentration de β -carotène ajoutée 2.67 ppm

II.4. Méthodes d'étude des propriétés biologiques des extraits de piment

II.4.1. Détermination du potentiel antioxydant des extraits de piment

II.4.1. 1. Test de réduction du radical stable DPPH°

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH°) est stable, coloré (violet) et centré sur l'azote (Blois, 1958). Le maximum de son absorption se situe vers 515 nm dans le méthanol et l'éthanol (Brand-Williams *et al.*, 1995). La réduction du DPPH° par un donneur d'atome H (AH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H) qui est incolore et au radical A° (Dangles *et al.*, 1999).



La capacité à piéger le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) des polyphénols, caroténoïdes et capsaïcinoïdes a été évaluée selon le protocole de Siracusa *et al.* (2011). Un volume de 37.5 µL d'extrait a été ajouté à 1.5 mL de solution de DPPH 0.1mM. Après 20 min de réaction, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Les résultats sont exprimés en mM de Trolox équivalent par g d'extrait de piment.

II.4.1. 2. Test de réduction du radical-cation (ABTS^{•+} ou TEAC)

Dans la méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), l'activité antioxydante d'une molécule est déduite de sa capacité à réduire le radical-cation ABTS^{•+} (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)), qui présente une bande d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm.

Une solution mère d'ABTS à 1.7 mM/L est préparée 12 à 14 h à l'avance pour être, ensuite, mélangée à une solution de persulfate de potassium à 4.3 mM/L dans un rapport 5/1 (V/V) et laissée à l'obscurité. La solution mère d'ABTS est diluée avec le méthanol jusqu'à une absorbance de 0.70 ± 0.02 à 734 nm. Une solution mère de trolox à 250 mM/L a été utilisée pour la préparation de solutions filles de concentrations comprises entre 0 et 250 mM/L. Un volume équivalent à 0.1 mL de polyphénols, caroténoïdes, capsaïcinoïdes ou bien de trolox a été ajouté à 2 mL d'ABTS et l'absorbance a été mesurée après 6 min à 734 nm (Buenguer *et al.*, 2006).

II.4.1. 3. Test de réduction du fer (FRAP)

L'activité réductrice du fer des trois extraits de polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes est déterminée selon la méthode décrite par [Benzie and Strain \(1996\)](#), basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} . La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}).

Une série de solutions a été préparée: Le tampon acétate est préparé par le mélange de 25 mL du tampon d'acétate à 300 mM, de 2.5 mL TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine) (10 mM) et 2.5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (40 mM). 50 μL de chaque échantillon ont été mélangés avec 1.5 mL de la solution de FRAP et la lecture a été effectuée après 4 min à 593 nm. Différentes concentrations de Fe (II) ont été choisies pour tracer les courbes d'étalonnage (100-1000 $\mu\text{M L}^{-1}$).

II.4.2. Mise en évidence et détermination de l'activité antimicrobienne des extraits de piment

II.4.2. 1. Nature et origine des souches testées

- Les souches bénéfiques

Bifidobacterium animalis sbsp *lactis* Bb12 provient de notre laboratoire partenaire français : UR 910 écologie et physiologie des systèmes digestif INRA 78352 Jouy-en-Josas, France.

La souche *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS, provient de la collection de notre laboratoire LMBAFS (Laboratoire de microorganismes bénéfiques, aliments fonctionnels et santé, Université de Mostaganem).

- Les souches pathogènes

Les souches pathogènes *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644 et ATCC 1392), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Proteus mirabilis* (ATCC 13315), *Enterococcus hirae* (ATCC 10541), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), et les souches isolées *Klebsiella*

pneumoniae, *Staphylococcus aureus* (8, 14, 26, 32, 550, 319) ainsi que la souche commensale *Escherichia coli* (ATCC 25922), proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie du département des sciences pharmaceutiques et produits de santé (Université de Messine, Italie).

II.4.2. 2. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur milieu gélose

Le pouvoir antimicrobien des extraits de polyphénols et capsaïcinoïdes, ainsi que celui des standards les plus représentatifs identifiés dans ces deux extraits (acide caféïque, kaempférol, quercétine, coumarine, rutine, narangine, capsaïcine et dihydrocapsaïcine) vis-à-vis de seize souches pathogènes et de deux souches bénéfiques a été évalué.

Pour réaliser cette expérience, la préculture des souches à tester a été préparée 16 h au préalable et les différents extraits de piment (polyphénols et capsaïcinoïdes) ont été dissous dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde) à raison de 100 mg/ mL ; alors que les standards l'ont été à raison de 10 mg/mL. Avant l'expérimentation, Les bactéries ont été ajustées à une concentration de 10^8 UFC/mL etensemencées dans 20 mL du milieu de culture. Après 15 min de repos, 10 μ L de l'échantillon à tester ont été déposés sur les disques filtres stériles (6 mm). Un autre disque contenant du diméthylsuloxyde a été utilisé comme témoin négatif. Les boîtes sont incubées après 30 min à 37°C pendant 24h et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés ([Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008](#)).

II.4.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h ([Teresa Fera et al., 1998](#)). La détermination de la CMI a été réalisée par la technique de micro-dilution en milieu liquide tel que cela est stipulé par le CLSI ([Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008](#)).

Dans cette technique, 100 µL de chaque suspension bactérienne ont été ajoutés aux puits d'une microplaque de 96 contenant déjà 100 µL de l'échantillon dilué d'une façon géométrique de raison de 2. La concentration finale de l'inoculum est 5×10^5 CFU/mL et la concentration maximale des échantillons testés est de 1 mg/mL pour les standards et 20 mg/mL pour les extraits.

Des puits contenant du milieu de culture seul ou bien ensemencé avec la souche testée mais sans l'échantillon ont été utilisés comme témoin. Les microplaques ont été incubées à 37°C. Après 24h d'incubation, la plus faible concentration qui a totalement inhibé le germe étudié est considérée comme la CMI.

II.5.2.4. Etude de la synergie d'action des substances actives contenues dans les extraits de piment

Dans le but de chercher une éventuelle synergie, des combinaisons entre les agents antimicrobiens testés et exerçant le plus grand effet inhibiteur a été étudié vis-à-vis deux souches bactériennes une à gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et une autre à gram positif, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.

La méthode suivie est celle de l'échiquier qui consiste à étudier différentes concentrations de deux agents antimicrobiens seuls et associés. Les dilutions des échantillons ont été faites à partir d'au moins le double de la CMI de chaque substance selon les directives du CLSI (Franklin et Cockerill, 2011).

La suspension bactérienne était de l'ordre de 5×10^5 CFU/mL et les boîtes ont été incubées pendant 24h à 37° C. Les résultats sont exprimés par le FIC index (fractional inhibitory concentration ou bien fraction de concentration inhibitrice). L'index de FIC est déterminé comme suit :

$$\text{FIC} = \text{FIC A} + \text{FIC B} = \frac{\text{CMI de A avec B}}{\text{CMI de A seul}} + \frac{\text{CMI de B avec A}}{\text{CMI de B seul}}$$

FIC A : correspond au rapport de la CMI de A associé à B sur la CMI de A seul,

FIC B : correspond au rapport de la CMI de B associé à A sur la CMI de B seul.

Si le FIC index est inférieur à 0,75, l'association est synergique, elle est additive s'il est équivalent à 1, indifférente s'il est compris entre 1 et 2 et antagoniste s'il est supérieur à 2 (Denes et Hidri, 2009).

II.4.3. Détermination de la cytotoxicité des extraits de piment

II.4.3. 1. Les lignées cellulaires utilisées

Les cellules mononucléaires humaines (PBMC) et la lignée cellulaire cancéreuse U937 (ATCC CRL 1593) ont été cultivées à 37 °C sous atmosphère CO₂ (5 %) dans du milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL, Life Technologies Italia s.r.l. Milan, Italy), additionné de 10 % (V/V) de sérum de veau foetal (SVF) (Grand Island, USA), 1% (V/V) de L-glutamine, 1% (v/v) d'antibiotiques (Penicillin/streptomycin) et de 1 % (V/V) d'antibiotiques antimycosiques.

II.4.3. 2. Evaluation de la toxicité

La toxicité des extraits de polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes de piment sur les deux lignées cellulaires a été évaluée selon le test d'exclusion du bleu Trypan. Les deux lignées cellulaires étaient maintenues dans le milieu RPMI 1640 pendant 72h avant l'addition de différentes concentrations des trois extraits testés (0, 25, 50, 100, 200, 500 et 1000 µg/mL). Le nombre initial des cellules avant chaque manipulation était de l'ordre de 5×10⁴ cellules/puit.

La lecture a été effectuée 24h après en utilisant le bleu de trypan qui donne une couleur bleue aux cellules mortes (Dinicola *et al.*, 2012). Le pourcentage de cellules viables est estimé selon la formule :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{(\text{nombre total de cellules} - \text{nombre de cellules colorées}) \times 100}{\text{nombre total de cellules}}$$

II.5. Traitement statistique des résultats

Chaque expérience a été indépendamment réalisée en 3 exemplaires et répétée trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de variance (ANNOVA) en utilisant le logiciel Stat box version 6.4 (1999).

La comparaison de moyennes a été réalisée par le test de Student- Newman-Keuls au seuil de 5% pour comparaison multiple. A $P < 0.05$, la différence est considérée significative.

Chapitre III :

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Résultats de l'approche analytique des capsaïcinoïdes

III.1.1. Observations liées au choix de la phase mobile

Dans les analyses des capsaïcinoïdes, deux solvants sont habituellement utilisés : le méthanol et l'acétonitrile. Pour voir quel était le meilleur solvant, deux analyses ont été effectuées avec soit le méthanol ou bien l'acétonitrile comme phase mobile (B). Les chromatogrammes obtenus sont présentés ci-dessous (fig. 17).

En terme de résultats, nous constatons que la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine ont plus d'affinité pour l'acétonitrile que le méthanol. Le temps de rétention de la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine était de l'ordre de 22.50 et de 39.20 min respectivement avec le méthanol comme phase mobile, tandis qu'avec l'acétonitrile était seulement de 3.40 et de 4.30 min.

En mode inverse, un accroissement de polarité de la phase mobile mène à une augmentation du volume de rétention (Ariffin *et al.*, 2014) ce qui donne un temps de rétention plus important. La polarité du méthanol est supérieure par rapport à l'acétonitrile ($6.6 > 6.2$) ce qui explique la différence dans le temps de rétention.

Il y'a une relation inverse entre la polarité et la force d'élution, lorsque la polarité du solvant est relativement faible, il en résulte une forte force d'élution. Bien qu'une grande variété de solvants organiques puisse être utilisée en chromatographie en phase inverse, mais seuls quelques-uns sont utilisés couramment.

Les deux modificateurs organiques les plus utilisés sont l'acétonitrile et le méthanol. L'isopropanol peut être utilisé en raison de ses propriétés d'élution forts, mais vu sa grande viscosité qui conduit à des pressions très élevées, son usage est limité. L'acétonitrile et le méthanol sont moins visqueux que l'isopropanol. L'acétonitrile possède une force d'élution plus élevée à celle du méthanol ($5.8 > 5.1$) (Gilar *et al.*, 2014).

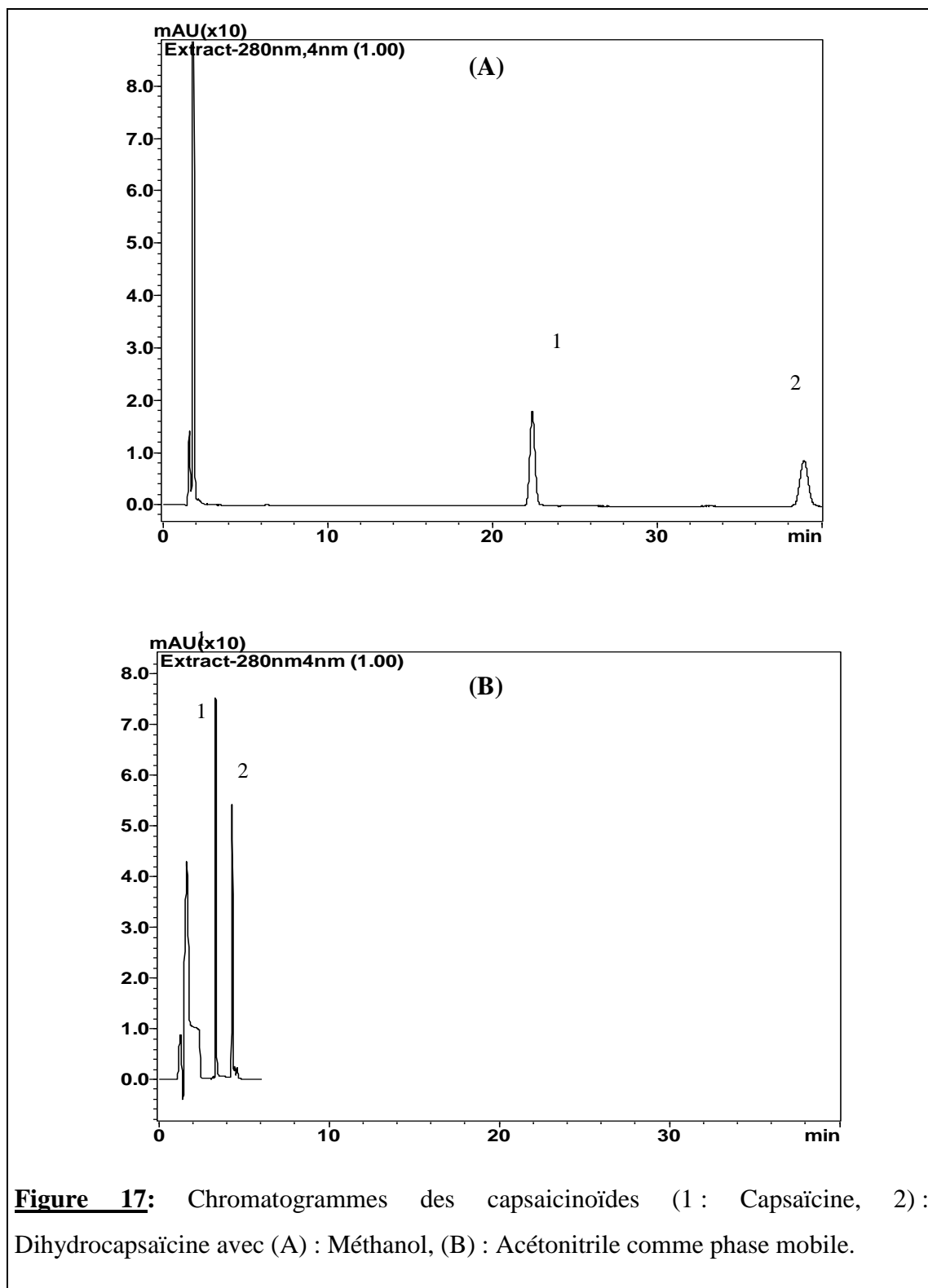


Figure 17: Chromatogrammes des capsaïcinoïdes (1 : Capsaïcine, 2) : Dihydrocapsaïcine avec (A) : Méthanol, (B) : Acétonitrile comme phase mobile.

III.1. 2. Courbes d'étalonnage des capsaïcinoïdes

Pour quantifier les capsaïcinoïdes tout au long du travail, les courbes d'étalonnage de la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine ont été effectuées (fig. 18). L'équation de la courbe d'étalonnage de la capsaïcine est $y = 4527x + 3297$ et le coefficient de corrélation est de l'ordre de $R^2 = 0.998$. Pour la dihydrocapsaïcine, $y = 3605x + 2295$ et $R^2 = 0.999$.

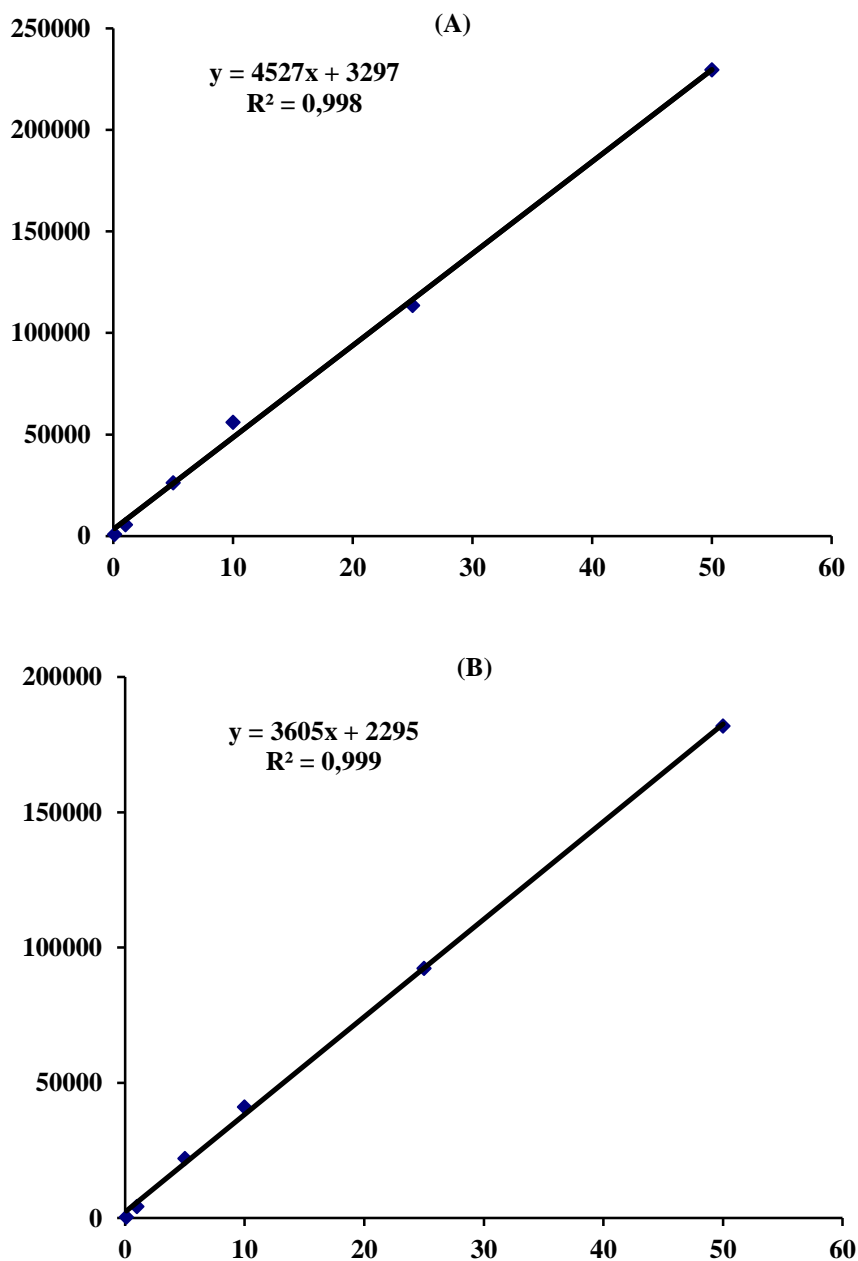


Figure 18: Courbe d'étalonnage de (A) : Capsaïcine, (B) : Dihydrocapsaïcine.

III.1.3.Optimisation de l'extraction des capsaïcinoïdes du piment

III.1.3.1. Influence de la nature du solvant d'extraction

Dans le but de voir l'effet du solvant sur l'extraction des capsaïcinoïdes, six solvants ont été étudiés (méthanol, éthanol, acétate d'éthyle, acétone, isopropanol et acétonitrile). Selon la [figure 19](#), l'effet du solvant était plus important dans l'extraction de la capsaïcine que la dihydrocapsaïcine.

En ce qui concerne la capsaïcine, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le méthanol en enregistrant 123.47 µg/g de matière sèche du piment, suivi de l'éthanol (110.84 µg/g) et l'isopropanol (99.10 µg/g). Le pouvoir d'extraction de la capsaïcine était moins prononcé avec l'acétonitrile (81.22 µg/g) et l'acétate d'éthyle (77.59 µg/g). L'acétone est le solvant qui a donné la valeur la plus faible de la capsaïcine (71.62 µg/g).

La dihydrocapsaïcine était moins affectée par le type de solvant que la capsaïcine. Les cinq solvants : le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, l'isopropanol ainsi que l'acétonitrile ont donné des valeurs proches de dihydrocapsaïcine. Le meilleur taux était enregistré avec l'éthanol (55.55 µg/g). L'acétone est toujours le solvant qui a le plus faible pouvoir d'extraction des capsaïcinoïdes avec une valeur de 35.87% moins que l'éthanol ([fig.20](#)). Le méthanol a été choisi pour le reste de l'expérimentation vu qu'il était d'une façon générale le meilleur solvant pour l'extraction des capsaïcinoïdes.

[Barbero et al. \(2008\)](#) ont étudié l'effet du méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile et l'eau sur l'extraction des capsaïcinoïdes. Leurs résultats confirment que le méthanol est le meilleur solvant pour l'extraction des capsaïcinoïdes suivi de l'éthanol et de l'acétonitrile. L'eau arrive en dernière position, il ne semble être un bon solvant pour l'extraction des capsaïcinoïdes. Selon [Peusch et al \(1997\)](#), la polarité des solvants a un effet significatif sur l'extraction des capsaïcinoïdes.

[Chinn et al. \(2011\)](#) ont utilisé trois solvants dans leur étude (l'éthanol, l'acétonitrile et l'acétone). Le taux des capsaïcinoïdes était plus important dans les extraits d'éthanol et d'acétonitrile. Mais lorsque le piment est sec, l'acétone s'avère le meilleur solvant.

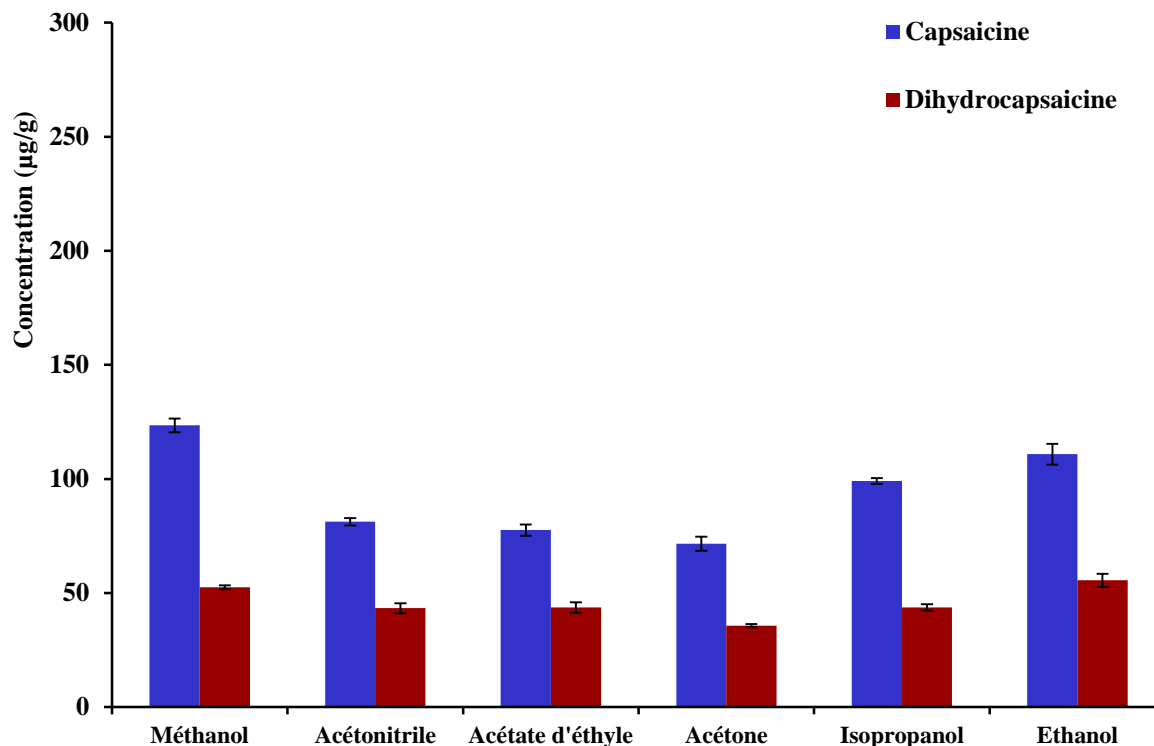


Figure 19 : Influence du solvant sur l'extraction de la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine.

III.1. 3. 2. Influence de la présence d'eau dans le solvant d'extraction

L'addition d'eau peut améliorer le pouvoir d'extraction des solvants (Rostagno et al., 2003). Pour cela, quatre concentrations d'eau (5, 10, 25 et 50%) ont été utilisées afin de voir leur influence sur l'extraction des capsaïcinoïdes. L'incorporation de l'eau au solvant a un grand effet sur l'extraction des capsaïcinoïdes (fig.21). L'addition de 5% d'eau a permis une légère amélioration de l'extraction de l'ordre de 2.14% de capsaïcine et 6.95% de dihydrocapsaïcine.

Le taux des capsaïcinoïdes n'a cessé d'augmenter parallèlement avec le pourcentage d'eau dans le solvant touchant un maximum de 186.04 µg/g de capsaïcine et 66.84 µg/g de dihydrocapsaïcine avec 25% d'eau, qui représente respectivement une amélioration de 54.24% et de 62.25%. Au-delà de ce pourcentage, une régression a été remarquée dans le taux des capsaïcinoïdes avec 50% d'eau. La polarité des capsaïcinoïdes est inférieure à celle d'eau ce qui explique leur faible solubilisation dans 50% de méthanol.

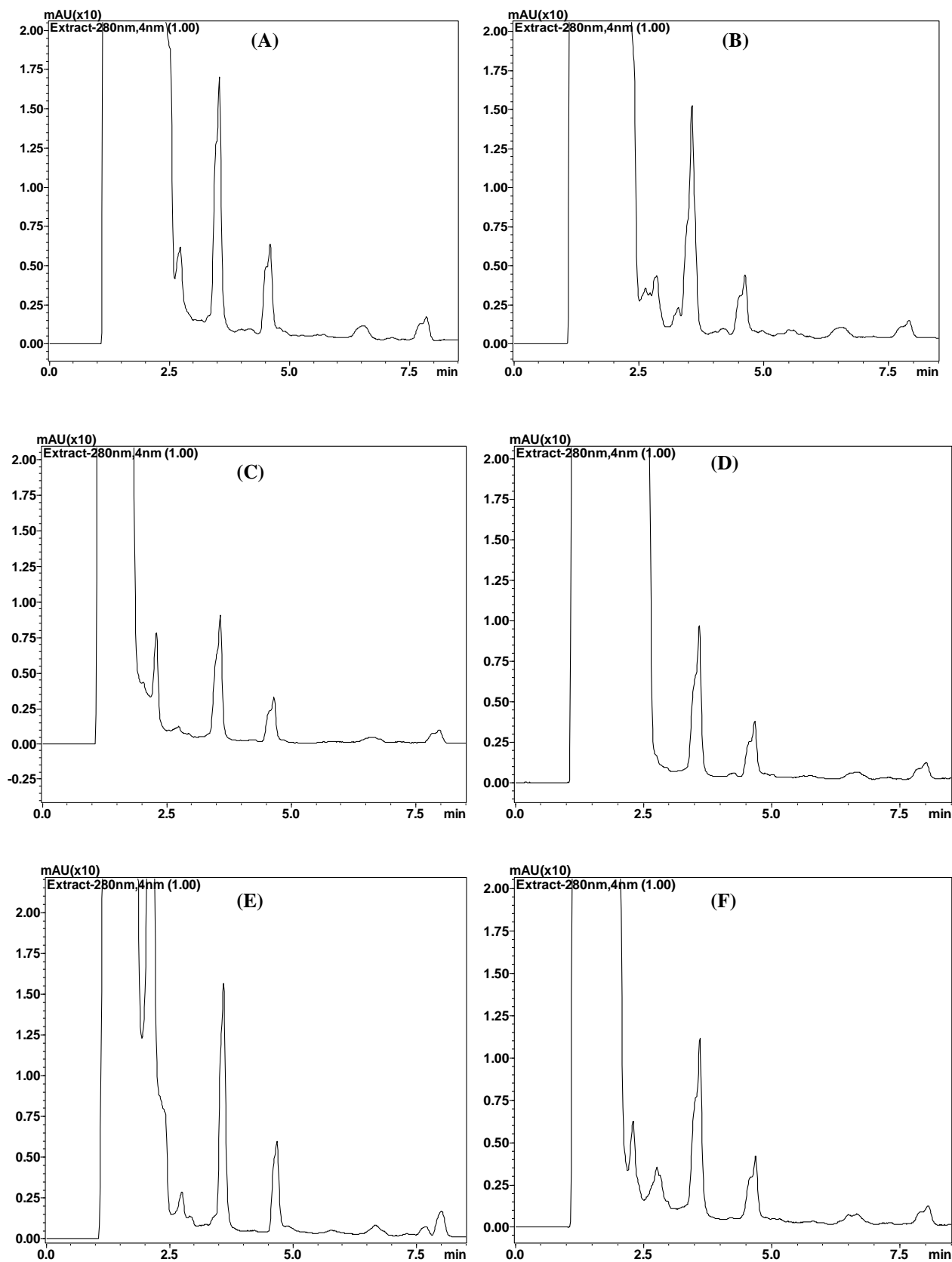


Figure 20: Chromatogrammes de capsaïcinoïdes obtenus avec (A) : Méthanol, (B) : Éthanol, (C) : Acétone, (D) : Isopropanol, (E) : Acétate d'éthyle, (F) : Acétonitrile.

Dans la littérature, il ya une contradiction dans les résultats obtenus par différents auteurs. D'après [Barbero et al. \(2008\)](#), l'addition de différents pourcentages d'eau dans le méthanol a diminué le taux d'extraction des capsaïcinoïdes, alors que [Boonkird et al. \(2008\)](#) ont remarqué une amélioration d'extraction des capsaïcinoïdes en utilisant 75% d'éthanol à 60 °C.

Pour voir le développement des capsaïcinoïdes au cours du temps, [Mueller-Seitz et al. \(2008\)](#) ont adapté la même méthode en mélangeant le piment avec 30 ml de 75% méthanol pendant 30 min.

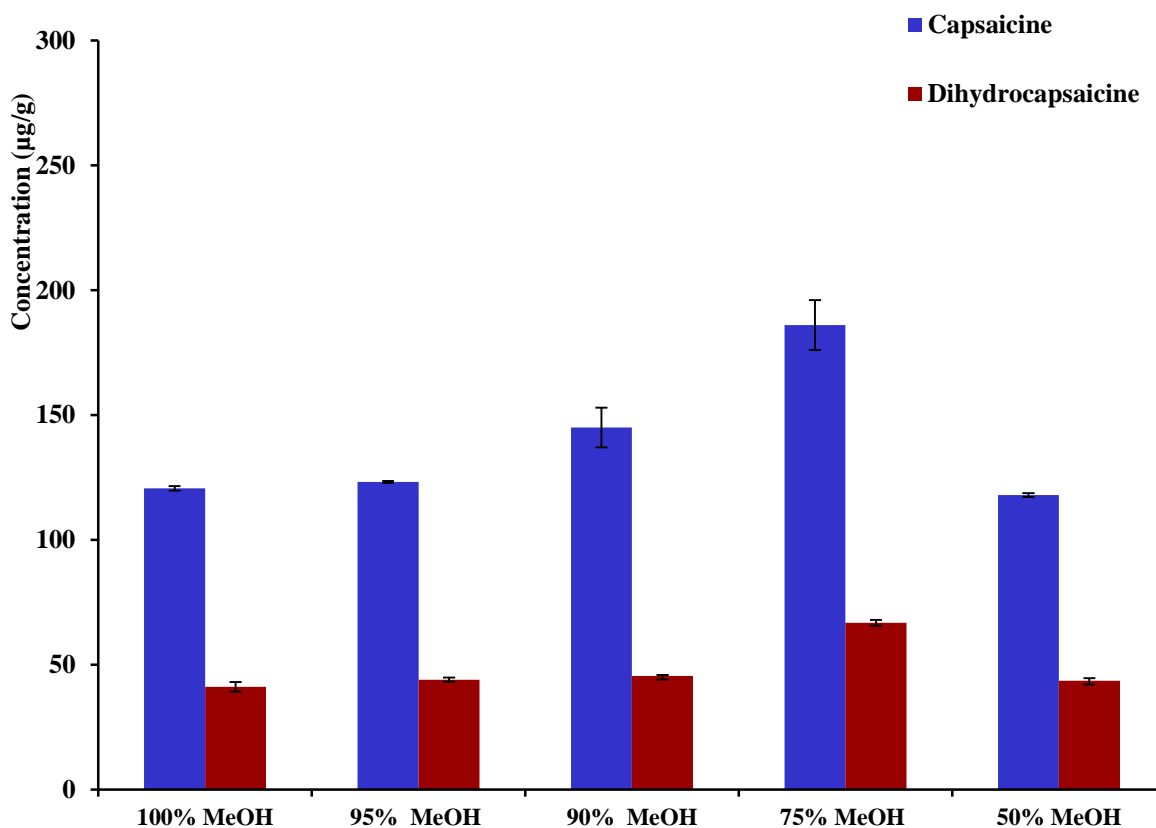


Figure 21: Influence d'addition de différentes concentrations d'eau dans le solvant sur l'extraction des capsaïcinoïdes.

III.1. 3. 3. Influence de la température sur l'extraction des capsaïcinoïdes

Des températures élevées peuvent modifier considérablement les propriétés physiques du solvant d'extraction et augmenter sa sélectivité (Huie, 2002). Afin d'améliorer la méthode d'extraction des capsaïcinoïdes, l'effet de quatre températures (50, 75, 100 et 120°C) a été exploré.

L'augmentation de la température a amélioré l'extraction des capsaïcinoïdes, le passage de 50 à 75°C a permis une amélioration de l'ordre de 38.97% de capsaïcine et 21.63% de dihydrocapsaïcine (fig.22).

Lorsque la température atteint 100°C, un maximum de capsaïcine a été obtenu (285.38 µg/g) équivalent à une amélioration de 53.48%, et de 110.19 µg/g de dihydrocapsaïcine qui en représente 87.91% d'amélioration. Le taux de capsaïcine obtenu à 125°C était de l'ordre de 51.22 µg/g et de 15.57 µg/g pour la dihydrocapsaïcine. Donc 100°C est la température optimale pour l'extraction des capsaïcinoïdes.

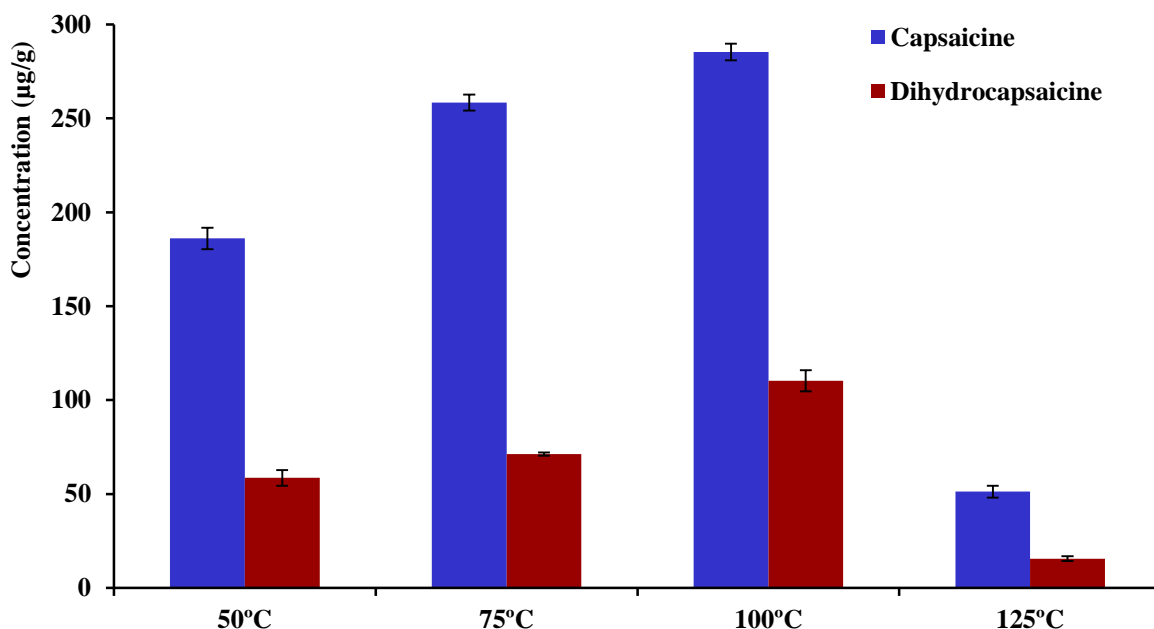


Figure 22: Effet de la température sur l'extraction de la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine.

Barbero et al. (2006) ont étudié la stabilité des capsaïcinoïdes dans des températures allant de 50 à 200°C. Les extractions ont été effectuées suivant la méthode PLE (extraction liquide sous pression). Ils ont trouvé que le maximum de capsaïcinoïdes a été obtenu à 200°C.

Dans le travail de Juangsamoot et al. (2012), les capsaïcinoïdes ont été extraits par la méthode de macération en utilisant trois solvants (méthanol, 80% v/v éthanol et acétonitrile) à quatre différentes températures (60, 70, 80 et 90°C) pendant (1, 2 et 3 h). Ils ont trouvé que la meilleure méthode d'extraction des capsaïcinoïdes serait soit d'utiliser MeOH/60°C/2h, 80% EtOH/90°C/1h ou ACN/80°C/1h.

III.1. 3. 4. Effet du temps d'extraction

Après la sélection du solvant, la concentration d'eau et la température convenable pour l'extraction des capsaïcinoïdes, l'influence du temps de l'extraction a été étudié. Trois intervalles de temps ont été choisis : 20, 40 et 60 min.

Selon les résultats, la prolongation du temps de l'extraction au delà de 20 min résulte en une dégradation de la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine. Donc les meilleures conditions pour l'extraction des capsaïcinoïdes est l'utilisation de 75% de méthanol à 100°C pendant 20 min.

Certains auteurs comme Barbero et al. (2008), Chuichulcherm et al. (2013) ont confirmé que le temps adéquat pour l'extraction des capsaïcinoïdes serait entre 10 et 20 min lorsque le méthanol est utilisé comme solvant.

III.1.4. Identification et quantification des capsaïcinoïdes par HPLC-DAD-ESI-MS

La capsaïcine, la dihydrocapsaïcine, la nordihydrocapsaïcine, l'homocapsaïcine et l'homodihydrocapsaïcine (fig.23) ont été identifiées par HPLC-DAD-ESI-MS. Ces composés ont été quantifiés dans le péricarpe, le placenta et les graines du piment frais et sec. L'homocapsaïcine a été quantifiée en utilisant la courbe d'étalonnage de la capsaïcine ; et la nordihydrocapsaïcine, l'homodihydrocapsaïcine grâce à la courbe de la dihydrocapsaïcine en raison d'inexistence des standards de ces molécules.

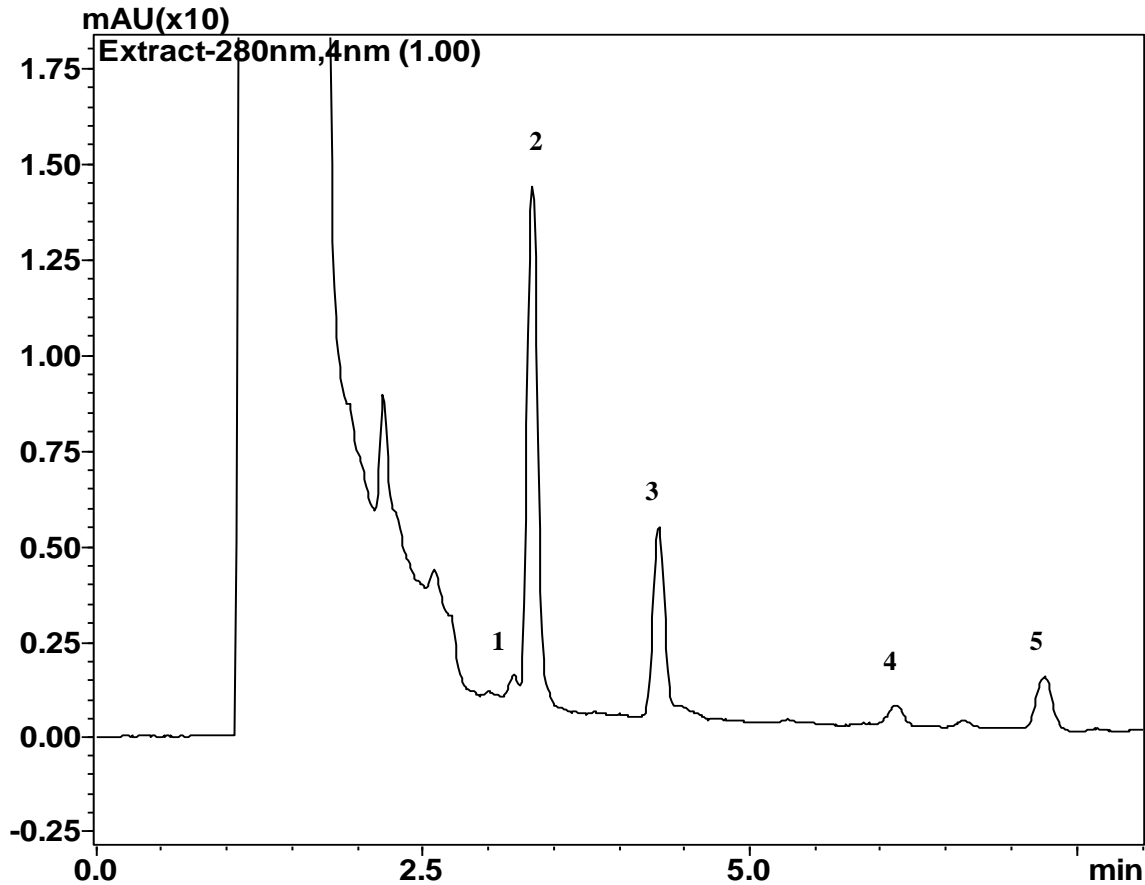


Figure 23: Les capsaïcinoïdes identifiés par HPLC-DAD-ESI-MS : 1- Nordihydrocapsaïcine, 2- Capsaïcine, 3- Dihydrocapsaïcine, 4- Homocapsaïcine, 5- Homodihydrocapsaïcine.

Le [tableau 5](#) montre la distribution des capsaïcinoïdes dans le placenta, le péricarpe et les graines du fruit du piment. D'après les résultats, le taux des capsaïcinoïdes est plus élevé dans le placenta suivi des graines et enfin le péricarpe. Cela est dû au fait que les capsaïcinoïdes sont produits dans le placenta.

Les graines contiennent plus de capsaïcinoïdes par rapport au péricarpe en raison qu'elles sont plus proches du site de production des capsaïcinoïdes qui est le placenta. Le contenu élevé de lipides dans les graines peut aussi participer à leur pouvoir de retenir plus les capsaïcinoïdes vu que ce sont des liposolubles ([Chinn et al., 2011](#)).

Tableau 5: Contenu en capsaïcinoïdes dans le péricarpe, le placenta et les graines du *Capsicum annuum* (µg/g MS).

	Péricarpe		Placenta		Graines	
	frais	sec	frais	sec	fraîches	sèches
Capsaïcine	51.68 ±0.32	52.96 ±0.48	497.63 ±1.71	1480.18 ±2.89	195.64 ±3.49	225.78 ±1.070
Dihydrocapsaïcine	12.58 ±0.17	15.08 ±0.38	224.13 ±2.92	819.56 ±3.29	83.31 ±4.45	94.86 ±3.11
Nordihydrocapsaïcine	<LOD	<LOD	23.52 ±0.48	125.60 ±3.53	2.32 ±0.04	6.72 ±0.64
Homocapsaïcine	<LOD	<LOD	<LOD	67.98 ±0.90	<LOD	<LOD
Homodihydrocapsaïcine	1.10 ±0.31	3.35 ±0.48	9.10 ±0.47	49.64 ±1.21	3.11 ±0.16	7.59 ±0.93

On remarque que la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine sont les capsaïcinoïdes majoritaires dans le fruit du piment avec des pourcentages respectives de 59.83% et de 33.12% des capsaïcinoïdes du placenta sec. L'homocapsaïcine, la nordihydrocapsaïcine et l'homodihydrocapsaïcine ne se trouvent que sous forme de traces.

Cisneros-Pineda *et al* (2007) ont quantifié la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine de sept variétés de piment dans le placenta, le péricarpe et les graines. Ils ont trouvé que la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine se trouvaient principalement dans le placenta dans toutes les variétés étudiées avec des valeurs qui varient de 18.99 µg/g à 5689 µg/g et de 370 à 5043 µg/g de matière sèche respectivement.

Plusieurs études ont été menées sur l'accumulation des capsaïcinoïdes en relation avec la taille, l'âge et le stade du développement du fruit du piment (Estrada *et al.*, 2000; Mueller-Seitz *et al.*, 2008 ; Barbero *et al.*, 2014). Tous les résultats ont confirmé que les capsaïcinoïdes commencent à s'accumuler durant les premiers stades de développement jusqu'à atteindre un maximum pendant la maturation. A ce moment, plus de 60% de capsaïcinoïdes sont dégradés après leur oxydation par la peroxydase (Bernal *et al.*, 1993). Il a été aussi démontré que les fruits du piment qui ont une déficience d'eau produisent plus de capsaïcinoïdes (Sung *et al.*, 2005 ; Ruiz-Lau *et al.*, 2011 ; Barbero *et al.*, 2014).

Les quantités des capsaïcinoïdes présentes dans le placenta est 7 fois supérieure à celles des graines et 36 fois au péricarpe (tableau 6) qui correspond à 1099.82, 39847.40 et 5392.76 unités Scoville respectivement. Ces résultats confirment que les capsaïcinoïdes sont synthétisés dans le placenta et que leur présence dans les graines et le péricarpe n'est qu'une conséquence de leur diffusion.

Govindrajan (1986) a trouvé que la quantité des capsaïcinoïdes était 20 fois supérieure dans le placenta que dans le péricarpe. Le contact entre le placenta et les autres tissus peut conduire à l'absorption des capsaïcinoïdes par ces parties qui sont non productrices de capsaïcinoïdes (Chinn *et al.*, 2011).

Les quantités en capsaïcinoïdes des tissus secs étaient plus importantes par rapport au frais. Le piment frais a une couche de cire qui peut empêcher la diffusion du solvant et

l'extraction de ces composés. Cette couche a été dégradée lors du séchage ce qui a amélioré la capacité d'extraction des capsaïcinoïdes (Chinn *et al.*, 2011).

Le test de Scoville constitue la première approche utilisée au laboratoire pour mesurer l'âcreté des piments. Dans cette méthode, des sujets humains goûtent un échantillon de piment, et déterminent son niveau de chaleur. Ces échantillons de piment sont dilués au laboratoire jusqu'à ce que cette chaleur ne soit plus ressentie par les dégustateurs. Cette dilution est appelée l'Unité de Scoville. Cette méthode est la plus simple et la moins coûteuse, toutefois, elle a ses limites car c'est une technique subjective (Dicecco, 1976).

Selon le contenu total en capsaïcinoïdes et la valeur en unités Scoville, la classification suivante a été proposée (Govindarajan, 1986 ; Weiss, 2002) : piment doux non piquant (0.1 à 0.4%, 0-5000 SHU), moyennement piquant (0.2-0.04%, 5000-20000 SHU), piquant (0.4-0.6%, 20000-70000 SHU) et très piquant (0.6-1.4%, 70000-300000 SHU). Selon cette classification et les résultats obtenus, on peut déduire que notre piment fait parti des piments piquants.

Tableau 6 : Capsaïcinoïdes totaux et Unités Scoville du péricarpe, placenta et les graines du piment.

	Capsaïcinoïdes (mg/g MS)	Unités Scoville
Péricarpe frais	0,062	996,23
Péricarpe sec	0,068	1099,82
Placenta frais	0,754	12145,57
Placenta sec	2,474	39847,40
Graines fraîches	0,284	4578,47
Graines sèches	0,335	5392,76

III.1.5. Calcul du rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction des capsaïcinoïdes a été calculé par l'ajout de 5 ppm de chaque standard 24h avant l'extraction. Les capsaïcinoïdes ont été extraits selon les conditions préalablement optimisées (75% de méthanol à 100°C pendant 20 min). Le taux de la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine a été calculé grâce aux courbes d'étalonnage. Le rendement de la capsaïcine était de l'ordre de 89.76% et celui de la dihydrocapsaïcine était de 83.45%.

III.2. Analyse des polyphénols de piment

III.2.1. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux du piment évalués par colorimétrie

Le contenu des polyphénols et flavonoïdes totaux des trois extraits a été déterminé par des méthodes colorimétriques. Les résultats sont reportés dans le [tableau 7](#). En ce qui concerne les polyphénols totaux, La courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de piment frais (mg EGA/ g).

L'équation de la courbe est $y = 0.004 x + 0.031$ et le coefficient de corrélation de l'ordre de $R^2 = 0.999$ ([fig.24](#)). Tandis que la quercétine a été utilisée pour quantifier les flavonoïdes totaux, les résultats sont exprimés en mg de quercétine par gramme de piment frais (mg EQ/g). L'équation de la courbe d'étalonnage est $y = 0.019 x + 0.029$ et $R^2 = 0.999$.

Tableau 7: Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux

	Polyphénols totaux mg GAE/g piment	Flavonoïdes totaux mg QE/g piment
MeOH	1.199 ± 0.0082	0.046 ± 0.002
EA	0.276 ± 0.0033	0.067 ± 0.0012
MeOH+ EA	1.373 ± 0.0046	0.098 ± 0.0015

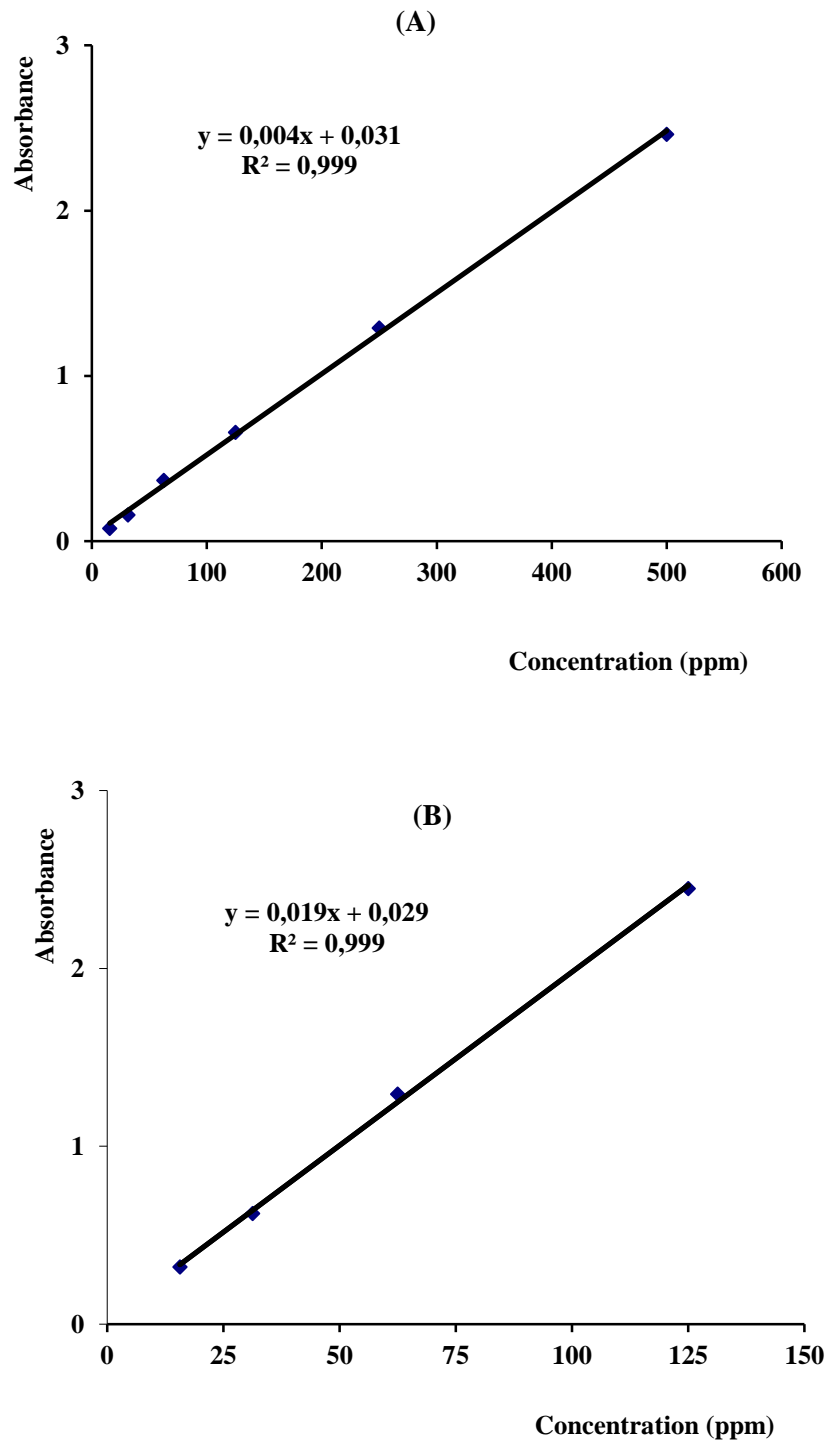


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de (A) : Acide gallique, (B) : Quercétine.

III.2.2. Optimisation des conditions chromatographiques

III.2.2.1. Choix de la phase mobile

Les systèmes de chromatographie en phase inverse sont caractérisés par de fortes interactions entre la phase mobile et les différentes molécules de l'échantillon à analyser. La phase mobile est normalement constituée d'un mélange eau-solvants organiques dans des proportions variables. Ces solvants doivent tous être parfaitement miscibles entre eux et également avec l'eau.

Il existe cependant trois solvants organiques qui possèdent ces caractéristiques et qui, de plus, possèdent une faible viscosité et une bonne transparence à l'U.V (méthanol, l'acétonitrile et le tétrahydrofurane). Dans le premier cas, une faible viscosité permet de diminuer la pression interne dans le système chromatographique et ainsi éviter les pressions limites permises pour les différentes colonnes. Leur bonne transparence nous permet d'utiliser efficacement des appareils de détection U.V, car leur faible absorbance ne camoufle pas ou très peu le signal engendré par le passage de l'analyte dans le détecteur (Montpas, 1999).

Parmi ces trois solvants, le méthanol et l'acétonitrile ont été étudiés dans notre travail en raison de leur grande utilisation dans les analyses des composés phénoliques. Les chromatogrammes obtenus avec les deux solvants sont présentés dans la [figure 25](#). L'utilisation d'acétonitrile comme phase mobile a permis de réduire le temps d'analyse.

La polarité du méthanol est plus importante par rapport à l'acétonitrile qui rend le temps d'analyse plus important en mode inverse, ainsi la force d'éluion de l'acétonitrile est plus puissante que celle du méthanol.

En fait, c'est l'interaction chimique des composés entre la phase stationnaire et la phase mobile (éluant) qui permet réellement d'obtenir une séparation. Chaque composé de l'analyte possède un coefficient de partage spécifique, représentant son affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. La rétention sera favorisée dans le cas où le coefficient de partage pour la phase stationnaire est le plus élevé, tandis qu'un coefficient élevé pour la phase mobile favorisera l'éluion, Plus la différence entre les deux

coefficients est grande, plus la rétention sera importante ou l'élution rapide (Montpas, 1999).

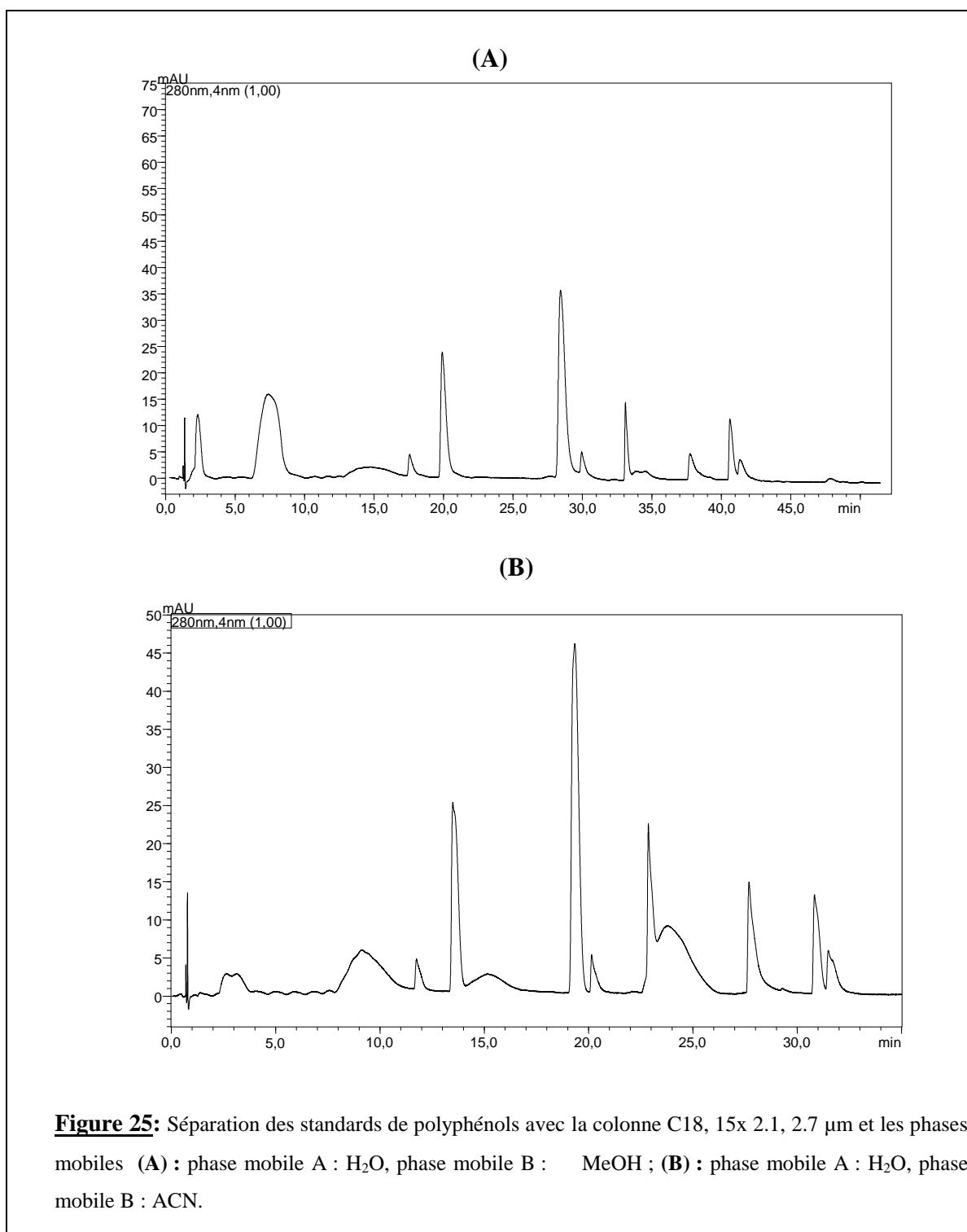
L'effet des deux acides (acide acétique et acide formique) sur la performance séparative de la phase mobile a été étudié. L'ajustement du pH des solvants organiques peut se faire de la même façon que celui de l'eau selon l'Institut National des Standards et de la Technologie (INST) (Bauke *et al.*, 1993 ; Barbosa *et al.*, 1998). La modification de la phase mobile en utilisant un agent organique serait un outil très efficace pour manipuler la sélectivité de la séparation (Snyder, 1974 ; Neue *et al.*, 2006 ; Amundsen *et al.*, 2013).

L'utilisation d'une phase mobile contenant un sel non-volatil, par exemple un tampon phosphate, est à éviter en chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse en raison de leur accumulation dans la source d'ionisation, entraînant ainsi rapidement des problèmes lors de l'ionisation.

Par contre, une phase mobile contenant un acide organique très volatil, comme l'acide formique ou acétique, demeure une solution idéale pour fournir une source de proton et ainsi ioniser des composés en mode positif sous la forme $[M+H]^+$. Toutefois, bien que cet acide soit parfait en spectrométrie de masse, la phase mobile doit être compatible avec la colonne utilisée et les molécules à séparer (Maheux, 2012).

Selon les résultats (fig. 26), l'addition des deux acides au solvant acétonitrile a nettement amélioré la forme des pics ainsi la séparation. La séparation et l'ionisation sont souvent améliorées par l'ajout d'un modificateur comme l'acide acétique, l'acide formique, l'acétate d'ammonium ou bien formate d'ammonium (El Mrabet, 2008).

L'état d'ionisation des molécules d'analytes dépend du pH de la phase mobile, les molécules ionisées sont apolaires et sont retenues plus longtemps dans la colonne dans les conditions inverses. Les analyses en phase inverse LC-MS sont traditionnellement menées avec des phases mobiles acides, ce qui favorise l'ionisation (Amundsen *et al.*, 2013). Le pH des phases mobiles est un facteur majeur qui influence le comportement chromatographique des polyphénols qui contiennent une fonction ionique. Leur temps de rétention dépend du pourcentage des formes ionisées et non ionisées (Barbosa *et al.*, 1998).



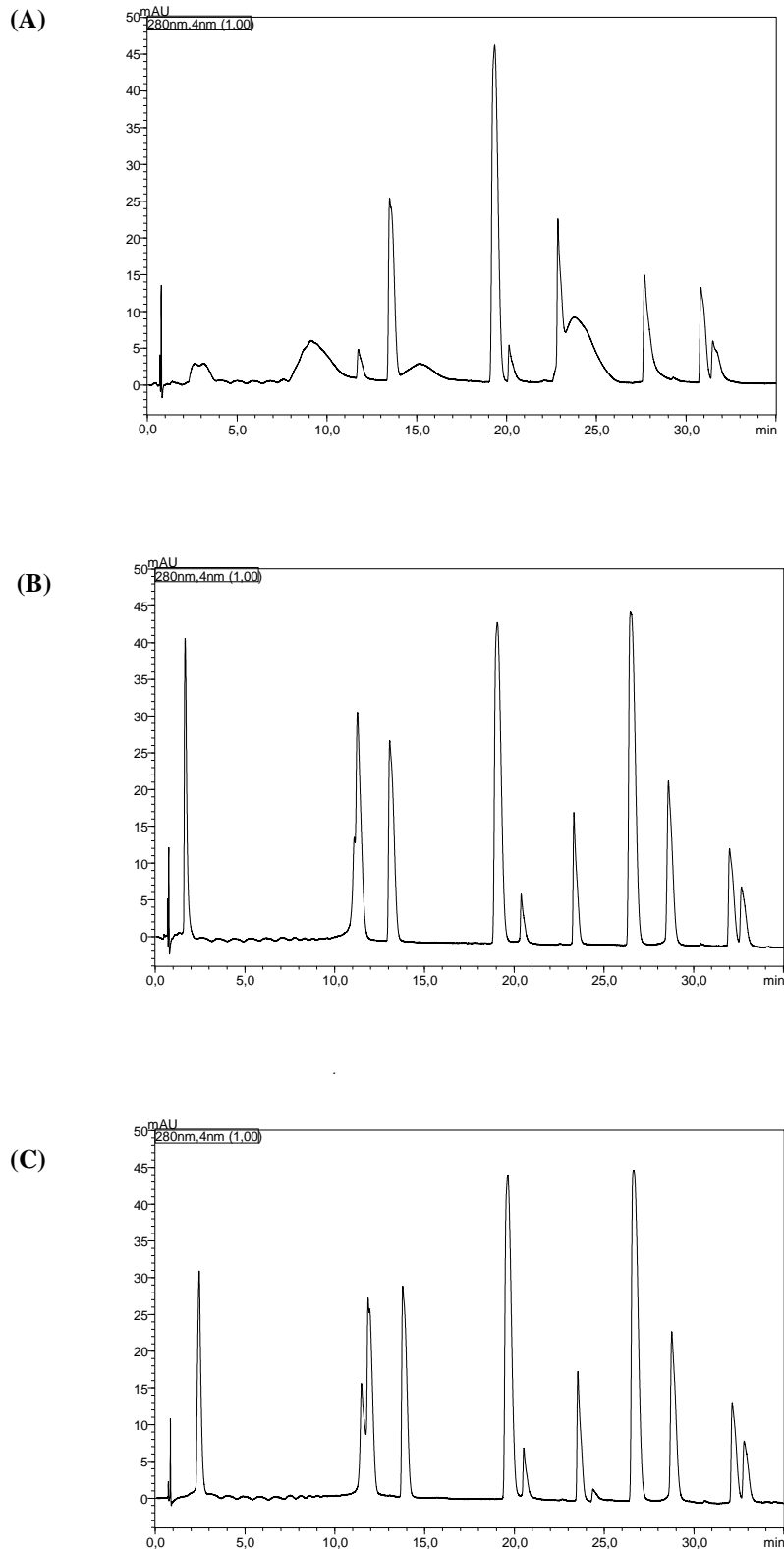


Figure 26 : Séparation des standards de polyphénols avec (A) : phase mobile A : H₂O, phase mobile B : ACN ; (B) : phase mobile A : H₂O + AF, phase mobile B : ACN+ AF ; (C) : phase mobile A : H₂O + AA, phase mobile B : ACN+ AA.

Le nombre de pics obtenus avec l'acide acétique était supérieur à celui de l'acide formique. L'acide acétique a permis une meilleure séparation des polyphénols, la raison pour laquelle qu'il a été retenu pour le reste de l'expérimentation.

Hua et Jenke (2012) ont essayé d'optimiser la phase mobile pour augmenter la sensibilité et la détection en LC-MS. Ils ont utilisé le méthanol comme phase mobile avec différentes combinaisons d'acides et de sels. Ils ont rapporté que l'ionisation est beaucoup plus favorisée avec l'acide acétique que l'acide formique, ce qui améliore la séparation et la détection.

III.2.2.2. Phase stationnaire

Lors d'une analyse en chromatographie liquide, Le choix de la phase stationnaire peut être extrêmement difficile. La sélectivité de la colonne est le facteur qui influence le plus la séparation des pics.

La phase stationnaire utilisée Lors de la chromatographie en phase inverse est constituée de plusieurs chaînes de carbones plus ou moins longues, dont chacune d'elles est Liée à un atome de silicium d'un gel de silice. Ce gel homogène constitue L'élément et le support principal de la phase stationnaire. Ce sont en fait les siliciums sous forme SiO_2 qui réagissent et deviennent Liés aux chaînes de carbones introduites dans le gel. La phase stationnaire prend alors une forme structurée avec une multitude de chaînes alkyles les unes à côté des autres (Montpas, 1999).

Cette partie non-polaire devient L'élément adsorbant pour les composés peu polaires et Le coefficient de partage la favorise au profit de la phase mobile qui doit être un éluant polaire (acétonitrile, méthanol, H_2O). C'est ce type de composé qui sortira de la colonne en dernier. Les plus polaires, par ailleurs, sont peu retenus.

On doit cependant respecter les limites de pH de la phase mobile lorsque L'on utilise ce type de phase stationnaire. Un pH trop bas peut causer l'hydrolyse des groupements non-polaires, pour former un groupement HO-Si-R_3 qui se détache de la phase stationnaire et détruit donc sa structure initiale. Un pH trop élevé peut tout

simplement dissoudre la silice du support de gel. Ces destructions affectent énormément l'efficacité, la reproductibilité et la durabilité de la colonne. Souvent, elle devient immédiatement inutilisable (Montpas, 1999).

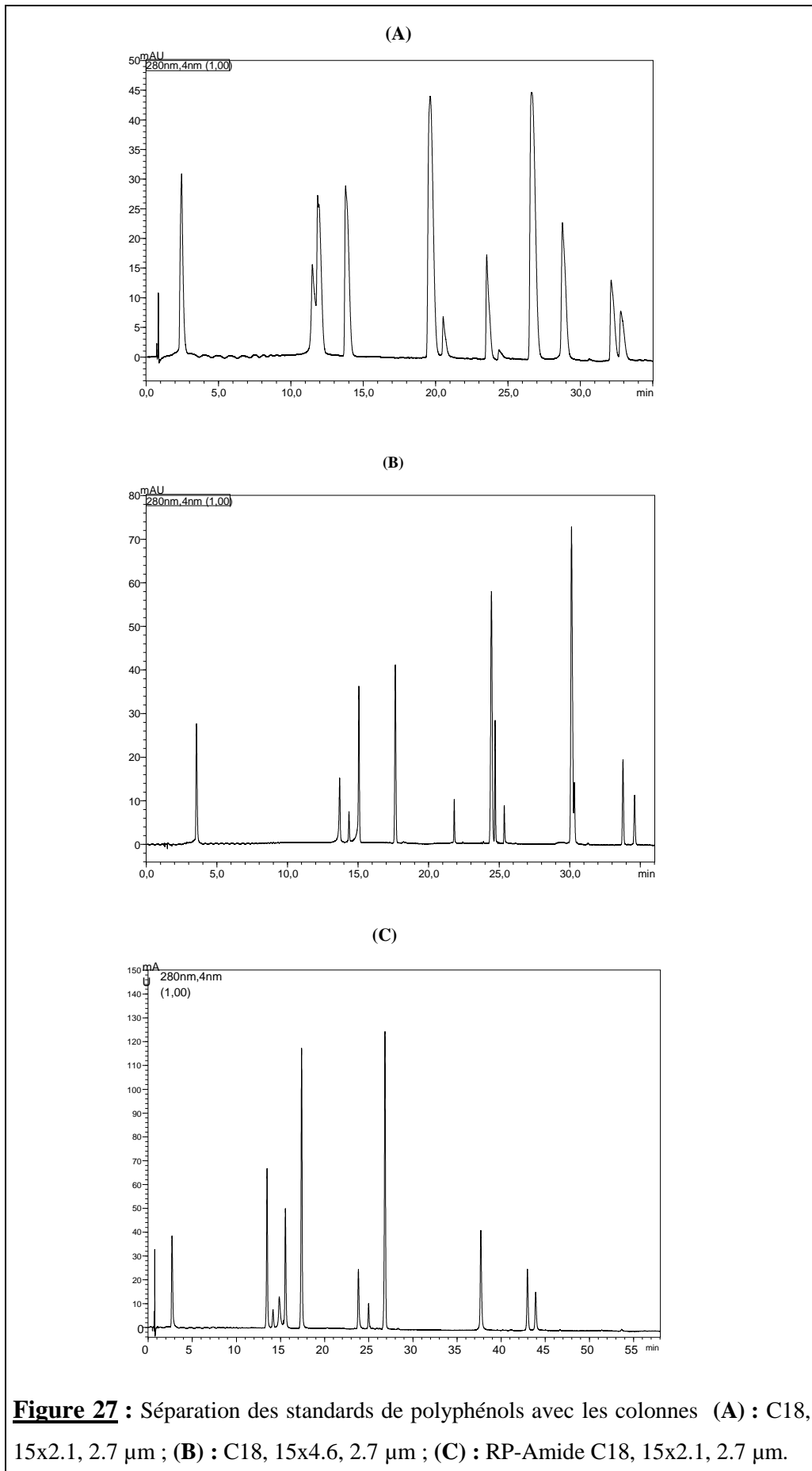
Afin d'améliorer encore la séparation des composés phénoliques, trois colonnes ont été étudiées en utilisant l'eau et l'acétonitrile comme phases mobiles : C18, 15x 2.1, 2.7 μm , C18, 15x 4.6, 2.7 μm et RP-Amide C18, 15x 2.1, 2.7 μm . Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 27. Selon les résultats, l'utilisation des deux colonnes (C18, 15x4.6, 2.7 μm et RP-Amide C18, 15x2.1, 2.7 μm) a permis de donner une bonne séparation des standards phénoliques, mais la meilleure séparation a été obtenue avec la RP-Amide.

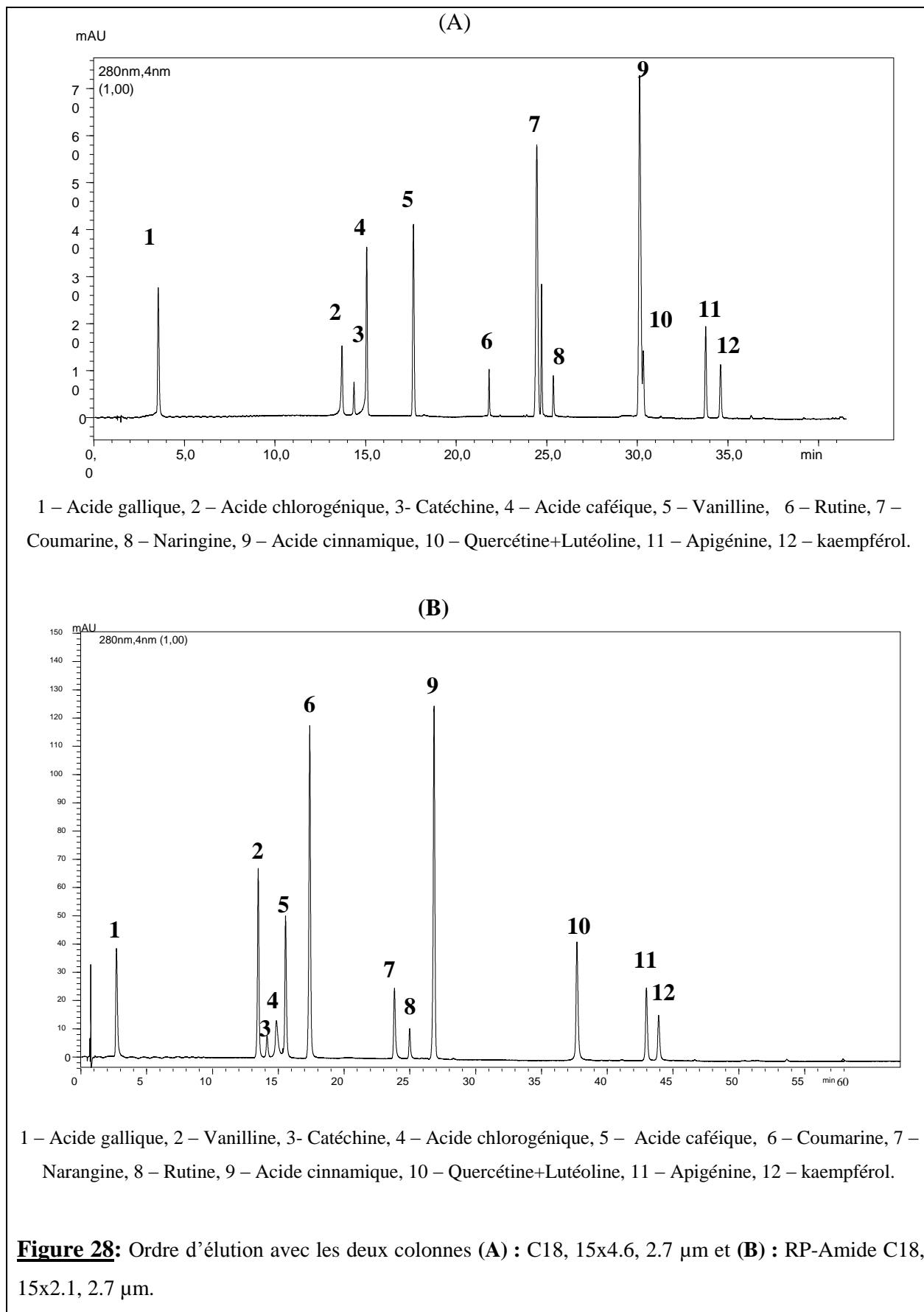
Les phases stationnaires habituellement employées pour la séparation de composés phénoliques sont les colonnes de silice greffées avec des chaînes C18 (Robards et Antolovich, 1997). La séparation peut être réalisée en mode isocratique ou en mode gradient d'élution, toutefois la vaste gamme de polarité de ces molécules nécessitent souvent de travailler en gradient d'élution pour éviter les co-élutions et pour éluer l'ensemble des composés (Michel, 2011).

L'utilisation de la colonne RP-Amide fournit une bonne sélectivité en phase inverse pour les composés polaires, en particulier pour les donneurs de liaison hydrogène. Il permet l'amélioration de la forme de pic (Chocholouš et al., 2013).

En comparant les deux colonnes RP-Amide et la C18, nous avons remarqué que l'ordre d'élution des standards n'était pas le même (fig.28). Avec la C18, l'ordre d'élution était : Acide gallique, acide chlorogénique, catéchine, acide caféique, vanilline, rutine, coumarine, naringine, acide cinnamique, quercétine + lutéoline, apigénine et kaempférol.

Lorsque la même analyse a été effectuée avec la RP-Amide, l'ordre d'élution était comme suite: Acide gallique, vanilline, catéchine, acide chlorogénique, acide caféique, coumarine, naringine, rutine, acide cinnamique, quercétine + lutéoline, apigénine et kaempférol. Une co-élution entre la quercétine et la lutéoline a été remarquée avec les deux colonnes.





Les séparations par HPLC peuvent être effectuées en mode isocratique, lorsque la composition en solvants de la phase mobile demeure constante, ou en mode gradient, c'est-à-dire que la composition de la phase mobile varie durant l'analyse. Lors de l'utilisation d'un gradient, on débute toujours par une composition de phase mobile de polarité opposée à celle de la phase stationnaire, pour évoluer vers une polarité qui tend vers celle de la phase stationnaire. Ainsi, en RP-HPLC, on commence la séparation avec un mélange de solvants polaire, donc à plus grande teneur en phase aqueuse, ce qui permet aux analytes de demeurer retenus sur la colonne chromatographique. On augmente ensuite graduellement la proportion de la phase organique (Maheux, 2012).

Différents gradients ont été utilisés pour séparer ces deux standards phénoliques, mais la co-élution était inévitable. Un autre essai a été réalisé avec la colonne RP-Amide mais cette fois-ci avec le méthanol comme phase mobile, ce qui a permis de résoudre le problème et de séparer la quercétine et la lutéoline (fig.29). Le gradient final optimisé est: 0 min- 5 min: 2% B; 5- 60 min : 50% B; 60-70 min: 50% B ; 71 min, 2% B.

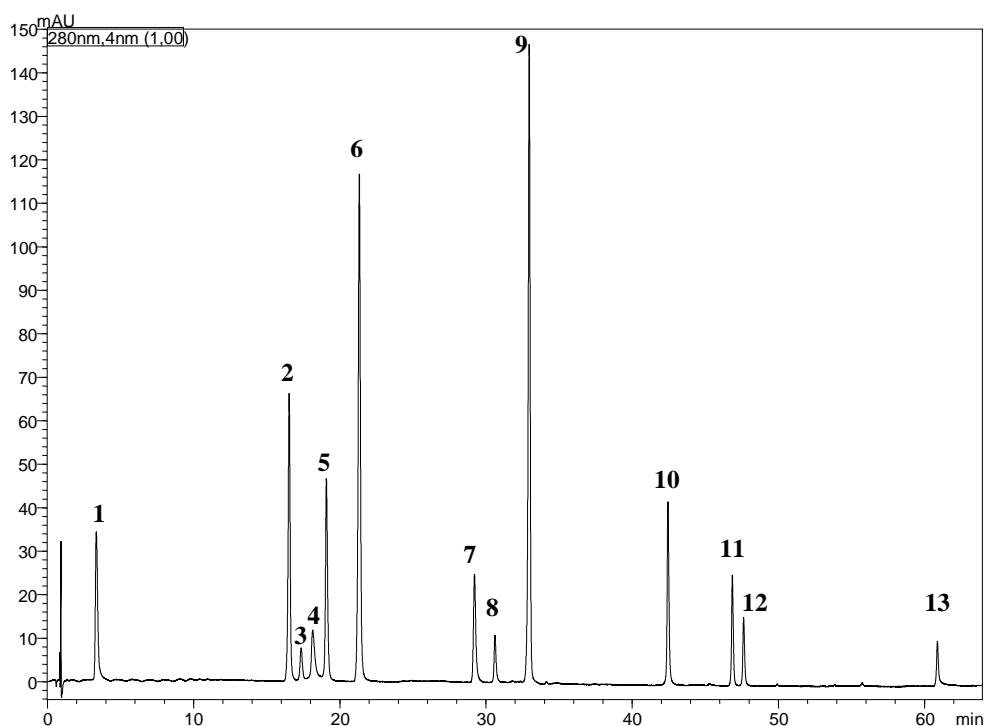


Figure 29: Séparation des standards phénoliques avec colonne RP-Amide C18 15x2.1, 2.7 μ m et méthanol comme modificateur organique. 1 – Acide gallique, 2 – Vanilline, 3- Catéchine, 4 – Acide chlorogénique, 5 – Acide caféique, 6 – Coumarine, 7 – Narangine, 8 – Rutine, 9 – Acide cinnamique, 10 –Lutéoline, 11 – Quercétine, 12- Apigénine, 13 – kaempférol.

III.2.3. Identification et quantification des polyphénols de piment

Le profil phénolique de l'extrait de piment obtenu par les deux solvants méthanol et acétate d'éthyle a été identifié par HPLC-DAD-ESI-MS (fig.30). La quantification a été faite grâce aux courbes d'étalonnage obtenues avec les treize standards (fig.31). Le tableau 8 montre les différents polyphénols identifiés et leur quantité dans le piment frais.

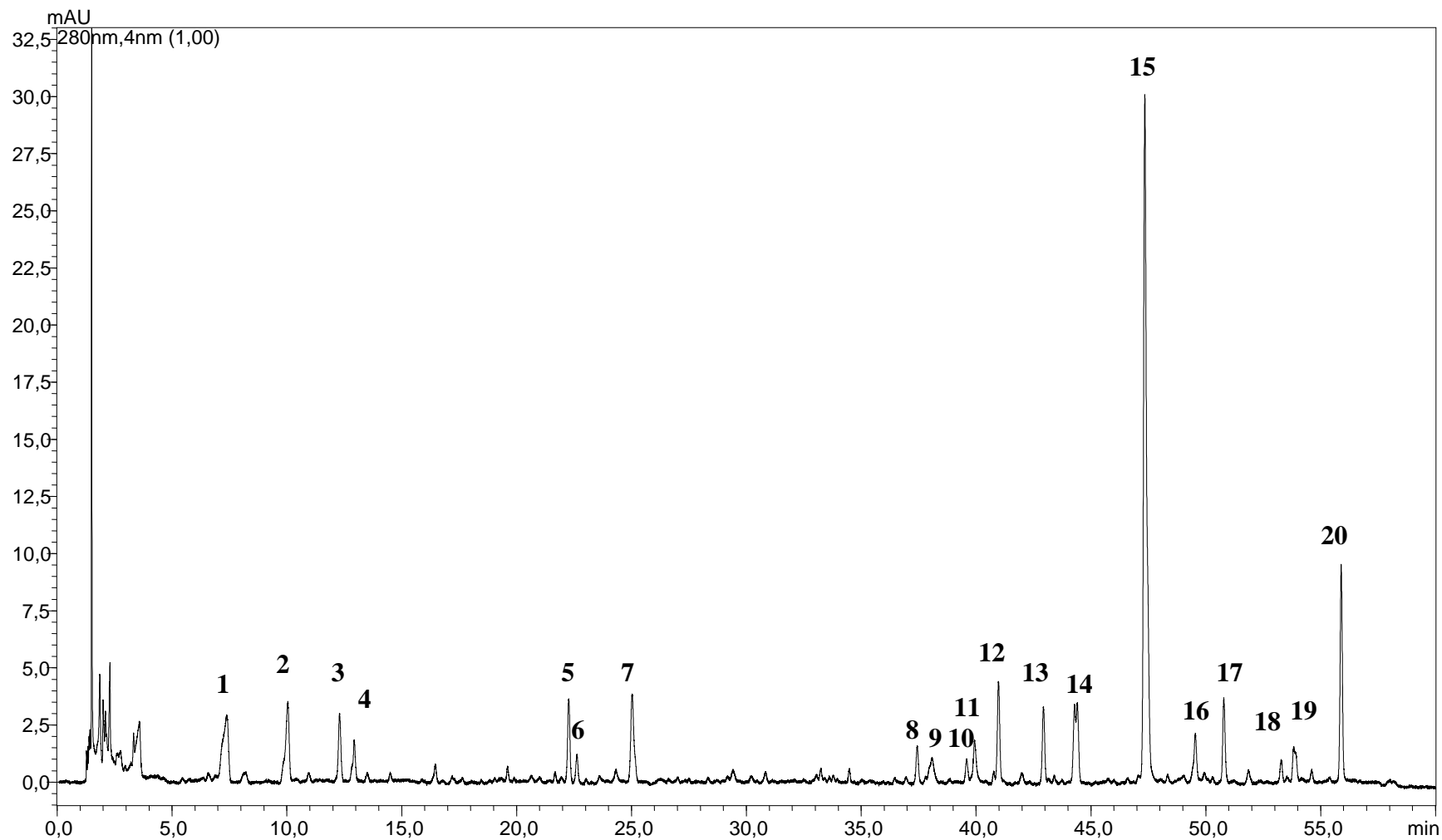
Selon les résultats, le composé phénolique le plus abondant est la quercétine rhamnoside (82.60 µg/g de piment frais). Cette valeur est supérieure à celle trouvée par Marin et al. (2004) qui ont étudié les polyphénols du piment vert et rouge dans les deux états immatures et matures. Leurs résultats ont montré que la quercétine rhamnoside et lutéoline glucoside représentaient les flavonoïdes majeures des piments.

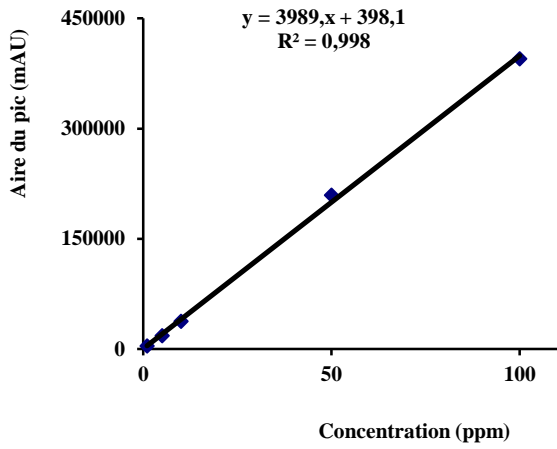
Le piment vert était plus riche de ces deux flavonoïdes que le piment rouge. La quercétine rhamnoside et lutéoline glucoside diminuaient avec la maturation (42.2 µg/g et 41.4 µg/g dans le piment vert immature, 5.7 µg/g et 7.3 µg/g dans le piment vert mature, 3.2 µg/g et 4.4 µg/g dans le piment rouge immature et enfin 3.1 µg/g et 3.9 µg/g dans le piment rouge mature) (Marin et al., 2004). Le piment utilisé dans notre étude est plus riche en lutéoline glucoside (8.09 µg/g).

Parmi les flavonoïdes, Les dérivés de la quercétine sont les plus dominants avec un taux de 113.46 µg/g, suivis des dérivés du kaempférol (30.86 µg/g) et la rutine (18.30 µg/g). Les composés suivant : hydroxybenzoyl hexose, acide vanillique glucoside, hydroxycoumarine, lutéoline et quercétine ont été reportés pour la première fois.

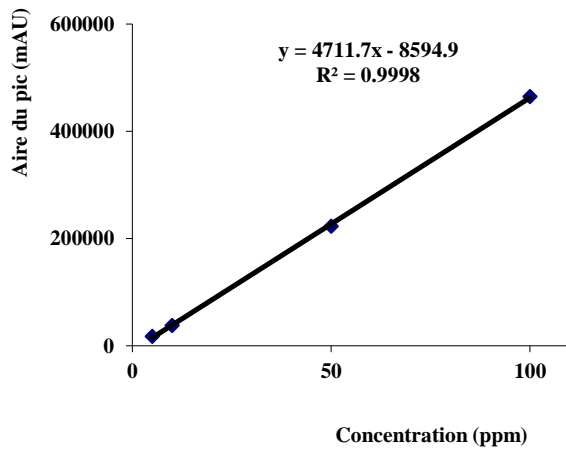
Materska et al. (2005) ont identifié les polyphénols dans quatre variétés de piment dans des stades verts et rouges. Huit polyphénols ont été identifiés dont deux dérivés de quercétine rhamnoside et trois de lutéoline glucoside et aussi un dérivé d'apigénine glucoside. Les quantités de ces flavonoïdes varient selon la variété et le stade de maturation, mais la lutéoline glucoside était le flavonoïde le plus abondant suivie de la quercétine rhamnoside. Le piment vert reste toujours plus riche en composés phénoliques que le piment rouge.

Figure 30 : Le profil phénolique du piment (*Capsicum annuum* L.) par HPLC-DAD-ESI-MS.

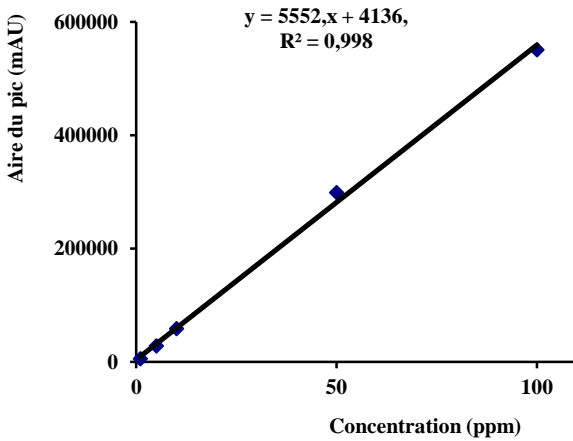




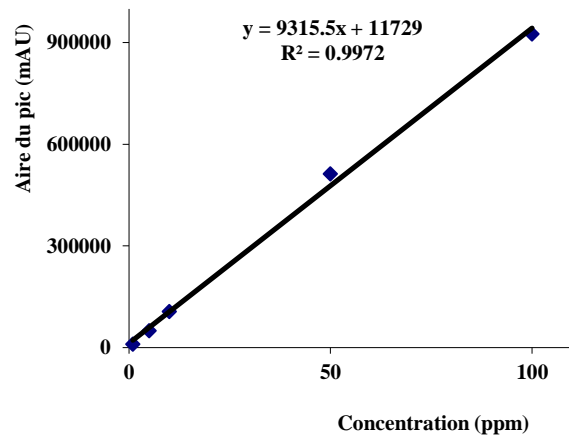
Acide gallique



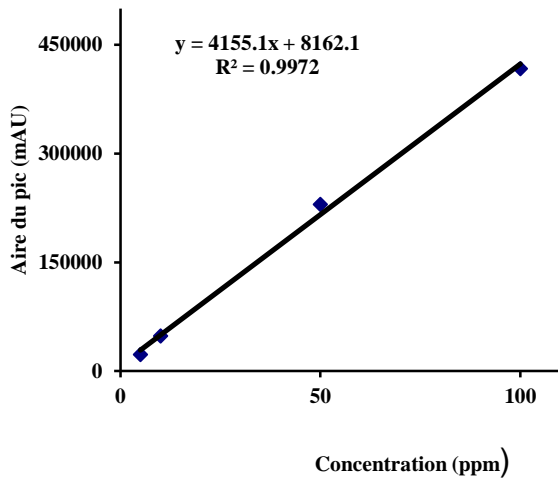
Acide chlorogénique



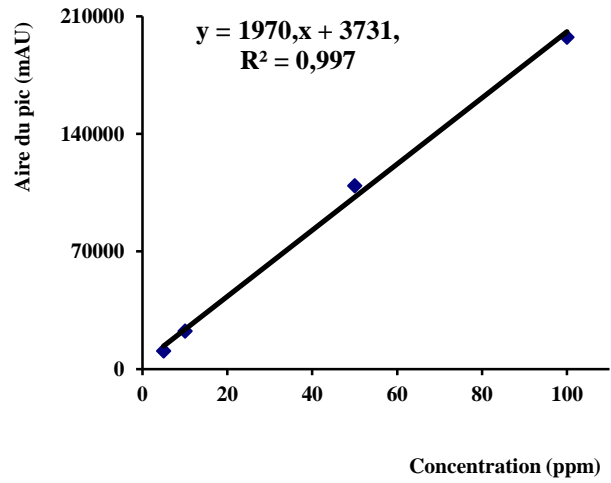
Acide caféique



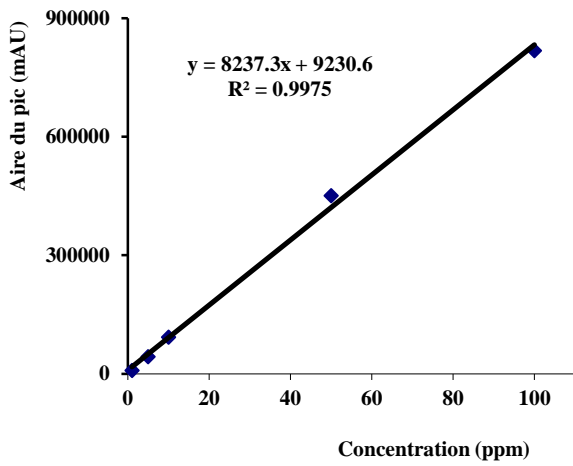
Acide cinnamique



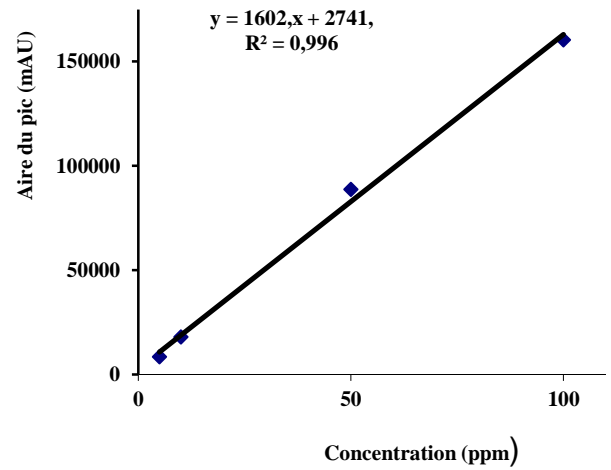
Vanilline



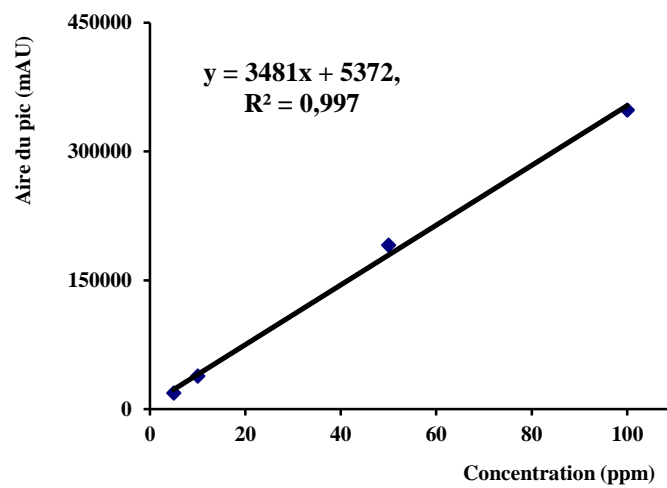
Naringine



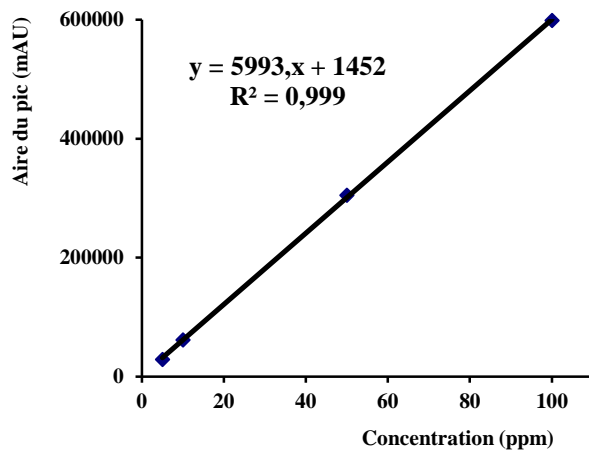
Coumarine



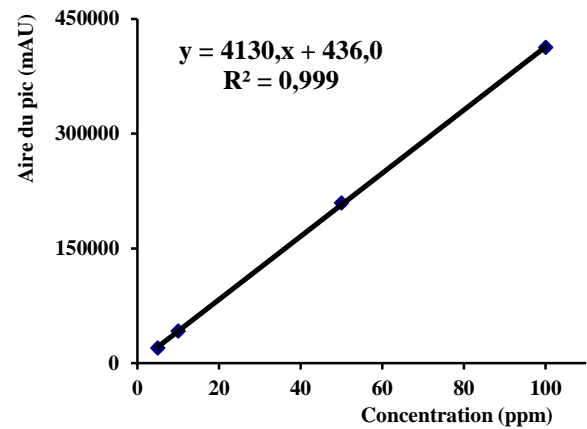
Rutine



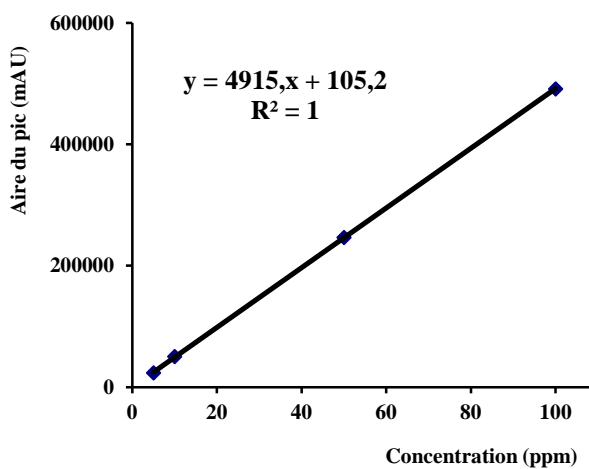
Kaempférol



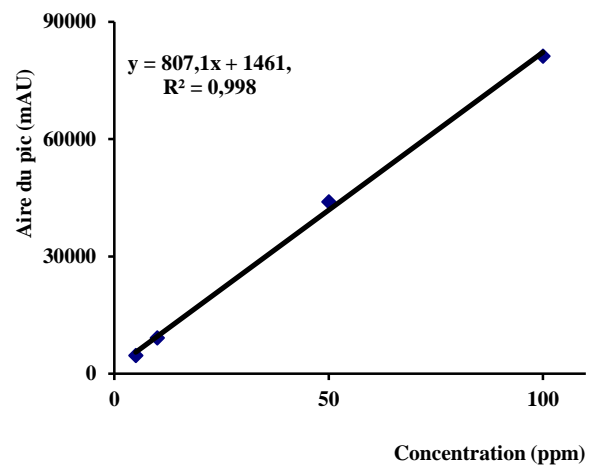
Quercétine



Lutéoline



Apigénine



Catéchine

Figure 31: Courbes d'étalonnage des standards étudiés : Acide gallique, acide chlorogénique, catéchine, acide caféique, vanilline, rutine, coumarine, naringine, acide cinnamique, quercétine, lutéoline, apigénine et kaempférol.

Tableau 8: Identification et quantification des polyphénols par HPLC-DAD-ESI-MS.

Pic	Formule moléculaire	t_R [min]	[M-H] ⁻	UV/Vis max [nm]	Composé	Quantification (µg/g)
1	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	7.3	325	264, 300	Dérivé d'acide p-coumarique	6.97
2	C ₁₈ H ₁₇ NO ₅	10.2	326	264, 300	p-Coumaroyl tyrosine	6.81
3	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	12.3	221	264, 305	Acide p-Coumaroyl glycolique	6.47
4	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	12.9	299	270	Hydroxybenzoyl hexose	3.29
5	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	22.3	329	254, 280	Acide vanillique glycoside	4.02
6	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	22.6	341	286, 338	Caffeoyl glucoside	2.59
7	C ₉ H ₆ O ₄	25.0	177	315	Daphnetine	16.29
8	C ₉ H ₆ O ₃	37.4	161	277, 315	Hydroxycoumarine	2.42
9	C ₉ H ₁₀ O ₄	38.1	181	285, 325	Acide hydrocafféique	3.03

10	$C_{33}H_{40}O_{20}$	39.9	755, 285	365	Kaempférol di glucoside	17.17
11	$C_{21}H_{20}O_{12}$	41.0	463, 301	262, 356	Quercétine glucoside	19.86
12	$C_{26}H_{28}O_{15}$	42.9	579, 285	365	Kaempférol glucoside	13.69
13	$C_{27}H_{32}O_{14}$	43.4	579	284	Naringine	19.99
14	$C_{27}H_{30}O_{16}$	44.2	609, 301	260, 357	Rutine	18.30
15	$C_{27}H_{30}O_{16}$	47.3	447, 301	262, 355	Quercétine rhamnoside	82.60
16	$C_{21}H_{18}O_{12}$	49.5	461, 285	260, 348	Lutéoline glucuronide	5.09
17	$C_{29}H_{30}O_{18}$	50.8	665, 285	260, 350	Lutéoline di-glucoside	5.66
18	$C_{15}H_{10}O_6$	53.3	285	260, 348	Lutéoline	0.88
19	$C_{21}H_{20}O_{11}$	53.8	447, 285	260, 348	Lutéoline glucoside	1.15
20	$C_{15}H_{10}O_7$	55.9	301	260, 370	Quercétine	10.81

Le profil phénolique de trois variétés de piment a été étudié par Jeong *et al.* (2011). Après l'identification par HPLC-MS/MS, plusieurs composés ont été identifiés. La composition était différente d'une variété à une autre. La lutéoline glucoside est le principal flavonoïde dans deux variétés d'environ 80.6 et 81.9 µg/g, et 206.6 µg/g dans la troisième variété. Alors que la quercétine rhamnoside ne se trouvait que dans la troisième variété avec un taux de 1501.8 µg/g. d'autres travaux ont aussi confirmé ces résultats (Wahyuni *et al.*, 2011 ; Materska, 2014).

III.2.4. Rendement

Le rendement a été calculé par l'ajout d'un standard (daphnétine) 24h avant l'extraction. Après l'analyse de l'extrait par HPLC-DAD-ESI-MS, la daphnétine a été quantifiée grâce à la courbe d'étalonnage (fig.32) et le rendement de l'extraction a été calculé. Le rendement était de l'ordre de 82.90%.

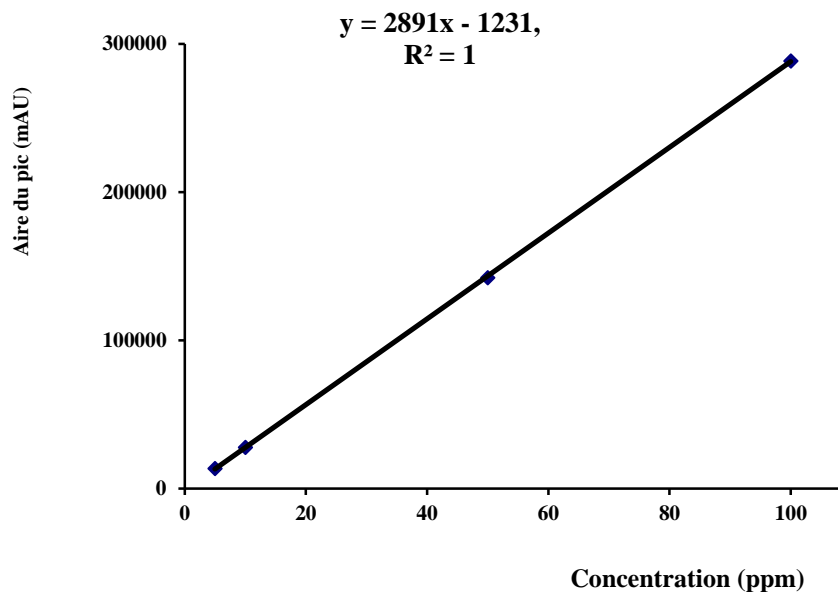


Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la daphnétine.

III.3. Analyse des caroténoïdes de piment

III.3. 1. Teneur en caroténoïdes totaux du piment

La teneur en caroténoïdes a été déterminée par des méthodes spectrométriques. La courbe est établie en utilisant la β -carotène comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent de β -carotène par 100 g de piment frais (mg ECa/100 g). L'équation de la courbe est $y = 0.111x - 0.009$ (fig.33) et le coefficient de corrélation $R^2 = 0.998$.

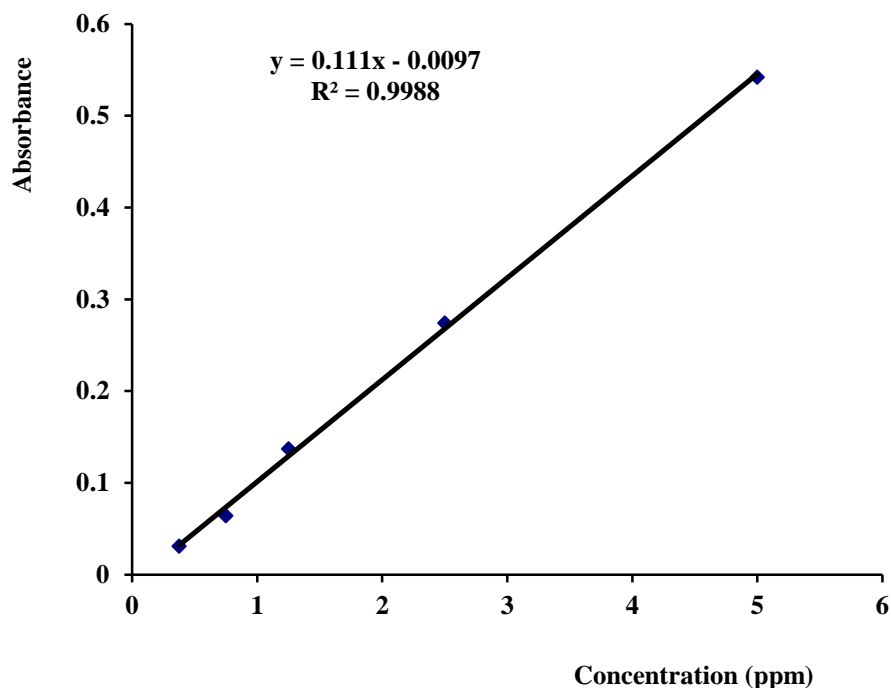


Figure 33: Courbe d'étalonnage de la β -carotène.

La teneur de caroténoïdes totaux contenu dans le piment étudié était de l'ordre de 1.62 mg ECa /100g de piment frais, ce qui donne une valeur de 22.05 mg ECa /100g de matière sèche. Ces résultats vont dans le même sens que celles trouvés dans d'autres travaux comme [Curl \(1964\)](#) qui a étudié le contenu des caroténoïdes dans trois lots de piments verts, il a trouvé que leur teneur est de l'ordre de 10.6 ,11.2 et 9 mg/kg de piment frais.

[González de Mejía et al. \(1998\)](#) ont trouvé des valeurs comprises entre 1598 et 6428 $\mu\text{g}/100$ g de caroténoïdes dans le piment vert. [Deli et al. \(2001\)](#) ont étudié la

composition en caroténoïdes du piment durant les différents stades de maturations, ils ont trouvé que la teneur en caroténoïdes du piment vert est 19,6 mg/100g de matière sèche.

Selon la littérature, le taux des caroténoïdes est plus élevé dans le piment rouge que le piment vert ou même jaune (Matsufuji *et al.*, 2007; Chuah *et al.*, 2008). Durant la maturation, la couleur verte du piment due à la présence des chlorophylles et quelques caroténoïdes comme la lutéine disparaissent avec la synthèse des pigments chromoplastes (Hornero-Mendez *et al.*, 2000).

III.3. 2. Choix de la phase stationnaire

La chromatographie en phase liquide à haute performance est la technique la plus utilisée dans l'analyse et la séparation des caroténoïdes même à des faibles concentrations dans les aliments (Melendez-Martinez *et al.*, 2007; Dugo *et al.*, 2008; Ligor *et al.*, 2014).

Selon la littérature, deux colonnes sont utilisées lors de l'analyse des caroténoïdes : C₁₈ (Zanfini *et al.*, 2010 ; Loranty *et al.*, 2010 ; Plaza *et al.*, 2011 ; Mech-Nowak *et al.*, 2012 ; Concurso *et al.*, 2012; Meulebroek *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Vinas *et al.*, 2013) et C₃₀ (Melendez-Martinez *et al.*, 2010 ; Mertz *et al.*, 2010 ; Djuikwo *et al.*, 2011 ; Kao *et al.*, 2012; Garzon *et al.*, 2012; Vallverdu-Queralt *et al.*, 2013 ; Amoussa-Houkpatin *et al.*, 2013 ; Lachman *et al.*, 2013 ; Courraud *et al.*, 2013 ; Giuffrida *et al.*, 2013).

Pour cela, ces deux colonnes ont été utilisées dans notre travail pour voir celle qui assure une bonne séparation des caroténoïdes de piment (Ascentis Express C18, 25 x 4.6 mm, 5 µm et YMC C30, 25 x 4.6 mm, 5 µm). Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la [figure 34](#).

La colonne C30 a permis de donner une bonne séparation des caroténoïdes de piment par rapport à C18 mais le temps d'analyse était plus important. Pour résoudre le problème du temps d'analyse jugé très long dans la colonne C30 qui était presque le double de celui de la C18, une modification du gradient (0-5 min : 0% B ; 5-30 min : 0-100% B) a permis de réduire le temps d'analyse de ces composés à 24 min.

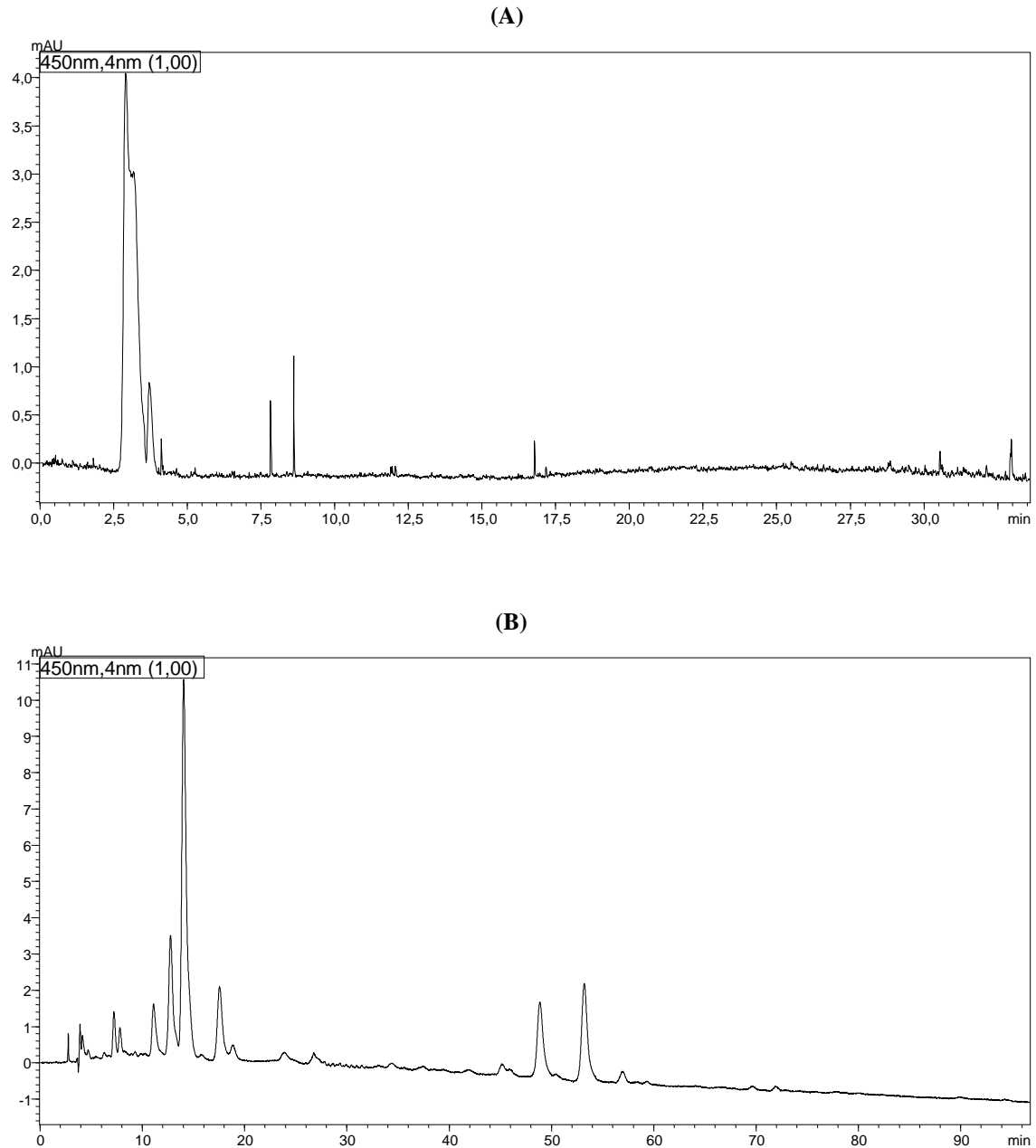


Figure 34: Séparation des caroténoïdes de piment par les colonnes (A) : Ascentis Express C18, 25 x 4.6 mm, 5 μ m YMC; (B) : C30, 25 x 4.6 mm, 5 μ m.

La phase stationnaire C18 et récemment C30 sont des colonnes typiques pour les chromatographies en phase inverse. Elles permettent d'avoir une bonne et rapide séparation d'une gamme vaste d'analytes, surtout ceux qui possèdent des chaînes courtes et un faible poids moléculaire. Mais la colonne C18 possède une faible résolution pour les isomères *cis-trans* (Simonovska *et al.*, 2013).

Les colonnes C30 sont un excellent choix pour la séparation de ces isomères (ex : lutéine et zéaxanthine) et donnent une meilleure forme de pic ainsi possèdent une meilleure sélectivité pour les analytes de longues chaînes (Melendez-Martinez et al., 2007 ; Simonovska et al., 2013).

La phase stationnaire C₁₈ est la plus utilisée parmi les chromatographies en phase inverse pour la séparation des molécules bioactives (Chauveau-Duriot et al., 2010; Abidi, 1999 ; Saha et al., 2013). Mais cette phase stationnaire est incapable de séparer les isomères comme β and γ -tocopherol. Ce problème a été résolu avec l'utilisation du C30 comme phase stationnaire (Britz et al., 2007).

Depuis leurs introduction dans les années 1990 (Sander et al., 1994), les colonnes C₃₀ ont connu un grand succès concernant la séparation des caroténoïdes (Melendez-Martinez et al., 2007; Sander et al., 2000; Oliver et Palou, 2000) par rapport au C₁₈. Selon Saha et al. (2013), la phase stationnaire C30 se comporte différemment des autres colonnes en ce qui concerne le temps de rétention.

La phase stationnaire C30 permet une bonne séparation et résolution des isomères de caroténoïdes moins polaires comme lycopène et β -carotène. Le problème qui se pose une fois appliquée à l'analyse générale des caroténoïdes comme les xanthophylles, C30 donne un profile similaire à celui du C18 mais dans un temps d'analyse plus long (Kashik et al., 2009 ; Daood et al., 2013 ; Amorim-Carrilho et al., 2014).

III.3.3. Résultats d'identification et de quantification des caroténoïdes par HPLC-DAD- APCI-MS

Les caroténoïdes du *Capsicum annuum* ont été identifiés par HPLC-DAD-APCI-MS (fig.35). La colonne utilisée était YMC C30, 25 x 4.6 mm; 5 μ m, le débit: 0.8 mL/min, les phases mobiles: (A) Méthanol/MTBE/eau (83:15:2, v/v/v) ; (B) Méthanol/MTBE/water (8:90:2, v/v/v). Gradient : 0-5 min : 0% B ; 5-30 min : 0- 100% B. Le volume d'injection : 20 μ L.

La quantification des caroténoïdes a été faite grâce à la courbe d'étalonnage de la β -carotène (fig.36) obtenue après injection de (0.05-100 ppm) du standard dans les mêmes

conditions analytiques que notre échantillon. L'équation de la courbe d'étalonnage est $y = 15345x - 24273$ et $R^2 = 0.999$.

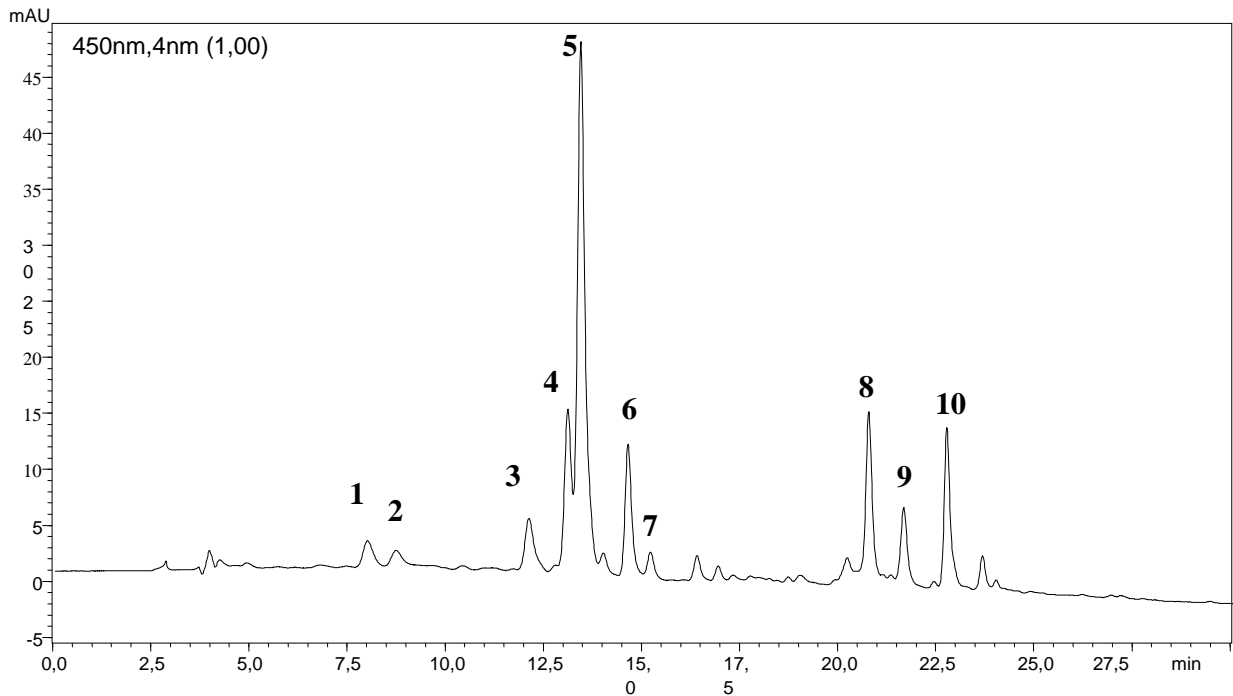


Figure 35: Identification des caroténoïdes du piment par HPLC-DAD-APCI-MS. 1-Violaxanthine, 2- Lutéoxanthine, 3- Phéophytine b, 4- Chlorophyl b, 5- Lutéine, 6- Zéaxanthine, 7- pynophéophytine, 8- Phéoptine b', 9- Phéoptine a', 10- β -carotène.

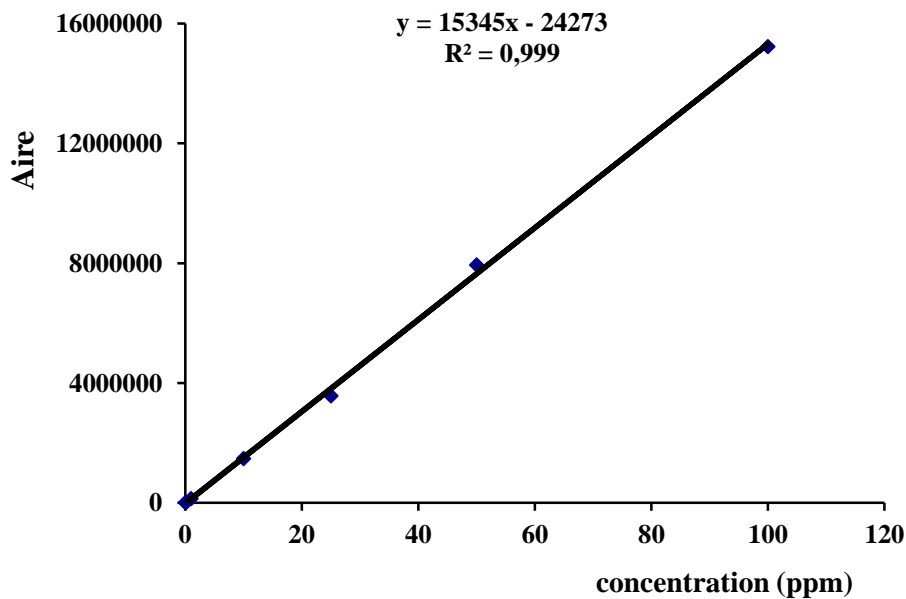


Figure 36: Courbe d'étalonnage de la β -carotène obtenue par HPLC. :

Parmi les caroténoïdes identifiés, la lutéine est le plus abondante avec une valeur de 13.42 $\mu\text{g/g}$ soit 54.40%, suivie de la zéaxanthine (4.32 $\mu\text{g/g}$; 17.53%) et le β -carotène (4.20 $\mu\text{g/g}$; 17.03%) (tableau 9). Ces taux sont plus élevés que ceux rapportés par Deli et al. (2001) qui ont trouvé que la lutéine et le β -carotène représentent 31.6% et 13.7% des caroténoïdes du piment.

Tableau 9 : Quantification des caroténoïdes de piment.

Caroténoïdes	Quantité ($\mu\text{g/g}$)
Violaxanthine	1.50
Lutéoxanthine	1.22
Lutéine	13.42
Zéaxanthine	4.32
β-carotène	4.20
Total	24.67

III.3.4. Rendement d'extraction des caroténoïdes

Le rendement de l'extraction des caroténoïdes a été calculé par l'ajout d'une concentration de 2.7 ppm de β -carotène 24h avant l'extraction. La concentration de ce caroténoïde est calculée après l'extraction grâce à la courbe d'étalonnage. Le rendement de l'extraction était de l'ordre de 92.04%.

III.4. Propriétés biologiques des substances d'intérêt (polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes) du piment

III.4.1. Activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la

quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Sanchez-Moreno, 2002 ; Marc et al., 2004; Huang et al., 2005; Popovici et al., 2009).

L'activité antioxydante est évaluée par plusieurs méthodes *in vitro* et *in vivo* comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle) (Popovici et al., 2009).

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger le pouvoir antioxydant global d'un extrait, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire (Cao et Prior, 1998 ; Rezaire, 2012).

Le pouvoir antioxydant des polyphénols, capsaïcinoïdes ainsi les caroténoïdes du piment (*Capsicum annuum*) a été déterminé avec trois tests : DPPH, ABTS et FRAP. Les résultats sont reportés dans le tableau 10 et les courbes d'étalonnage dans les figures 37,38 et 39. Selon les résultats, parmi les trois extraits c'est les caroténoïdes qui possèdent le plus grand pouvoir antioxydant suivis par les polyphénols et ensuite les capsaïcinoïdes. Dans le test de DPPH, les caroténoïdes représentent plus de 53 fois d'équivalent en trolox supérieur que les polyphénols et presque 56 fois que les capsaïcinoïdes.

Tableau 10 : Pouvoir antioxydant des polyphénols, caroténoïdes et capsaïcinoïdes du piment.

	DPPH mM Te/g	ABTS mM Te/g	FRAP mM Fe²⁺ e/g
Caroténoïdes	2,781 ± 0.298	3,379 ± 0.003	5,885 ± 0.264
Polyphénols	0,052 ± 0.008	0,069 ± 0.007	0,109 ± 0.002
Capsaïcinoïdes	0,050 ± 0.006	0,065 ± 0.005	0,094 ± 0.005

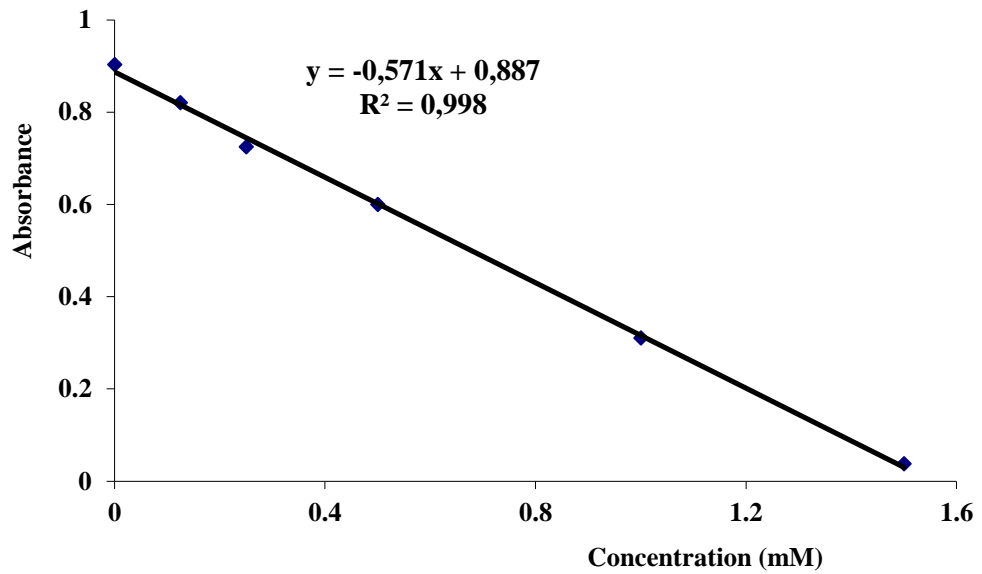


Figure 37: Courbe d'étalonnage de trolox dans le test de DPPH

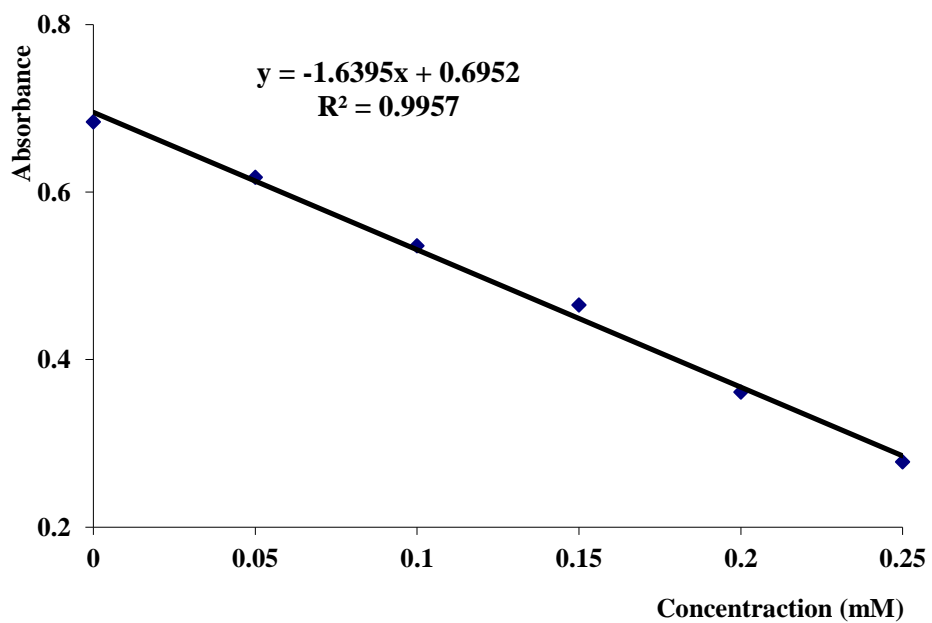


Figure 38: Courbe d'étalonnage de trolox dans le test d'ABTS

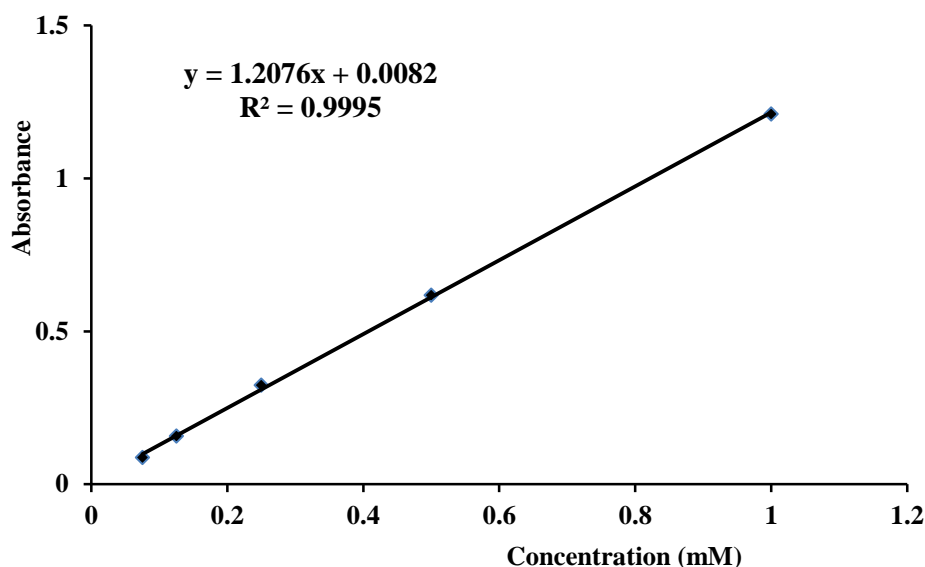


Figure 39: Courbe d'étalonnage de FeSO₄.7H₂O

En ce qui concerne le pouvoir antiradicalaire, les résultats obtenus dans le test ABTS sont supérieurs à ceux de DPPH ce qui a été observé dans d'autres travaux (Teow et al., 2007 ; Bhojar et al., 2011). Cela peut être expliqué par la grande solubilité de l'ABTS en milieux aqueux et organique.

Les caroténoïdes sont des pigments responsables des couleurs rouges, orangées, jaunes et vertes des fruits, des légumes, des fleurs et des algues. Cette vaste famille de substances liposolubles possède des propriétés antioxydantes. Les caroténoïdes majeurs identifiés dans le piment sont la lutéine, la zéaxanthine et le β -carotène connus pour leur grand pouvoir antioxydant.

La lutéine et la zéaxanthine possèdent des propriétés biologiques intéressantes au niveau de la région maculaire de la rétine, ils pourraient prévenir la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Le rôle d'antioxydant est certainement important, d'autant que la rétine et le cristallin sont soumis à un stress oxydatif notable, conséquence de la présence simultanée de la lumière et d'oxygène. La lutéine et la zéaxanthine constituent de meilleurs antioxydants que l'alpha et le bêta-carotène (Bourre, 2008).

Le β -carotène et les caroténoïdes en général, ont un effet antioxydant lié principalement à une réaction avec les radicaux libre peroxy. Le β -carotène utilise l'énergie du radical $O^{\cdot-}$ pour changer de conformation (passage de la forme *cis* à une forme *trans*).

L'activité antioxydante des polyphénols peut être attribuée à la rutine, la quercétine et le kaempférol, principaux composés phénoliques identifiés dans le piment. La quercétine et la rutine sont de meilleurs donneurs d'atomes H. [Rice-Evans et al.\(1996\)](#), ont rapporté que l'activité de réduction du radical $ABTS^{\bullet+}$ par la quercétine est deux fois plus élevée que celle de la catéchine et de la rutine.

Les polyphénols ayant des stœchiométries élevées ont une capacité importante à piéger les radicaux libres par transferts multiples d'atomes H ou d'électrons du phénol de départ et de certains de ses produits d'oxydation, comme dans le cas de la quercétine ([Goupy et al., 2009](#); [Achat, 2013](#)). Les produits d'oxydation de la quercétine, notamment le dérivé benzofuranone et l'acide protocatéchine, possèdent un pouvoir antioxydant propre. Ils contribuent au pouvoir antioxydant global de ce flavonol, ce qui explique pourquoi la quercétine est un très bon antioxydant en général, dont l'effet protecteur peut persister même après sa consommation totale ([Achat, 2013](#)).

Plusieurs études ont montré que les capsaïcinoïdes possèdent un grand pouvoir antioxydant et peuvent empêcher l'oxydation des lipoprotéines humaines ([Ahuja et al., 2006](#) ;[Yang, et al., 2010](#)). Ces recherches ont indiqué aussi que la capsaïcine inhibe potentiellement différents peroxydations lipidiques, piège directement les différents radicaux toxiques, et empêche l'accumulation des espèces actives de l'oxygène ([Kogure et al., 2002](#)).

III.4.2. Activité antimicrobienne

III.4.2.1. Diamètres des zones d'inhibition

Durant ces deux dernières décennies, de plus en plus de cas de multirésistances bactériennes aux antibiotiques classiques ont été recensées. Au niveau de tous les microorganismes, ces multirésistances sont liées à plusieurs facteurs tels que l'utilisation abusive des antibiotiques en agriculture et élevage, l'utilisation inappropriée des

antibiotiques en clinique et de manière plus spécifique, des modifications du microorganisme lui-même. Devant cette situation alarmante, il est urgent de trouver de nouveaux traitements contre lesquels les bactéries n'ont pas encore développé de résistance (Atindehou, 2012).

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules (MM < 500 Da) dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. En général, cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (Tegos *et al.*, 2002 ; Lewis et Ausubel, 2006). Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont donc plus élevées pour les molécules isolées de plantes que pour celles issues de bactéries et de champignons (Guinoiseau, 2011). L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est une pratique traditionnelle et universelle qui remonte à plusieurs siècles. Les plantes représentent une source très riche de molécules bioactives pouvant avoir un effet antimicrobien sur les bactéries résistantes.

Dans ce travail, Le pouvoir antimicrobien des extraits de polyphénols, capsaïcinoïdes ainsi que quelques standards les plus représentatifs dans ces deux extraits (acide caféïque, kaempférol, quercétine, coumarine, rutine, naringine, capsaïcine et dihydrocapsaïcine) a été étudié vis-à-vis seize souches pathogènes et deux souches bénéfiques.

Les souches étudiées sont : *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P, 8, 14, 26, 32, 550, 319), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644 et ATCC 1392), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Proteus mirabilis* (ATCC 13315), *Enterococcus hirae* (ATCC 10541), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Klebsiella pneumoniae*, *Bifidobacterium animalis* sbsp *lactis* Bb12 et *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS.

D'après les résultats illustrés dans le [tableau 11](#), l'effet antibactérien varie d'une souche à une autre et dépend aussi de l'échantillon testé. Les souches probiotiques Bb12 et LbRE-LSAS semblent être résistantes vis-à-vis tous les échantillons testés vu qu'aucune zone d'inhibition n'a été obtenue.

Tableau 11 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus avec les différentes souches.

	EP	EC	Cap	DHC	Ac caf	C	Q	K	R	N
<i>S. aureus 6538P</i>	6±0	4.5±0.17	9.5±0.35	11.5±0.5	16.5±0.43	9±0.35	9.5±0.17	8.5±0.43	-	-
<i>S. aureus 319</i>	6±0.32	8±0.25	5±0.17	8±0.19	20.5±0.47	9±0	12±0.37	11±0.62	-	-
<i>S. aureus 14</i>	4.5±0.17	3.75±0.12	-	6±0.18	11±0.45	5±0	12±0.28	11±0.47	-	-
<i>S. aureus 26</i>	7±0.22	6.5±0.38	3.25±0.12	8±0.27	11.75±0.54	9.50±0.36	9±0.24	14±0.58	-	-
<i>S. aureus 8</i>	5±0.21	4.5±0.18	5±0.23	7±0.14	10.75±0.52	5±0.32	12.5±0.24	7±0.35	-	-
<i>S. aureus 32</i>	6.5±0.34	3.25±0.14	6.5±0.25	8±0.35	12±0.57	8±0.39	13.5±0.42	12.75±0.56	-	-
<i>S. aureus 550</i>	8±0.32	5±0.17	3.5±0.19	4±0.22	9.5±0.42	8.5±0.34	12±0.36	12±0.41	-	-
<i>L. monocytogenes</i> <i>ATCC 7644</i>	7±0.25	9±0.46	8±0.25	9.75±0.49	12.5±0.32	10±0.33	10.75±0.52	12±0.62	-	-
<i>L. monocytogenes</i> <i>ATCC 1392</i>	8±0.15	9±0.32	8±0.18	9±0.25	10.75±0.65	6.75±0.50	7.25±0.25	10±0.39	-	-

<i>E. hirae</i> ATCC 10541	4.75±0.07	5.25±0.21	5±0.21	5.5±0.13	12±0.32	-	3.5±0	4±0.09	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	4.75±0.12	-	-	-	4±0.12	-	6±0.24	5±0	-	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	4±0.17	4±0	-	3.75±0.24	4±0.35	-	7±0.41	7±0.14	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6.25±0.35	4.75±0.25	5±0.22	5±0.25	4.5±0.18	-	12±0.63	10.75±0.25	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6±0.23	4±0.18	-	3±0	5±0.24	5±0.30	13±0.36	11.75±0.56	5±0.32	4.5±0.42
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10±0	4.5±0.12	3±0	7±0.15	12.13±0.12	-	12±0	12±0	-	3.21±0.20
<i>P. mirabilis</i> ATCC 13315	4±0.25	3.5±0.17	3.5±0.17	3.25±0.14	3.5±0.17	3±0.07	4.75±0.27	7±0.32	-	7±0.65
<i>Lb. rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bb12</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

EP : Extrait phénolique ; **EC**: Extrait capsaïcinoïdes ; **Cap**: Capsaïcine; **DHC**: Dihydrocapsaïcine ; **AC caf** : Acide caféique ; **C**: Coumarine ; **Q** : Quercétine ; **K**: Kaempférol ; **N** : Narangine ; **R** : Rutine.

Plusieurs études menées chez des sujets humains ou bien animaux (rats, cochons et poulets) ont révélé une augmentation de la croissance des bactéries bénéfiques comme *Lactobacillus* et une diminution dans les *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* et *Bacteroides* après une administration de sources naturelles riches en polyphénols (Hara, 1997 ; Dolara et al., 2005 ; Molan et al., 2010 ; Viveros et al., 2011).

Par conséquent, les polyphénols semblent avoir le potentiel de conférer des avantages de santé via la modulation de la flore intestinale et exerçant des effets semblables aux prébiotiques (Tzounis et al., 2011).

Il ya un nombre limité d'études sur la capacité des probiotiques tels que les bactéries lactiques et bifidobactéries à métaboliser des composés polyphénoliques. *Lactobacillus plantarum* a été décrite d'avoir plusieurs activités enzymatiques tels que la tannase, l'acide phénol décarboxylase (PAD) et la benzyl alcool déshydrogénase qui sont capables de dégrader quelques composés phénoliques (Rodríguez et al., 2009).

Quelques bactéries lactiques comme *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus plantarum* ont la capacité de métaboliser les acides phénoliques par décarboxylation, et/ou réduction. Les produits de la décarboxylation des acides phénoliques sont vinylcatéchol, vinylphénol, vinylguaiacol, pyrogallol et catéchol; la réduction des acides hydroxycinnamiques donne les acides dihydrocaféique et dihydrofêrulique (Van Beek et Priest 2000; Curiel et al., 2010; Svensson et al., 2010 ; Sanchez-Maldonado al., 2011). Les lactobacilles capables de métaboliser les composés phénoliques sont principalement isolés des produits riches en polyphénols tels que les olives, le vin, et le sorgho (Rozes et Peres 1998; Van Beek et Priest 2000; Campos et al., 2009; Svensson et al., 2010).

En ce qui concerne les bifidobactéries, peu d'informations sont disponibles sur l'influence des composés phénoliques sur leur croissance, leur viabilité et leurs activités enzymatiques. Takagaki et Nanjo (2010) ont décrit que la souche *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* hydrolyse (-)-epigallocatechine-3-O-gallate en (-)-epigallocatechine et l'acide gallique, mais l'activité enzymatique reste toujours non caractérisée.

Baboota *et al.* (2014) ont étudié l'effet de la supplémentation de la capsaïcine à l'aliment des souris sur l'écosystème intestinal. Ils ont remarqué une diminution de la survie des *Enterobacteriaceae* et une amélioration avec *Akkermansia* et *Bacteroidetes*. Le nombre des lactobacilles était plus important chez les souris nourries de la capsaïcine, alors que le nombre de bifidobactéries semble diminuer.

L'extrait des polyphénols et des capsaïcinoïdes du piment étaient actifs vis-à-vis de toutes les souches pathogènes testées à l'exception de *K. pneumoniae* qui était résistante au capsaïcinoïdes. De façon générale, l'effet antibactérien était plus important avec l'extrait phénolique qu'avec les capsaïcinoïdes. Cette différence dans l'activité demeure plus claire avec les standards étudiés, hormis la rutine et la naringine, les zones d'inhibition obtenues avec les autres standards phénoliques étaient plus importantes à celles enregistrées avec la capsaïcine et dihydrocapsaïcine.

La seule souche qui était sensible à la rutine est *P. aeruginosa* avec une zone d'inhibition de l'ordre de 5 mm. Ceci est déjà confirmé par les résultats obtenus par Sami et Shakoori (2007) qui ont trouvé que la croissance de *Pseudomonas* est retardée en présence de la rutine.

Rauha *et al.* (2000) ont étudié l'activité antimicrobienne de 13 substances phénoliques et quelques extraits de plantes contre *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. La rutine était inactive vis-à-vis de toutes les souches testées. Ces résultats ont été aussi confirmés par d'autres auteurs (Arima *et al.*, 2002; Maddox *et al.*, 2010).

La naringine possédait un effet inhibiteur légèrement plus important que la rutine avec des zones d'inhibition de l'ordre de 3, 4.5 et de 7 mm avec les souches *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* respectivement.

Alcaez *et al.* (2000) ont étudié la relation structure-activité des flavanones, flavones et les substituants hydroxy ou méthoxy chalcone contre *S. aureus*. Ils ont trouvé que parmi ces composés, les flavanones (y compris la naringine) sont les moins actives.

Dans une autre recherche menée par Céliz *et al.* (2011), l'activité antimicrobienne de la naringine et ses dérivés a été étudiée contre quelques bactéries pathogènes (*L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7 et *S. aureus*). Leurs résultats confirment que la naringine n'a aucune activité antimicrobienne.

Un grand nombre des effets délétères des flavonoïdes sur les bactéries pathogènes peuvent se produire en particulier en présence d'aglycones, qui sont facilement transportés à travers les membranes cellulaires par diffusion (Mandalari *et al.*, 2007). Ce qui peut expliquer la raison pour laquelle la rutine et la naringine n'avaient pas un grand effet inhibiteur sur la croissance bactérienne par rapport aux autres flavonoïdes aglycones.

Toutes les souches staphylocoques étaient sensibles à la coumarine donnant des zones d'inhibition qui varient entre 5 et 9.5 mm. La souche *L. monocytogenes* ATCC 7644 semble être la souche la plus sensible à ce polyphénol avec une zone d'inhibition de 10 mm alors qu'avec *L. monocytogenes* ATCC 1392 qui est plus résistante, la zone d'inhibition était de l'ordre de 6.75 mm. Le reste des souches étaient résistantes.

L'activité antibactérienne de la coumarine et la quercétine a été étudiée vis-à-vis quatre bactéries et comparée à celle de la gentamicine et ciprofloxacine. Les résultats ont montré que la coumarine à une concentration de 1000 µg par disque possède une grande activité contre *Escherichia coli* et *Enterobacter aerogenes* et modérée contre *Salmonella typhimurium* et *Salmonella infantis* (Nitiema *et al.*, 2012).

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acide caféique, la quercétine et le kaempférol qui ont pu inhiber toutes les souches pathogènes. Les zones d'inhibition obtenues avec les souches pathogènes en présence d'acide caféique varient de 3.5 à 20.5 mm. La souche la plus sensible est *S. aureus* 319 suivie de *S. aureus* ATCC 6538P, et la plus résistante est *P. mirabilis*.

En ce qui concerne la quercétine, la souche *S. aureus* 32 suivie de *S. aureus* 8 sont les souches les plus sensibles (13.5 et 12.5 mm) alors que *E. hirae* s'avère la plus résistante avec une zone d'inhibition de l'ordre de 3.5 mm. Cette bactérie maintient sa résistance aussi contre le kaempférol qui résulte en une zone d'inhibition de 4 mm. Les souches

staphylocoques sont toujours les plus sensibles, une zone de l'ordre de 14 mm a été obtenue avec la souche *S. aureus* 26.

Les résultats de l'activité antimicrobienne des capsaïcinoïdes sont en accord avec la littérature (Jones *et al.*, 1997; Molina-Torres *et al.*, 1999; Snyman *et al.*, 2001; Acero-Ortega *et al.*, 2005a; Dima *et al.*, 2013; Nascimento *et al.*, 2014). L'effet de la dihydrocapsaïcine était plus important que celui de la capsaïcine, ce qui a été expliqué par Nascimento *et al.* (2014) par le fait que la capsaïcine peut être utilisée comme nutriment pour la croissance de quelques bactéries. En revanche Dorantes *et al.* (2000) n'a trouvé aucune activité microbienne de ces deux capsaïcinoïdes vis-à-vis *B. subtilis*, *S. aureus* et *C. albicans*.

D'une façon générale et selon les résultats, les bactéries à Gram positif sont beaucoup plus sensibles par rapport aux bactéries à Gram négatif. La structure de la paroi cellulaire est à l'origine de la résistance des bactéries à Gram négatif vu qu'elles possèdent une membrane externe en plus du peptidoglycane. L'interaction des polyphénols avec les membranes, parois cellulaires et / ou les protéines extracellulaires semble être la base de leur effet inhibiteur sur les bactéries, donc les variations dans les activités antimicrobiennes de ces composés peut être expliquée par les différences dans la structure de surface cellulaire entre les espèces à Gram négatif et à Gram-positifs (Smith *et al.*, 2005; Cueva *et al.*, 2010).

La paroi bactérienne constitue une surface d'échange avec l'extérieur. Le peptidoglycane est poreux et laisse passer de nombreuses substances ce qui n'est pas le cas de la membrane externe des bactéries à Gram négatif qui s'oppose, notamment, à la pénétration des antibiotiques hydrophobes (Abedini, 2013).

Rodriguez Vaquero et Manca de Nadra (2008) ont montré que parmi les non-flavonoïdes, les dérivés d'acide hydroxycinnamique, comme l'acide caféique, sont des antibactériens plus efficaces contre *L. monocytogenes* et *E. coli* que les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.

L'activité antimicrobienne des acides phénoliques est déterminée par leur structure chimique, en particulier le nombre et la position de substitution sur le noyau benzène, et la

longueur de chaîne saturée (Cueva et al., 2010 ; Sanchez-Maldonado al., 2011). Le pouvoir antimicrobien des acides phénoliques est plus faible que celui de leurs esters (Cueva et al., 2010). Ce pouvoir augmente avec la longueur croissante de la chaîne alkyle (Merkl et al., 2010).

Wu et al. (2013) ont étudié l'activité antibactérienne de 11 flavonoïdes y compris deux polyméthoxyflavones et 4 isoflavonoïdes (kaempférol, quercétine, chrysin, lutéoline, baicaléine, tangeritine, daidzéine, génistéine, ononine, puerarine et 5,6,7,4'-tetraméthoxyflavone) sur *Escherichia coli*. Selon le degré de leur activité, ces composés ont été classés comme suite : flavonoïdes, polyméthoxyflavones et isoflavonoïdes.

Il a été observé que les polyméthoxyflavones et isoflavonoïdes augmentent la fluidité de la membrane. Il y avait une corrélation positive significative entre la capacité antibactérienne et l'effet de rigidification de la membrane des flavonoïdes. Une étude structure-activité quantitative a démontré que l'activité des composés flavonoïdes peut être reliée à l'hydrophobie et les charges sur l'atome de carbone en position 3 (C₃). Les flavonoïdes ont inhibé la croissance d'*E. coli* plus intensément que les isoflavonoïdes. Les inhibitions les plus élevées étaient enregistrées avec le kaempférol, la quercétine et la chrysin avec des CMI₅₀ de 25 µg/mL, 35.76 µg/mL et 36.72 µg/mL, respectivement.

Plusieurs auteurs ont rapporté que l'absence du groupe hydroxyle dans les flavonoïdes diminue leurs capacités antioxydante et antimicrobienne (Sichel et al., 1991 ; Tripoli et al., 2007 ; Haneen et al., 1997 ; Wu et al., 2013).

III.4.2.2. Concentration minimale d'inhibition

Les trois standards (acide caféique, quercétine et kaempférol) ainsi les deux extraits de polyphénols et capsaïcinoïdes ont été maintenus pour le test de la concentration minimale d'inhibition (tableau 12). On remarque que les trois standards phénoliques exercent un grand pouvoir inhibiteur sur les souches testées. Cet effet était plus important en milieu liquide par rapport au milieu de culture solide pour les deux flavonoïdes quercétine et kaempférol, cela peut être expliqué par des problèmes de solubilités de ces deux composés dans l'agar, ce qui a diminué leur effet dans le test en milieu solide.

Tableau 12: Concentration minimales inhibitrice (mg/mL) de l'extrait phénolique, les capsaïcinoïdes, l'acide caféique, la quercétine et le kaempférol.

	EC	EP	Ac caf	Quer	Kaemp
<i>S. aureus 6538P</i>	2.5	2.5	0.25	0.031	0.0156
<i>S. aureus 319</i>	5	5	0.25	0.0039	0.0078
<i>S. aureus 14</i>	10	2.5	0.5	0.0039	0.0156
<i>S. aureus 26</i>	5	2.5	0.5	0.125	0.0156
<i>S. aureus 8</i>	10	2.5	0.5	0.0039	0.0156
<i>S. aureus 32</i>	5	1.25	0.5	0.00195	0.0156
<i>S. aureus 550</i>	10	5	1	0.0078	0.0156
<i>L. monocytogenes ATCC 7644</i>	10	5	0.5	0.125	0.125
<i>L. monocytogenes ATCC 1392</i>	10	5	1	0.5	0.125
<i>E. hirae ATCC 10541</i>	10	5	1	1	0.25
<i>K. pneumoniae</i>	10	10	2	1	1
<i>S. typhimurium ATCC 13311</i>	10	5	2	0.5	0.125
<i>E. coli ATCC 25922</i>	10	5	2	0.0625	0.0625
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	10	10	2	0.25	0.125
<i>B. subtilis ATCC 6633</i>	10	2.5	0.5	0.25	0.25
<i>P. mirabilis ATCC 13315</i>	10	10	2	0.25	0.125

Les souches cliniques *S. aureus* (319, 14, 8, 32 et 550) étaient plus sensibles à l'action de la quercétine par rapport au kaempférol et l'acide caféique avec des CMI qui varient de 0.00195- 0.0078 mg. En ce qui concerne les souches *L. monocytogenes* ATCC 7644, *K. pneumoniae*, *E.coli*, *B. subtilis* ; les CMI obtenus avec ces deux flavonoïdes étaient identiques. Le reste des souches (*S. aureus* 6538, *S. aureus* 26, *E. hirae*, *L. monocytogenes* ATCC 1392, *S. typhimurium* et *P. aeruginosa*) étaient plus sensibles vis-à-vis du kaempférol avec des CMI entre 0.0156 et 0.125 mg.

Rodríguez Vaquero et al. (2007) ont étudié les propriétés antimicrobiennes de quelques composés phénoliques purs ainsi que trois extraits phénoliques du vin d'Argentine contre *Listeria monocytogenes*. Ils ont trouvé que la meilleure inhibition a été obtenue avec la quercétine avec une CMI de l'ordre de 25 µg/ml.

Santas et al. (2010) a étudié l'effet de la quercétine et le kaempférol sur *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* , *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. Selon les résultats, la quercétine avait un pouvoir inhibiteur plus important que le kaempférol lors de la méthode de disques vis-à-vis toute les souches testées (9.8 ± 0.6 à 15.0 ± 1.0 mm) alors que le kaempférol était actif seulement contre *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* (9.3 ± 1.2 and 10.3 ± 0.6 mm respectivement). Ce qui était en accord avec les résultats rapportés par Xu et Lee (2001). En faisant le test de microdilution, ces auteurs ont trouvé que les résultats obtenus avec le kaempférol étaient plus importantes que celles obtenus avec la quercétine.

Les composés phénoliques de faible taille, tels que les acides phénoliques, seraient facilement capable de traverser la membrane et exercer leur activité antimicrobienne (Ikigai et al., 1993). Un mécanisme possible pour expliquer l'action antimicrobienne des acides phénoliques est l'hyperacidification (Vattem et al., 2005) en raison de la dissociation des acides phénoliques (Choi and Gu, 2001). Cette hyperacidification modifierait la membrane cellulaire et la rend plus perméable, ainsi affecte la pompe sodium-potassium impliquée dans la synthèse d'ATP (Vattem et al., 2005).

L'effet de l'acide caféique était moins important que celui de la quercétine ou bien le kaempférol, cela peut être attribué au fait que le pH du milieu de culture MHB (6.5) est élevé au pKa du groupe carboxyle des acides phénoliques (environ 4.5). A ce pH du

milieu, les acides sont généralement dissociés, alors que la forme non dissociée a le pouvoir antimicrobien le plus élevé car ils sont plus solubles dans la membrane (Davidson et Taylor, 2007).

La concentration des acides phénoliques non dissociés qui sont plus lipophiles augmente avec la diminution du pH. L'activité des acides phénoliques non dissociés est plus élevée par rapport aux acides phénoliques dissociés, car ils sont plus solubles dans la membrane cytoplasmique (Ramos-Nino et al., 1996).

Le kaempférol et la quercétine qui possèdent les plus grande charges positives sur C3 exercent la plus forte activité antibactérienne. Bien que l'addition de groupes hydroxyle affaiblit le caractère hydrophobe de ces flavonoïdes, elle augmente la charge d'atomes. Cela pourrait expliquer pourquoi d'autres études ont également constaté le fait que l'activité antibactérienne augmente lorsque le nombre des groupes hydroxyles est plus élevé (Alcaraz et al., 2000 ; Sato et al., 1996 ; Wu et al., 2013).

L'effet inhibiteur d'un extrait ou bien des composés purs dépend des conditions expérimentales telles que la concentration de l'inoculum, les quantités des nutriments, le solvant utilisé et la concentration finale de l'agent antimicrobien. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est considérée comme une bonne méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne des composés qui ont une faible solubilité dans l'eau car leur précipitation peut diminuer leur effet (Pistelli et Giorgi, 2012).

Le test de diffusion sur disques est une méthode qui dépend de la solubilité et la diffusion de l'agent testé sur un milieu solide. Le kaempférol a une faible solubilité ce qui provoque une perte d'inhibition dans la méthode de disques par rapport à son effet à une dilution appropriée dans le bouillon (Santas et al., 2010).

III.4.2.3. Effets synergiques entre les composés phénoliques

Devant la gravité potentielle d'une infection bactérienne, il est naturel de vouloir recourir à une association d'antibiotiques. Les quatre principaux arguments en faveur d'une telle stratégie sont : l'élargissement du spectre d'activité, l'obtention d'un effet

synergique, l'augmentation de la vitesse de la bactéricidie et la prévention de l'émergence de mutants résistants (Denes et Hidri, 2009; Caruba et al., 2010).

Face à des infections dont l'éradication est réputée difficile ou devant des germes avec des profils de résistance inhabituels, le clinicien peut avoir recours à une association d'antibiotiques dans le but d'accroître la bactéricidie. Il est nécessaire dans ces situations de s'assurer que les antibiotiques utilisés répondent au concept de synergie, c'est-à-dire que l'association de deux antibiotiques exerce une activité antibactérienne supérieure à celle de l'effet additionné de chacun d'entre eux (Montravers et Dupont, 1996).

En bactériologie, les associations d'antibiotiques ou de molécules sont caractérisées par quatre types d'interaction (Denes et Hidri, 2009) :

- indifférence : l'activité de l'un des antibiotiques n'est pas affectée par la présence de l'autre ;
- addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque antibiotique étudié séparément à la même concentration que dans l'association ;
- synergie : l'effet de l'association est significativement supérieur à la somme des activités de chaque antibiotique étudié séparément à la même concentration. La traduction arithmétique est : $1 + 1 > 2$;
- antagonisme : l'association diminue l'effet de l'un ou l'autre des antibiotiques. L'activité de cette association est inférieure à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément à la même concentration. De façon arithmétique : $1 + 1 < 2$.

Les résultats de ces dosages sont exprimés mathématiquement (FIC : *Fractional Inhibitory Concentration*) et graphiquement (isobologramme). Si le FIC index est inférieur à 0,75, l'association est synergique, elle est additive s'il est équivalent à 1, indifférente s'il est compris entre 1 et 2 et antagoniste s'il est supérieur à 2. La plus faible valeur du F.I.C. correspond au ratio optimal.

Un isobologramme concave par rapport à la droite d'additivité (correspondant à l'activité des produits seuls), représente un effet synergique entre les deux molécules associées, un isobologramme convexe, un effet antagoniste et un isobologramme qui croise la ligne d'additivité révèle un effet additif.

Afin de chercher une éventuelle synergie entre les trois standards retenus (acide caféique, kaempférol et quercétine), la méthode d'échiquier a été utilisée. Deux souches appartenant au gram positif et négatif ont été sélectionnées (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

III.4.2.3. 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

- Quercétine et Kaempférol

La souche à gram positive *S. aureus* a une CMI de l'ordre de 0.03125 mg/mL en présence de la quercétine. L'addition d'une faible concentration de 0.00195 mg/ml de kaempférol ne représente aucune amélioration vu que l'effet était indifférent (tableau 13). Lorsque cette concentration atteint 0.0039 mg/mL avec 0.00781 mg/mL de quercétine (qui représente seulement $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{2}$ CMI respectivement), une synergie a été remarquée entre ces deux flavonoïdes avec un indice de FIC de 0.51233 (fig.40). En augmentant la concentration du kaempférol à 0.0781 mg/mL, un effet additif a été enregistré.

Alvarez et al. (2008) a étudié l'effet de la quercétine (20 μ g/mL) additionnée de différentes concentrations de kaempférol sur la croissance d'*E. coli* et *S. aureus*. Une diminution de croissance des deux souches a été remarquée, mais *E. coli* était la souche la plus sensible.

Tableau 13: Etude de la synergie entre la quercétine et le kaempférol contre *S. aureus*.

Q		K		Σ FIC	Interprétation
Concentration	Fic Q	Concentration	Fic K		
0,03125	1	0	0	1	CMI Q
0,03125	1,00806	0,00195	0,12484	1,13290	indifférent
0,00781	0,25193	0,00390	0,26040	0,51233	synergie
0,00781	0,25193	0,00781	0,52066	0,77260	additive
0	0	0,01562	1	1	CMI K

Arima *et al.* (2002) ont étudié l'effet de quelques associations (la quercétine et la quercitrine, la quercétine et la morine, la quercétine et la rutine) sur la croissance de quelques souches pathogènes. Ils ont remarqué que ces associations sont beaucoup plus actives contre ces souches que les flavonoïdes seuls.

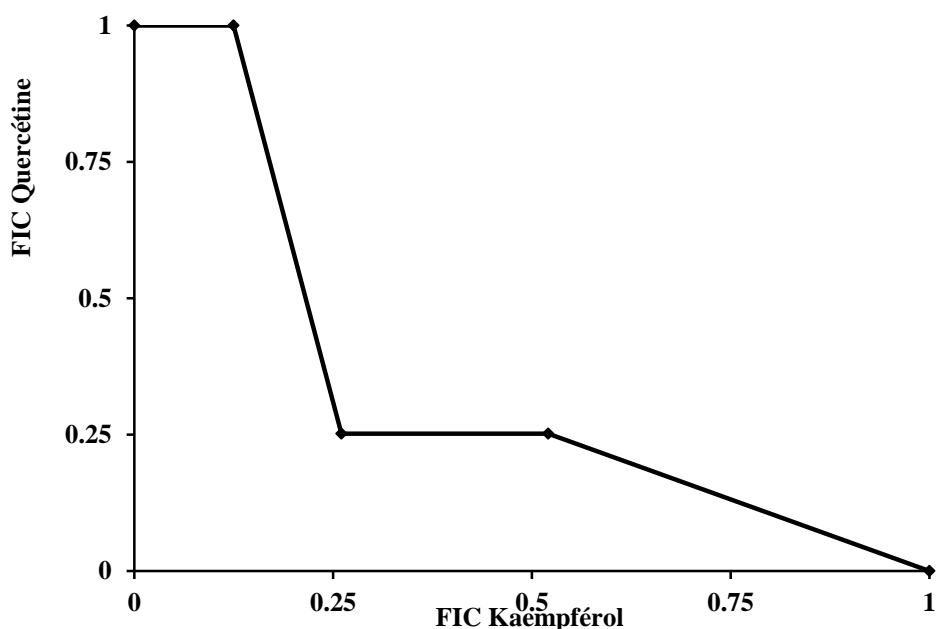


Figure 40: Isobologramme de la combinaison quercétine-kaempférol contre *S. aureus*

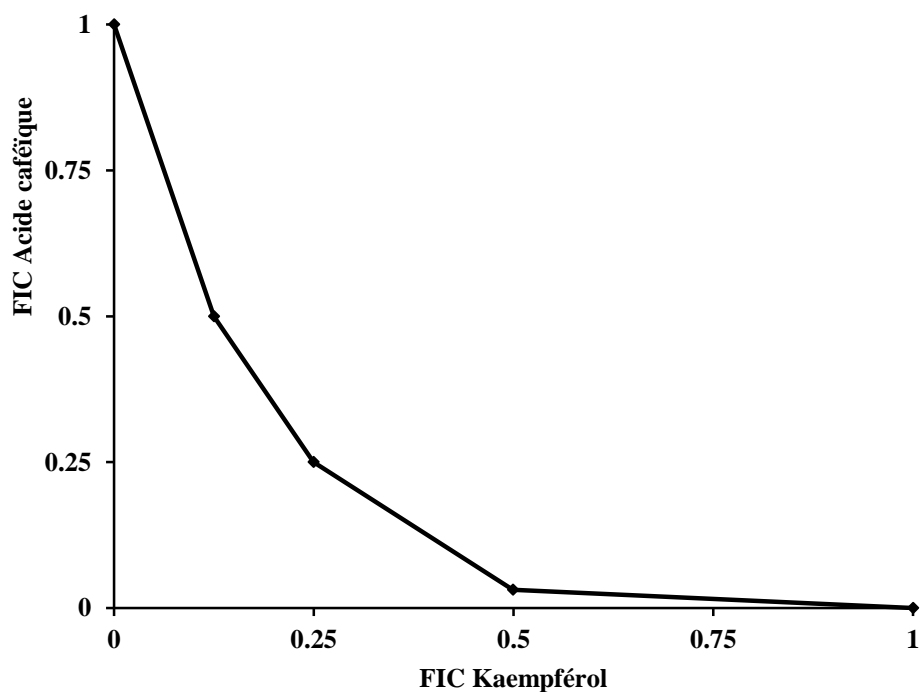
- Acide caféique et Kaempférol

Lorsque ce test a été effectué avec l'acide caféique et le kaempférol, de meilleurs indices de FIC ont été obtenus. L'utilisation de la moitié de la CMI de l'acide caféique avec seulement 0.00195 mg/mL de kaempférol a permis une amélioration de l'effet antibactérien avec un indice de FIC de l'ordre de 0.6248, mais l'effet reste additif (tableau 14).

Cet indice diminue jusqu'à 0.4996, qui est le meilleur indice avec cette association, lorsque les concentrations de l'acide caféique et le kaempférol sont équivalents à 0.0625 et 0.0039 respectivement ; l'effet est synergique. Un autre effet synergique mais légèrement inférieur (FIC= 0.53 ; fig.41) est obtenu avec la moitié du CMI du kaempférol et ¼ de l'acide caféique.

Tableau 14: Etude de la synergie entre l'acide caféique et le Kaempférol contre *S. aureus*.

Ac caf		K		Σ FIC	Interprétation
Concentration	Fic Ac caf	Concentration	Fic K		
0,25	1	0	1	1	CMI Ac caf
0,125	0,5	0,00195	0,12484	0,62484	additive
0,0625	0,25	0,0039	0,24967	0,49968	synergie
0,0078	0,0312	0,0078	0,49936	0,53056	synergie
0	0	0,01562	0	1	CMI K

**Figure 41:** Isobologramme de la combinaison acide caféique-kaempférol contre *S. aureus*

- Acide caféique et Quercétine

La souche *Staphylococcus aureus* est très sensible à l'action de l'acide caféique avec une CMI de 0.25 mg/mL, l'addition de 0.00195 mg/mL de quercétine n'a pas amélioré son effet inhibiteur vu que l'effet est indifférent avec un indice de FIC de 1.06 (tableau 15). Cet effet devient additif lorsque 0,125 mg/mL d'acide caféique sont mélangé avec 0,0039 de quercétine, mais une synergie (fig.42) est remarquée lors de l'utilisation de (0,00195 - 0,03125 mg/mL) d'acide caféique et (0,0156- 0,0078 mg/mL) de quercétine.

Toutes les combinaisons qui ont été testées semblent améliorer l'action de chacune des molécules mais l'association entre l'acide caféique et la quercétine a donné le meilleur indice de FIC (0.37661) avec seulement 1/8 et 1/4 de leur CMI respectivement.

Prasad et al. (2014) ont étudié l'effet des combinaisons entre la quercétine et trois acides phénoliques (acide gallique, acide cinnamique et acide p-anisique) contre trois bactéries à gram négatif pathogènes pour les poissons (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* et *Edwardsiella tarda*). Toutes les molécules testées ont pu inhiber ces bactéries avec des CMI qui varient entre 0.83 et 2.5 mg/mL.

Tableau 15: Etude de la synergie entre l'acide caféique et la quercétine contre *S. aureus*.

Ac caf		Q		Σ FIC	Interprétation
Concentration	Fic Ac caf	Concentration	Fic Q		
0,25	1	0	0	1	CMI Ac caf
0,25	1	0,00195	0,06290	1,06290	indifférent
0,125	0,5	0,0039	0,12580	0,62580	additive
0,03125	0,125	0,0078	0,25161	0,37661	synergie
0,00195	0,0078	0,0156	0,50322	0,51102	synergie
0	0	0,03125	1	1	CMI Q

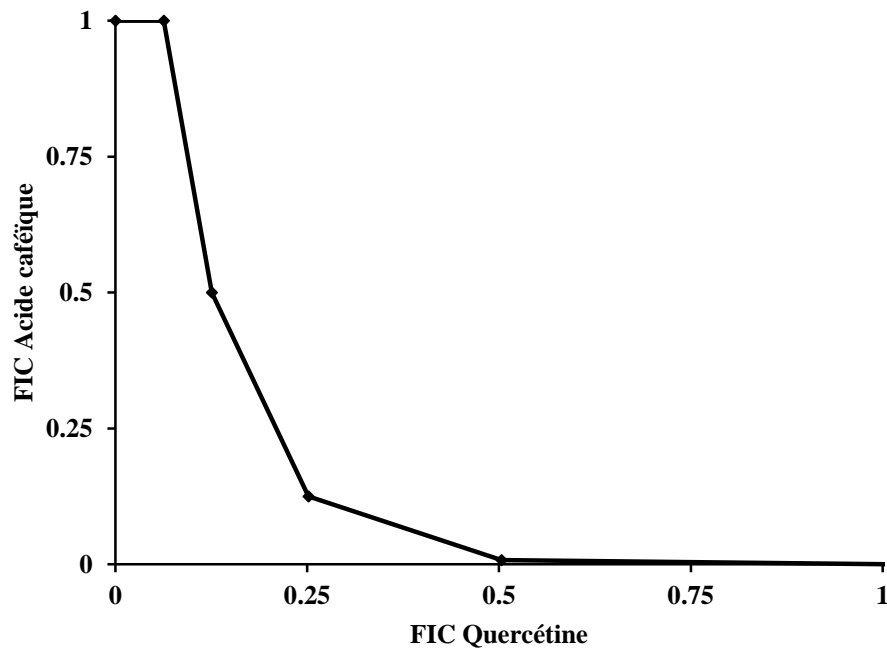


Figure 42 : Isobologramme de la combinaison acide caféique-quercétine contre *S. aureus*

Lorsque la quercétine a été combinée avec l'acide gallique, anisique ou cinnamique, un effet additif a été obtenu avec les deux souches *A. hydrophila* et *E. tarda* en enregistrant des indices de FIC de l'ordre de 0.85, 0.92 ; 0.92, 0.75 et de 0.85, 0.85 respectivement; et synergique avec *A. salmonicida* (0.32, 0.32 et 0.28).

Les acides phénoliques ont un effet antibactérien faible lorsqu'ils sont administrés seuls avec des CMI qui peuvent atteindre 2.5 mg/mL, mais leur combinaisons avec d'autres molécules permettent la réduction du CMI jusqu'à 8 fois (Prasad *et al.*, 2014).

III.4.2.3. 2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- Quercétine et Kaempférol

Afin d'améliorer l'effet antibactérien, les deux flavonoïdes quercétine et kaempférol ont été combinés à différentes concentrations, et leur pouvoir inhibiteur sur la souche à gram négatif *P. aeruginosa* a été testé. Cette souche s'est comportée sensible à l'action de ces deux flavonoïdes en donnant des CMI de 0.125 et 0.25 mg/mL avec le kaempférol et la quercétine respectivement. En présence de 0.0078 mg/mL de kaempférol et 0.125 mg/mL

de quercétine, l'effet de ces deux composés s'additionne et donne un indice de FIC de 0.56 (tableau 16).

Ces deux flavonoïdes semblent avoir une synergie très positive claire dès les concentrations (0.0039- 0.0625 mg/mL) de quercétine et (0.1248- 0.5 mg/mL) de kaempférol. Mais le meilleur indice de FIC (0.31) est obtenu avec 0.0156 mg/ml de quercétine et 0.03125 mg/mL de kaempférol (fig.43).

Akroum *et al.* (2009) ont étudié l'effet de quelques flavonoïdes isolés (lutéoline-7-O-glucoside, lutéoline-7,3'-O-diglucoside, apigénine, quercétine3-O-glycoside, kaempférol-3-O-glucoside) sur *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* et *B. subtilis*. Tous les flavonoïdes testés ont inhibé toute les souches, sauf le lutéoline-7-O-glucoside et le lutéoline-7,3'-O-diglucoside qui ont donné un résultat négatif avec *E. coli* et *P. aeruginosa*. La quercétine 3-O-glycoside a inhibé toutes les souches testées avec de très faibles CMI, mais la combinaison entre la quercétine3-O-glycoside, kaempférol-3-O-glucoside et l'apigénine a donné les meilleurs résultats. Un CMI de l'ordre de 0.40 mg/mL a été obtenu en présence de cette combinaison avec *P. aeruginosa*.

Tableau 16: Etude de la synergie entre la quercétine et le kaempférol contre *P. aeruginosa*.

Q		K		Σ FIC	Interprétation
Concentration	Fic Q	Concentration	Fic K		
0,25	1	0	0	1	CMI Q
0,125	0,5	0,0078	0,0624	0,5624	additive
0,0625	0,25	0,0156	0,1248	0,3748	synergie
0,0156	0,0624	0,03125	0,25	0,3124	synergie
0,0039	0,0156	0,0625	0,5	0,5156	synergie
0	0	0,125	1	1	CMI K



Figure 43: Isobogramme de la combinaison quercétine-kaempférol contre *P. aeruginosa*

- Acide caféique et Kaempférol

Une autre combinaison testée avec *P. aeruginosa* est l'acide caféique et le kaempférol. Cette souche était très résistante à l'acide caféique avec une CMI de l'ordre de 2 mg/mL. L'addition des concentrations qui atteignent jusqu'à 0,03125 mg/mL de kaempférol ne semble pas avoir un grand effet, l'effet reste toujours indifférent (tableau 17).

La combinaison entre 0.0625 mg/mL de kaempférol avec 0.0625 mg/mL d'acide caféique a permis d'avoir un effet synergique (fig.44) avec une valeur d'indice de FIC de 0.53 qui est supérieur à celui observé lorsque le kaempférol était combiné avec la quercétine.

Gutiérrez-Fernández *et al.* (2013) ont étudié l'activité antimicrobienne de différents composés phénoliques (thymol, carvacrol, acide gallique, hydroxyanisole butylé et gallate d'octyl) seuls et en combinaison sur 4 souches isolées d' *Enterococcus faecalis*. Tous les composés testés individuellement ont exercé un effet antibactérien avec des CMI qui

varient de 30 $\mu\text{g/mL}$ (octyl gallate) à 3,150 $\mu\text{g/mL}$ (acide gallique). En combinaison, la meilleure association fut celle de thymol + carvacrol et acide gallique + octyl gallate avec 67 à 75% de réduction des CMI.

Tableau 17: Etude de la synergie entre l'acide caféique et le kaempférol contre *P. aeruginosa*.

Ac caf		K		Σ FIC	Interprétation
Concentration	Fic Ac caf	Concentration	Fic K		
2	1	0	0	1	CMI Ac caf
2	1	0,0078	0,0624	1,0624	indifférent
2	1	0,0156	0,1248	1,1248	indifférent
2	1	0,03125	0,25	1,25	indifférent
0,0625	0,03125	0,0625	0,5	0,53125	synergie
0	0	0,125	1	1	CMI K

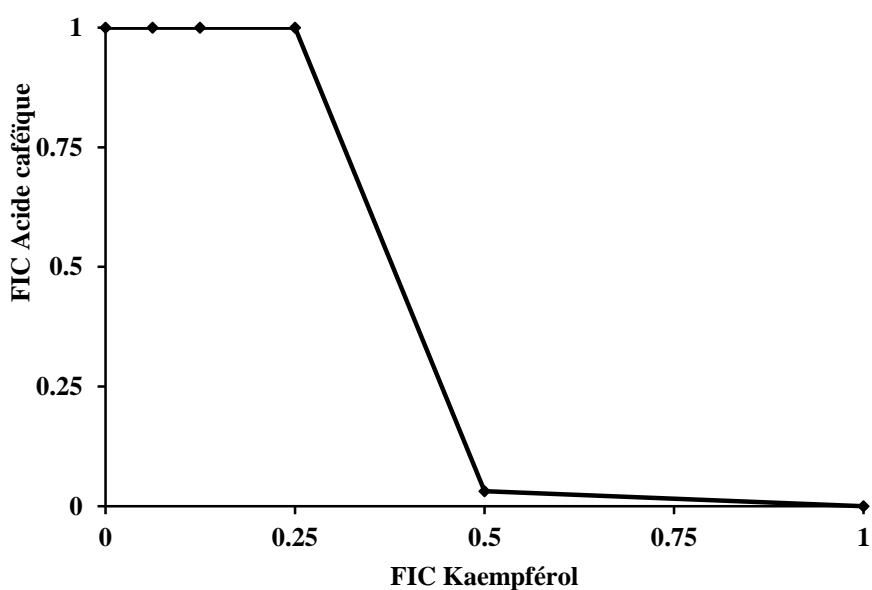


Figure 44: Isobologramme de la combinaison acide caféique-kaempférol contre *P. aeruginosa*

- Acide caféique et Quercétine

En dernier lieu, la combinaison entre l'acide caféique et la quercétine n'a pas d'effet synergique sur *P. aeruginosa* (tableau 18). L'effet modéré de l'acide caféique ne subit pas une grande amélioration lorsqu'il est associé avec la quercétine. Le meilleur indice de FIC calculé est 0.75, il reflète un effet additif (fig.45).

Tableau 18: Etude de la synergie entre l'acide caféique et la quercétine contre *P. aeruginosa*.

Ac caf		Q		Σ FIC	Interprétation
Concentration	Fic Ac caf	Concentration	Fic Q		
2	1	0	0	1	CMI Ac caf
2	1	0,031	0,124	1,124	indifférent
2	1	0,0625	0,25	1,25	indifférent
0,5	0,25	0,125	0,5	0,75	additive
0	0	0,25	1	1	CMI Q

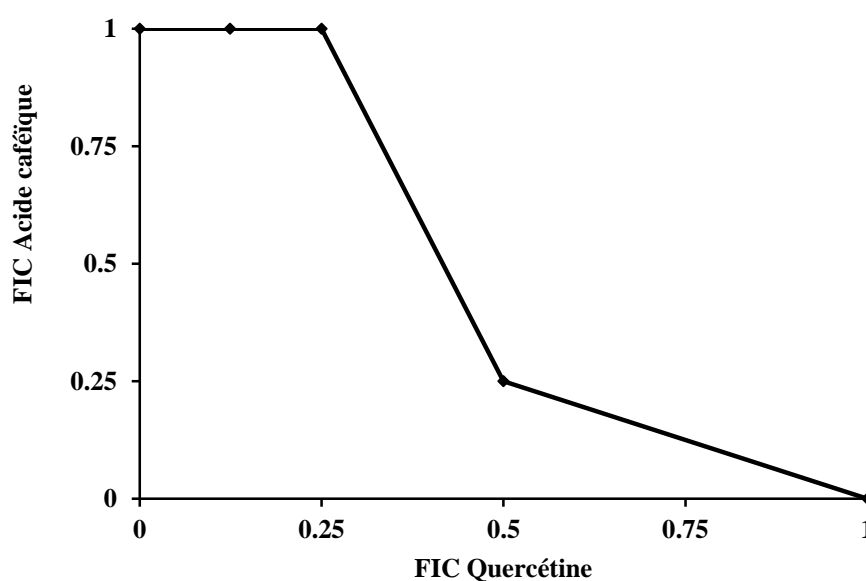


Figure 45: Isobologramme de la combinaison acide caféique-quercétine contre *P. aeruginosa*

III.4.3. Cytotoxicité des constituants d'intérêt du piment (polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes) vis-à-vis des cellules cancéreuses

Le terme général de « cancer » définit un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme. La caractéristique majeure du cancer est la prolifération rapide de cellules anormales qui, au-delà de leur délimitation habituelle, peuvent envahir des parties adjacentes de l'organisme, puis essaimer dans d'autres organes (Konan, 2014).

Ces dernières années, plusieurs recherches ont été menées sur l'activité anti-tumorale des plantes afin d'identifier de nouvelles molécules actives avec de nouveaux mécanismes d'action (Jayaprakasha *et al.*, 2007).

Dans une étude cas-témoin incluant plus de 250 personnes, Greenwald *et al.* (2001) ont montré que la consommation de fruits, légumes et graines diminuait le risque de développer un certain nombre de cancers tels que les cancers de la bouche, de l'oesophage, du pharynx, des poumons, de l'estomac, du colon et du rectum.

Parmi cette multitude d'agents naturels chimio-préventifs issus de l'alimentation, on peut notamment citer les flavonoïdes, les isothiocyanates, les lycopènes, les indoles, les organo-sulfures et les polyphénols (Jankun *et al.*, 1997).

Afin d'examiner le potentiel anti-cancéreux des polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes de piment, deux lignées cellulaires ont été utilisées : Les cellules mononucléaires humaines (PBMCs) et la lignée cellulaire cancéreuse U937 (ATCC CRL 1593). La toxicité de ces extraits sur les deux lignées cellulaires a été évaluée selon le test d'exclusion du bleu Trypan.

Suivant les résultats (fig.46), on remarque que l'effet des polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes était dose-dépendant et sélectif. Les cellules leucémiques humaines U937 sont les plus sensibles au traitement par rapport aux cellules circulantes (PBMCs).

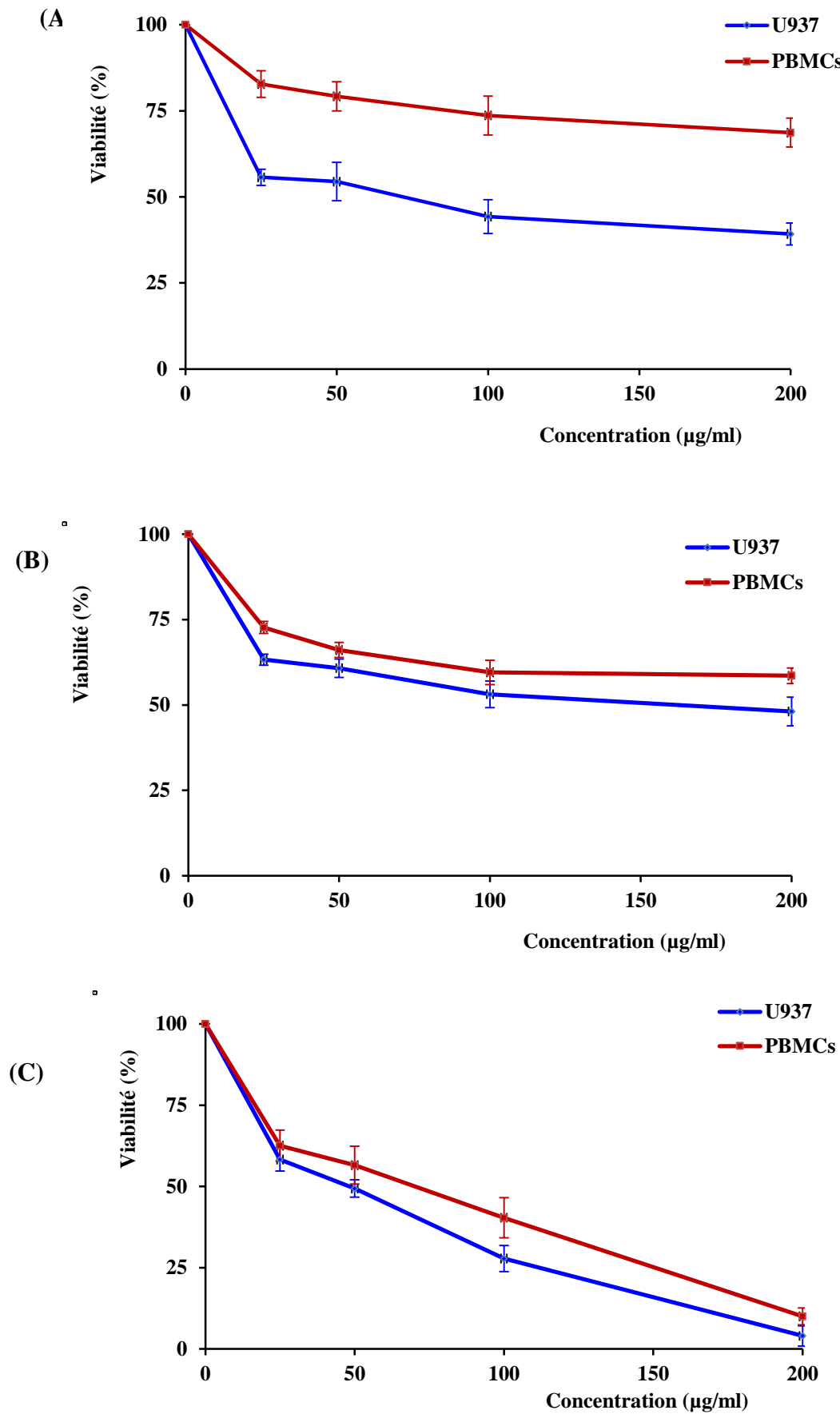


Figure 46 : Cytotoxicité des polyphénols (A), capsaïcinoïdes (B) et caroténoïdes (C) du piment.

Parmi les trois extraits, les caroténoïdes ont exercé le pouvoir anti-tumorale le plus important. L'addition de seulement 25 µg/mL a permis une diminution de 41.74% des cellules cancéreuses U937. Lorsque cette concentration augmente à 50 µg/mL, 50.64% d'U937 sont inhibées.

La viabilité des cellules leucémiques continue a diminué avec les concentrations les plus élevées de caroténoïdes jusqu'à l'obtention de seulement 4% de viabilité en présence de la plus grande concentration 200 µg/mL, mais la cytotoxicité vis-à-vis les cellules saines s'est trouvée elle aussi augmentée. Cette concentration cause 90% de perte au niveau des cellules PBMCs.

[Smith-Warner et al. \(1999\)](#) ont signalé dans leur étude que la réduction du risque de développer un cancer de sein était souvent associée à la consommation de carottes et de légumes verts riches en caroténoïdes. La réduction du risque de cancer de prostate était associée à la prise régulière de légumes de couleur jaune très riches en caroténoïdes et de tomates qui sont riches en caroténoïdes lycopène ([Souleymane, 2011](#)).

Selon [McDevitt et al., \(2005\)](#), L'exposition au sérum enrichi à un des caroténoïdes suivants : β -carotène, lycopène ou bien la lutéine pourra inhiber la prolifération des cellules U937, et suggèrent que les caroténoïdes peuvent influencer la différenciation des monocytes en macrophages.

Les caroténoïdes tels que le α -carotène, β -carotène, β -cryptoxanthine, lycopène, lutéine, zéaxanthine, violaxanthine, néoxanthine, canthaxanthine, astaxanthine, fucoxanthine et siphonaxanthine se sont avérés avoir une activité anticancéreuse vis-à-vis différentes cellules cancéreuses telles du côlon, du foie, du sein , de la prostate, du col utérin et la leucémie ([Ajila et Brar, 2012](#); [Gloria et al.,2014](#); [Haddad et al., 2013](#); [Nishino et al., 2000](#); [Rokkaku et al., 2013](#); [Sugawara et al., 2014](#); [Tanaka et al., 2012](#)).

Les deux autres extraits, capsaïcinoïdes et polyphénols, possèdent une cytotoxicité inférieure par rapport aux caroténoïdes mais une meilleure sélectivité. L'exposition des cellules à 25 µg/mL de capsaïcinoïdes inhibe la prolifération des cellules U937 et donne une inhibition de 36.72 % et 27.33% de PBMCs. La viabilité des cellules cancéreuses est

de l'ordre de 60.77% en présence de 50 µg/mL de capsaïcinoïdes et atteint 48.1% avec la plus forte concentration. A cette dose, 58.5% de viabilité a été obtenue avec les cellules saines.

Le traitement des cellules U937 avec 25 µg/mL d'extrait phénolique du piment, permet d'inhiber la prolifération cellulaire à 44.3 % et 17.2 3% des cellules PBMCs. Le doublement de cette dose a permis une légère amélioration d'inhibition des cellules leucémiques de l'ordre de 2.25%, qui représente une viabilité de 54.44%.

Pour la concentration maximale, le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire après 24h d'exposition est de 60.78% pour les cellules U937. La viabilité des cellules saines PBMCs enregistrée est de l'ordre de 68.67% ce qui représente le meilleur taux de survie obtenu avec les trois extraits testés. Pour cela, l'extrait phénolique représente le meilleur traitement par rapport aux caroténoïdes et capsaïcinoïdes grâce à sa capacité à inhiber la prolifération des cellules leucémiques et son mode action plus sélectif.

La capsaïcine est capable de réduire la prolifération cellulaire et d'induire la mort par apoptose (Bley *et al.*,2012). Plusieurs études ont montré que les activités génotoxiques et pro-apoptotiques de la capsaïcine sont plutôt limitées aux cellules tumorales, alors que dans le cas des cellules saines la capsaïcine n'induit pas de cytotoxicité (Macho *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2008; Pramanik *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2006; Skrzypski *et al.*, 2014).

En raison de sa capacité à inhiber la progression du cancer, ainsi l'induction de l'apoptose, la capsaïcine a été proposé comme un nouveau candidat dans la thérapie du cancer (Luo *et al.*, 2011; Skrzypski *et al.*, 2014).

Lin *et al.* (2013) ont étudié l'effet de la capsaïcine sur une lignée cellulaire cancéreuse humaine. Ils on observé quelques effets tels que la réduction de la viabilité et prolifération, ainsi l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2/M et la perte de la membrane de la mitochondrie conduisant à une activation de la caspase 9, qui à son tour est responsable de l'apoptose cellulaire.

Ces dernières années, plusieurs études menées *in vitro* sur des lignées de cellules cancéreuses ou *in vivo* à l'aide de modèles animaux ont montré le rôle protecteur des polyphénols contre différents types de cancers (Yang et al., 2010).

Beaucoup de recherches ont été réalisées pour la compréhension des mécanismes moléculaires responsables des effets chemo-préventive des polyphénols, et par conséquent, un large éventail de mécanismes et gènes cibles ont été identifiés. Parmi ces mécanismes, leur capacité à interrompre ou inverser le processus de cancérogenèse en agissant sur molécules de signalisation intracellulaires impliquées dans l'initiation et / ou la promotion de cancer, ou de leur potentiel pour arrêter ou inverser le stade de la progression du cancer. Les composés polyphénoliques peuvent également déclencher l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Manson, 2003; Surh, 2003 ; Kuno et al., 2012).

Plusieurs études ont été menées sur l'effet de la quercétine sur des cellules cancéreuses (Wattel et al., 2004; Gulati et al., 2006; Thaler et al., 2009; Gibelliniet al., 2010 ; Yamaguchi and Weitzmann, 2011; Yao et al., 2012 ; Pratheeshkumar et al., 2012 ; Tabaczar et al., 2014 ; Pan et al., 2015 ; Pavan et al., 2015).

Selon des recherches réalisées sur des modèles murins par Lee et al. (2006), la quercétine semble posséder un effet anticancer en empêchant la prolifération, et par arrêt de la phase G2/M dans les cellules U937. Ramos et al. (2008) ont montré que la quercétine et l'acide ursolique peuvent prévenir les dommages d'ADN et la prolifération des cellules HepG2, alors que la rutine n'avait pas d'effet.

De nombreuses études ont décrit les effets bénéfiques du kaempférol dans la réduction des maladies chroniques, en particulier le cancer. Des études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre la consommation de kaempférol et le cancer. Au niveau moléculaire, le kaempférol a été rapporté pour moduler un certain nombre d'éléments clés de signal cellulaire des voies de transduction liés à l'apoptose, l'angiogenèse, l'inflammation et les métastases (Chen et Chen, 2013).

De manière significative, le kaempférol inhibe la croissance des cellules cancéreuses et l'angiogenèse et induit l'apoptose des cellules cancéreuses, mais d'autre part,

le kaempférol apparaît à préserver la viabilité des cellules saines, dans certains cas, en exerçant un effet protecteur (Chen et Chen, 2013).

Xu et al., (2008) ont reporté que le Kaempferol-7-O-b-D-glucoside (KG) exerce une activité anticancer vis-à-vis un nombre de cellules cancéreuses dont HeLa (cellules cancéreuses du col de l'utérus) était la plus sensible. L'expérience sur des cellules humaine saines comme HEK293 (cellules du rein embryonnaire) ou bien L-02 (cellules du foie embryonnaire) a révélé que la cytotoxicité du KG est moins importante que sur les cellules cancéreuses.

La rutine exerce *in vivo* un effet anti-tumorale et anti-angiogénique. Elle peut être une bonne option pour le traitement du cancer en raison de sa faible toxicité sur les cellules saines et ses effets antitumoraux (Alonso-Castro et al., 2013).

Une autre étude menée par Ramesh et Alshatwi (2013) a montré que la naringine est capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du col d'utérus SiHa engendrant l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2/M. Ce flavonoïde a permis aussi la réduction de la prolifération des cellules cancéreuses de foie et induit l'apoptose selon les recherches *in vivo* de Thangavel et Vaiyapuri (2013).

Conclusion

Conclusion

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

L'objectif de cette étude est l'identification des polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes du piment (*Capsicum annuum* L.) et l'évaluation de leur pouvoir antioxydant, antimicrobien et anticancéreux. La première partie du travail a été consacré pour la détermination de la composition chimique.

Au cours de ce travail, différentes méthodes d'extractions et d'analyse ont été développées. La meilleure méthode d'extraction des capsaïcinoïdes est l'utilisation de 75% de méthanol pendant 20 min à une température de 100°C. La capsaïcine et la dihydrocapsaïcine sont les composés majoritaires de cet extrait. Pour les polyphénols, l'utilisation de l'eau et méthanol acidifié avec la colonne RP amide C18 semble le bon choix pour assurer une bonne séparation. Le piment est une source très riche en composés bioactifs, 19 acides phénoliques et flavonoïdes ont été identifiés et quantifiés, les flavonols étaient majoritaires. En ce qui concerne les caroténoïdes, la lutéine est la plus abondante avec un pourcentage de 54.40%.

Les polyphénols, capsaïcinoïdes et caroténoïdes de piment sont de bons antioxydants qui pourraient être utilisés pour lutter contre les radicaux libres et les problèmes de santé qui peuvent résulter de leur présence. Mais les caroténoïdes possèdent le pouvoir antiradicalaire le plus puissant.

L'activité antimicrobienne des polyphénols et capsaïcinoïdes identifiés dans le piment vis-à-vis de 18 souches pathogènes et probiotiques qui appartiennent aux bactéries à gram positive et négative, a révélé que l'effet de ces substances est sélectif. Parmi toutes les molécules testées, le kaempférol, la quercétine et l'acide caféique ont été retenus vu leur grande activité. Une synergie positive est observée entre ces trois polyphénols, mais

les meilleures combinaisons sont l'acide caféique et la quercétine, la quercétine et le kaempférol avec *S. aureus* et *P. aeruginosa* respectivement.

Dans le test de cytotoxicité de ces trois extraits sur les deux lignés cellulaires PBMCs et U937, les caroténoïdes avaient le plus grand pourcentage de réduction des cellules cancéreuses mais les polyphénols possédaient la meilleure sélectivité.

Les résultats des propriétés biologiques des principes actifs de piment suggèrent leurs utilisations dans le domaine agroalimentaire pour protéger les aliments contre l'oxydation et les altérations microbiennes ou dans le domaine pharmaceutiques pour lutter contre le stress oxydatif et les maladies qui peuvent en résulter ainsi contre les bactéries pathogènes.

Sur le plan des perspectives, nous considérons que les observations faites *in vitro* ne constituent qu'une première étape de recherche pour l'évaluation des propriétés biologiques des substances bioactives du piment. Ces effets doivent être explorés *in vivo*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

1. **Abdel-Aal, E.S.M, Akhtar,H., Zaheer, K., Ali, R. (2013).** Dietary Sources of Lutein and Zeaxanthin Carotenoids and Their Role in Eye Health. *Nutrients*, 5: 1169-1185
2. **Abedini, A. (2013).** Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de l'Université de Lille.
3. **Abidi, S.L. (1999).** Reversed-phase retention characteristics of tocotrienol antioxidants. *J Chromatogr A*, 844:67–75.
4. **Acero-Ortega, C., Dorante, L., Hernandez-Sanchez, H., Tapia,M.S., Guitiérrez-Lopez, G., Alzamora, S., Lopez-Malo, A. (2005a).** Response surface analysis of the effects of *Capsicum* extract, temperature and pH on the growth and inactivation of *Listeria monocytogenes*. *J.Food. Eng*, 67 : 247-252.
5. **Achat, S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse de l'Université d'Avignon.
6. **Adams, M.J., Ahuja, K.D., Geraghty, D.P. (2009).** Effect of capsaicin and dihydrocapsaicin on in vitro blood coagulation and platelet aggregation. *Thromb. Res*, 124:721–723.
7. **Ahuja, K. D., Kunde, D. A., Ball, M. J., Geraghty, D. P. (2006).** Effects of capsaicin, dihydrocapsaicin, and curcumin on copper-induced oxidation of human serum lipids. *J. Agric. Food Chem*, 54: 6436–6439.
8. **Ajila, C., Brar, S. (2012).** Role of dietary antioxidants in cancer. In S. Shankar & R. K. Srivastava (Eds.), *Nutrition, diet and cancer*,377–412.
9. **Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D., Lalaoui, K. (2009).** Antibacterial activity and acute toxicity: Effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *Am. Eurasian J. Sci. Res.*, 4: 93-96.
10. **Alcaráz, L. E., Blanco, S. E., Puig, O. N., Tomas, F., Ferreti, F. H. (2000).** Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theor. Biol.* 205:231-240.
11. **Alonso-Castro, A.J., Domínguez, F., García-Carrancá, A. (2013).** Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *Arch Med Res*, 44: 364- 351.
12. **Alvarez, M.A., Debattista, N.B., Pappano, N.B. (2008).** Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. *Folia Microbiol.*, 53: 23–28.
13. **Amorim-Carrilho, K.T., Cepeda, A., Fente, C., Regal, P. (2014).** Review of methods for analysis of carotenoids. *Trend. Anal. Chem.*,56: 49–73.
14. **Amoussa-Houkpatin, W., Mouquet-Rivier, C., Kayode, A.P.P., Hounhouigan, S. (2013).** Effect of a multi-step preparation of amaranth and palm nut souces on their carotenoid content and retinol activity equivalent values. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48: 204–210.
15. **Amundsen, I ., Øiestad, Å ., Ekeberg, D ., Kristoffersen, L. (2013).** Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., B*, 927, 112–123.
16. **Anthoni, J. (2007).** Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoïdes. Thèse à l'Institut National Polytechnique de Lorraine.
17. **Ariffin , A.A ., Ghazali , H.M ., Kavousi, P. (2014).** Validation of a HPLC method for determination of hydroxymethylfurfural in crude palm oil. *Food Chem*, 154: 102–107.
18. **Arima, H., Ashida, H., Danno, G. (2002).** Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 66:1009–1014.

19. Arnnok, P., Ruangviriyachai, C., Mahachai, R., Techawongstien, S., Chanthai, S. (2012). Determination of total phenolics and anthocyanin contents in the pericarp of hot chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Int. Food Res. J*, 19 :235–243.
20. Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P. (1994). Standardization d'une extrait de propolis et identification des principaux constituents, *J Pharm Belg*, 49 :462- 468.
21. Atindehou, E. (2012). Caractérisation structurale et biologique de nouveaux agents antibactériens naturels actifs dans les infections intestinales : des peptides de la chromogranine A et des principes actifs de *Chromolaena odorata*. Thèse de l'Université de Strasbourg.
22. Auger,C., et Schini-Kerth, V.B.(2014). Potentiel des polyphénols à améliorer la protection vasculaire en stimulant la fonction endothéliale. *Cah Nutri Diet*, 49(4) : 160–172.

-B-

23. Baboota, R.K., Murtaza,N., Jagtap, S., Singh, P., Karmase, A., Kaur, J., Bhutani, K.K., Boparai, R.K., Premkumar, L.S., Kondepudi, K.K., Bishnoi, M. (2014). Capsaicin-induced transcriptional changes in hypothalamus and alterations in gut microbial count in high fat diet fed mice. *J. Nutr. Biochem*, 25: 893–902.
24. Barbero, G. F., Liazid, A., Palma, M., Baffoso, C. G. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75(5): 1332–1337.
25. Barbero,G.F., Palma,P., Barroso, C.G. (2006). Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction–high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*,578: 227–233.
26. Barbero,G.F., Ruiz, A.G., Liazid, A., Palma, M., Vera, J.C., Barroso, C.G. (2014). Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annuum* L.). *Food. Chem*, 153:200–206.
27. Barbosa, J., Bergés, R., Sanz-Nebot, V. (1998). Retention behaviour of quinolone derivatives in high-performance liquid chromatography: Effect of pH and evaluation of ionization constants. *J Chromatogra A*, 823, Issues 1–2: 411–422.
28. Basu, T.K., Donaldson, D. (2003). Intestinal absorption in health and disease: micronutrients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 17: 957-979.
29. Bauke, F.G.K., Naumann, R., Alexander-Weber, C. (1993). Multiple-point calibration with linear regression as a proposed standardization procedure for high-precision pH measurements. *Anal. Chem.*, 65: p. 3244.
30. Benavente-García, O., Castillo, J., Del Baño, M.J., Lorente, J. (2001). Improved Water Solubility of Neohesperidin Dihydrochalcone in Sweetener Blends. *J. Agric. Food Chem*,49:189 - 191.
31. Bennetau-Pelissero,C. (2014). Polyphénols et voies de signalisation, données récentes. *Cah Nutr Diet*, 49 : 151-159.
32. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.*, 239:70-76.
33. Bernal, M.A., Calderon, A.A., Pedreno, M.A., Muñoz, R., Ros Barceló, A., Merino de Caceres, F. (1993). Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (variety Annuum) fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 1041-1044.
- 34 .Bernal, M.A., Ros Barceló, A. (1996). 5,5'- dicapsaicin, 4'-O-5-dicapsaicin ether, and dehydrogenation polymers with high molecular weights are the main products of the oxidation of capsaicin by peroxidase from hot pepper. *J. Agric. Food Chem*, 43, 352-355.
35. Bhojar, M.S., Mishra, G.P., Naik, P.K., Srivastava, R.B. (2011). Estimation of antioxidant activity and total phenolics among natural populations of Caper (*Capparis spinosa*) leaves collected from cold arid desert of trans-Himalayas. *Aust. J. Crop Sci.*, 5(7): 912-919.

36. Bley, K., Boorman, G., Mohammad, B., McKenzie, D., Babbar, S. (2012). A Comprehensive Review of the Carcinogenic and Anticarcinogenic Potential of Capsaicin. *Toxicol Pathol*, 40: 847-873.
37. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable radical. *Nature*, 4617, 1199-1200.
38. Bloor S.J. (2001). Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Methods Enzymol*, 335 :3-14.
39. Blount, J. D., McGraw, K. J. (2008). Signal functions of carotenoid colouration. *Carotenoids*. Volume 4: 213-236.
40. Boon, C.S., McClements, D.J., Weiss, J., Decker, E.A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 50(6): 515-532.
41. Boonkird, S., Phisalaphong, C., Phisalaphong, M. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab- and pilot-plant scale. *Ultrason. Sonochem*, 15:1075–1079.
42. Bourre, J.M. (2008). Bien manger : vrais et faux dangers.
43. Borel, P., Draï, J., Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Laromiguière, M., Le Moël, G. (2005). Données récentes sur l'absorption et le catabolisme des caroténoïdes. *Ann Biol Clin*, 63 (2) : 165-77.
44. Borys, J.M., Ghafari, Y., Alizier, B., Mayer, J., Mercier, A. (2012). Épices et contrôle du poids. *Phytothérapie*, 10:105–108.
45. Bosland, P.W., Votava, E.J. (2000). Peppers : Vegetable and Spice Capsicums .*CABI Publishing*. 204.
46. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol*, 28, 25-30.
47. Britton, G. (2008). Functions of intact carotenoids. *Carotenoids*. Volume 4.
48. Britz, S.J., Prasad, P.V.V., Moreau, R.A., Allen, L.H. Jr., Kremer, D.F., Boote, K.J. (2007). Influence of growth temperature on the amounts of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol in brown rice. *J Agric. Food. Chem.*, 55:7559–7565.
49. Buenger, J., Ackermann, H., Jentzsch, A., Mehling, A., Pfitzner, I., Reiffen, KA., Schroeder, KR., Wollenweber, U. (2006). An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. *Int. J. Cosm. Sci.*, 28, 135-146.
50. Bulvestre, M.D. (2007). Influence du β -Carotène sur les performances de reproduction chez la vache laitière. Thèse de l'École Nationale Veterinaire d'Alfort.

-C-

51. Campbell, N. A. (1993). La photosynthese. *Biologie. D. Universite*: 199-220.
52. Campos, F.M., Couto, J.A., Figueredo, A.R., Toth, I.V., Rangel, A.O.S.S, Hogg, T.A. (2009). Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acids bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.*, 135: 144–151.
53. Cao, G., Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin .Chem*,44(6): 1309-1315.
54. Caris-Veyrat, C., M.J. Amiot, R. Ramasseul, and J.C. Marchon. (2001). Mild oxidative cleavage of beta,beta-carotene by dioxygen induced by a ruthenium porphyrin catalyst: characterization of products and of some possible intermediates. *New J. Chem.*, 25(2): 203-206.
55. Caruba, T., Sabatier, B., Matta, M., Arlet, J.B., Ranque, B., Capron, L., Mainardi, J.L., Pouchot, J. (2010). Prospective evaluation of the relevance of prescribing antibiotic combinations in an internal medicine department. *Rev Med Interne*, 31(7):469-75.
56. Cazzonelli, C.I. (2011). Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Funct. Plant Biol*, 38 : 833-847.

57. Céliz, G., Daz, M., Audisio, M.C. (2011). Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. *J. Appl. Microbiol*,1364-5072.
58. Chauveau-Duriot, B., Doreau, M., Noziere, P., Graulet, B. (2010). Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397:777–790.
59. Chen, J., Huang, G.D., Tan, S.R., Guo, J., and Su, Z.Q. (2013). The Preparation of Capsaicin-Chitosan Microspheres (CCMS) Enteric Coated Tablets. *Int. J. Mol. Sci*, 14, 24305-24319.
60. Chen, A.Y., Chen, Y.C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food. Chem*, 138:2099–2107.
61. Chinn, M.S, Sharma-Shivappa, R.R., Cotter, J.L. (2011). Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. *Food bioprod process*, 89 (4): 340–345.
62. Chocholousn, P., Vackova, J., Sramkova, I., Šatinsky,D., Solich, P. (2013). Advantages of core-shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids. *Talanta*, 103:221–227.
63. Choi, S.H., Gu, M.B. (2001). Phenolic toxicity e detection and classification through the use of a recombinant bioluminescent *Escherichia coli*. *Environ. Toxicol. Chem*. 20: 248-255.
64. Chuah, A. M., Lee, Y. C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L. J., Matoba, T. (2008). Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chem*, 111, 20–28.
65. Chuichulcherm, S., Prommakort S, Srinophakun, P., Thanapimmetha, A. (2013). Optimization of capsaicin purification from *Capsicum frutescens* Linn. With column chromatography using Taguchi design. *Ind Crop Prod*, 44: 473– 479.
66. Cisneros-Pineda, O., Torres-Tapia, L.W., Gutiérrez-Pacheco, L.C., Contreras-Martín, F., González-Estrada, T., Peraza-Sánchez, S.R. (2007). Capsaicinoids quantification in chili peppers cultivated in the state of Yucatan, Mexico. *Food.Chem*, 104, 1755–1760.
67. Clinical and Laboratory Standards Institute, M100–S18. (2008). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne.
68. Condurso, C., Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Crino, P., Paratore, A., Romano D. (2012). Effects of different rootstocks on aroma volatile compounds and carotenoid content of melon fruits. *Sci. Hortic*. 148: 9–16.
69. Coon, D. (2003). Chile Peppers: Heating up Hispanic foods. *Food. Tech*, 57(1):39-43.
70. Contreras-Padilla, M., Yahia, E.M. (1998). Changes in capsaicinoids during development maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *J. Agric. Food Chem*,46: 2075-2079.
71. Courraud, J., Berger, J., Cristol, J., Avallone, S. (2013). Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during *in vitro* digestion. *Food. Chem*. 136:871–877.
72. Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Martínez-Alvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.F., Basilio, A., Lopez Rivas, C., Requena, T. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res Microbiol* 16, 372–382.
73. Curiel, J.A., Rodriguez, H., Landete, J.M., De las Rivas, B., Munoz, R. (2010). Ability of *Lactobacillus brevis* to degrade food phenolic acids. *Food. Chem*, 120: 225–229.
74. Curl ; A.L. (1964). The carotenoids of red bell peppers. *J. Agric. Food Chem*, 12 (6): 522–524.
75. Curry, J., Aluru, M., Mendoza, M., Nevarez, J., Melendez, M., O'Connell, M.A. (1999). Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Sci*. 148, 47–57.
76. Cutting, S. M. (2008). Colorspore: new sources of naturel, gastric stable, food additives, colorants and novel functional foods. Small collaborative project. *Technical Annex: proposal n°207948:1-84*.

-D-

77. **Da Costa Cardoso. (2008).** Identification de facteurs opératoires influents en vue d'une production microbienne optimale de torularhodine et de sa fonctionnalisation à partir d'études cinétiques. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine.
78. **Daglia, M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Chem. Biol*, 23:174–181.
79. **Dangles, O., Fargeix, G., Dufour, C. (1999).** One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1387-1395.
80. **Daood, H.G., Bencze, G., Palotas, G., Pek, Z., Sidikov, A. Helyes, L. (2013).** HPLC analysis of carotenoids from tomatoes using cross-linked C18 column and MS detection. *J. Chromatogr. Sci.*, 1–7.
81. **Date, Y., Murakami, N., Toshinai, K., Matsukura, S., Nijjima, A., Matsuo, H., Kangawa, K., Nakazato, M. (2002).** The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, 123: 1120-8.
82. **Davidson, P. M., Taylor, T. M. (2007).** Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, & L. R. Beuchat (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (3rd ed.) (pp. 713-745). Washington DC: ASM Pres.
83. **De, A. (2003).** *Capsicum* : The genus *Capsicum*. *Medicinal and aromatic plants - industrial profiles*, 33.
84. **Deli, J.; Molnár, P.; Matus, Z.; Tóth, G. (2001).** Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during ripening; Biosynthesis of carotenoids in red paprika. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1517–1523.
85. **Denes, E., Hidri, N. (2009).** Synergie et antagonisme en antibiothérapie. *Antibiotiques*, 11 :106—115.
86. **De Silva V, El-Metwally A, Ernst E, Lewith G, Macfarlane GJ; Arthritis Research Campaign working group on complementary and alternative medicines. (2011).** Evidence for the efficacy of complementary and alternative medicines in the management of fibromyalgia: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*, 50(5):911-20.
87. **Dicecco, J.J (1976).** Gas-liquid Chromatographic determination of capsaicin. *J. AOAC*, 59, 1.
88. **Dima, C., Coman, G., Cotarlet, M., Alexe, M., Dima, S. (2013).** Antioxidant and antibacterial properties of capsaïcine microemulsions. *Food Tech*, 37(1): 39-49.
89. **Di Mascio, P., Sundquist, A.R., Devasagayam, T.P.A., Sies, H. (1992).** Assay of lycopene and other carotenoids as singlet oxygen quencher. *Methods Enzymol* , 213 : 429-32.
90. **Dinicola, S., Cucina, A., Pasqualato, A., D'Anselmi, F., Proietti, S., Lisi, E., Pasqua, G., Antonacci, D., Bizzarri, M. (2012).** Antiproliferative and Apoptotic Effects Triggered by Grape Seed Extract (GSE) versus Epigallocatechin and Procyanidins on Colon Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.*, 13 :651-664.
91. **Djuikwo, V.N., Ejoh, R.A., Gouado, I., Mbofung, C.M., Tanumihardjo, S.A. (2011).** Determination of major carotenoids in processed tropical leafy vegetables indigenous to Africa. *Food Nutr. Sci.* 2:793–802.
92. **Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A. P., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Crecí, A. (2005).** Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat. Res. Fund. Molec. Mech. Mutag.* 591:237–246.
93. **Dorantes, L., Colmenero, R., Hernandez-Sanchez, H., Mota, L., Jaramillo, M.E., Fernandez, E., Salano, C. (2000).** Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *Int. J. Food Microbiol*, 57 : 125-128.
94. **Duarte, C., Martins, M. M., Gouveia, A. F., da Costa, S. B., Leitao, A. E. and Gil, M. G. B. (2004).** Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.). *J. Supercrit. Fluids*, 30: 155-161.
95. **Duc, H., Fraser, P.D, Tam, N.K.M., Cutting, S.M.(2006).** "Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. *FEMS Microbiol Rev*, 255(2): 215-224.

96. Dugo, P., Herrero,M., Giuffrida,D., Ragonese,C., Dugo,G., Mondello,L. (2008). Analysis of native carotenoid composition in orange juice using C30 columns in tandem. *J. Sep. Sci*, 31, 2151 – 2160.

97. Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M.(2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev*, 13(1):79–106.

-E-

98. Eich, E. (2008). In Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites, Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook); Eich, E., Ed.; *Springer-Verlag: Berlin*, 271–342.

99. El Mrabet, K. (2008). Développement d'une méthode d'analyse de résidus de pesticides par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem dans les matrices céréalières après extraction en solvant chaud pressurisé. Thèse de L'Université de Pierre et Marie Curie.

100. Estrada, B., Bernal, M. A., Diaz, J., Pomar, F., Merino, F. (2000). Fruit development in *Capsicum annum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *J. Agri Food Chem*, 48(12):6234–6239.

101. Estrada, B., Bernal, M.A., Diaz, J., Pomar, F., Merino, F. (2002). Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annum* L. in relation to fruiting. *J. Agri Food Chem*, 50: 1188–1191.

102. Everett, S.A., Dennis, M.F., Patel, K.B., Maddix, S., Kundu, S.C., Willson, R.L. (1996). Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl, and sulfonyl free-radicals by the nutritional antioxidant beta carotene. *J Biol Chem*, 271 : 3988-94.

-F-

103. FAO. (2015). Organisation des nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).

104. Faure H, Fayol V, Galabert C, Grolier, P., Le Moël, G., Steghens, J.P., Nabet, F. (1999). Les caroténoïdes : 2. Pathologies et études de supplémentation. *Ann Biol Clin* , 57 : 273-82.

105. Ferrazzano, G.F., Roberto, L., Amato, I., Cantile ,T., Sangianantoni, G., Ingenito, A. (2011). Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: An *in vivo* study. *J Med Food*, 14:907–11.

106. Fraenkel, L., Bogardus Jr., S.T., Concato, J., Wittink, D.R. (2004). Treatment options in knee osteoarthritis: the patient's perspective. *Arch. Intern. Med*, 164: 1299–1304.

107. Franklin, R., Cockerill, M.D. (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-First Informational Supplement M100-S21; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA.

108. Frigaard, N-U. (2008). Carotenoid biosynthesis, function, and evolution. University of Copenhagen.

-G-

109. Garcia-Lafuente, A., Guillamon, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martínez, J.A. (2009). Flavonoids as antiinflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res*, 58: 537-552.

110. Garcia-Perez, M.E. (2008). Caractérisation de composés phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune: Etude de leur capacité antioxydante. Université Laval.

111. Garcs-Claver, A., Gil-Ortega, R., Ivarez-Fernndez, A., Arnedo Andrs, M.S. (2007). Inheritance of Capsaicin and Dihydrocapsaicin, Determined by HPLC-ESI/MS, in an Intraspecific Cross of *Capsicum annum L.* *J. Agric. Food Chem*, 55 (17): 6951-6957.
112. Garzon, G.A., Narvaez-Cuenca, C.E., Kopec, R.E., Barry, A.M., Riedl, K.M., Schwartz, S.J. (2012). Determination of carotenoids, total phenolic content, and antioxidant activity of Araza (*Eugenia stipitata* McVaugh), an Amazonian fruit, *J. Agric. Food Chem.*, 60:4709–4717.
113. Gerster, H.G. (1997). The potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll. Nutr.*, 16 : 109-26.
114. Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Biasi, S.D., Roat, E., Bertocelli, L., Cossarizza, A. (2010). Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of quercétine. *Cancers*, 2:1288–1311.
115. Gilar, M., Jaworski, A., McDonald, T.S. (2014). Solvent selectivity and strength in reversed-phase liquid chromatography separation of peptides. *J Chromatogra A*, 1337:140–146.
116. Giuffrida, D., Dugo, P., Torre, G., Bignardi, C., Cavazza, A., Corradini, C., Dugo, G. (2013). Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chem*, 140, 794–802.
117. Gloria, N. F., Soares, N., Brand, C., Oliveira, F. L., Borojevic, R., Teodoro, A. J. (2014). Lycopene and beta-carotene induce cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. *Anticancer Res*, 34: 1377–1386.
118. González de Mejía, E., Quintanar-Hernández, J.A., Loarca-Piña, G. (1998). Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* ,416, Issues 1–2: 11–19.
119. González-Zamora, A., Sierra-Campos, E., Pérez-Morales, R., Vázquez-Vázquez, C., Gallegos-Robles, M. A., López-Martínez, J.D., García-Hernández, J.A. (2015). Measurement of Capsaicinoids in Chiltepin Hot Pepper: A Comparison Study between Spectrophotometric Method and High Performance Liquid Chromatography Analysis. *J. Chem.* 2015, 709150, 10.
120. Goupy, P., Bautista-Ortin, A. B., Fulcrand, H., Dangles, O. (2009). Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: hydrogen transfer reactions to the DPPH radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid. *J. Agric. Food. Chem.* 57: 5762-5770.
121. Govindraj, V.S. (1986). Capsicum: production, technology, chemistry, and quality. Part III. Chemistry of the color, aroma, and pungency stimuli. *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 24: 245–355.
122. Greenwald, P., Clifford, C.K., Milner, J.A. (2001). *Diet and cancer prevention.* *Eur. J. Canc.*, 37:948–65.
123. Grigoras, C.G. (2012). Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs. Thèse à l'Université d'Orléans.
124. Guignard, J.L. (1996). Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris, 160 p.
125. Guinoiseau, E. (2011). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse de l'Université de Corse-Pasquale Paoli.
126. Gulati, N., Laudet, B., Zohrabian, V.M., Mural, R., Jhanwar-Uniyal, M. (2006). The antiproliferative effect of quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway. *Anticancer Res*, 26:1177–1182.
127. Gutiérrez-Fernández, J., García-Armesto, M. R., Álvarez-Alonso, R., del Valle, P., de Arriaga, D., Rúa, J. (2013). Antimicrobial activity of binary combinations of natural and synthetic phenolic antioxidants against *Enterococcus faecalis*. *J. Dairy Sci.*, 96 :4912–4920.
128. Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in Olive Oils. *J Am Oil Chem Soc*, 58: 966-968.

-H-

129. Haddad, N. F., Teodoro, A. J., Leite de Oliveira, F. L., Soares, N., de Mattos, R. M., Hecht, F., Dezone, R. S., Vairo, L., Goldenberg, R. C., Gomes, F. C. A., de Carvalho, D. P., Gadelha, M. R., Nasciutti, L. E., & Miranda-Alves, L. (2013). Lycopene and β -carotene induce growth inhibition and proapoptotic effects on ACTH-secreting pituitary adenoma cells. *PLoS ONE*, 8, 62773.
130. Halliwell, B. (2006). Polyphenols: antioxidant treats for healthy living or covert toxins. *J. Food Agric*, 86: 1992-1995.
131. Haenen, G.R.M.M., Paquay, J.B.G., Korthouwer, R.E.M., Bast, A. (1997). Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 591–593.
132. Hara, Y. (1997). Influence of tea catechins on the digestive tract. *J. Cell. Biochem.* 27:52–58.
133. Harada, N., Okajima, K. (2009). Effects of capsaicin and isoflavone on blood pressure and serum levels of insulin-like growth factor-I in normotensive and hypertensive volunteers with alopecia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1456–1459.
134. Herrmann, K. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in food. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 28: 315–347.
135. Hercegovca, A., Domotorova, M., Matisova, E. (2007). Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. *J Chromatogra A*, 1153: 54–73.
136. Hornero-Mendez, D., Guevara, R. G., Minguez-Mosquera, M. I. (2000). Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *J Agric. Food .Chem*, 48: 3857–3864.
137. Hua, Y., Jenke, D. (2012). Increasing the Sensitivity of an LC–MS Method for Screening Material Extracts for Organic Extractables via Mobile Phase Optimization. *J Chromatogra Sci* ,50: 213–227.
138. Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric.Food. Chem*, 53: 1841-1856.
139. Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem*, 373: 23-30.

-I-

140. Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1147, 132-136.

-J-

141. Jankovic, B., Loblaw D.A., Nam.R. (2010). Capsaicin may slow PSA doubling time: case report and literature review. *Canad. Uro. Asso. J*, 4, Issue 1.
142. Jankun, J., Selman, S.H., Swiercz, R., Skrzypczak-Jankun, E. (1997). Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*:387:561.
143. Jayaprakasha, G.K., Mandadi, K.K., Poulouse, S.M., Jadegou, Y., Nagana Gowda, G.A., Patil, B.S. (2007). Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Bioorg Med Chem.*,15(14):4923-32.

- 144.. Jeong ,W.Y., Jin, J.S., Cho, Y.A., Lee, J.H., Park, S., Jeong, S.W., Kim, Y.H., Lim,C.S, Abd El-Aty, A.M., Kim, G.S., Lee, S.J., Shim, J.H., Shin, S.C.(2011). Determination of polyphenols in three *Capsicum annum L.* (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: their contribution to overall antioxidant and anticancer activity. *J Sep Sci*, 34(21):2967-74.
145. Jin, J., Lin, G., Huang, H., Xu, D., Yu, H., Ma, X., Zhu, L., Ma, D., Jiang, H. (2014). Capsaicin mediates cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells via stabilizing and activating p53. *Int J Biol Sci*, 10: 285–295.
146. Jolicoeur, H. (2001). Les chasse-ours à base de poivre de Cayenne. Page 13. *Société de la faune et des parcs du Québec ed.* Direction du développement de la faune. Québec.
147. Jones, N. L., Shabib, S., Sherman, P.M. (1997). Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS. Microbio. Lett*, 146: 223-227.
148. Joo, J.I., Kim, D.H., Choi, J.W., Yun, J.W. (2010). Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet. *J. Proteome Res*, 9: 2977–2987.
149. Juangsamoot, J., Ruangviriyachai, C., Techawongstien, S., Chanthai, S. (2012). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in some hot chilli varieties by RP-HPLC-PDA after magnetic stirring extraction and clean up with C18 cartridge. *Int. Food Res. J.*, 19 (3): 1217-1226.
150. Jung, M.Y, Kang, H.J, Moon, A. (2001). Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Canc. Lett*, 165 :139–145.

-K-

151. Kao, T.H., Loh, C.H., Inbaraj, B.S., Chen, B.H. (2012). Determination of carotenoids in *Taraxacum formosanum* by HPLC–DAD–APCI-MS and preparation by column chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 66:144–153.
152. Kashik, F. (2009). Analysis of carotenoids in nutritional studies. (2009).Carotenoids: Handbook, Birkhauser Verlag, Basel, 7–43.
153. Knotkova, H., Pappagallo ,M., Szallasi, A. (2008). Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief: farewell or revival. *Clin J Pain*, 24:142–154.
154. Kobata, K., Todo, T., Yazawa, S., Iwai, K., Watanabe, T. (1998). Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 sweet, of pepper (*Capsicum annum L.*). *J Agric Food Chem*, 46(5): 1695–1697.
155. Kogure, K., Goto, S., Nishimura, M., Yasumoto, M., Abe, K., Ohiwa, C., Sassa, H., Kusumi, T., Terada, H. (2002). Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochim Biophys Acta*,1573: 84–92.
156. Köhn, S., Kolbe, H., Korger, M., Köpsel, C., Mayer, B., Helmut, A., Lüddecke, E., Bettermann, H., Martin, H.D. (2008). Aggregation and interface behaviour of carotenoids. *Carotenoids*. 4: 53-98.
157. Konan, K. M., Mamyrbékova-Békro, J. A., Pirat, J. L., Virieux, D., Lecouvey, M., Békro, Y. A. (2014). Analyse GC-MS des polyphénols totaux extraits des racines de *Glyphaea brevis* (Spreng.) MONACHINO (Tiliaceae) et évaluation de leur potentiel anti-prolifératif. *Phytothérapie*. 10298-014-0909-8.
158. Kortei, N.K., Odamtten, G.T., Obodai, M., Appiah, V., Akuamoah, F., Adu-Bobi, A.K., Annan, S.N.Y., Armah, J.N.O., Acquah, S.A. (2014). Evaluating the Effect of Gamma Radiation on the Total Phenolic Content, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Dried *Pleurotus ostreatus*((Jacq. ex. Fr) Kummer) Stored in Packaging Materials. *Adv.Pharm*, 2014, 1.
159. Kouassi, K.C., Koffi-Nevry, R. (2012). Evaluation de la connaissance et utilisation des variétés de piment (*Capsicum*) cultivées en Côte d'Ivoire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 6 (1): 75-185.
160. Krinsky, N. I., Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med*, 26(6): 459-516.

161. Kumar, A.M., Reddy, K.N., Sreevathsa, R., Ganeshan, G., Udaykumar, M. (2009). Towards crop improvement in bell pepper (*Capsicum annuum* L.): transgenics by a tissue-culture-independent Agrobacterium-mediated in planta approach. *Sci. Hortic. Amsterdam*, 119:362–370.

162. Kuno, T., Tsukamoto, T., Hara, A., Tanaka, T. (2012). Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *Biophys Chem*, 3 : 156-73.

-L-

163. Lachman, J., Hejtmankova, K., Kotikova, Z. (2013). Tocols and carotenoids of einkorn, emmer and spring wheat varieties: selection for breeding and production. *J. Cereal Sci.* 57: 207–214.

164. Lang, Y., Kisaka, H., Sugiyama, R., Nomura, K., Morita, A., Watanabe, T., Tanaka, Y., Yazawa, S., Miwa, T. (2009). Functional loss of pAMT results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs, in *Capsicum annuum* cv. CH-19 Sweet. *Plant J*, 59:953–961.

165. Lau, J.K., Brown, K.C., Dom, A.M., Witte, T.R., Thornhill, B.A., Crabtree, C.M., Perry, H.E., Brown, J.M., Ball, J.G., Creel, R.G., Damron, C.L., Rollyson, W.D., Stevenson, C.D., Hardman, W.E., Valentovic, M.A., Carpenter, A.B., Dasgupta, P. (2014). Capsaicin induces apoptosis in human small cell lung cancer via the TRPV6 receptor and the calpain pathway. *Apoptosis*, 19:1190–1201.

166. Lee, C. J., Yoo, E., Shin, J. H., Lee, J., Hwang, H. S., Kim, B. D. (2005). Non-pungent Capsicum contains a deletion in the capsaicinoid synthetase gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. *Mol Cell*, 19: 262-267.

167. Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J.K., Fine, H.A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9 : 391–403.

168. Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., Lee, C.Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wines. *J. Agric Food Chem*, 51:7292–5.

169. Lee, Y., Howard, L. R., Villalon, B. (1995). Flavonoid and ascorbic acid content and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. IFT Abstract, 55, 79.

170. Lefebvre, V., Goffinet, B., Chauvet, J. C., Caromel, B. (2002). Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data. *Theor. Appl. Genet*, 102 : 741 –750.

171. Lemmens, L., Colle, I., Van Buggenhout, S. Palmero, P., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2014). Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable based food products as affected by product (micro) structural characteristics and the presence of lipids: A review. *Trends. Food. Sci. Tech* ;38:125-135.

172. Lenoir, L. (2011). Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Université d'Auvergne.

173. Lewis, K., Ausubel, F.M. (2006). Prospects for plant derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* 24: 1504-1507

174. Li, H., Deng, Z., Liu, R., Loewen, S., Tsao, R. (2012). Ultra-performance liquid chromatographic separation of geometric isomers of carotenoids and antioxidant activities of 20 tomato cultivars and breeding lines. *Food Chem.*, 132:508–517.

175. Lietz, G., Oxley, A., Boesch-Saadatmandi, C., Kobayashi, D. (2012). Importance of β , β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1) and β , β -carotene 9',10'-dioxygenase 2 (BCDO2) in nutrition and health. *Mol Nutr Food Res*, 56: 241-250.

176. Ligor, M., Kovacova, J., Gadzala-Kopciuch, R.M., Studzinska, S. Bocian, Lehotay, J., Buszewski, B. (2014). Study of RP HPLC Retention Behaviours in Analysis of Carotenoids. *Chromatographia*, 77:1047–1057.

177. Iijima, K., Yoshizumi, M., Hashimoto, M., Kim, S., Eto, M., Ako, J., Liang, Q.Y., Sudoh, N., Hosoda, K., Nakahara, K., Toba, K., Ouchi, Y. (2000). Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation*, 101:805–811.
178. Lin, C.H., Lu, W.C., Wang, C.W., Chan, Y.C., Chen, M.K. (2013). Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. *BMC Complement Altern Med*, 13:46.
179. 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.
180. Loranty, A., Rembialkowska, E., Rosa, E.A.S., Bennett, R.N. (2010). Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas. *J. Food Compos. Anal*, 23: 432–441.
181. Luo, X.J., Peng, J., Li, Y.J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoïdes. *Eur. J. Pharmacol.* 650 1–7.

-M-

182. Macheix, J.J., Fleuriet, A. (1998). Phenolic acids in fruits. In: Rice-Evans CA, Packer L, eds. *Flavonoids in Health and Disease. New York: Marcel Dekker*, 35-59.
183. Macho, A., Calzado, M.A., Munoz-Blanco, J., Gomez-Diaz, C., Gajate, C., Mollinedo, F., Navas, P., Munoz, E. (1999). Selective induction of apoptosis by capsaicin in transformed cells: The role of reactive oxygen species and calcium. *Cell Death Differ.*, 6:155–165.
184. Maddox, C.E., Laur, L. M., Tian, L. (2010). Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol*, 60 (1): 53–58.
185. Maiani, G., Cast on, M. J. P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodon, I. G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Bohm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res*, 53: S194-S218.
186. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79(5): 727 – 747.
187. Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson, M.J., Narbad, A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *J. App Microbiol*, 103(6), 2056–2064.
188. Manson, M. M. (2003). Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signaling. *Trends Mol. Med.* 9: 11–18.
189. Marin, A., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F. A., Gil, M. I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum L.*). *J.Agric. Food Chem.*, 52: 3861–3869.
190. Marti, M., Camejo, D., Vallejo, F., Romojaro, F., Bacarizo, S., Palma, J.M., Sevilla, F., Jimenez, A. (2011). Influence of Fruit Ripening Stage and Harvest Period on the Antioxidant Content of Sweet Pepper Cultivars. *Plant Food f Hum Nutr*, 66 (4), 416-423.
191. Mata-Gómez, L.C., Montañez, J.C, Méndez-Zavala, A., Aguilar, C.N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13:12.
192. Materska, M. (2014). Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy pepper fruits (*Capsicum annuum L.*). *J. Funct. Foods*, 7: 269–277.
193. Materska, M., Perucka, I. (2005). Antioxidant Activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum L.*). *J. Agric. Food Chem*, 53: 1750-1756.

194. Matsufuji, H., Ishikawa, K., Nunomura, O., Chino, M., Takeda, M. (2007). Anti-oxidant content of different coloured sweet peppers, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annuum* L.). *Int. J. Food Sci & Tech*, 42:1482–1488.
195. Marc, F.r., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S: médecine sciences*, 20(4), 458-463.
196. Mazourek, M., Pujar, A., Borovsky, Y., Paran, I., Mueller, L. and Jahn, M.M. (2009). A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology*, 150: 1806-1821.
197. McDevitt, T. M., Tchao, R., Harrison, E. H., Morel, D. W. (2005). Carotenoids normally present in serum inhibit proliferation and induce differentiation of a human monocyte/macrophage cell line (U937) *J. Nutr*, 135: 160-164.
198. Mech-Nowak, A., Swiderski, A., Kruczek, M., Luczak, I., Kostecka-Gugala, A. (2012). Content of carotenoids in roots of seventeen cultivars of *Daucus carota* L, *Acta Biochim. Pol.*, 59:139–141.
199. Melendez-Martinez, A.J., Escudero-Gilete, M.L., Vicario, I.M., Heredia, F.J. (2010). Study of the influence of carotenoid structure and individual carotenoids in the qualitative and quantitative attributes of orange juice colour, *Food Res. Int.*, 43:1289–1296.
200. Melendez-Martinez, A.J., Vicario, I.M., Heredia, F. J. (2007). Analysis of carotenoids in orange juice, *J. Food Compos. Anal.* 20: 638–649.
201. Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M.R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B., Houghton, P.J., Menichini, F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv habanero. *Food Chem*, 114: 553–560.
202. Merkl, R., Hradkova, I., Filip, V. and Smidrkal, J. (2010). Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. *Czech J Food Sci*, 28: 275–279.
203. Mertz, C., Brat, P., Caris-Veyrat, C., Gunata, Z. (2010). Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.), *Food Chem.*, 119; 653–659.
204. Meulebroek, L.V., Vanhaecke, L., De Swaef, T., Steppe, K., De Brabander, H. (2012). UHPLC-MS/MS to quantify liposoluble antioxidants in red-ripe tomatoes, grown under different salt stress levels. *J. Agric. Food Chem.*, 60:566– 573.
205. Michel, T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). Thèse de L'Université d'Orléans.
206. Molan, A.L., Liu, Z., Tiwari, R. (2010). The ability of green tea to positively modulate key markers of gastrointestinal function in rats. *Phytother. Res*, 24 : 1614–1619.
207. Molina-Torres, J., Garcia-Chavez, A., Ramirez-Chavez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *J. Ethnopharmacol*, 64, 241–248.
208. Montpas, S. (1999). Analyse de la biodégradation de composés nitroaromatiques par des microorganismes provenant du sol. Thèse de l'Université Laval.
209. Montravers, P., Dupont, H. (1996). Monitoring d'une antibiothérapie. *Conférences d'actualisation*, p. 651-68.
210. Mori A., Lehmann S., O'Kelly J., Kumagai T., Desmond J.C., Pervan M., McBride W.H., Kizaki M., Koeffler H.P. (2006). Capsaicin, a Component of Red Peppers, Inhibits the Growth of Androgen-Independent, p53 Mutant Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.*, 66, 3222–3229.
211. Mortensen, A., Skibsted, L.H., Evans, C., Everett, S.A. (1997). Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett*, 418 : 91-7.
212. Moss, G.P. (2000). Nomenclature of lignans and neolignans. *Pure Appl. Chem.* 72, 1493-1523.
213. Muanda, F.N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de l'Université Paul Verlaine-Metz.

214. Mueller-Seitz, E., Hiepler, C., Petz, M. (2008). Chili pepper fruits: Content and pattern of capsaicinoids in single fruits of different ages. *J Agri Food Chem*, 56(24):12114–12121.

215. Mun, J.M., Ok, H.M., Kwon, O. (2014). Corn gluten hydrolysate and capsaicin have complimentary actions on body weight reduction and lipid-related genes in diet-induced obese rats. *Nutr Res.* 34(5):458-65.

-N-

216. Nascimento, P. L. A., Nascimento, T. C. E. S., Ramos, N.S. M., Silva, G. R., Gomes, J.E.G., Falcão, R.E. A., Moreira, K. A., Porto A.L. F., Silva, T.M. S. (2014). Quantification, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Phenolics Isolated from Different Extracts of *Capsicum frutescens* (Pimenta Malagueta). *Molecules*, 19 : 5434-5447.

217. Nishino, H., Tokuda, H., Murakoshi, M., Satomi, Y., Masuda, M., Onozuka, M., Yamaguchi, S., Takayasu, J., Tsuruta, J., Okuda, M. (2000). Cancer prevention by natural carotenoids. *Biofactors (Oxford, England)*, 13: 89–94.

218. Nitiema, L.W., Savadogo, A., Simpoire, J., Dianou, D., Traore, A.S. (2012). In vitro antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. *Intl. J. Microbiol. Res.*, 3(3): 183-187.

219. Nkhili, E. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de l'Université Cadi Ayyad, Mrrakach.

220. Neue, U.D., O'Gara, J.E., M'endez, A. (2006). Selectivity in reversed-phase separations Influence of the stationary phase. *J Chromatogra A*, 1127:161–174.

-O-

221 . Ochi, T., Takaishi, Y., Kogure, K., Yamauti, I. (2003). Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annum*. *J Nat Prod*, 66:1094–1096.

222. Oh, S.H., Kim, Y.S., Lim, S.C., Hou, Y.F., Chang, I.Y., You, H.J. (2008). Dihydrocapsaicin (DHC), a saturated structural analog of capsaicin, induces autophagy in human cancer cells in a catalase-regulated manner. *Autophagy*, 4: 1009–1019.

223. Oliver, J., Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J. Chromatogr. A* 2000, 881, 543 – 555.

224. Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, J.M., Gómez, E., Fernández, P. (2002). The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol. Pharmacol.*, 61:294–302.

225. Ornelas-Paz, J.J., Martínez-Burrola, J.M., Ruiz-Cruz, S., Santana-Rodríguez, V., Ibarra-Junquera, V., Olivás, G.I. and Pérez-Martínez, J.D. (2010). Effect of cooking on the capsaicinoids and phenolics contents of Mexican peppers. *Food Chem*, 119: 1619–1625.

-P-

226. Pan, H.C, Jiang, Q., Yu, Y., Mei, J.P., Cui, Y.K., Zhao, W.J. (2015). Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. *Neurochem Int*, 80:60–71.

227. Pavan, B., Capuzzo, A., Forlani, G. (2015). Quercetin and quercetin-3-O-glucoside interact with different components of the cAMP signaling cascade in human retinal pigment epithelial cells. *Life. Sci*, 121: 166–173.
228. Pegon, J. (2009). Des piments à la capsaïcine : quels impacts sur la santé ? Thèse doctorat à l'université Strasbourg. France.
229. Penchev, P.I. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de l'Université de Toulouse.
230. Peng, J., Li, Y.J. (2010). The vanilloid receptor TRPV1: role in cardiovascular and gastrointestinal protection. *Eur. J. Pharmacol.* 627: 1–7.
231. Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Andriantsitohaina, R. (2006). Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radical Res*, 40: 1054–65.
232. 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.
233. Petigny, L., Périno, S., Minuti, M., Visinoni, F., Wajsman, J., Chemat, F. (2014). Simultaneous Microwave Extraction and Separation of Volatile and Non-Volatile Organic Compounds of Boldo Leaves. From Lab to Industrial Scale. *Int. J. Mol. Sci*, 15: 7183-7198.
234. Peusch, M., Seitz, E.M., Petz, M., Muller, A., Anklam, E. (1997). Extraction of capsaicinoids from chilies (*Capsicum frutescens L.*) and paprika (*Capsicum annum L.*) using supercritical fluids and organic solvents. *Eur. Food Res. Technol.* 204: 351–355.
235. Pistelli, L., Giorgi, I. (2012). Antimicrobial properties of flavonoids. In: Patra AK, editor. Dietary phytochemicals and microbes. Berlin: Springer, 33–91.
236. Plaza, L., Sanchez-Moreno, C., De Ancos, B., Elez-Martinez, P., Martin-Belloso, O., Cano, M.P. (2011). Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization, *LWT – Food Sci. Technol.*, 44:834–839.
237. Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Rev. génie ind*, 4 : 25-39.
238. Pramanik, K.C., Boreddy, S.R., Srivastava, S.K. (2011). Role of Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes in Capsaicin Mediated Oxidative Stress Leading to Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One*, 6, 20151.
239. Prasad, B.C.N., Bhaskar, H., Kumar, V., Giridhar, P., Parimalan, R., Sharma, A., Ashwathanarayana, G. (2006). Influence of 8-Methyl-nonenic Acid on capsaicin biosynthesis in in vivo and in-vitro cell cultures of *Capsicum* spp. *J. Agric. Food Chem*, 54: 1854–1859.
240. Prasad, V.G.N.V., krishna,B.V., Swamy, P.L., Rao, T.S., Rao, G.S. (2014). Antibacterial synergy between quercetin and polyphenolic acids against bacterial pathogens of fish. *Asian Pac J Trop Dis*; 4(1): 326-329.
241. Pratheeshkumar, P., Budhraj, A., Son, Y.O., Wang, X., Zhang, Z., Ding, S., Wang, L., Hitron, A., Lee, J.C., Xu, M., Chen, G., Luo, J., Shi, X. (2012). Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR-2 regulated AKT/ mTOR/ P70S6K signaling pathways. *PLoS ONE*, 7: 47516.

-Q-

242. Qiao, S., Li, W., Tsubouchi, R., Haneda, M., Murakami, K., Yoshino, M. (2005). Involvement of peroxynitrite in capsaicin-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Neurosci. Res*, 51:175–183.
243. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységou, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Edit*, 50: 586–621.

-R-

244. Ramesh, E., Alshatwi, A.A. (2013). Naringin induces death receptor and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (SiHa) cells. *Food Chem Toxicol*, 51: 97–105.
245. Ramos, A. A., Lima, C. F., Pereira, M. L., Fernandes-Ferreira, M. and Pereira-Wilson, C. (2008). Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. *Toxicol Lett*, 177: 66-73.
246. Ramos-Nino, M.E., Clifford, M.N., Adams, M.R. (1996). Quantitative structure activity relationship for the effect of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 80 : 303–310.
247. Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kuyala, T., Pihlaya, K., Vuorela, H., Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbio.*, 56: 3-12.
248. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free. Radic. Biol. Med.*, 20: 933-956.
249. Reyes-Escogido, M.L., Gonzalez-Mondragon, E.G., Ricarda, E., Saulea, E., Barnetcheb, T., Trevesa, R., Vergne-Sallea, P., Bertina, P. (2013). Efficacité de la capsaïcine dans le traitement des douleurs neuropathiques : méta-analyse des essais randomisés contrôlés. *Douleurs Évaluation - Diagnostic – Traitement*, 14:286- 291.
250. Reyes-Escogido, M.L., Gonzalez-Mondragon, E.G., Vazquez-Tzompantzi E. (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*, 16:1253-1270.
251. Reynaud, E. (2009). Synthèse organique d'apo-lycopénoïdes : étude des propriétés antioxydantes et complexantes. Thèse de l' Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
252. Rezaire, A. (2012). Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de l'Université des Antilles et de la Guyane.
253. Ricard, E., Saule, E., Barnetche, T., Treves, R., Vergne-Salle, P., Bertin, P. (2013). Efficacy of capsaicin in neuropathic pain: meta-analysis of randomized trials. *Douleurs*, 14(6): 286-291.
254. Robards, K., Antolovich, M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids—a review. *Analyst*, 122 : 11R–34R.
255. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucke, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 66: 401–436.
256. Rock, C. L. (2009). Carotenoids and cancer. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG.
257. Rodriguez-Amaya, D.B. (1999). A guide to carotenoid analysis in foods. *ILSI Press, Washington, D.C.*, 64 pages.
258. Rodriguez-Amaya, D.B., Benjamin, C. (2003). CAROTENOIDS: Occurrence, Properties, and Determination. Chapitre du livre : Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, pages 927-936. *Academic Press, Oxford*.
259. Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de Las Rivas, B., de Felipe, F.L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol*, 132 (2–3), 79–90.
260. Rodriguez Vaquero, M.J., Aredes Fernandez, P.A., Manca de Nadra, M.C., Strasser de Saad, A.M. (2010). Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *J Agric Food Chem*, 58:6048-6052.
261. Rodríguez Vaquero, M.J., Manca de Nadra, M.C. (2008). Growth parameter and viability modifications of *Escherichia coli* by phenolic compounds and Argentine wine extracts, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151:342–352.

262. Rokkaku, T., Kimura, R., Ishikawa, C., Yasumoto, T., Senba, M., Kanaya, F., Mori, N. (2013). Anticancer effects of marine carotenoids, fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on osteosarcoma. *Int. J. Oncol*, 43:1176–1186.
263. Romero-Castillo, R.A., Roy Choudhury, S., León-Félix, J., Pandey, S. (2015). Characterization of the heterotrimeric G-protein family and its transmembrane regulator from capsicum (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci*, 234:97-109.
264. Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A*, 1012(2):119-28.
265. Rozes, N., Peres, C. (1998). Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 49, 108–111.
266. Ruiz-Lau, N., Medina-Lara, F., Minero-Garcia, Y., Zamudio-Moreno, E., Guzman- Antonio, A., Echevarria-Machado, I., Martínez-Estevéz, M. (2011). Water deficit affects the accumulation of capsaicinoids in fruits of capsicum chinense Jacq. *Hortscience*, 46(3):487–492.

-S-

267. Saha, S., Walia, S., Kundu, A., Pathak, N. (2013). Effect of mobile phase on resolution of the isomers and homologues of tocopherols on a triacontyl stationary phase. *Anal Bioanal Chem*, 405:9285–9295.
268. Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y., Fujisawa, S. (2005). Molecular requirements of lignin–carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*, 66: 2108 - 2120.
269. Sami, A.J., Shakoori, A.R. (2007). Extracts of plant leaves have inhibitory effects on the cellulose activity of whole body extracts of insects – a possible recipe for bioinsecticides. *Proc Pakistan Cong Zool*, 27:105–18.
270. Sánchez, A.M., Malagarie-Cazenave, S., Olea, N., Vara, D., Chiloeches, A., Díaz-Laviada, I. (2007). Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation. *Apoptosis*, 12: 2013-2024.
271. Sanchez-Maldonado, A.F., Schieber, A., Ganzle, M.G. (2011). Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *J. App. Microbiol.*, 1364-5072.
272. Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food. Sci. Tech. Int*, 8 (3): 121-137.
273. Sander, L. C., Sharpless, K. E., Craft, N. E., Wise, S. A. (1994). Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Anal. Chem.*, 66, 1667 – 1674.
274. Sander, L. C., Sharpless, K. E., Pursch, M. (2000). C30 Stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 880:189 – 202.
275. Santamaria, R. I., Reyes-Duarte, M. D., Barzana, E., Fernando, D., Gama, Moto, M. and Lopez-Munguim, A. (2000). Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annuum* L.) using ethanol as solvent. *J. Agric. Food Chem*, 48: 3063- 3067.
276. Santas, J., Almajano, M.P., Carbó, R. (2010). Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 45: 403–409.
277. Sato, M., Fujiwara, S., Tsuchiya, H., Fujii, T., Iinuma, M., Tosa, H., Ohkawa, Y. (1996). Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J. Ethnopharmacol*. 54: 171–176.
278. Simirgiotis M.J., Schmeda-Hirschmann G. (2010). Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1217:443–449.

279. Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J.Nutri*, 130: 2073- 2085.
280. 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.
281. Shibutani, S., Samejima, M., Doi, S. (2004). Effects of stilbenes from bark of *Picea glehnii* (Sieb. et Zucc) and their related compounds against feeding behaviour of *Reticulitermes speratus* (Kolbe). *J. Wood Sci*, 50: 439–444.
282. Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M., Di Bilio, A.J., Bonomo, R.P. (1991). In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂-dot. *Free Radic. Biol. Med.* 11: 1–8.
283. Simirgiotis, M.J., Schmeda-Hirschmann, G. (2010). Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217, 443–449.
284. Simonovska, B., Vovk, I., Glavnik, V., Cernelica, K. (2013). Effects of extraction and high-performance liquid chromatographic conditions on the determination of lutein in spinach. *J. Chromatogra A*, 1276: 95– 101.
285. Snyman, T., Stewart, M.J, Steenkamp, V. (2001). A fatal case of pepper poisoning. *Forensic Sci Int*, 124, 43-46.
286. Siracusa, L., Saija, A., Cristani, M., Cimino, F., D'Arrigo, M., Trombetta, D., Rao, F., Ruberto, G. (2011). Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves — Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*, 82: 546–556.
287. Skrzypski M., Sassek M., Abdelmessih S., Mergler S., Grötzing C., Metzke D., Wojciechowicz T., Nowak K.W., Strowski M.Z. (2014). Capsaicin induces cytotoxicity in pancreatic neuroendocrine tumor cells via mitochondrial action. *Cellular Signalling*, 26 41–48.
- 288 . Smith, A. H., Zoetendal, E., Mackie, R. I. (2005). Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microb Ecol*, 50: 197–205.
289. Smith-Warner, S.A., Giovannucci, E. (1999). Fruit and vegetable intake and cancer. In: HEBER D, BLACKBURN GL, GO VLW, editors. *Nutritional Oncology*. San Diego: Academic Press, p. 153–93.
290. Snyder, L.R. (1974). Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chromatogr.* 92: 223.
291. Souleymane, F. (2011). Etude des effets antiradicalaires et antilipoxygénase des extraits d'Erythrina Senegalensis DC (Fabaceae). Thèse de l'Université de Ouagadougou.
292. Stahl, W., Sies, H. (1996). Perspective in biochemistry and biophysics. Lycopene : a biologically important carotenoïd for human ? *Arch Biochem Biophys*, 336 : 1-9.
293. Stahl, W., Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*, 24(6): 345-351.
294. Stevanovic, T., Perrin, D. (2009). Chimie du bois. Nancy, 241 p: Presses polytechniques et universitaires romandes.
295. Stewart ,C. Jr., Kang, B.C., Liu, K., Mazourek ,M., Moore, S.L., Yoo, E.Y., Kim, B.D., Paran ,J., Jahn, M. (2005). The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant J*, 42: 675-688.
296. Stoclet, J.C., Schini-Kerth, V.B. (2011). Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, Elsevier Masson, 69 :78-90.
297. Sugawara, T., Ganesan, P., Li, Z., Manabe, Y., Hirata, T. (2014). Siphonaxanthin, a green algal carotenoid, as a novel functional compound. *Mar. Drugs*, 12:3660–3668.
298. Sung, Y., Chang, Y. Y., Ting, N. L. (2005). Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Bot Bull Acad Sinica*, 46(1): 35–42.
299. Surh, Y.J. (2002). More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *J. Natl Cancer Inst.* 94:1263–1265.

300. Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lopes Lutz, D., Schieber, A. and Ganzle, M.G. (2010). Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *J. Agric. Food. Chem.*, 58: 9214–9220.

301. Sy, C. (2011). Nouveaux caroténoïdes issus de bactéries marines : étude de leur stabilité, de leur pouvoir antioxydant et de leur biodisponibilité à l'aide de modèles chimiques et biologiques. Comparaison avec les propriétés fonctionnelles de caroténoïdes de référence. Thèse de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse.

-T-

302. Tabaczar, S., Domeradka, K., Czepas, J., Piasecka-Zelga, J., Stetkiewicz, J., Gwozdziński, K., Koceva-Chyla, A. (2014). Anti-tumor potential of nitroxyl derivative Pirolin in the DMBA-induced rat mammary carcinoma model: A comparison with quercétine. *PHAREP*, 256: 1–8.

303. Talcott, S.T., Howard, L.R. (1999). Chemical and sensory quality of processed carrot puree as influenced by stress-induced phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47(4):1362-6.

304. Takagaki A., Nanjo F. (2010). Metabolism of (-)-epigallocatechin gallate by rat 8 intestinal flora. *J. Agric. Food. Chem.*, 58(2): 1313-1321.

305. Tanaka, T., Shnimizu, M., Moriwaki, H. (2012). Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*, 17, 3202–3242.

306. Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.*, 54: 733–749.

307. Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K.D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother.*, 58: 100-110.

308. Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O., Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3133-3141.

309. Telfer, A., A. Pascal, Gall, A. (2008). Carotenoids in photosynthesis. *Carotenoids*, 4, 2008, pp 265-308.

310. Teow, C.C., Truong, V., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Pecota, K.V., Yencho, G.C. (2007). Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chem.*, 103 : 829-838.

311. Teresa Fera, M., Carbone, M., De Sarro, A., Blandino, G., Riggio, G., Cusumano, V., Battista De Sarro, G., Anzani Ciliberti, F. (1998). Bactericidal activity of lansoprazole and three macrolides against *Helicobacter pylori* strains tested by the time-kill kinetic method. *Int. J. Antimi. Ag.*, 10: 285–289.

312. Teuscher, E., Anton, R., Lobstein, A. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles.

313. Tewksbury, J.J., Levey, D.J., Huizinga, M., Haak, D., Travaset, A. (2008a). Costs and benefits of capsaicin-mediated control of gut retention in dispersers of wild chilies. *Ecology*, 89:107–117.

314. Tewksbury, J.J., Manchego, C., Haak, D.C., Levey, D.J. (2006). Where did the chili get its spice? Biogeography of capsaicinoid production in ancestral wild chili species. *Chem. Ecol.*, 32(3):547-64.

315. Thaler, S., Hähnel, P.S., Schad, A., Dammann, R., Schuler, M. (2009). RASSF1A mediates p21Cip1/Waf1-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of Akt. *Cancer Res.*, 69 :1748–1757.

316. Thangavel, P., Vaiyapuri, M. (2013). Antiproliferative and apoptotic effects of naringin on diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats. *Biomed. Aging. Path.*, 3:59–64.

317. Thoenissen, N.H., O'Kelly, J., Lu, D., Iwanski, G.B., La, D.T., Abbassi, S., Leiter, A., Karlan, B., Mehta, R., Koeffler, H.P. (2010). Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and -negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. *Oncogene*, 29: 285–296.

318. Todd, P., Bensinger, M., and Biftu, T. (1977). Determination of Pungency due to Capsicum by Gas-Liquid Chromatography. *J Food Sci*, 42: 660-665.

319. Tripoli, E., Guardia, M.L., Giammanco, S., Majo, D.D., Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review, *Food Chem.* 104: 466–479.

320. Tsou, M.F., Lu, H.F., Chen, S.C., Wu, L.T., Chen, Y.S., Kuo, H.M., Lin, S.S., Chung, J.G. (2006). Involvement of Bax, Bcl-2, Ca²⁺ and caspase-3 in capsaicin-induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells. *Anticancer Res*, 26: 1965–1971.

321. Turfkruyer, M. (2014). Impact de la vitamine A du lait maternel sur le développement de la tolérance orale chez le nouveau-né et la prévention des maladies allergiques Thèse de l'Université de Nice Sophia-Antipolis.

322. Tuoya, Baba, N., Shimoishi, Y., Murata, Y., Tada, M., Koseki, M., Takahata, K. (2006). Apoptosis induction by dohevanil, a DHA substitutive analog of capsaicin, in MCF-7 cells. *Life Sci*, 78: 515– 519.

323. Tzounis, X., Rodriguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G.R., Kwik-Urbe, C., Spencer, J.P.E. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am J Clin Nutr*, 93: 62–72.

-V-

324. Vallverdu-Queralt, A., Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Lamuela-Raventos, R.M., Martin-Belloso, O., Elez-Martinez, P. (2013). Metabolite profiling of phenolic and carotenoid contents in tomatoes after moderate-intensity pulsed electric field treatments. *Food Chem.*, 136:199–205.

325. Van Beek, S., Priest, F.G. (2000). Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*, 66, 5322–5328.

326. Van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., Somoza, V., Knorr, D., Jasti, P. R., Eisenbrand, G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing, *Mol. Nutr. Food Res*, 54:1215–1247.

327. Vattem, D.A., Lin, Y.T., Ghaedian, R., Shetty, K. (2005). Cranberry synergies for dietary management of Helicobacter pylori infections. *Process. Biochem.* 40: 1583-1592.

328. Vauzour, D. (2014). Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *J Sci Food Agric*, 94(6), 1042-56.

329. Vinas, P., Bravo-Bravo, M., Lopez-Garcia, I., Hernandez-Cordoba, M. (2013). Quantification of b-carotene, retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate in enriched fruit juices using dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1275: 1–8.

330. Visioli, F., Bellomo, G., Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 247, 60-64.

331. Viveros, A., Chamorro, S., Pizarro, M., Arija, I., Centeno, C., Brenes A. (2011). Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poult. Sci.* 90, 566-578.

-W-

332. 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.
333. Wang, J., Peng, Z., Zhou, S., Zhang, J., Zhang, S., Zhou, X., Zhang, X., Peng, B. (2011). A Study of Pungency of Capsaicinoid as Affected by Their Molecular Structure Alteration. *Pharmacol. Pharm*, 2, 109–115.
334. Wattel, A., Kamel, S., Prouillet, C., Petit, J.P., Lorget, F., Offord, E., Brazier, M. (2004). Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via a mechanism involving NF-kappaB and AP-. *J. Cell. Biochem*, 92 (2004), pp. 285–295
335. Weiss, E. A. (2002). Spice Crops, CABI Publishing International, New York, pp. 411.
336. Wen, D., Chenchen, L., Hao, D., Yiping, L., Liu, H. (2005). A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines. *J. Agric. Food Chem*, 53: 6624-6629.
337. Wenk, S.O., Schneider, D., Boronowsky, U., Jäger, C., Klughammer, C., de Weerd, F.L., van Roon, H., Vermaas, W.F., Dekker, J.P., Rögner, M. (2005). Functional implications of pigments bound to cyanobacterial cytochrome b6f complex. *FEBS J*, 272(2): 582-592.
338. Westerterp-Plantenga, M.S., Smeets, A., Lejeune, M.P.G. (2005). Sensory and gastrointestinal satiety effects of capsaicin on food intake. *Int J Obes (Lond)* : 29 :682-8.
339. Woodall, A.A., Lee, S.W.M., Weesie, R.J., Jackson, M.J., Britton, G. (1997). Oxidation of carotenoids by free radicals : relationships between structure and reactivity. *Biochim Biophys Acta*, 1336 : 33-42.
340. Wu, C.C., Lin, J.P., Yang, J.S., Chou, S.T., Chen, S.C., Lin, Y.T., Lin, H.L., Chung, J.G. (2006). Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca²⁺ productions and caspase-3 activation. *Mutat. Res*, 601:71–82.
341. Wu,T., He,M., Zang,X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan,S., Xu, X. (2013). A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E.coli* by membrane interaction effect. *Bioch Biophys Acta Biomembr*, 1828 (11), 2751–2756.

-X-

342. Xiao, Z., Lester, G.E., Luo, Y., Wang, Q. (2012). Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: edible microgreens, *J. Agric. Food. Chem.*, 60:7644–7651.
343. Xu, H.X. , Lee, S.F. (2001). Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytoh Res*, 15, 39–43.
344. Xu, W., Liu, J., Li, C., Wu, H.Z., Liu, Y.W. (2008). Kaempferol-7-O-beta-D-glucoside (KG) isolated from *Smilax china* L. rhizome induces G2/M phase arrest and apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner. *Cancer. Lett.*, 264: 229-240.

-Y-

345. Yamaguchi, M., Weitzmann, M.N. (2011). Quercetin, a potent suppressor of NF-κB and Smad activation in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med*, 28: 521–525.
346. Yang, Z.H., Wang, X.H., Wang, H.P., Hu, L.Q., Zheng, X.M., Li, S.W. (2010). Capsaicin mediates cell death in bladder cancer T24 cells through reactive oxygen species production and mitochondrial depolarization. *Urology*, 75: 735–741.

347. Yao, R.Q., Qi, D.S., Yu, H.L., Liu, J., Yang, L.H., Wu, X.X. (2012). Quercetin attenuates cell apoptosis in focal cerebral ischemia rat brain via activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway. *Neurochem. Res*, 37: 2777–2786.

348. Yeum, K.J., Russell, R.M. (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual review of nutrition*, 22: 483-504.

-Z-

349. Zachariah, T.J., Gobinath, P. (2008). Paprika and chilli. In: “Chemistry of Spices” (V.A. Parthasarathy, B. Chempakam and T. J. Zachariah, eds), 260-286. CAB International, Wallingford, UK.

350. Zanfani, A., Corbini, G., La Rosa, C., Dreassi, E. (2010). Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and α -tocopherol in synthetic mixtures. *LWT – Food Sci. Technol*, 43: 67–72.

351. Zhang, R., Humphreys, I., Sahu, R.P., Shi, Y., Srivastava, S.K. (2008). In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis*, 13, 1465–1478.

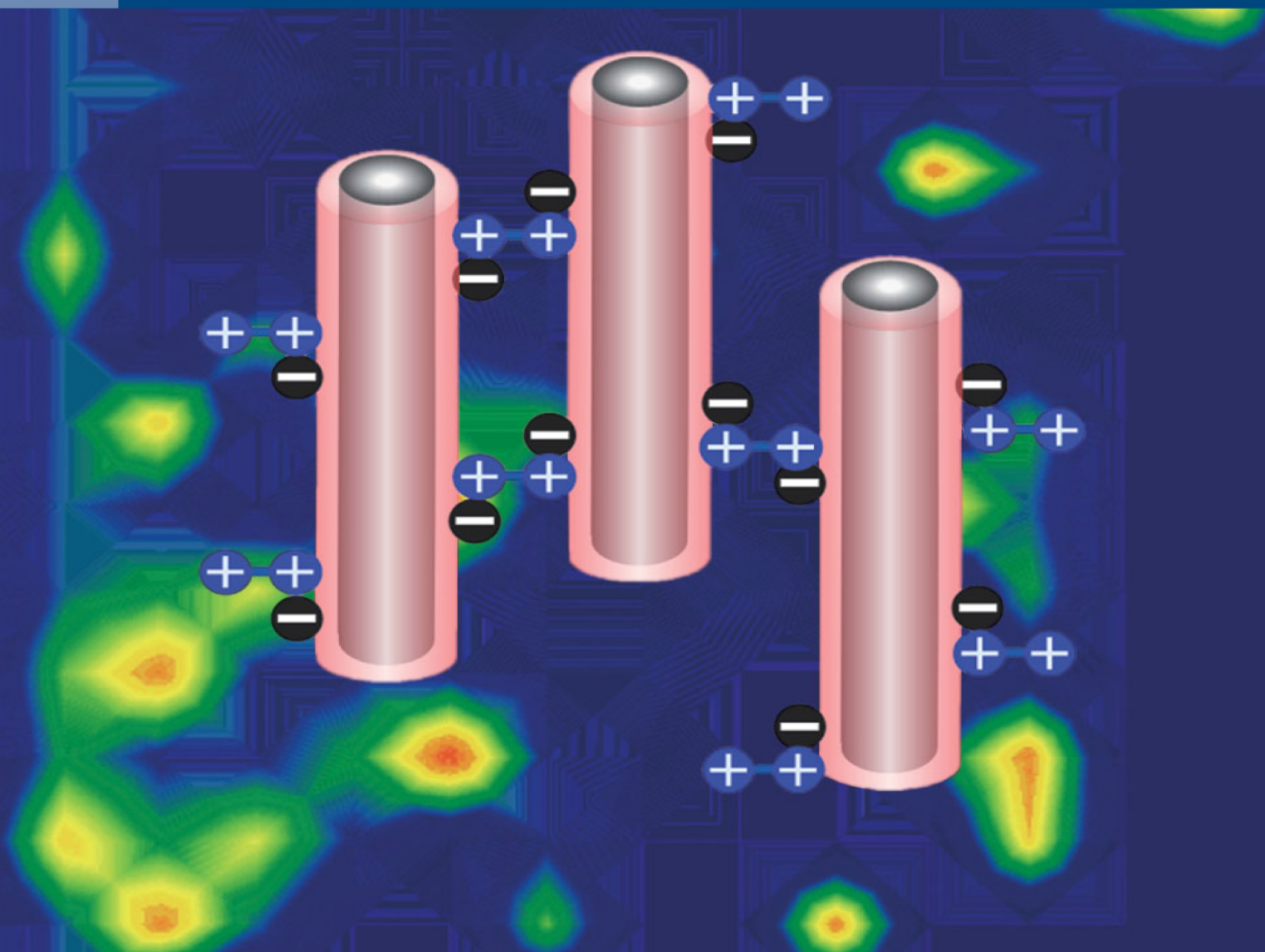
352. Zimmer, A.R., Leonardi, B., Miron, D., Schapoval, E., Oliveira, J.R., Gosmann, G. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *J Ethnopharmacol*, 139 (1): 228-233.

353. Zis, P., Apsokardos, A., Isaia, C., Sykioti, P., Vadalouca, A. (2014). Posttraumatic and Postsurgical Neuropathic Pain Responsive to Treatment with Capsaicin 8% Topical Patch. *Pain Physician*, 17:213-218.

Publication

JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE

2|15



Methods
Chromatography · Electroseparation

Applications
Biomedicine · Foods · Environment

www.jss-journal.com

WILEY

Meriem Mokhtar^{1,2}
 Jan Soukup^{1,3}
 Paola Donato^{1,4,5}
 Francesco Cacciola^{5,6}
 Paola Dugo^{1,4,5}
 Ali Riazi²
 Pavel Jandera³
 Luigi Mondello^{1,4,5}

¹Dipartimento di Scienze del Farmaco e Prodotti per la Salute, University of Messina, Viale Annunziata, Messina, Italy

²Laboratory of Beneficial Microorganisms, Functional Food and Health (LMBAFS), Faculty of Natural Sciences and Life, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria

³Department of Analytical Chemistry, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic

⁴Centro Integrato di Ricerca, University Campus Bio-Medico of Rome, Roma, Italy

⁵Chromaleont s.r.l. A start-up of the University of Messina, c/o Dipartimento di Scienze del Farmaco e Prodotti per la Salute, University of Messina, Messina, Italy

⁶Dipartimento di Scienze dell'Ambiente, della Sicurezza, del Territorio, degli Alimenti e della Salute, University of Messina, Messina, Italy

Received September 12, 2014

Revised October 24, 2014

Accepted October 24, 2014

1 Introduction

In recent years, scientists have focused on studying natural products and the activities that their bioactive components can exert. Among all investigated compounds, polyphenols remain the most interesting class, because of their biological properties. Polyphenols are the most abundant bioactive compounds, reaching values of 1 g/day in the diet, approximately ten times higher than vitamin C intake [1]. These compounds

Correspondence: Professor Luigi Mondello, Dipartimento di Scienze del Farmaco e Prodotti per la Salute, University of Messina, Viale Annunziata, 98168 Messina, Italy

E-mail: lmondello@unime.it

Fax: +39-090-358220

Abbreviations: **ABTS**, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazine-6-sulfonic acid); **DPPH**, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; **FRAP**, ferric reducing antioxidant power; **GAE**, gallic acid equivalent; **MIC**, minimum inhibitory concentration; **PBMC**, peripheral blood mononuclear cell; **TEAC**, trolox equivalent antioxidant capacity; **TPTZ**, 2,4,6-tripirydyl-s-triazine; **Trolox**, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

Research Article

Determination of the polyphenolic content of a *Capsicum annuum* L. extract by liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection and evaluation of its biological activity

The present study was aimed to investigate the polyphenolic profile of a pepper (*Capsicum annuum* L.) extract from Algeria and evaluate its biological activity. The total polyphenol content of the extract was determined as 1.373 mg of gallic acid equivalents (± 0.0046), whereas the flavonoids were determined as 0.098 mg of quercetin (± 0.0015). The determination of the complete polyphenolic profile of the extract was achieved by liquid chromatography with an RP-amide column in combination with photodiode array and mass spectrometry detection through an electrospray ionization interface. A total of 18 compounds were identified, of which five were reported for the first time in the sample tested. Quercetin rhamnoside was the most abundant compound (82.6 $\mu\text{g/g}$ of fresh pepper) followed by quercetin glucoside (19.86 $\mu\text{g/g}$). The antioxidant activity and antimicrobial effects were also determined. For the antimicrobial tests assessed against Gram-positive and Gram-negative bacteria, kaempferol showed the strongest inhibitory effect followed by quercetin and caffeic acids. In the study of the cytotoxicity of the extract, the cancer cells (U937) were more affected than the normal cells (peripheral blood mononucleated cells), with more than 62% inhibition at the highest concentration.

Keywords: Antimicrobial activity / Antioxidant activity / *Capsicum annuum* L. / Liquid chromatography / Polyphenols
 DOI 10.1002/jssc.201400993

exhibit a wide range of beneficial properties, such as antiallergic, antiatherogenic, anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, antithrombotic, cardioprotective, and vasodilatory effects [2]. A high polyphenol intake has allegedly been associated with decreased risk of cancer, cardiovascular diseases, and neurodegenerative disorders [3].

Polyphenols are a large heterogeneous group of secondary metabolites, widely distributed in plant foods, such as fruits and vegetables, as well as cereals, legumes, tea, coffee, and chocolate [4]. Polyphenol quantity and quality in plant foods can vary significantly according to different intrinsic and extrinsic factors, such as plant genetics and cultivar, soil composition, growing conditions, and state of ripeness, among others [5].

The genus *Capsicum*, which originates from tropical and humid zones of Central and Southern America, belongs to the Solanaceae family and includes peppers of important economic value [6]. Hot pepper is a well-known spice and finds widespread use both either dried, or fresh, in cookery to enrich foods with its unique flavor. Moreover, it has a long history as a source of healthy and biologically active compounds, such as flavonoids, phenols, carotenoids, capsaicinoids, and

vitamins [7]. *Capsicum annuum* is the most widespread and widely cultivated species in subtropical and temperate countries [8].

So far, several studies carried out on *Capsicum* have focused on the analysis of capsaicinoids, which are responsible of the pungency of pepper, but some studies investigating the polyphenolic profile of peppers have been reported as well [9–16].

This research was conducted in two steps: (i) to achieve a thorough characterization of flavonoids and other phenolic components extracted from *C. annuum* by LC in combination with photodiode array (PDA) and ESI-MS detection; (ii) correlate the polyphenolic content with important biological properties, namely antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazine-6-sulfonic acid) (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), ferric chloride hexahydrate, Folin–Ciocalteu phenol reagent, coumarin, gallic acid, vanillin, caffeic acid, daphnetine, kaempferol, rutin, luteolin, quercetin, along with LC-MS-grade water, methanol, acetonitrile, and reagent grade ethylacetate and dimethylsulfoxide were purchased from Sigma-Aldrich (Milan, Italy). Acetic acid (99%) was purchased from Riedel-de Haen (Seelze, Germany). Trypan blue 0.4% was purchased from McLean (Virginia, USA). L-Glutamine was provided by Euro-Clone, (Pero, Milan, Italy) while Penicillin/Streptomycin and bovine fetal serum were purchased from Gibco for life technologies (Grand Island, USA).

2.2. Plant material and extraction procedure

Capsicum annuum L. var. Biskra was purchased in an Algerian market (Mostaganem, Algeria). Peppers were washed under running tap water and blotted with a paper towel, then the pericarp was homogenized.

The extraction was conducted according to the method of Arnnok et al. [17] with some modifications. Two grams of the sample was extracted with 0.05% v/v hydrochloric acid/solvent (10:90) under sonication for 30 min. Three extractions were made using methanol, ethyl acetate, or both. The homogenates were then filtered through 0.45 μm membrane filters (Whatman, Clifton, USA) and evaporated to dryness under vacuum at a temperature of 40°C. The whole procedure was carried out in darkness and repeated in triplicate. Recovery of polyphenolic compounds from the pepper sample was calculated after addition of a known amount (60 ppm) of daphnetine. Recovery was calculated as the mean of three replicates.

2.3 Phytochemical investigations

2.3.1 Determination of total phenols (TP) and total flavonoids

The amount of TPs was determined by the Folin–Ciocalteu reagent based on the method of Gutfinger [18]. The content was expressed as milligram of gallic acid equivalents (GAE)/g of extract.

The total flavonoid content was determined using the Dowd method, as adapted by Arvouet-Grand et al. [19]. The content was expressed as milligram of quercetin equivalents/g of extract.

2.3.2 Identification of phenolic compounds by LC–PDA–ESI-MS analysis

LC–PDA–ESI-MS analyses of the polyphenolic compounds were performed on a Prominence LC system in combination with a quadrupolar mass analyzer earlier described [20]. Data acquisition was performed by Shimadzu Lab Solution software ver. 5.10.153.

Ascentis Express C₁₈ and RP-Amide columns, both 15 cm \times 4.6 mm id packed with 2.7 μm partially porous particles (Supelco, Bellefonte, PA, USA) were employed for the separations. Different mobile phases composed of hydro-organic solvents, namely methanol and acetonitrile, and gradient programs were investigated aiming to provide complete resolution of all the components within a reasonable analysis time.

The optimized mobile phase consisted of water/acetic acid (0.075%) at pH 3 (solvent A) and methanol/acetic acid (0.075%; solvent B), in a linear gradient mode: 0 min, 2% B; 5 min, 2% B; 60 min, 50% B; 70 min, 50% B; 71 min, 2% B. The mobile phase flow rate was 1.0 mL/min, and it was split to 0.35 mL/min before MS detection, while the injection volume was 5 μL .

PDA wavelength range was 190–400 nm and the chromatograms were extracted at 280 nm (time constant: 0.025 s; sample frequency: 40 Hz). MS acquisition was performed using an ESI interface, in the negative ion mode, under the following conditions: mass spectral range 100–800 m/z ; interval: 0.5 s; scan speed: 1500 amu/s; nebulizing gas (N₂) flow: 1.5 L/min; interface temperature: 350°C, heat block: 300°C; desolvation line temperature: 300°C; DL voltage: –34 V; interface voltage: –4.5 kV; Qarray DC voltage: 1.0 V; Qarray radio frequency voltage: 60 V.

The quantitative determination of each compound was carried out by the external standard method, using the standards listed in Section 2.1 in a concentration range of 1–100 ppm. The results were obtained from the average of three determinations and are expressed as milligram per gram dried extract \pm %RSD.

2.4 Antioxidant activity measurement: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The free radical scavenging activity of *C. annuum* was tested as bleaching of the stable radical DPPH. The DPPH assay was carried out according to the method of Siracusa et al. [21]. Concentrations were reported as millimoles TE/g (TE, equivalent trolox; g, gram of the extract).

In the TEAC assay, the antioxidant activity was determined according to the capacity of a compound to scavenge the stable ABTS radical, compared to the activity of the standard trolox. The TEAC of the antioxidant was calculated by relating this decrease in absorbance to that of a trolox solution, on a molar basis [22]. The FRAP assay was done according to Benzie and Strain [23].

2.5 Antimicrobial activity

2.5.1 Microbial strains

Listeria monocytogenes ATCC 1392, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Klebsiella pneumoniae* (wild type) were obtained from the University of Messina in-house culture collection (Italy). *Staphylococcus aureus* ATCC 49444 and the beneficial bacteria *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 were obtained from the University of Mostaganem (Algeria).

2.5.2 Antimicrobial screening and determination of minimum inhibitory concentration

The agar disc diffusion method was employed for the determination of the antimicrobial activity of the polyphenol extract, as well as selected polyphenol standards identified in pepper, namely, caffeic acid, coumarin, quercetin, kaempferol, rutin, and naringin prepared as described in Section 2.3.2.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the tested samples was determined by the broth microdilution method, previously reported [24]. MIC was defined as the lowest concentration at which no bacterial growth was observed after incubation.

2.6 Cytotoxicity

2.6.1 Cells

Human histiocytic U937 and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco-BRL, Life Technologies Italia, Milan, Italy) containing 10% fetal calf serum, 1% v/v of L-glutamine, and 1% v/v of both penicillin and streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

2.6.2 Evaluation of cell death

U937 and PBMC cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum 72 h before the addition of different concentrations of pepper polyphenols (0, 25, 50, 100, 200, 500, and 1000 µg/mL). After 24 h of incubation, a Trypan blue dye exclusion test was performed to evaluate the viability of the cultures [25].

3 Results and discussion

3.1 Determination of TPs and total flavonoids

The TP content was estimated using the Folin–Ciocalteu colorimetric method. The phenolic substances are oxidized by Folin–Ciocalteu reagent resulting in a blue color. The aluminum chloride colorimetric method is based on the formation of stable complexes by the C-4 keto group of aluminum chloride and either the C-3 or the C-5 hydroxyl group of flavones and flavonols. In addition, aluminum chloride forms acid labile complexes with the orthodihydroxyl groups in the A- or B-ring of flavonoids [26]. The methanolic extract contained more phenols (1.199 mg of GAE/g ± 0.0082) than the ethyl acetate extract (0.276 mg of GAE/g ± 0.0033), but the combination of the two solvent allowed a more exhaustive extraction of phenols (1.373 mg of GAE/g ± 0.0046). This also applied for the determination of total flavonoids by the aluminum chloride colorimetric method, with such a solvent combination working more exhaustively for flavonoid extraction (0.098 mg of QE/g ± 0.0015). On the basis of these results, the sample extracted with this solvent combination was used for the rest of the work. The total phenolic content obtained in this study was higher than that reported by both Hallmann et al. [27] and Nazzaro et al. [28] who obtained values of 0.953 and 0.643 mg of GAE/g, respectively.

3.2 Analysis of polyphenols by HPLC–PDA–ESI–MS

Characterization of the polyphenolic content of the *C. annuum* L. was accomplished by HPLC–PDA–ESI–MS. Two columns with different RP stationary phases, namely C₁₈ and RP-amide, were tested. Optimization of the mobile phase composition was initiated by choosing a suitable organic modifier, and running a mixture of nine standard compounds. As in previous works [20, 29–33], acetonitrile-based mobile phases were first investigated; despite satisfactory results were achieved at moderate backpressure values (under a mobile phase flow rate of 1.0 mL/min, the pressure drop across the column was 135 bar at 50% B), quite long retention times were observed. On the other hand, methanol-based mobile phases resulted in higher separation efficiency and better peak symmetry for all the analytes tested, even at the cost of higher backpressure values (400 bar), due to the higher viscosity, however within the allowance of conventional

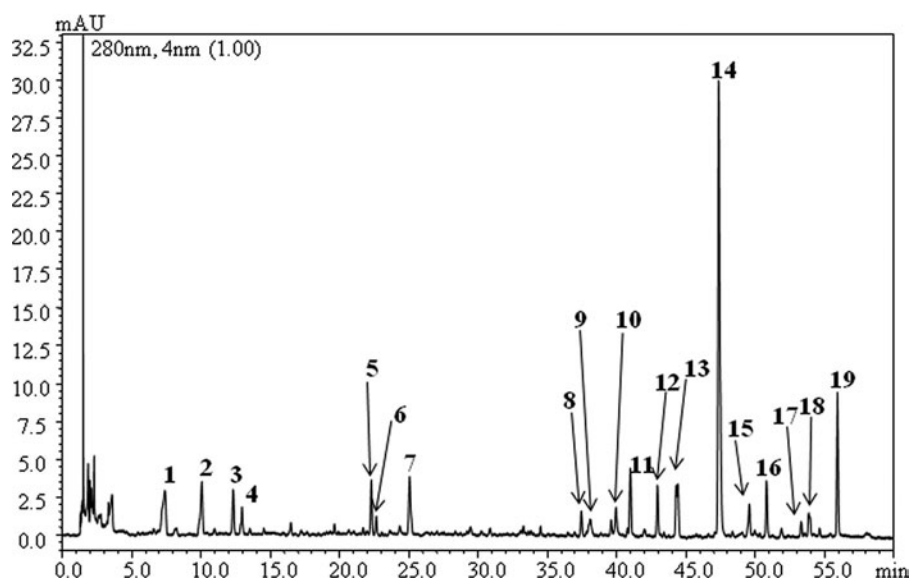


Figure 1. LC–PDA analysis of a *Capsicum annuum* L. polyphenolic extract obtained on an RP-Amide column, 15 cm × 4.6 mm, 2.7 μm particles (chromatogram extracted at 280 nm). For peak identification, see Table 1.

equipment. Afterwards, the optimization study was focused on finding an appropriate methanol/water gradient and a suitable pH value, to achieve optimal separation of the polyphenolic standard mixture in a reasonable analysis time. The use of formic and acetic acids was tested to suppress ionization of the polyphenolic acids, thus improving the chromatographic performance (e.g., peak tailing) and finding proper analytical conditions for MS ionization. In particular, the use of 0.075% acetic acid (at pH 3.6) with the LC–MS method as the aqueous portion of the mobile phase provided favorable sensitivities for most of the polyphenolic compounds in negative ionization mode [34].

From a chromatographic point of view, out of the two columns tested the RP-amide, probably due to the polar embedded RP phase, provided the highest selectivity separation for the target extract components in the shortest analysis time (roughly 56 min) at a mobile phase flow rate of 1.0 mL/min. On-line coupling to PDA (extracted at a 280 nm wavelength) and MS detection provided complementary information for reliable identification of all the separated compounds (Fig. 1). A list of the identified flavonoids is reported in Table 1. MS identification was achieved by inspection of both m/z values of the $[M-H]^-$ ions and secondary fragment ions resulting from further fragmentation (loss of the sugar moieties).

Table 1. HPLC–PDA and ESI-MS (negative and positive ionization mode) polyphenolic fingerprint of *Capsicum annuum* L.

Peak	Molecular formula	t_R (min)	$[M-H]^-$ observed	UV/Vis $_{max}$ (nm)	Compound	Quantification ^{a)}
1	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	7.3	325	264, 300	<i>p</i> -Coumaric acid derivative	6.97
2	C ₁₈ H ₁₇ NO ₅	10.2	326	264, 300	<i>p</i> -Coumaryl tyrosine	6.81
3	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	12.3	221	264, 305	<i>p</i> -Coumaroyl glycolic acid	6.47
4	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	12.9	299	270	Hydroxybenzoylhexose	3.29
5	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	22.3	329	254, 280	Vanillic acid glucoside	4.02
6	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	22.6	341	286, 338	Caffeoyl glucoside	2.59
7	C ₉ H ₆ O ₄	25.0	177	315	Daphnetine	16.29
8	C ₉ H ₆ O ₃	37.4	161	277, 315	Hydroxycoumarin	2.42
9	C ₉ H ₁₀ O ₄	38.1	181	285, 325	Hydrocaffeic acid	3.03
10	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	39.9	741, 285	365	Kaempferol diglucoside	17.17
11	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	41.0	463, 301	262, 355	Quercetin glucoside	19.86
12	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	42.9	579, 285	255, 350	Luteolin glucoside	12.73
13	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	44.4	579, 285	255, 350	Luteolin glucoside	16.49
14	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	47.3	447, 301	262, 355	Quercetin rhamnoside	82.60
15	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	49.5	461, 285	260, 350	Luteolin glucoside	5.09
16	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₈	50.8	665, 285	260, 350	Luteolin diglucoside	5.66
17	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	53.3	285	260, 350	Luteolin	0.88
18	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	53.8	447, 285	260, 350	Luteolin glucoside	1.15
19	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	55.9	301	260, 370	Quercetin	10.81

a) Milligram per gram of fresh pepper.

18 compounds were identified and out of them hydroxybenzoylhexose, vanillic acid glucoside, hydroxycoumarin, luteolin, and quercetin were reported for the first time in the sample tested. Daphnetine, a polyphenolic compound not usually present in *C. annuum* L. fruits, was employed as internal standard. Considering its very similar chemical structure, it was assumed that similar recoveries could be attained for all polyphenolic compounds contained in the sample and a value as high as 82% demonstrated the exhaustiveness of the extraction method. Quantitative determination of the polyphenolic content in the pepper extract analyzed was performed by interpolation of the coumarin ($\lambda = 305$ nm), gallic acid ($\lambda = 270$ nm), vanillin ($\lambda = 280$ nm), caffeic acid ($\lambda = 325$ nm), daphnetine ($\lambda = 315$ nm), kaempferol ($\lambda = 365$ nm), rutin ($\lambda = 355$ nm), luteolin ($\lambda = 350$ nm), and quercetin ($\lambda = 370$ nm) calibration curves and the results (ppm \pm SD) are reported in Table 1.

As reported in the literature, quercetin rhamnoside turned out to be the most abundant compound (82.6 $\mu\text{g/g}$ of fresh pepper) [9, 10, 12–16], accounting for 36% of the total polyphenolic content. Among flavonoids, the quercetin derivatives had the highest concentration (65%) in accordance with literature data [9, 10, 12, 13, 16], followed by luteolin (24%) and kaempferol derivatives (9%).

3.3 Antioxidant activity

Since different antioxidant compounds may act *in vivo* through different mechanisms of action, no single method is able to fully evaluate the antioxidant capacity of a food sample [35]. On the basis of such observation, these assays, namely DPPH, ABTS and FRAP, based on distinct mechanisms, were selected to take into account the wide variety and range of actions of the antioxidant compounds in the food sample.

Evaluation of the antioxidant activity using the ABTS⁺ radical cation and free radical DPPH is based upon the ability of an antioxidant to donate protons in a physiological or in an alcoholic medium [36]. The ABTS⁺ test gave higher value than that obtained with the DPPH test (0.069 mM TE/g \pm 0.007 and 0.052 TE/g \pm 0.008, respectively), in agreement with what observed in other works [37]. ABTS is soluble in both aqueous and organic solvents, and it reacts relatively rapidly compared to DPPH, which normally takes several hours for the reaction to be completed. In the DPPH assay, color interference may arise from anthocyanins contained in a sample, thus leading to underestimation of the antioxidant activity. In contrast, this problem does not occur with the ABTS assay, especially when the absorbance is measured at 734 nm wavelength [38].

The reducing power assay, which measures the ability of the extract components to donate electrons to Fe (III), gave as a result 0.109 mM Fe²⁺ E/g (\pm 0.002). Antioxidant properties of polyphenolic compounds are mainly ascribed to their free radical scavenging and metal chelating activities, as well as their effects on cell signaling pathways and on gene

expression [39]. Arora et al. [40] found that flavonoids display higher antioxidant capacity against metal ion induced peroxidation than peroxy radical induced peroxidation. The number of hydroxyl groups and their position on the molecule ring largely affect the antioxidant capacity of individual flavonols. Among this class of compounds, in agreement with previous findings by Majo et al. [41], the activity was enhanced with the increasing number of hydroxyl substitution at the flavonoid nucleus, while it was reduced by substitution with a methoxyl group.

3.4 Antimicrobial activity

The antimicrobial properties of certain classes of polyphenols have been assessed for several reasons. The development of novel food preservatives, due to the increasing consumer pressure on the food industry aims to avoid the use of synthetic preservatives. Further, in the pharmaceutical industry, there is an interest in natural bioactive compounds able to solve the problems of antibiotic resistant bacteria, thus continuous effort is poured into the search of natural compounds with antimicrobial activity against these resistant strains [42]. Last, it is important to emphasize that the study of the interactions between pepper polyphenols and gut microbiota with the reference to human health can exert a negative impact on intestinal bacteria and more precisely beneficial microorganisms.

The results obtained from the filter disc for the antimicrobial properties assay are shown in Table 2. The polyphenolic extract from *C. annuum* L. was active against Gram-positive bacteria, except the two beneficial bacteria *L. rhamnosus* and *B. longum*, and inactive against the Gram-negative bacteria *K. pneumoniae*. *Staphylococcus aureus* was the most sensitive strain, followed by *L. monocytogenes* and *E. hirae*, with inhibition zones of 12, 8, and 4.5 mm.

These results confirm those obtained by Nazzaro et al. who investigated the antimicrobial activity of pepper polyphenols against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, and *L. rhamnosus* [28]. The two pathogenic strains were sensitive to the pepper polyphenols, whereas the lactic acid bacteria were resistant.

The different behavior of polyphenols toward Gram-positive and Gram-negative bacteria might be attributed to the difference in their membrane structure and the associated cell wall differences. For a polyphenolic compound to function effectively as an antimicrobial agent, it should be able to function at the lipid–water interface and therefore should be partially hydrophobic [43].

Duda-Chodak studied the antimicrobial activity of some polyphenols (naringenin, naringin, hesperetin, hesperidin, quercetin, rutin, and (+)-catechin) and also noticed that both rutin and naringin were inactive [44]. On the other hand, naringenin and quercetin slowed the growth of all analyzed intestinal bacteria or even completely inhibited it.

Table 2. Inhibition zone diameter (mm) of the *Capsicum annum* L. polyphenolic extract and some selected polyphenolic standards

	Phenolic extract	Caffeic acid	Coumarin	Quercetin	Kaempferol	Rutin	Naringin
<i>Listeria monocytogenes</i>	8	12.5	10	7.25	5.75	-	-
<i>Enterococcus hirae</i>	4.5	14	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	4	-	6	5	-	-
<i>Staphylococcus Aureus</i>	12	14	9	8	6.5	-	-
<i>Lactobacillus. rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium Longum</i>	-	-	-	-	-	-	-

Table 3. MIC (mg/mL) of the *Capsicum annum* L. polyphenolic extract, quercetin, kaempferol, and caffeic acid against *Listeria monocytogenes* ATCC 1392, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Klebsiella pneumonia* (wild type), and *Staphylococcus aureus* ATCC 49444

	Polyphenolic extract	Caffeic acid	Quercetin	Kaempferol
<i>L. monocytogenes</i>	2.5	0.5	0.5	0.125
<i>E. hirae</i>	5	2	1	0.25
<i>K. pneumoniae</i>	5	2	1	1
<i>S. aureus</i>	2.5	0.125	0.0078	0.0078

There are few studies investigating the influence of polyphenols on the composition and activity of the nonpathogenic gut microbial community. In the study of Sanchez-Patan et al. (2012), the extract of wine phenolics (rich in quercetin, flavan-3-ols and anthocyanins) had no influence on the *Lactobacillus/Enterococcus* spp. and *Bifidobacterium* spp. [45]. Some phenolic acids (gallic, caffeic, and ferulic acids) were found to be more efficient against Gram-positive (*S. aureus* and *L. monocytogenes*) and Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*) than conventional antibiotics such as gentamicin and streptomycin [46].

In the sample tested in this work, caffeic acid, quercetin, and kaempferol showed the strongest activity, whereas no inhibition of the microbial growth was observed with rutin and naringin. As a consequence, these three polyphenolic compounds along with the *C. annum* L. polyphenolic extract were chosen among the standard compounds to calculate the MIC, and the results obtained are shown in Table 3. The polyphenolic extract was more efficient on *L. monocytogenes* and *S. aureus*, with a MIC of 2.5 mg/mL. Both kaempferol and quercetin had MICs in the range of 0.0078–1 mg/mL, but kaempferol had a stronger activity on *E. hirae*. The range of the caffeic acid MICs was between 0.125 and 2 mg/mL.

Although the three main mechanisms of the antibacterial activity of flavonoids may be attributable to cytoplasmic membrane damage, inhibition of nucleic acid synthesis, and inhibition of energy metabolism, new studies suggest that flavonol, flavan-3-ols, and flavolan classes damage the cytoplasmic membrane by generating hydrogen peroxide [47],

whereas flavan-3-ols and isoflavones inhibit nucleic acid synthesis through topoisomerase and/or dihydrofolate reductase inhibition [48].

3.5 Cytotoxicity

So far, a substantial number of studies in cultured cells, animal models, and human clinical trials have illustrated the protective role of dietary polyphenols against different types of cancers [49]. Significant gains have been made in understanding the molecular mechanisms underpinning the chemopreventive effects of polyphenols, and consequently, a wide range of mechanisms and gene targets have been identified for individual compounds. Various mechanistic explanations for their chemopreventive efficacy include their ability to interrupt or reverse the carcinogenesis process by acting on intracellular signaling network molecules involved in the initiation and/or promotion of cancer, or their potential to arrest or reverse the progression stage of cancer.

Epidemiological studies have consistently linked abundant consumption of fruits and vegetables to a reduction of the risk of developing several types of cancer [50]. Jeong et al. investigated the anticancer activity of polyphenol isolated from the fruits of three genotypes of matured *C. annum* L. fruits on three different cancer cells (AGS human gastric adenocarcinoma cells, A549 human lung carcinoma cells, and HeLa human cervical carcinoma cells) [12]. The major activity of one genotype, namely CLST (*C. annum* L. cv. ST4712) over the other two was inferred to much higher concentration of the quercetin derivatives as reported from *in vitro* and *in vivo* studies [51].

In this work, the effect of *Capsicum* polyphenolic extract was evaluated on U937 and PBMCs cells, treated with various concentrations of the extract and observe their viability. The results are reported in Fig. 2. According to the results, the effect of the extract was more prominent on the cancer cells U937 than the normal cells PBMCs, and it reacted in a dose-dependent manner. The effect of polyphenols was evident from the lowest concentration (25 µg/mL), and more than 62% of U937 cells were inhibited at the highest concentration.

These results might be attributed to the flavonoids and phenolic acids identified in our sample. In a study conducted

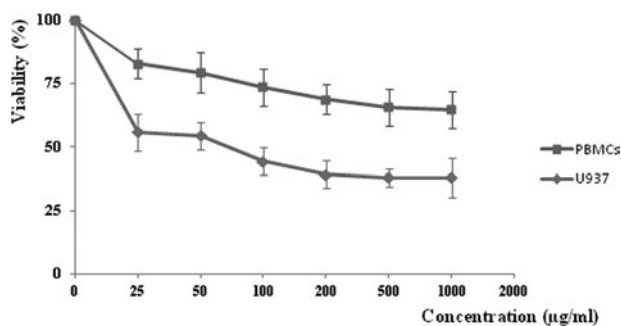


Figure 2. Cytotoxicity effects of a *Capsicum annuum* L. polyphenolic extract on tumor cell lines (U937) and PBMCs after 24 h of incubation.

by Lee et al. [52], quercetin has been shown to prevent carcinogenesis in murine models by inducing antiproliferation. According to Ramos et al. [53], quercetin and ursolic acid prevented DNA damage and had antiproliferative properties in HepG2 cells, suggesting an anticarcinogenic potential for these compounds, whereas rutin had no effect. Xu et al. reported that kaempferol-7-O- β -D-glucoside displayed marked anticancer activity on a panel of established cancer cells, of which, HeLa human cervix carcinoma cells were the most sensitive [54]. Meanwhile, the cytotoxic effects of kaempferol-7-O- β -D-glucoside on normal human cells (HEK293 embryonic kidney cells and L-02 embryonic liver cells) were much smaller than on cancer cells.

4 Concluding remarks

In the current work, a comparative study of the polyphenolic composition and some biological properties of a pepper (*C. annuum* L.) was carried out. The HPLC–PDA–ESI-MS analysis achieved on an RP-Amide column highlighted the presence of 18 compounds, of which quercetin rhamnoside was the most abundant, accounting for roughly 36% of the whole fresh pepper. Total polyphenols and flavonoids were extracted using two solvents (methanol and ethyl acetate), revealing how a proper solvent combination could represent a promising extraction tool for recovery of both phenolic acids and flavonoids. For the antimicrobial activity, the best results were obtained with kaempferol, quercetin, and caffeic acid, and *S. aureus* turned out to be the most sensitive strain. The extract exhibited strong antioxidant properties, as capable of reducing the viability of the studied cancer cells. The results of this study indicate that the fruits of *C. annuum* L. may be considered a source of natural compounds with antioxidant and antimicrobial activity, explaining in part the therapeutic and preventive usefulness.

M. M. thanks the Erasmus Mundus programme of the European Union (PROJECT EU-MARE NOSTRUM Erasmus Mundus Action 2). J. S. is grateful to the project Enhancement of R&D Pools of Excellence at the University of Pardubice, reg. Nr. CZ.1.07/2.3.00/30.0021. The authors gratefully thank Shi-

madzu and Sigma-Aldrich/Supelco Corporations for their continuous support.

The authors have declared no conflicts of interest.

5 References

- [1] Scalbert, A., Johnston, I. T., Saltmarsh, M., *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, *81*, 215–217.
- [2] Balasundram, N., Sundram, K., Sammar, S., *Food Chem.* 2006, *1*, 191–203.
- [3] Petti, S., Scully, C., *J. Dent.* 2009, *37*, 413–423.
- [4] Erdman, J. W., Jr., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C. L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., Burrowes, J., *J. Nutr.* 2007, *137*, 718–737.
- [5] Jaffery, E. H., Brown, A. F., Kurilich, A. C., Keek, A. S., Matusheski, N., Klein, B. P., *J. Food Comp. Anal.* 2003, *16*, 323–330.
- [6] Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., Cindio, B. D., Houghton, P. J., Menichini, F., *Food Chem.* 2009, *114*, 553–560.
- [7] Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Paccagnini, S., Appendino, G., Ballero, M., Dessi, M. A., *J. Agric. Food Chem.* 2002, *50*, 7396–7401.
- [8] Belletti, P., Marzachi, C., Lanteri, S., *Plant Syst. Evol.* 1998, *209*, 85–91.
- [9] Marin, A., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F. A., Gil, M. I., *J. Agric. Food Chem.* 2004, *52*, 3861–3869.
- [10] Materska, M., Perucka, I., *J. Agric. Food Chem.* 2005, *53*, 1750–1756.
- [11] Kappel, V. D., Costa, G. M., Scola, G., Silva, F. A., Landell, M. F., Valente, P., Souza, D. G., Vanz, D. C., Reginatto, F. H., Moreira, J.C.F., *J. Med. Food* 2008, *11*, 267–274.
- [12] Jeong, W. Y., Jin, J. S., Cho, Y. A., Lee, J. H., Park, S., Jeong, S. W., Kim, Y. H., Lim, C. S., Abd El-Aty, A. M., Kim, G. S., Lee, S. J., Shim, J. H., Shin, S. C., *J. Sep. Sci.* 2011, *34*, 2967–2974.
- [13] Wahyuni, Y., Ballester, A.-R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., *Bovy A. G. Phytochem.* 2011, *72*, 1358–1370.
- [14] Park, S., Jeong, W. Y., Lee, J. H., Kim, Y.-H., Jeong, S. W., Kim, G.S., Bae, D. W., Lim, C.S., Jin, J.S., Lee, S. J., Shin, S. C., *Food Chem.* 2012, *130*, 981–985.
- [15] Morales-Soto, A., Gomez-Caravaca, A. M., Garcia-Salas, P., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., *Food Res. Int.* 2013, *51*, 977–984.
- [16] Materska, M., *J. Funct. Foods* 2014, *7*, 269–277.
- [17] Arnnok, P., Ruangviriyachai, C., Mahachai, R., Techa-wongstien, S., Chanthai, S., *Int. Food Res. J.* 2012, *19*, 235–243.
- [18] Gutfinger, T., *J. Am. Chem. Soc.* 1981, *58*, 966–998.
- [19] Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P., *J. Pharm. Belg.* 1994, *49*, 462–468.
- [20] Germanò, M. P., Cacciola, F., Donato, P., Dugo, P., Certo, G., D'Angelo, V., Mondello, L., Rapisarda, A., *Fitoterapia* 2012, *83*, 877–882.

- [21] Siracusa, L., Saija, A., Cristani, M., Cimino, F., D'Arrigo, M., Trombetta, D., Rao, F., Ruberto, G., *Fitoterapia* 2011, 82, 546–556.
- [22] Buenger, J., Ackermann, H., Jentzsch, A., Mehling, A., Pfitzner, I., Reiffen, K. A., Schroeder, KR., Wollenweber, U., *Int. J. Cosmet. Sci.* 2006, 28, 135–146.
- [23] Benzie, I. F. F., Strain, J. J., *Anal. Biochem.* 1996, 239, 70–76.
- [24] Clinical and Laboratory Standards Institute, M100–S18. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, 2008.
- [25] Dinicola, S., Cucina, A., Pasqualato, A., D'Anselmi, F., Proietti, S., Lisi, E., Pasqua, G., Antonacci, D., Bizzarri, M., *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 651–664.
- [26] Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C., *J. Food Drug Anal.* 2002, 10, 178–182.
- [27] Hallmann, E., Rembalkowska, E., *J. Sci. Food Agric.* 2012, 92, 2409–2415.
- [28] Nazzaro, F., Caliendo, G., Arnesi, G., Veronesi, A., Sarzi, P., Fratianni, F., *J. Food Biochem.* 2009, 33, 852–868.
- [29] Blahova, E., Jandera, P., Cacciola, F., Mondello L., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 555–566.
- [30] Cacciola, F., Jandera, P., Blahova, E., Mondello L., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 2500–2513.
- [31] Dugo, P., Cacciola, F., Herrero, M., Donato, P., Mondello, L., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 3297–3308.
- [32] Dugo, P., Donato, P., Cacciola, F., Germano, M.P., Rapisarda, A., Mondello, L., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 3627–3634.
- [33] Russo, M., Cacciola, F., Bonaccorsi, I., Dugo, P., Mondello, L., *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 681–687.
- [34] Hua, Y., Jenke D., *J. Chromatogr. Sci.* 2012, 50, 213–227.
- [35] Pellegrini, M., Serafini, B., Colombi, D., del Rio, S., Salvatora, M., Bianchi Brighenti, F., *J. Nutr.* 2003, 133, 2812–2819.
- [36] Molyneux P., *J. Sci. Technol.* 2004, 26, 211–219.
- [37] Teow, C. C., Truong, V., McFeeters, R. F., Thompson, R. L., Pecota, K. V., Yencho, G. C., *Food Chem.* 2007, 103, 829–838.
- [38] Arnao, M. B., *Trends Food Sci. Technol.*, 2000, 11, 419–421.
- [39] Dell'Agli, M., Galli, G. V., Vrhovsek, U., Mattivi, F., Bosisio, E., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 960–1965.
- [40] Arora, A., Nair, M. G., Strasburg, G. M., *Free Radic. Bio. Med.* 1998, 24, 1355–1363.
- [41] Majo, D. D., Guardia, M. L., Giammanco, S., Neve, L. L., Giammanco, M., *Food Chem.* 2008, 111, 45–49.
- [42] Daglia, M., *Curr. Opin. Biotech.* 2012, 23, 174–181.
- [43] Vatter, D. A., Lin, Y. T., Labbe, R. G., Shetty, K., *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2004, 5, 81–91.
- [44] Duda-Chodak, A., *J. Physiol. Pharmacol.* 2012, 63, 497–503.
- [45] Sanchez-Patan, F., Cueva, C., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson, G. R., Quintanilla-Lopez, J. E., Lebron-Aguilar, R., Martin-Alvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., Bartolome, B. J., *Agric. Food Chem.* 2012, 60, 2136–2147.
- [46] Saavedra M. J., Borges, A., Dias, C., Aires, A., Bennett, R., Rosa, E. S., Simoes, M., *Med. Chem.* 2010, 6, 174–183.
- [47] Arakawa, H., Maeda, M., Okubo, S., Shimamura T., *Biol. Pharm. Bull.* 2004, 27, 277–281.
- [48] Bisignano, C., Filocamo, A., Faulks, R. M., Mandalari, G., *FEMS Microbiol. Lett.* 2013, 341, 62–67.
- [49] Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., Newmark, H. L., *Annu. Rev. Nutr.* 2001, 21, 381–406.
- [50] Wang, W., Zhao, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., Zhang, R., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007, 59, 589–601.
- [51] Nguyen, T. T., Tran, E., Nguyen, T. H., Do, P. T., Huynh, T. H., Huynh, H., *Carcinogenesis* 2004, 25, 647–659.
- [52] Lee, T. J., Kim, O. H., Kim, Y. H., Lim, J. H., Kim, S., Park, J. W., Kwon, T. K., *Cancer Lett.* 2006, 240, 234–242.
- [53] Ramos, A. A., Lima, C. M., Pereira, M. L., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., *Toxicol. Lett.* 2008, 177, 66–73.
- [54] Xu, W., Liu, J., Li, C., Wu, H. Z., Liu, Y. W., *Cancer Lett.* 2008, 264, 229–240.