



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université de Constantine 3 Salah Boubnider  
Faculté de Médecine de Constantine Pr Belkassem BENSMAIL  
Département de Pharmacie

**CONCEPTION IN SILICO DE NOUVEAUX ANALOGUES DE LA PIPERINE :  
EVALUATION DES ACTIVITES ANALGESIQUE, ANTI INFLAMMATOIRE ET  
ANTIBACTERIENNE DE LA PIPERINE ISOLEE DU POIVRE NOIR ET DE SES  
ANALOGUES N-ARYLAMIDES SYNTHETISES.**

THESE  
Présentée pour l'Obtention du  
Diplôme de Doctorat d'Etude en Sciences Médicales

Par  
Dr Mehdi GUEROUI  
Maitre-assistant hospitalo-universitaire

Soutenue publiquement le : 26/02/2025

Année Universitaire  
2024-2025

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université de Constantine 3 Salah Boubnider  
Faculté de Médecine de Constantine Pr Belkassem BENSMAIL  
Département de Pharmacie



N° de Série :

N° d'Ordre :

**CONCEPTION IN SILICO DE NOUVEAUX ANALOGUES DE LA  
PIPERINE : EVALUATION DES ACTIVITES ANALGESIQUE, ANTI-  
INFLAMMATOIRE ET ANTIBACTERIENNE DE LA PIPERINE  
ISOLEE DU POIVRE NOIR ET DE SES ANALOGUES N-ARYLAMIDES  
SYNTHETISES.**

THESE  
Présentée pour l'Obtention du  
Diplôme de Doctorat d'Etude en Sciences Médicales  
en Chimie Thérapeutique

Par  
Dr Mehdi GUEROUI  
Maitre-assistant hospitalo-universitaire

Devant le Jury Composé de :

|                             |              |                                    |
|-----------------------------|--------------|------------------------------------|
| Pr. F. Z. HADJADJ AOUL      | Présidente   | Faculté de Pharmacie d'Alger       |
| Pr. K. BENEMEBAREK          | Directrice   | Faculté de Médecine de Constantine |
| Pr. A. NEGhra               | Examineur    | Faculté de Médecine d'Annaba       |
| Pr. N. AMOURA BOUGHANDJIOUA | Examinatrice | Faculté de Médecine d'Annaba       |
| Pr. H. LAOUAR               | Examineur    | Faculté de Médecine de Constantine |
| Pr. A. LALAOUNA             | Examineur    | Faculté de Médecine de Constantine |

Année Universitaire  
2024-2025

## *REMERCIEMENT*

Je tiens d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Allah, le Tout-Puissant et Miséricordieux, qui ma a accordé la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Ensuite, je souhaite remercier mon directeur de thèse, Pr K. BENEMEBAREK, pour sa guidance, sa patience et ses précieux conseils tout au long de ces années. Ses vastes connaissances et son enthousiasme pour la recherche ont été une source d'inspiration constante.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse, Pr F.Z. HADJADJ, Pr A. NEGHRA, Pr N. AMOURA, Pr H. LAOUAR et Pr A. LALAOUNA pour leur temps, leurs suggestions constructives et leur bienveillance. Leur expertise a grandement enrichi ce travail.

Un grand merci à mes collègues des laboratoires de pharmacognosie, chimie analytique, pharmacologie, pour leur soutien quotidien, leurs discussions stimulantes et leur amitié. Votre présence a rendu cette expérience de recherche plus agréable et motivante.

Je suis également reconnaissant envers mes partenaires de recherche et collaborateurs, centre de recherche en science pharmaceutique, le laboratoire de microbiologie CHU de Constantine et les laboratoires ISOPHARM pour leur collaboration fructueuse à ce projet.

## *DEDICACE*

À mes parents, Abdelmadjid et DOUES Fatiha, pour leur amour inconditionnel, leur soutien constant et leur foi en moi. Votre dévouement et vos sacrifices ont rendu tout cela possible.

À ma partenaire, Amira, pour ton amour, ta patience et ta compréhension durant les moments les plus difficiles. Ton soutien indéfectible a été ma plus grande force.

À mes frères et leurs famille, Riad, Abdelhakim, Anis, Walid et Abdelkrim pour leur encouragement, leur soutien et leur présence réconfortante. Vous avez été une source d'inspiration et de motivation tout au long de ce parcours.

À mes enfants, Samy et Ramy, pour votre joie, votre énergie et votre inspiration. Vous êtes la lumière de ma vie.

À mes amis et collègues, pour leur soutien, leurs encouragements et leurs précieux conseils tout au long de ce parcours.

À tous ceux qui ont cru en moi et m'ont encouragé à persévérer, même dans les moments de doute.

Avec toute ma gratitude et mon amour,

**M.GUEROUI**

# ***TABLE DE MATIERES***

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| Liste des figures .....      | ix    |
| Liste des tableaux .....     | xv    |
| Liste des équations .....    | xviii |
| Liste des abréviations ..... | xix   |
| Liste des annexes .....      | xxiii |
| Résumé .....                 | xxv   |
| Introduction .....           | 01    |

## **PARTIE A. REVUE Bibliographique**

### **CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES**

|  |    |
|--|----|
| I.1. Inflammation .....                                  | 04 |
| I.1.1. Les étiologies d'une réaction inflammatoire ..... | 04 |
| I.1.2. Les mécanismes de réponse inflammatoire .....     | 04 |
| I.1.2.1.1. Inflammations aiguës .....                    | 05 |
| I.1.2.1.2. Inflammations chroniques .....                | 07 |
| I.2. Douleur .....                                       | 10 |
| I.2.1. Evaluation de la douleur .....                    | 11 |
| I.2.2. Types de douleur .....                            | 12 |
| I.2.3. La Physiologie de la douleur .....                | 13 |
| I.3. Infections bactériennes .....                       | 15 |
| I.3.1. Les bactéries .....                               | 15 |
| I.3.2. Maladies infectieuses .....                       | 17 |
| I.3.2.1. Définition .....                                | 17 |
| I.3.2.2. Types des infections .....                      | 18 |
| I.3.2.2.1. Infections respiratoires .....                | 18 |
| I.3.2.2.2. Infection urinaire .....                      | 19 |
| I.3.2.2.3. Infection neurologique .....                  | 20 |
| I.3.2.2.3. Infections sexuellement transmises .....      | 21 |
| I.3.3. Résistance bactérienne .....                      | 22 |

## CHAPITRE II : LE POIVRE NOIR

|   |    |
|---|----|
| II.1. Généralités et histoire .....                   | 23 |
| II.2. Etude botanique                                 |    |
| II.2.1. Description botanique .....                   | 23 |
| II.2.2. Classification .....                          | 24 |
| II.2.3. Caractères végétatifs .....                   | 24 |
| II.3. Profil chimique. ....                           | 24 |
| II.3.1. L'huile essentielle .....                     | 26 |
| II.3.2. La résine.....                                | 28 |
| II.4. Domaine d'utilisation .....                     | 30 |
| II.4.1. Activité antimicrobienne du poivre noir ..... | 30 |
| II.4.2. Activité antioxydante du poivre noir.....     | 31 |
| II.4.3. Activité anti cancéreuse du poivre noir.....  | 31 |
| II.4.4. Activité anti-diarrhéique .....               | 31 |
| II.4.5. Autres activités.....                         | 32 |

## CHAPITRE III : LES ALCALOÏDES DU POIVRE NOIR

|  |    |
|--|----|
| III.1. Données chimiques.....                            | 33 |
| III.1.1. Formule chimique .....                          | 33 |
| III.1.2. Caractère physique.....                         | 34 |
| III.1.3. Biosynthèse de la pipérine. ....                | 34 |
| III.1.4. Technologies d'extraction .....                 | 35 |
| III.2. Données analytiques .....                         | 40 |
| III.2.1. Caractéristiques chimiques .....                | 40 |
| III.2.2. Caractéristiques spectrales.....                | 41 |
| III.3. Données structure-activité .....                  | 44 |
| III.4. Données pharmacologiques.....                     | 45 |
| III.4.1. Activité anti-inflammatoire et analgésique..... | 46 |
| III.4.2. Activité antioxydante.....                      | 47 |
| III.4.3. Activité anticonvulsivante .....                | 47 |

|  |    |
|--|----|
| III.4.4. Activité antidépressive.....  | 48 |
| III.4.5. Effet de la pipérine sur le tractus gastro-intestinal. ....   | 49 |
| III.4.6. Effet de la pipérine sur les pompes à efflux .....  | 49 |
| III.4.7. Effet de la pipérine au niveau rénal et hépatique.....  | 49 |
| III.4.8. Effet antiplaquettaire de la pipérine.....  | 50 |
| III.4.9. Effet de la pipérine sur le profil lipidique .....  | 51 |
| III.4.10. Activité anticancéreuse de la pipérine... ..   | 52 |
| III.4.11. Effet de la pipérine sur le métabolisme : un Bio-activateur .....  | 52 |
| III.4.12. Activité Immunomodulatrice .....   | 53 |
| III.4.13. Effets de la pipérine sur le SNC et la conductivité nerveuse .....   | 53 |
| III.5. Données pharmacocinétiques .....  | 54 |
| III.6. Données cliniques .....   | 56 |
| III.6.1. Effet de la pipérine sur la biodisponibilité orale des médicaments et des composés thérapeutiques naturels..... | 56 |
| III.6.2. Effet de la pipérine sur le tractus digestif ..   | 57 |
| III.6.3. Effet de la pipérine sur le vitiligo .....  | 58 |
| III.6.4. Autres effets .....   | 58 |

#### **CHAPITRE IV : LES ANALOGUES AMIDES DE LA PIPERINE ET LEURS METHODES DE SYNTHESE**

|   |    |
|---|----|
| IV.1. Les analogues de la pipérine .....  | 60 |
| IV.2. Méthodes de synthèse d'amide .....  | 61 |
| IV.2.1. Amination des chlorures ou anhydrides d'acyle .....                         | 61 |
| IV.2.2. Méthodes dérivées de chimie peptidique (intermédiaires d'ester actifs)..... | 63 |
| IV.3. Les Protocoles de référence .....   | 68 |

#### **CHAPITRE V : LES METHODES IN SILICO**

|  |    |
|--|----|
| V.1. Principes des méthodes <i>In silico</i> ..... | 70 |
| V.1.1. Le criblage virtuel .....                   | 70 |
| V.1.2. Le docking moléculaire .....                | 71 |
| V.1.3. La dynamique moléculaire .....              | 74 |
| V.1.4. La modélisation QSAR.....                   | 75 |
| V.1.5. Chimie quantique.....                       | 76 |

|   |    |
|---|----|
| V.2. Applications des méthodes <i>In silico</i> dans la découverte des médicaments .. | 76 |
| V.2.1. Identification de nouveaux ligands ..  | 76 |
| V.2.2. Optimisation des composés ..   | 76 |
| V.2.3. Prédiction de la toxicité ..   | 77 |

## **PARTIE B. REVUE PRATIQUE**

### **I. PRESENTATION DU TRAVAIL**

### **II. MATERIELS ET METHODES**

|   |     |
|---|-----|
| II.1. Identification botanique des fruits du poivre noir ..   | 82  |
| II.2. Isolation de la pipérine à partir du poivre noir ..   | 87  |
| II.3. Identification de la pipérine isolée ..   | 91  |
| II.4. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité anti-inflammatoire et analgésique de la pipérine isolée ..                                      | 95  |
| II.5. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antibactérienne de la pipérine isolée et de l'acide pipérique hémisynthétique ..               | 101 |
| II.6. Etude <i>in silico</i> (ADMET, Docking moléculaire, Dynamique moléculaire) des analogues amides de l'acide pipérique ..                 | 105 |
| II.7. Hémisynthèse des meilleurs analogues amides de l'acide pipérique (Analogues 08,09) ..   | 123 |
| II.8. Identification de l'acide pipérique et de ses analogues amides hémisynthétiques ..  | 127 |
| II.9. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des analogues amides de l'acide pipérique hémisynthétiques .. | 130 |
| II.10. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antibactérienne des analogues amides de l'acide pipérique hémisynthétique ..                  | 134 |

### **III. RESULTATS ET DISCUSSION**

|  |     |
|--|-----|
| III.1. Identification botanique des fruits du poivre noir ..   | 135 |
| III.2. Isolation de la pipérine à partir du poivre noir ..   | 141 |
| III.3. Identification de la pipérine isolée ..   | 142 |
| III.4. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité anti-inflammatoire et analgésique de la pipérine isolée ..                        | 155 |
| III.5. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antibactérienne de la pipérine isolée et de l'acide pipérique hémisynthétique .. | 161 |

|  |     |
|--|-----|
| III.6. Etude <i>in silico</i> (ADMET, Docking moléculaire, Dynamique moléculaire) des dérivés amides de l'acide pipérique .....                    | 165 |
| III.7. Hémissynthèse des meilleurs analogues amides de l'acide pipérique (Analogues 08,09) .....   | 206 |
| III.8. Identification de l'acide pipérique et de ses analogues amides hémissynthétiques .....  | 206 |
| III.9. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des analogues amides de l'acide pipérique hémissynthétiques ..... | 238 |
| III.10. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antibactérienne des analogues amides de l'acide pipérique hémissynthétiques .....                 | 244 |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....  | 248 |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....   | I   |
| <b>ANNEXES</b> .....   | a   |
| <b>BIOGRAPHIE DE L'AUTEUR</b>  |     |

## ***LISTE DES FIGURES***

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 01</b> : Les principales étapes de l'inflammation aigüe .....  | 05 |
| <b>Figure 02</b> : Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins .....                                  | 06 |
| <b>Figure 03</b> : Système de la coagulation/fibrinolyse.....  | 08 |
| <b>Figure 04</b> : Les voies de la douleur.....  | 15 |
| <b>Figure 05</b> : La coloration de Gram.....  | 16 |
| <b>Figure 06</b> : La paroi des bactéries Gram – bactéries Gram + .....  | 16 |
| <b>Figure 07</b> : Infection urinaire .....  | 20 |
| <b>Figure 08</b> : Les principales causes des méningites bactériennes .....  | 21 |
| <b>Figure 09</b> : Les principales causes d'infection bactérienne sexuellement transmise .....                                     | 21 |
| <b>Figure 10</b> : Schéma d'une branche de <i>Piper nigrum</i> L.....  | 24 |
| <b>Figure 11</b> : Localisation des principaux constituants chimiques dans les différents tissus du fruit (coloriés en noir) ..... | 25 |
| <b>Figure 12</b> : Structures chimiques des principaux terpènes.....   | 27 |
| <b>Figure 13</b> : Alcaloïdes isolés du <i>piper nigrum</i> .....  | 29 |
| <b>Figure 14</b> : Flavonoïdes isolés du piper nigrum.....   | 30 |
| <b>Figure 15</b> : Formule développée de la pipérine .....   | 33 |
| <b>Figure 16</b> : Autres alcaloïdes isolés du poivre noir.....  | 34 |
| <b>Figure 17</b> : Réaction catalysée par la pipéridine pipéroyltransférase du poivre noir.....                                    | 34 |
| <b>Figure 18</b> : Biosynthèse de la pipéridine à partir de la L-Lysine.....   | 35 |
| <b>Figure 19</b> : Aperçu de la pipérine obtenue.....  | 36 |
| <b>Figure 20</b> : Synthèse de la pipérine à partir de 4-méthyl-2-bromo-buténoate .....  | 38 |
| <b>Figure 21</b> : Réaction à trois composants entre les aldéhydes, les amines et le céténylidène triphénylphosphorane.....        | 39 |
| <b>Figure 22</b> : Synthèse des analogues amides de la pipérine .....  | 40 |
| <b>Figure 23</b> : Fragmentation SM de la sylvatine et la guineensine-type amide .....   | 43 |
| <b>Figure 24</b> : Les différents fragments de la structure de la pipérine.....  | 44 |
| <b>Figure 25</b> : Quelques analogues amides de la pipérine.....   | 60 |
| <b>Figure 26</b> : Réaction d'amidification par les chlorures d'acyle. ....  | 61 |
| <b>Figure 27</b> : Mécanisme de formation de liaisons amides à partir d'un chlorure d'acyle.....                                   | 62 |
| <b>Figure 28</b> : Mécanisme de formation de liaisons amides à partir d'anhydride mixte.....                                       | 63 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 29</b> : Mécanisme de formation de liaisons amides à partir d'une réaction à médiation carbodiimide.....        | 64  |
| <b>Figure 30</b> : Formation de liaison amide à partir d'un ester activé .....  | 65  |
| <b>Figure 31</b> : Structure générale des sels de phosphonium .....   | 66  |
| <b>Figure 32</b> : Mécanisme proposé de voie de couplage au sel de phosphonium .....                                      | 66  |
| <b>Figure 33</b> : Structure de Certains sels d'ammonium .....  | 67  |
| <b>Figure 34</b> : Structure de Certains sels d'uronium .....   | 68  |
| <b>Figure 35</b> : Flux de travail du criblage virtuel .....  | 71  |
| <b>Figure 36</b> : Les différentes étapes du docking moléculaire .....  | 72  |
| <b>Figure 37</b> : Les différents types de docking moléculaire .....  | 73  |
| <b>Figure 38</b> : Analyse de simulations de dynamique moléculaire d'une protéine TAL en complexe avec l'ADN .....        | 75  |
| <b>Figure 39</b> : la structure chimique de la pipérine .....   | 79  |
| <b>Figure 40</b> : Pharmacophore.....   | 79  |
| <b>Figure 41</b> : Variations structurales envisagées autour du pharmacophore .....                                       | 80  |
| <b>Figure 42</b> : Isolation et évaluation de l'activité biologique de la pipérine.....                                   | 81  |
| <b>Figure 43</b> : les fruits du poivre noir .....  | 82  |
| <b>Figure 44</b> : (a) Loupe binoculaire, (b) Microscope optique, (c) Broyeur électronique.....                           | 83  |
| <b>Figure 45</b> : Réactifs de double coloration .....  | 84  |
| <b>Figure 46</b> : Extrait hydro-alcoolique de nos fruits du poivre Noir .....  | 84  |
| <b>Figure 47</b> : Hydrate chloral + La poudre de poivre noir .....   | 84  |
| <b>Figure 48</b> : Réalisation des coupes transversales .....   | 86  |
| <b>Figure 49</b> : Logiciel d'analyse du spectre UV .....   | 92  |
| <b>Figure 50</b> : Le banc kofler.....  | 93  |
| <b>Figure 51</b> : Spectrophotomètre Uv.....  | 93  |
| <b>Figure 52</b> : Spectrophotomètre IR.....  | 94  |
| <b>Figure 53</b> : Analgésimetre. (BIOSEB).....   | 96  |
| <b>Figure 54</b> : Pléthysmomètre. (BIOSEB).....  | 97  |
| <b>Figure 55</b> : Injection de carragénine dans la région sub-plantaire de la patte postérieure gauche d'une souris..... | 98  |
| <b>Figure 56</b> : Souches bactériennes utilisées sur GN .....  | 103 |
| <b>Figure 57</b> : Caractéristiques générales du microordinateur utilisé dans notre travail.....                          | 105 |
| <b>Figure 58</b> : Logiciel autodock tools .....  | 106 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 59</b> : L`interface du programme Discovery Studio 2020.....   | 106 |
| <b>Figure 60</b> : Logiciel Open Babel.....  | 107 |
| <b>Figure 61</b> : Logiciel Chems sketch.....  | 107 |
| <b>Figure 62</b> : Logiciel Avogadro.....  | 108 |
| <b>Figure 63</b> : Les protéines Pseudomonas aeruginosa (6m1s) et E.Coli (5L3J) non simplifiées<br>.....   | 112 |
| <b>Figure 64</b> : Les protéines staphylococcus aureus (3vsl) et Bacillus subtilis (3zih) non<br>simplifiées.....  | 113 |
| <b>Figure 65</b> : La protéine de cyclooxygénase 2 (1CVU) non simplifié.....   | 113 |
| <b>Figure 66</b> : Les protéines Pseudomonas aeruginosa (6m1s) et E.Coli (5L3J) simplifiées ....   | 114 |
| <b>Figure 67</b> : Les protéines staphylococcus aureus (3vsl) et Bacillus subtilis (3zih) simplifiées<br>.....   | 114 |
| <b>Figure 68</b> : La protéine de la cyclo-oxygénase 2 (1CVU) simplifiée.....  | 115 |
| <b>Figure 69</b> : Structure des différents ligands amides conçus.....   | 116 |
| <b>Figure 70</b> : Détermination de l`espace d`amarrage moléculaire .....  | 117 |
| <b>Figure 71</b> : Importation de la protéine et le ligand dans l`espace de travail .....  | 118 |
| <b>Figure 72</b> : Préparation des paramètres de la boîte de docking (gpf file) .....  | 118 |
| <b>Figure 73</b> : Détermination des paramètres de docking moléculaire (dpf file) .....  | 119 |
| <b>Figure 74</b> : Exécution des paramètres du grid box (gpf) et de docking moléculaire (dpf)....  | 120 |
| <b>Figure 75</b> : Résonance magnétique nucléaire (RMN) .....  | 129 |
| <b>Figure 76</b> : L`aspect de fruit de poivre sous la loupe binoculaire .....   | 135 |
| <b>Figure 77</b> : Fragment de mésocarpe, d`endocarpe et de tégument de la poudre des fruits du<br>poivre noir observé au microscope optique (G x 10) x 40 .....           | 136 |
| <b>Figure 78</b> : Cellules sclérifiées d`endocarpe avec cellules à pigment de la poudre des fruits du<br>poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40 .....   | 136 |
| <b>Figure 79</b> : Fragment parenchymateux d`endocarpe de la poudre des fruits du poivre noir<br>observés au microscope optique (G x 10) x 40 .....                        | 137 |
| <b>Figure 80</b> : Cellules de réserves d`albumen avec des graines d`aleurone de la poudre des<br>fruits du poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40 ..... | 137 |
| <b>Figure 81</b> : Fragment d`épicarpe avec cuticules de la poudre des fruits du poivre noir<br>observés au microscope optique (G x 10) x 40 .....                         | 138 |
| <b>Figure 82</b> : Canal sécréteur de la poudre des fruits du poivre noir observés au microscope<br>optique (G x 10) x 40.....   | 138 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 83</b> : Cellules scléreuses avec cellules de réserve de la poudre des fruits du poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40 .....                                 | 139 |
| <b>Figure 84</b> : Autres éléments de la poudre des fruits du poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40.....   | 139 |
| <b>Figure 85</b> : Aspect microscopique des coupes transversales du fruit du poivre noir.....   | 140 |
| <b>Figure 86</b> : La forme de la pipérine isolée de chaque extraction .....  | 142 |
| <b>Figure 87</b> : Test de solubilité de la pipérine.....   | 143 |
| <b>Figure 88</b> : Point de fusion de la pipérine isolée.....   | 144 |
| <b>Figure 89</b> : Spectre UV d'absorption de la pipérine de référence.....   | 144 |
| <b>Figure 90</b> : Le spectre UV d'absorption de la pipérine isolée .....   | 145 |
| <b>Figure 91</b> : Spectre IR de la pipérine de référence.....  | 146 |
| <b>Figure 92</b> : Spectre IR de la pipérine isolée.....  | 146 |
| <b>Figure 93</b> : Spectre RMN H <sup>1</sup> théorique de la pipérine prédit par le serveur nmrdb.....   | 149 |
| <b>Figure 94</b> : Spectre RMN H <sup>1</sup> de la pipérine isolée.....  | 149 |
| <b>Figure 95</b> : Spectre RMN C <sup>13</sup> théorique de la pipérine prédit par le serveur nmrdb .....   | 151 |
| <b>Figure 96</b> : Spectre RMN C <sup>13</sup> de la pipérine isolée .....  | 152 |
| <b>Figure 97</b> : HSCQ de la pipérine isolée .....   | 154 |
| <b>Figure 98</b> : Pourcentages d'augmentation de l'œdème induit par la carragénine en fonction du temps dans les trois lots .....  | 156 |
| <b>Figure 99</b> : Pourcentages d'inhibition de l'œdème par la pipérine (extrait) et l'aspirine (standard) .....  | 157 |
| <b>Figure 100</b> : Evolution du seuil de nociception en fonction du temps.....   | 159 |
| <b>Figure 101</b> : Zone d'inhibition de ceftazidime .....  | 162 |
| <b>Figure 102</b> : L'action de la pipérine (à droite) et de l'acide pipérique (à gauche) sur les souches bactériennes : E. coli, S.aureus et P. aeruginosa .....                         | 162 |
| <b>Figure 103</b> : L'action de la pipérine (à gauche) et de l'acide pipérique (à droite) sur les souches bactériennes : (a) B. subtilis (b) E. coli (c) P. aeruginosa,(d) S.aureus ..... | 163 |
| <b>Figure 104</b> : Structures 3D des 4 complexes issus de la PDB .....   | 172 |
| <b>Figure 105</b> : Comparaison des conformations obtenues par rayon-X (colorés en noir) et par docking moléculaire avec AutoDock 4.2 (colorés en rouge).....                             | 173 |
| <b>Figure 106</b> : Pose 2D de la pipérine sur le site actif de la protéine 1cvu .....  | 175 |
| <b>Figure 107</b> : Pose 3D de la pipérine sur le site actif de la protéine 1cvu .....  | 174 |
| <b>Figure 108</b> : Pose 2D de la pipérine sur le site actif de la protéine 5lj3 .....  | 176 |
| <b>Figure 109</b> : Pose 3D de la pipérine sur le site actif de la protéine 5lj3 .....  | 177 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 110</b> : Pose 2D de la pipérine sur le site actif de la protéine 6m1s .....                             | 177 |
| <b>Figure 111</b> : Pose 3D de la pipérine sur le site actif de la protéine 6m1s .....                             | 178 |
| <b>Figure 112</b> : Pose 2D de la pipérine sur le site actif de la protéine 3zih.....                              | 178 |
| <b>Figure 113</b> : Pose 3D de la pipérine sur le site actif de la protéine 3zih.....                              | 179 |
| <b>Figure 114</b> : Pose 2D de la pipérine sur le site actif de la protéine 3vsl.....                              | 179 |
| <b>Figure 115</b> : Pose 3D de la pipérine sur le site actif de la protéine 3vsl.....                              | 180 |
| <b>Figure 116</b> : Modèle pharmacophore.....  | 182 |
| <b>Figure 117</b> : Structures des 6 meilleurs analogues actifs sur les 5 protéines.....                           | 183 |
| <b>Figure 118</b> : Pose 2D de l'analogue 8 sur le site actif de la protéine 1cvu.....                             | 185 |
| <b>Figure 119</b> : Pose 2D de l'analogue 10 sur le site actif de la protéine 1cvu.....                            | 186 |
| <b>Figure 120</b> : Pose 2D de l'analogue 13 sur le site actif de la protéine 1cvu.....                            | 186 |
| <b>Figure 121</b> : Pose 2D de l'analogues 8 sur le site actif de la protéine 5lj3.....                            | 188 |
| <b>Figure 122</b> : Pose 2D de l'analogues 10 sur le site actif de la protéine 5lj3.....                           | 189 |
| <b>Figure 123</b> : Pose 2D de l'analogues 13 sur le site actif de la protéine 5lj3.....                           | 189 |
| <b>Figure 124</b> : Pose 2D de l'analogue 8 sur le site actif de la protéine 6m1s.....                             | 191 |
| <b>Figure 125</b> : Pose 2D de l'analogue 10 sur le site actif de la protéine 6m1s.....                            | 192 |
| <b>Figure 126</b> : Pose 2D de l'analogue 13 sur le site actif de la protéine 6m1s.....                            | 192 |
| <b>Figure 127</b> : Pose 2D de l'analogue 8 sur le site actif de la protéine 3vsl.....                             | 194 |
| <b>Figure 128</b> : Pose 2D de l'analogue 10 sur le site actif de la protéine 3vsl.....                            | 195 |
| <b>Figure 129</b> : Pose 2D de l'analogue 13 sur le site actif de la protéine 3vsl.....                            | 195 |
| <b>Figure 130</b> : Pose 2D de l'analogue 8 sur le site actif de la protéine 3zih.....                             | 197 |
| <b>Figure 131</b> : Pose 2D de l'analogue 10 sur le site actif de la protéine 3zih.....                            | 198 |
| <b>Figure 132</b> : Pose 2D de l'analogue 13 sur le site actif de la protéine 3zih.....                            | 198 |
| <b>Figure 133</b> : RMSD de la protéine avec des ligands à 100 ns de temps de simulation .....                     | 200 |
| <b>Figure 134</b> : Les Fluctuations quadratiques moyennes des ligands .....                                       | 202 |
| <b>Figure 135</b> : Rayon de giration de la protéine COX – ligands.....  | 203 |
| <b>Figure 136</b> : L'aspect de l'acide pipérique hémisynthétique.. .....  | 207 |
| <b>Figure 137</b> : Point de fusion de l'acide pipérique hémisynthétique.....                                      | 207 |
| <b>Figure 138</b> : le spectre UV de l'acide pipérique .....   | 208 |
| <b>Figure 139</b> : Spectre IR théorique de l'acide pipérique prédit par le serveur cheminfo .....                 | 208 |
| <b>Figure 140</b> : Spectre IR de l'acide pipérique hémisynthétique .....  | 209 |
| <b>Figure 141</b> : Spectre RMN H <sup>1</sup> théorique de l'acide pipérique prédit par le serveur nmrdp<br>..... | 211 |
| <b>Figure 142</b> : Spectre RMN H <sup>1</sup> de l'acide pipérique hémisynthétique .. .....                       | 211 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 143</b> : Spectre RMN C <sup>13</sup> théorique de l'acide pipérique prédit par le serveur nmrd   | 213 |
| <b>Figure 144</b> : Spectre RMN C <sup>13</sup> de l'acide pipérique hémisynthétique  | 214 |
| <b>Figure 145</b> : HSCQ de l'acide pipérique hémisynthétique   | 216 |
| <b>Figure 146</b> : Aspect de l'analogue 08   | 217 |
| <b>Figure 147</b> : Détermination du point de fusion de l'analogue 08 sur Banc Kofler   | 217 |
| <b>Figure 148</b> : Spectre théorique de l'analogue 08 prédit par le serveur cheminfo   | 218 |
| <b>Figure 149</b> : Spectre expérimental de l'analogue 08 hémisynthétique   | 218 |
| <b>Figure 150</b> : Spectre RMN H <sup>1</sup> théorique de l'analogue 08 prédit par le serveur nmrd  | 221 |
| <b>Figure 151</b> : Spectre RMN H <sup>1</sup> de l'analogue 08 hémisynthétique   | 221 |
| <b>Figure 152</b> : Spectre RMN C <sup>13</sup> théorique de l'analogue 08 prédit par le serveur nmrd   | 223 |
| <b>Figure 153</b> : Spectre RMN C <sup>13</sup> de l'analogue 08 hémisynthétique  | 224 |
| <b>Figure 154</b> : HSQC de l'analogue 08   | 225 |
| <b>Figure 155</b> : Aspect de l'analogue 09   | 227 |
| <b>Figure 156</b> : Détermination du point de fusion de l'analogue 09   | 227 |
| <b>Figure 157</b> : Spectre théorique de l'analogue 09 prédit par le serveur cheminfo   | 228 |
| <b>Figure 158</b> : Spectre expérimental de l'analogue 09   | 228 |
| <b>Figure 159</b> : Spectre RMN H <sup>1</sup> théorique de l'analogue 09 prédit par le serveur nmrd  | 231 |
| <b>Figure 160</b> : Spectre RMN H <sup>1</sup> de l'analogue 09 hémisynthétisé  | 231 |
| <b>Figure 161</b> : Spectre RMN C <sup>13</sup> théorique de l'analogue 09 prédit par le serveur nmrd   | 234 |
| <b>Figure 162</b> : Spectre RMN C <sup>13</sup> de l'analogue 09 hémisynthétique  | 234 |
| <b>Figure 163</b> : HSQC de l'analogue 09   | 236 |
| <b>Figure 164</b> : Pourcentages d'augmentation de l'œdème induit par la carragénine en fonction du temps dans les cinq lots  | 239 |
| <b>Figure 165</b> : Pourcentages d'inhibition de l'œdème par l'aspirine, l'acide pipérique, l'analogue 8 et l'analogue 9  | 239 |
| <b>Figure 166</b> : Evolution du seuil de nociception en fonction du temps pour les cinq lots   | 242 |
| <b>Figure 167</b> : Illustration de l'effet de l'analogue 08 sur les souches bactériennes : <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> | 245 |
| <b>Figure 168</b> : Illustration de l'effet de l'analogue 09 sur les souches bactériennes : <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> | 245 |
| <b>Figure 169</b> : Diamètre d'inhibition par les deux analogues 08 et 09   | 246 |

## ***LISTE DES TABLEAUX***

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 01</b> : Étiologie de l'inflammation.....   | 04  |
| <b>Tableau 02</b> : Principales causes des infections respiratoires.....   | 18  |
| <b>Tableau 03</b> : Les caractères organoleptiques et physicochimiques de l'huile essentielle de poivre noir .....                                     | 26  |
| <b>Tableau 04</b> : Concentrations et caractères organoleptiques des principaux terpènes composant l'huile essentielle du poivre noir.....             | 27  |
| <b>Tableau 05</b> : Point de fusion, longueur d'onde d'absorption et pouvoir piquant de la pipérine et de ses isomères .....                           | 28  |
| <b>Tableau 06</b> : Données spectrales UV de la Guineensine et Sylvatine .....   | 41  |
| <b>Tableau 07</b> : Données spectrales UV de la Guineensine et Sylvatine .....   | 42  |
| <b>Tableau 08</b> : Fragmentation SM de la Guineensine et Sylvatine.....   | 42  |
| <b>Tableau 09</b> : Les activités pharmacologiques de la pipérine .....  | 46  |
| <b>Tableau 10</b> : Les réactifs chimiques utilisés dans l'isolation de la pipérine .....  | 87  |
| <b>Tableau 11</b> : Les souches bactériennes utilisées .....   | 102 |
| <b>Tableau 12</b> : Les réactifs nécessaires pour la synthèse d'analogues .....  | 123 |
| <b>Tableau 13</b> : Les souches bactériennes utilisées .....   | 134 |
| <b>Tableau 14</b> : Rendement de la pipérine isolée du poivre noir en (%) .....  | 141 |
| <b>Tableau 15</b> : Les caractères organoleptiques de la pipérine. ....  | 142 |
| <b>Tableau 16</b> : Résultats du test de solubilité .....  | 143 |
| <b>Tableau 17</b> : Etude comparative des bandes d'absorbance de la pipérine .....   | 147 |
| <b>Tableau 18</b> : Analyse du spectre RMN H1 de la pipérine .....   | 150 |
| <b>Tableau 19</b> : comparaison des déplacements chimiques observés dans les spectres théorique et expérimental .....                                  | 153 |
| <b>Tableau 20</b> : Volume moyen de la patte postérieure gauche avant et après différents temps de l'injection de carragénine dans les trois lots..... | 155 |
| <b>Tableau 21</b> : Seuils de nociception des souris des différents lots par la méthode de la pression de la queue .....                               | 158 |
| <b>Tableau 22</b> : Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion sur disque.....                            | 161 |
| <b>Tableau 23</b> : Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion de puits .....                                     | 163 |
| <b>Tableau 24</b> : Les règles de LIPINSKI .....   | 165 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 25</b> : Propriétés physicochimiques de la pipérine et ses analogues.....   | 167 |
| <b>Tableau 26</b> : Propriétés pharmacocinétiques de la pipérine et ses analogues.....   | 169 |
| <b>Tableau 27</b> : Les 4 complexes utilisés pour tester la fiabilité du protocole de docking par Auto dock 4.2.....   | 171 |
| <b>Tableau 28</b> : Les énergies d`interactions de la pipérine avec les différentes protéines.....   | 174 |
| <b>Tableau 29</b> : Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition des protéines Cyclo-oxygénase 2 (1cvu), E.Coli (5lj3), Pseudomonas Aerogenosa (6m1s), Staphylococcus Aureus (3vsl), Bacillus subtilis (3zih) par la pipérine..... | 174 |
| <b>Tableau 30</b> : Les énergies d`interactions des 27 analogues de la pipérine avec les différentes protéines.....  | 181 |
| <b>Tableau 31</b> : Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition de la protéine Cyclo-oxygénase 2 (1cvu), par les meilleurs analogues.....   | 184 |
| <b>Tableau 32</b> : Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition de la protéine d`E.Coli (5lj3), par les meilleurs analogues.....  | 187 |
| <b>Tableau 33</b> : Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition de la protéine Pseudomonas Aerogenosa (6m1s), par les meilleurs analogues.....  | 190 |
| <b>Tableau 34</b> : Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition de la protéine Staphylococcus Aureus (3vsl), par les meilleurs analogues.....   | 193 |
| <b>Tableau 35</b> : Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition de la protéine Bacillus subtilis (3zih), par les meilleurs analogues.....   | 196 |
| <b>Tableau 36</b> : Etude de la toxicité des meilleurs analogues.....  | 205 |
| <b>Tableau 37</b> : rendement obtenu des 02 analogues synthétisé.....  | 206 |
| <b>Tableau 38</b> : Comparaison entre les pics du spectre IR expérimental et théorique pour l`acide pipérique.....   | 209 |
| <b>Tableau 39</b> : Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN H <sup>1</sup> pour l`acide pipérique.....   | 212 |
| <b>Tableau 40</b> : Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN C <sup>13</sup> pour l`acide pipérique.....  | 215 |
| <b>Tableau 41</b> : Comparaison entre les pics du spectre IR expérimental et théorique pour l`analogue 08.....   | 219 |
| <b>Tableau 42</b> : Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN H <sup>1</sup> pour l`analogue 08 ...  | 222 |
| <b>Tableau 43</b> : Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN C <sup>13</sup> pour l`analogue 08 ..  | 225 |
| <b>Tableau 44</b> : Comparaison entre les pics du spectre IR expérimental et théorique pour l`analogue 09.....   | 229 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 45</b> : Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN H1 pour l'analogue 09 ..  | 232 |
| <b>Tableau 46</b> : Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN C <sup>13</sup> pour l'analogue 09 ..   | 235 |
| <b>Tableau 47</b> : Volume moyen de la patte postérieur gauche avant et à différents temps après l'injection de carragénine dans les cinq lots .. | 238 |
| <b>Tableau 48</b> : Seuils de nociception des souris des différents lots par la méthode de la pression de la queue ..                             | 241 |
| <b>Tableau 49</b> : Valeurs des diamètres moyens des zones d'inhibition induites par les analogues 08 et 09 ..                                    | 244 |

## ***LISTE DES EQUATIONS***

|  |     |
|--|-----|
| <b>Equation 01</b> : La seconde loi de Newton .....  | 74  |
| <b>Equation 02</b> : Le rendement en pipérine (Rp) isolée du poivre noir exprimé en pourcentage (%) .....          | 91  |
| <b>Equation 03</b> : La détermination des pourcentages d'augmentation moyens de l'œdème en fonction du temps ..... | 99  |
| <b>Equation 04</b> : La détermination du pourcentage d'inhibition de l'œdème .....                                 | 99  |
| <b>Equation 05</b> : Formule du RMSD .....   | 111 |

## ***LISTE DES ABRÉVIATIONS***

**%** : Pourcentage

**°C**: Degré Celsius

**2D** : Deux dimensions

**3D** : Trois dimensions

**Å** : Angström

**AINS** : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

**acyl-CoA**: Acyl-Co-enzyme A

**ADME/T** : Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination/ Toxicité

**CASTp**: Computed Atlas of Surface Topography of proteins

**cm** : Centimètre

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**COX2** : Cyclooxygénase 2

**COMU** : O-(6-Chloro-1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium  
hexafluorophosphate

**CRP**: C-Reactive Protein

**CYP**: Cytochrome

**Da** : Dalton

**DCM**: Dichlorométhane

**DCC** : Dicyclohexylcarbodiimide

**DIPEA** : N,N-Diisopropylethylamine

**DFT** : Density Functional Theory

**DM** : Docking moléculaire

**DM** : Dynamique moléculaire

**Dpf** : Docking moléculaire

**E. Coli** : Escherichia coli

**EDC** : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

**FAO**: Food and Agriculture Organization

**FDS** : Fiche de données de sécurité

**FFA** : Free Fatty Acids

**GI** : Gastro-intestinale

**Glg**: GridLoG file

**GOT** : Glutamate Oxaloacetate Transaminase

**GPCRs** : G-Protein Coupled Receptors  
**GPT** : Glutamate Pyruvate Transaminase  
**Gpf**: Grid parameter file  
**HAPYU** : Hydroxyazabenzotriazole-N-hydroxyphthalimide-urea  
**HBTU** : Hexamethylphosphoramide-benzotriazole-urea  
**HDL**: High-Density Lipoprotein  
**HEK293**: Human Embryonic Kidney 293  
**HOBt** : Hydroxybenzotriazole  
**HOAt** : Hydroxyazabenzotriazole  
**HPLC**: High-Performance Liquid Chromatography  
**HPTLC**: High-Performance Thin-Layer Chromatography  
**HSQC**: Heteronuclear Single Quantum Coherence  
**HTS**: High-Throughput Screening  
**IASP**: International Association for the Study of Pain  
**ICAM-1** : Intercellular adhesion molecule 1  
**IFN- $\gamma$**  : Interféron gamma  
**IL1** : Interleukine 1  
**IL-6** : Interleukine 6  
**INADPH**: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
**ip** : Intrapéritonéale  
**IR** : Infra-rouge  
**IST** : Infections sexuellement transmissibles  
**Kel** : Constante d'élimination  
**Ki** : Constante d'inhibition  
**LBVS** : Ligand-based virtual screening  
**LDL**: Low-Density Lipoprotein  
**LGA** : Algorithme génétique Lamarckian  
**Log P** : Coefficient de partage octanol/eau  
**LTB4** : Leucotriène B4  
**m/z** : Rapport masse/charge  
**MES** : Maximal Electroshock Seizure  
 **$\mu$ L** : Microlitre  
 **$\mu$ m**: micromètre  
**NB-UVB**: Narrow-Band Ultraviolet B

**nm** : Nanomètre

**P. aeruginosa** : Pseudomonas aeruginosa

**P. guineense**: Piper guineense

**P. nigrum**: Piper nigrum

**P. umbellatum**: Piper umbellatum

**PAF** : Platelet-Activating Factor

**PARP-1**: Poly (ADP-ribose) polymerase 1

**PDB**: Protein data bank

**PECAM-1**: Platet endothelial cell adhesion molecule 1

**PGI2** : Prostacycline

**PGE2** : Prostaglandine E2

**PTZ** : Pentylenetetrazole

**QSAR** : Quantitative Structure-Activity Relationship

**REE** : Resting Energy Expenditure

**Rg** : Le rayon de giration

**RMSD** : L'écart quadratique moyen

**RMSF** : La fluctuation quadratique moyenne

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**RP-HPLC**: Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography

**SAR** : Structure-Activity Relationship

**S. aureus** : Staphylococcus aureus

**S. epidermidis** : Staphylococcus epidermidis

**SM** : Spectre de masse

**SSC** : Steady-State Concentration

**T1/2** : Demi-vie

**TBVS**: Target-based virtual screening

**TBTU** : Tetramethylbenzotriazolyluronium hexafluorophosphate

**TEA** : Triéthylamine

**THE** : Tonic Hindlimb Extension

**THF**: Tétrahydrofurane

**TL-CUV** : Chromatographie sur Couche Mince-Ultraviolet

**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor-alpha

**TOTU** : O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate

**TPSA** : Topological Polar Surface Area

**TRPV1** : Transient Receptor Potential Vanilloid 1

**TSTU** : 2,4,6-Trimethylbenzenesulfonylurea

**UDP** : Uridine diphosphate glucose

**UV** : Ultra-violet

**VLDL**: Very-Low-Density Lipoprotein

**VCAM-1**: Vascular cell adhesion molecule 1

## ***LISTE DES ANNEXES***

|  |   |
|--|---|
| <b>Annexe 01</b> : Monographie de la spectroscopie par l'IR « Pharmacopée Européenne 8ème édition » pages 38-39.....                               | a |
| <b>Annexe 2</b> : Monographie de la spectroscopie par l'UV « Pharmacopée Européenne 8ème édition » pages 40-41.....                                | b |
| <b>Annexe 3</b> : Monographie de Poivre Noir de « Atlas Of Microscopy Of Medicinal Plants Culinary Herbs And Spices» pages 24-25.....              | c |
| <b>Annexe 04</b> : Montage de la poudre .....  | d |
| <b>Annexe 05</b> : Les étapes de traitement des coupes transversales par le vert de méthyl et le rouge Congo (Technique de double coloration)..... | e |
| <b>Annexe 06</b> : L'appareillage utilisé dans l'isolement de la pipérine.....   | f |
| <b>Annexe 07</b> : Les étapes d'extraction par chauffage à reflux.....   | g |
| <b>Annexe 08</b> : Les étapes d'extraction par acide acétique.....   | h |
| <b>Annexe 09</b> : Extraction de la pipérine par Soxhlet .....   | i |
| <b>Annexe 10</b> : Extraction de la pipérine par micro-onde.....   | j |
| <b>Annexe 11</b> : Administration intra-péritonéale de produits et sub-plantaire de carragénine .....  | k |
| <b>Annexe 12</b> : Photo de l'œdème au niveau de la patte postérieure gauche (B) et la mesure du volume de l'œdème via le pléthysmomètre (A) ..... | l |
| <b>Annexe 13</b> : Mesure du seuil de tolérance de la douleur chez la souris par le biais de l'analgésimètre.....                                  | m |
| <b>Annexe 14</b> : Préparation de la suspension de pipérine .....  | n |
| <b>Annexe 15</b> : Ensemencement des suspensions bactériennes .....  | o |
| <b>Annexe 16</b> : les concentrations des solutions et préparation des puits .....   | p |
| <b>Annexe 17</b> : La synthèse de l'acide pipérique à partir de la pipérine.....   | q |
| <b>Annexe 18</b> : La synthèse des analogues amides (analogue 08 et 09) à partir de l'acide pipérique.....   | r |
| <b>Annexe 19</b> : La purification d'analogue 08 .....   | s |
| <b>Annexe 20</b> : Echantillon des 4 produits obtenus.....   | t |
| <b>Annexe 21</b> : Certificat d'analyse du réactif HBTU .....  | u |
| <b>Annexe 22</b> : Certificat d'analyse du réactif Dichlorométhane.....  | v |
| <b>Annexe 23</b> : Certificat d'analyse du réactif diisopropylamine .....  | w |
| <b>Annexe 24</b> : Certificat d'analyse du réactif aniline .....   | x |

|  |    |
|--|----|
| <b>Annexe 25</b> : Fiche technique du réactif 4-aminophénol .....  | y  |
| <b>Annexe 26</b> : l'appareil RMN Bruker® 400 .....  | z  |
| <b>Annexe 27</b> : Interface du logiciel Top spin 3.5.....   | aa |
| <b>Annexe 28</b> : Spectre IR de la pipérine isolées .....   | bb |
| <b>Annexe 29</b> : Spectre IR de l'acide pipérique hémisynthétique.....  | cc |
| <b>Annexe 30</b> : Spectre IR de l'analogue 08 hémisynthétique.....  | dd |
| <b>Annexe 31</b> : Spectre IR de l'analogue 09 hémisynthétique.....  | ee |
| <b>Annexe 32</b> : Monographie du Poivre noir « Pharmacopée européenne 11 -ème édition » pages<br>1665-1666..... | ff |

## RESUME

Cette étude porte sur l'extraction, la caractérisation, la synthèse et l'évaluation des propriétés biologiques de la pipérine et de ses analogues de synthèse de type N-arylamides. Elle vise à explorer leur potentiel en tant qu'agents anti-inflammatoires, analgésiques et antibactériens, tout en combinant des approches expérimentales et *in silico*.

La pipérine a été extraite du poivre noir par différentes méthodes, dont l'extraction avec l'acide acétique glacial, qui a permis d'obtenir un produit pur et cristallin. Sa structure chimique a été confirmée par des techniques spectrales (UV, IR, RMN). Ensuite, deux analogues amides de l'acide pipérique (08 et 09) ont été synthétisés avec des rendements élevés (64,7 % et 70,12 %), et leur structure a été validée par des analyses similaires.

Les études biologiques *in vivo* ont révélé que la pipérine et ses analogues possèdent des activités anti-inflammatoires et analgésiques significatives. La pipérine, administrée à une dose de 50 mg/kg, a montré des effets comparables à ceux de l'aspirine (150 mg/kg) et du tramadol, respectivement pour les activités anti-inflammatoires et analgésiques.

Les analyses *in vitro* n'ont révélé aucune activité antibactérienne significative pour la pipérine et l'acide pipérique, tandis que les analogues 08 et 09 ont montré une activité antibactérienne contre les souches testées. En parallèle, les études *in silico* de type ADME des analogues ont mis en évidence une absorption gastro-intestinale élevée. Les simulations de docking ont confirmé des interactions solides entre les analogues et la cyclooxygénase-2 (COX-2), ainsi qu'avec diverses protéines bactériennes, suggérant leur potentiel à la fois anti-inflammatoire et antibactérien. De plus, les simulations de dynamique moléculaire ont validé la stabilité structurale des analogues lors de leurs interactions avec la COX-2.

Sur le plan toxicologique, les analogues présentent un profil sécuritaire avec une toxicité modérée, sans risque de cancérogénicité, et un faible impact environnemental.

En conclusion, les résultats mettent en évidence le potentiel thérapeutique des analogues amides de la pipérine, en particulier les analogues 08 et 09, en tant qu'anti-inflammatoires, analgésiques et antibactériens prometteurs. Ces composés méritent des études précliniques supplémentaires pour évaluer leur efficacité et leur sécurité.

**Mots Clés.** Pipérine, *in silico*, Cyclooxygénase2, Anti-inflammatoire, Antibactérien, Analogues amides.

## ABSTRACT

This study covers the extraction, characterization, synthesis and evaluation of the biological properties of piperine and its synthetic analogues of type N-aryl amide. It aims to explore their potential as anti-inflammatory, analgesic and antibacterial agents, while combining experimental and in silico approaches.

Piperine was extracted from black pepper by various methods, including glacial acetic acid extraction, which resulted in a pure and crystalline product. Its chemical structure has been confirmed by spectral techniques (UV, IR, NMR). Then, two amide analogues of piperic acid (08 and 09) were synthesized with high yields (64.7% and 70.12%), and their structure was validated by similar analyses.

In vivo biological studies have shown that piperine and its analogues have significant anti-inflammatory and analgesic activities. Piperine, given at a dose of 50 mg/kg, showed effects comparable to aspirin (150 mg/kg) and tramadol for anti-inflammatory and analgesic activities respectively.

In vitro assays revealed no significant antibacterial activity for piperine and piperic acid, while 08 and 09 analogues showed antibacterial activity against the tested strains. In parallel, the ADME-type in silico studies of analogues showed high gastrointestinal absorption. Docking simulations confirmed strong interactions between the analogues and cyclooxygenase-2 (COX-2), as well as with various bacterial proteins, suggesting their potential to be both anti-inflammatory and antibacterial. Furthermore, molecular dynamics simulations validated the structural stability of analogues during their interactions with COX-2.

The analogues have a safe profile with moderate toxicity, no risk of carcinogenicity and low environmental impact.

In conclusion, the results highlight the therapeutic potential of piperine amide analogues, particularly 08 and 09, as promising anti-inflammatory, analgesic and antibacterial. These compounds merit additional preclinical studies to assess their efficacy and safety.

**Keywords.** Piperine, in silico, Cyclooxygenase, Anti-inflammatory, Antibacterial, Amides analogues.

## الملخص

تتناول هذه الدراسة استخراج، توصيف، تخليق وتقييم الخصائص البيولوجية للـ بيبيرين ونظائرها الاصطناعية من نوع ان اريل اميد تهدف إلى استكشاف إمكاناتها كعوامل مضادة للالتهابات، مسكنة ومضادة للبكتيريا، مع الجمع بين النهج التجريبية والحاسوبية (إن سيليكو)

تم استخراج الـ بيبيرين من الفلفل الأسود باستخدام طرق متعددة، بما في ذلك الاستخلاص بحمض الأسيتيك الجليدي، مما أسفر عن منتج نقي ومتبلور. تم تأكيد بنيته الكيميائية باستخدام تقنيات طيفية (فوق البنفسجي، الأشعة تحت الحمراء، الرنين المغناطيسي النووي). بعد ذلك، تم تخليق نظيرين أميديين لحمض الـ بيبيريك (08 و09) بمرود مرتفع (64.7% و70.12%)، وتمت المصادقة على بنيتهما بتحليلات مماثلة

كشفت الدراسات البيولوجية الحية (إن فيفو) أن الـ بيبيرين ونظائره يمتلكون نشاطات مضادة للالتهابات ومسكنة بارزة. أظهر الـ بيبيرين عند إعطائه بجرعة 50 ملغ/كغ تأثيرات مشابهة للأسبرين (150 ملغ/كغ) وللترامادول، على التوالي للنشاطات المضادة للالتهابات والمسكنة

لم تُظهر التحاليل المخبرية (إن فيترو) أي نشاط مضاد للبكتيريا ملحوظ لكل من الـ بيبيرين وحمض الـ بيبيريك، بينما أظهر النظيران 08 و09 نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد السلالات المختبرة. بالتوازي، أظهرت الدراسات الحاسوبية (إن سيليكو) من امتصاصاً عاليًا في الجهاز الهضمي للنظائر. وأكدت محاكاة الجزيئية تفاعل قوي بين النظائر وإنزيم الـ سايكلوأوكسيجيناز وكذلك مع بروتينات بكتيرية متنوعة، مما يشير إلى إمكاناتها كمضادات للالتهاب والبكتيريا. علاوة على ذلك، أكدت محاكاة الديناميكا الجزيئية الاستقرار البنوي للنظائر أثناء تفاعلاتها مع الـ سايكلوأوكسيجيناز-2

على الصعيد السمي، تظهر النظائر ملفاً آمناً مع سمية معتدلة، دون مخاطر سرطانية، وتأثير بيئي منخفض ختاماً، تسلط النتائج الضوء على الإمكانيات العلاجية لنظائر الـ بيبيرين الأميدية، خاصة النظيرين 08 و09، كعوامل واعدة مضادة للالتهاب، مسكنة، ومضادة للبكتيريا. تستحق هذه المركبات دراسات ما قبل سريرية إضافية لتقييم فعاليتها وسلامتها

**الكلمات المفتاحية :** بيبيرين، إن سيليكو، سايكلوأوكسيجيناز-2، مضاد للالتهاب، مضاد للبكتيريا، نظائر الأميدات

### INTRODUCTION

L'inflammation est une réponse naturelle de l'organisme à un traumatisme biologique, physique ou chimique. Bien que cette réaction soit essentielle à la défense de l'organisme, sa persistance peut provoquer des douleurs et diverses pathologies nécessitant souvent des traitements à base d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). (1)

Parmi les différentes approches thérapeutiques contre l'inflammation, l'inhibition sélective de la cyclooxygénase-2 (COX-2) s'est révélée particulièrement efficace. Plusieurs composés, tels que le célécoxib et le rofécoxib, inhibent spécifiquement la synthèse des prostaglandines en agissant sur la COX-2. Cependant, la plupart des AINS sont associés à des effets indésirables graves, notamment des ulcères gastro-intestinaux, des saignements et des accidents cardiovasculaires graves. (2) Il est donc crucial de développer de nouveaux anti-inflammatoires puissants, efficaces et mieux tolérés.

En parallèle, les maladies infectieuses et la résistance bactérienne représentent un problème de santé publique majeur. Pour y faire face, nous avons contribué au développement de nouveaux inhibiteurs des enzymes et protéines essentielles des bactéries telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, car la survie de ces organismes dépend de ces cibles.(3)

La recherche de nouvelles molécules bioactives est un domaine d'intérêt majeur en chimie médicinale et en pharmacologie. Parmi les molécules naturelles étudiées, la pipérine est un alcaloïde majeur du poivre noir, utilisé depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour traiter divers maux. Les recherches modernes ont confirmé que la pipérine possède plusieurs propriétés thérapeutiques.

Les principales propriétés thérapeutiques de la pipérine incluent :

-Activité analgésique : La pipérine est capable de réduire la douleur en modulant les voies de signalisation neuronale.(4-6)

-Propriétés anti-inflammatoires : Elle inhibe la production de médiateurs inflammatoires, réduisant ainsi l'inflammation.(4,7-9)

-Activité antibactérienne : La pipérine peut inhiber la croissance de diverses bactéries pathogènes, ce qui en fait un potentiel agent antimicrobien.(10)

La conception de médicaments *in silico* utilise des techniques de modélisation informatique pour prédire l'interaction entre les molécules et leurs cibles biologiques. (11)

Cette approche permet de :

- Accélérer le processus de découverte de médicaments en réduisant le nombre de composés à tester expérimentalement. (11)
- Optimiser la structure des composés pour améliorer leur efficacité et réduire les effets secondaires.
- Économiser du temps et des ressources en identifiant rapidement les candidats les plus prometteurs. (11)

Dans ce travail, nous avons développé des analogues originaux de l'acide pipérique, dérivé numéro un de la pipérine, en introduisant sur le groupement carboxylique des amines aromatiques cycliques ou acycliques portant diverses substitutions.

L'objectif principal de cette étude est de concevoir *in silico* de nouveaux analogues amides de l'acide pipérique et d'évaluer leurs activités biologiques.

Les étapes clés de cette recherche incluent :

- Conception et modélisation des analogues : Utiliser des logiciels et serveurs de modélisation moléculaire pour concevoir des analogues de l'acide pipérique.
- Synthèse chimique : Préparer les analogues conçus en laboratoire.
- Évaluation des activités biologiques : Tester les meilleurs analogues pour leurs propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et antibactériennes à l'aide de méthodes *in vitro* et *in vivo*.
- Analyse comparative : Comparer les résultats obtenus avec ceux de la pipérine naturelle pour déterminer les améliorations potentielles.

Notre objectif secondaire était d'analyser diverses techniques d'isolation de la pipérine à partir du poivre noir et de vérifier ses effets anti-inflammatoires, analgésiques et antibactériens en les confrontant aux données issues de différentes études scientifiques.

PARTIE A.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA  
DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES**

**I.1. Inflammation :**

L'inflammation est la réponse du système immunitaire aux stimuli nocifs, tels que les agents pathogènes, les cellules endommagées, les composés toxiques ou l'irradiation (1). Elle agit en éliminant les stimuli nuisibles et en amorçant le processus de guérison. L'inflammation est donc un mécanisme de défense vital pour la santé. (12,13)

**I.1.1. Les étiologies d'une réaction inflammatoire :**

Divers facteurs pathogènes, comme une infection, une lésion tissulaire ou un infarctus cardiaque, peuvent provoquer une inflammation en endommageant les tissus. Les étiologies de l'inflammation peuvent être infectieuses ou non (Tableau 01). En réponse à une lésion tissulaire, le corps initie une cascade de signalisation chimique qui stimule les réponses visant à guérir les tissus touchés. Ces signaux activent le chimiotactisme des leucocytes, attirant ces derniers depuis la circulation générale vers les sites endommagés. Ces leucocytes activés produisent des cytokines qui induisent des réponses inflammatoires.(14)

**Tableau 01 :** Étiologie de l'inflammation(2)

| <b>Facteurs non infectieux</b>  | <b>Facteurs infectieux</b>                   |
|---|--|
| Physique : brûlures, engelure, blessures physiques, corps étrangers, traumatismes, radiations.<br>Produits chimiques : glucose, acides gras, toxines, alcool, irritants chimiques (y compris le fluorure, le nickel et d'autres oligo-éléments).<br>Biologie : cellules endommagées.<br>Psychologique : excitation. | Bactérie<br>Virus<br>Autres micro-organismes |

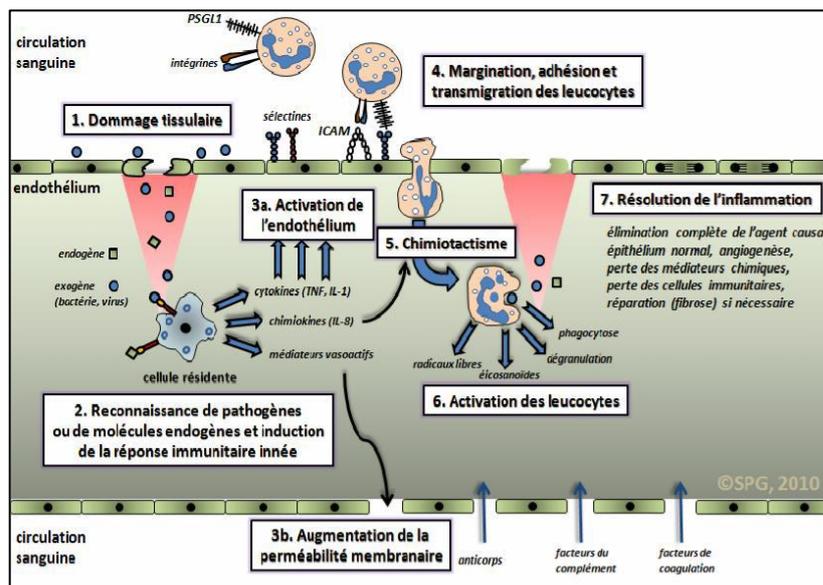
**I.1.2. Les mécanismes de réponse inflammatoire :**

***I.1.2.1. Les différents types d'inflammation :***

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoire :

## 1.1.2.1.1. Inflammations aiguës :

L'inflammation aiguë est une réponse physiologique complexe, qui implique la participation des deux branches du système immunitaire : l'immunité innée et l'immunité adaptative. C'est une réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), à l'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses.(15) Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante. (Figure1) (16)



**Figure 01** : Les principales étapes de l'inflammation aiguë. (15)

*Les phases de l'inflammation aiguë :*

- La phase vasculaire (réaction vasculo-exsudative)

Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire très brève (quelques secondes), rapidement ressentie comme douloureuse. Cette douleur est expliquée par la libération de médiateurs tels que l'histamine, la sérotonine et la kinine, qui excitent les terminaisons nerveuses, renforçant ainsi le processus douloureux. Cette constriction agit également sur les plaquettes circulantes, perturbant la circulation et entraînant leur activation. (17)

Rapidement, cette vasoconstriction est suivie d'une vasodilatation des vaisseaux sanguins, provoquée par l'histamine et les prostaglandines libérées par les mastocytes. Cela entraîne une augmentation du débit sanguin local et une perméabilité accrue des capillaires, favorisant l'extravasation des cellules sanguines (diapédèse). Ce phénomène contribue à l'apparition de chaleur et de rougeur au site de l'inflammation. La migration des cellules s'accompagne d'un transfert de plasma, ce qui provoque la formation d'un œdème. Le liquide extravasé, appelé

## CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES

exsudat, contient de l'eau, des protéines plasmatiques et des cellules immunitaires, qui convergent vers le foyer lésionnel. (17)

➤ La phase cellulaire (recrutement des leucocytes)

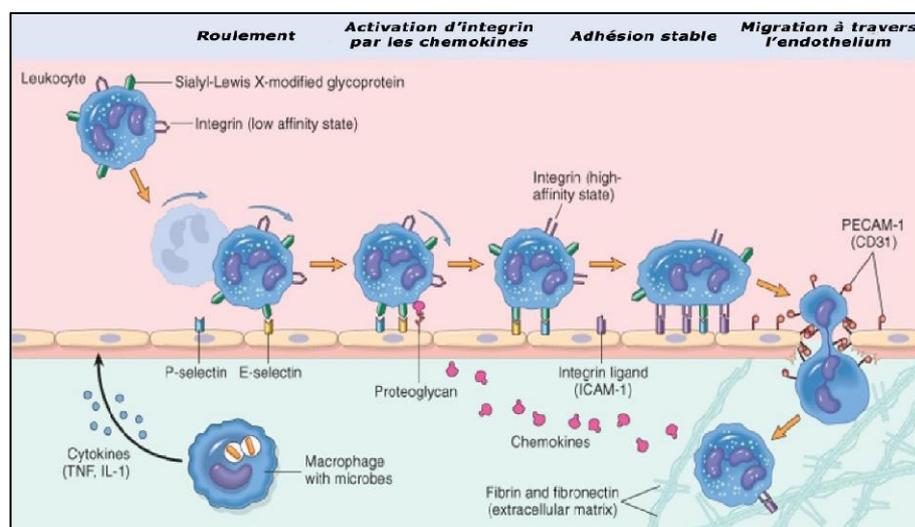
Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée des leucocytes au site inflammatoire. (18) Les cellules endothéliales jouent un rôle clé dans cette étape. Sous l'effet des médiateurs libérés lors de la phase précédente (comme les dérivés du complément, la thrombine, la bradykinine, l'histamine, le PAF, les prostaglandines, les cytokines inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et INF- $\gamma$ , ainsi que les espèces réactives de l'oxygène), elles s'activent et expriment des molécules d'adhésion nécessaires au recrutement des leucocytes.(15)

Le recrutement des leucocytes se déroule en trois étapes :

1. **Roulement sur la surface de l'endothélium** : Médié par les sélectines.
  2. **Adhésion ferme** : Impliquant les E-sélectines, ainsi que les molécules ICAM-1 et VCAM-1, appartenant à la famille des immunoglobulines.
  3. **Transmigration à travers l'endothélium** : Facilitée notamment par PECAM-1. (15)
- (Figure 2)

Les neutrophiles constituent les principaux leucocytes recrutés au cours de l'inflammation aiguë. Cependant, les cellules endothéliales recrutent également des monocytes, des lymphocytes B et T, ainsi que d'autres leucocytes.(19)

Le TNF- $\alpha$  stimule la dégranulation des neutrophiles, augmentant leur capacité à libérer des protéases (comme l'élastase et la collagénase), des peptides antimicrobiens et des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS).(20,21)



**Figure 02** : Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins.(15)

### ➤ Phase de résolution et la réparation

La phase de résolution, appelée également phase de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. Dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles (PMNs), tandis que les produits de dégradation et les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. (22)

Ces macrophages sécrètent des cytokines et des médiateurs qui induisent la cicatrisation et la régénération tissulaire. Le retour à un état physiologique commence par la réparation de l'endothélium, réalisée par les cellules endothéliales elles-mêmes. Ces dernières produisent et remodelent les composants de leur stroma (collagène de type I et III) ou de leur lame basale (collagène de type IV et V, laminine).

Dans le cas de lésions plus sérieuses entraînant une destruction importante des tissus, d'autres cellules interviennent pour restaurer le tissu. Les macrophages contribuent à l'angiogenèse, mais les fibrocytes, suivis des fibroblastes, produisent les protéines matricielles des tissus intercellulaires, telles que le collagène, la fibronectine et la laminine, afin de permettre la reconstruction des tissus.(22)

### ***1.1.2.1.2. Inflammations chroniques :***

L'inflammation chronique est une inflammation prolongée qui peut survenir dans trois contextes principaux :

- **La persistance de micro-organismes de faible toxicité**, comme le bacille de Koch (BK).
- **L'exposition prolongée à des agents toxiques :**
  - Exogènes, tels que les contacts répétés avec le ciment ou les cosmétiques.
  - Endogènes, comme l'athérosclérose, réaction des parois vasculaires aux LDL.
- **L'auto-immunité :** Réaction dirigée contre des antigènes du soi modifiés, comme dans la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux.(22)

De façon schématique, l'inflammation chronique se distingue de l'inflammation aiguë par :

- La coexistence prolongée des étapes vasculaires et d'amplification décrites précédemment.
- Une persistance de l'inflammation dans le temps.
- Des destructions tissulaires importantes.(22)

### **1.1.2.2. Les médiateurs de l'inflammation :**

#### ***1.1.2.2.1. Les systèmes d'activation plasmatique :***

Les conséquences fonctionnelles de cette activation sont l'élimination du pathogène (par ex. par phagocytose) et/ou la réparation de la lésion.

## CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES

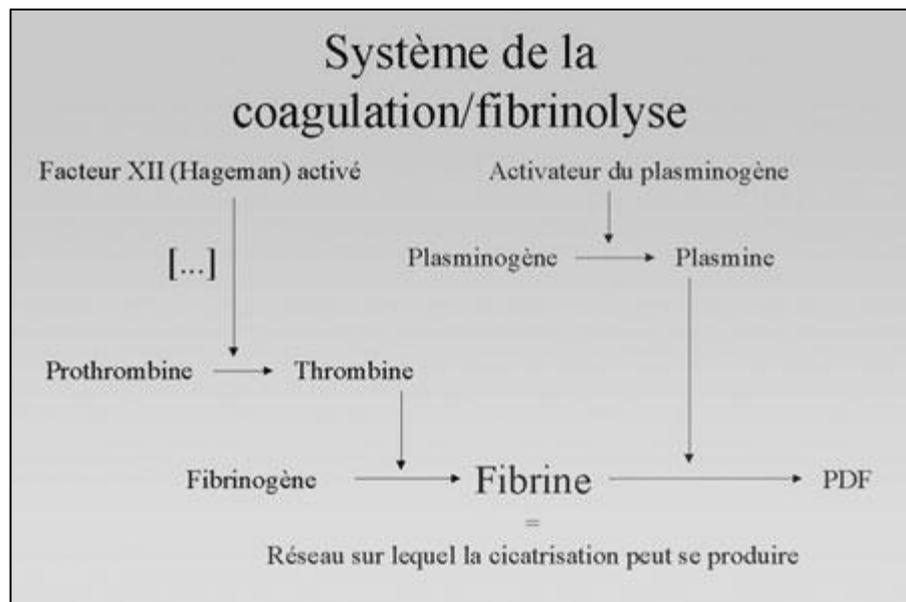
### ➤ Les systèmes coagulation / fibrinolyse :

Les relations entre l'inflammation et le système de coagulation sont complexes. La présence de dépôts de fibrine, tant intra-vasculaires qu'extra-vasculaires, est presque systématique dans les processus inflammatoires.

Au cours de la coagulation, une cascade de protéolyse conduit à la conversion du fibrinogène en fibrine. La fibrine joue un rôle essentiel dans l'exsudat inflammatoire :

- Elle délimite le foyer inflammatoire, empêchant la propagation de l'inflammation.
- Elle forme une matrice permettant le déplacement des cellules inflammatoires vers le site de la lésion.(23)

Cependant, la coagulation est étroitement régulée par un équilibre avec la fibrinolyse. La plasmine, enzyme clé de la fibrinolyse, dégrade la fibrine en fragments, appelés produits de dégradation de la fibrine (PDF).(23)



**Figure 03 :** Système de la coagulation/fibrinolyse.(1)

### ➤ Le système du complément et inflammation :

Le système du complément, en particulier par l'intermédiaire du composant C3 et de ses produits de dégradation, joue un rôle crucial dans l'inflammation. Il active les cellules porteuses des récepteurs CR1, CR2, CR3 et CR4, ce qui entraîne la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires.(24)

- ### ➤ Le système des kinines/Kallicréine :
- Les kinines constituent une petite famille de peptides comprenant la bradykinine (BK), la kallidine et leurs métabolites actifs. La bradykinine est produite suite à l'activation du facteur de Hageman (ou facteur

## CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES

---

XII) du système de coagulation sanguine, lorsqu'il entre en contact avec le collagène après une lésion vasculaire. Ce peptide vasoactif très puissant induit :

- La dilatation des veinules,
- L'augmentation de la perméabilité vasculaire,
- La contraction locale des muscles lisses.

Ces événements favorisent le recrutement des leucocytes sur le site inflammatoire.(25)

### ***1.1.2.2. Les médiateurs cellulaires :***

#### ➤ L'Histamine :

L'histamine est principalement stockée dans les basophiles et les mastocytes sous forme préformée, liée aux protéoglycans. Elle provoque la constriction des veines et des artères (effets H1) et, au contraire, la dilatation des artérioles et des capillaires (effets H1 + H2). Elle augmente également, in vivo, la perméabilité capillaire (effet H1). L'histamine joue ainsi un rôle modulateur important dans les réactions inflammatoires et les réponses immunitaires.(26)

#### ➤ Les radicaux libres :

L'inflammation est une source majeure de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées. (27)

Dans la minute suivant le contact avec une particule étrangère, les neutrophiles induisent une augmentation de la consommation d'oxygène. Tout l'oxygène consommé est réduit par le NADPH en ion superoxyde. Dans le phagosome, les ions superoxydes sont convertis en eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et, en présence d'ion chlorure et de l'enzyme myéloperoxydase, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est transformée en acide hypochlorique. Ce dernier agit sur la membrane des bactéries en fixant le chlore, en oxydant les groupements SH et en décarboxylant les acides aminés en aldéhydes, ce qui entraîne la perte de l'intégrité de la membrane bactérienne. (28)

L'activation de la NOS macrophagique stimule la formation de monoxyde d'azote (NO) à partir de l'arginine. Le NO est un puissant vasodilatateur et peut générer, en combinaison avec les radicaux libres, des peroxy-nitrites très délétères.(27,28)

#### ➤ Les Eicosanoides :

L'activité de la cyclooxygénase (COX) conduit à la formation de prostaglandines (PG) et de thromboxanes (TX). Ces médiateurs sont essentiellement libérés par les cellules endothéliales, les macrophages, les mastocytes, les plaquettes et les fibroblastes.

Les leucotriènes (LT) sont synthétisés par des réactions catalysées par les lipoxygénases. La 5-lipoxygénase est une enzyme dont la distribution est limitée à certaines cellules d'origine médullaire, aux polynucléaires neutrophiles (PNN), aux éosinophiles, basophiles, aux

## CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES

---

monocytes/macrophages, aux mastocytes et aux lymphocytes B. Parmi les médiateurs inflammatoires lipidiques les plus puissants, on trouve la PGE<sub>2</sub>, la PGI<sub>2</sub> et le LTB<sub>4</sub>, qui contribuent au recrutement des cellules immunitaires sur le site inflammatoire.(29)

➤ Les cytokines :

Les cytokines sont des molécules pro-inflammatoires de nature protéique produites principalement par des macrophages activés. Elles permettent aux cellules de communiquer au sein du système immunitaire, mais aussi entre le système immunitaire et les autres systèmes de l'organisme.(30)

- **TNF- $\alpha$**  : Il s'agit d'une cytokine pro-inflammatoire produite par les mastocytes et les macrophages. Le TNF- $\alpha$  possède deux récepteurs principaux : le TNFR1 et le TNFR2, qui diffèrent par leur domaine intracellulaire. Le TNF- $\alpha$  stimule l'expression de molécules d'adhésion et la production de chimiokines par les cellules endothéliales, permettant le recrutement des leucocytes sanguins (neutrophiles, éosinophiles, monocytes ou cellules NK) vers le foyer inflammatoire. De plus, il peut induire l'apoptose de certaines cellules.(22)
- **IL1** : L'interleukine 1 se compose de deux isoformes : IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . L'IL-1 agit sur le système nerveux central en déclenchant la fièvre, et elle induit la synthèse des eicosanoïdes et de l'oxyde nitrique. Elle stimule également la synthèse du collagène.(22,31)
- **IL6** : IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire produite par de nombreux types cellulaires. Elle induit la sécrétion des protéines de la phase aiguë et joue un rôle dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (LB) et des lymphocytes T cytotoxiques (LT) dans la réponse immunitaire spécifique.(22)

### I.2. Douleur :

Selon la définition de l'IASP (International Association for the Study of Pain), la douleur est « une sensation désagréable et une expérience émotionnelle en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en ces termes ».

La douleur est donc une expérience s'articulant autour de quatre composantes fondamentales :

- **Sensori-discriminative**
- **Affective et émotionnelle**
- **Cognitive**
- **Comportementale**

## CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES

---

En s'intéressant à la première composante sensori-discriminative de la douleur, Sherrington, neurophysiologiste anglais de la fin du XIXe siècle, a créé le terme de « Nociception » qui caractérisait des stimulations sensorielles de haute **intensité**, celles qui étaient « susceptibles de remettre en cause l'intégrité physique de l'organisme ». (32,33)

Ainsi, une stimulation périphérique nociceptive de forte **intensité** déclenche une cascade d'**événements** physiologiques conduisant à l'intégration des informations codant pour les différents aspects de la douleur. Des perturbations peuvent être à l'origine du prolongement dans le temps du processus à l'origine de la douleur, conduisant au développement d'une douleur chronique parfois sans cause organique, qui laisse le plus souvent le thérapeute désarmé et pour laquelle l'apport de la recherche n'en est encore qu'à ses balbutiements. La douleur perd alors sa signification de signal d'alarme pour évoluer vers un véritable syndrome chronique dont les effets délétères sont le plus souvent handicapants. (32,33)

### **I.2.1. Evaluation de la douleur :**

#### ***I.2.1.1. Localisation de la douleur :***

Le schéma des zones douloureuses, ou dessin de la douleur, permet de localiser et de visualiser les régions affectées. Le patient indique ces zones sur un dessin d'un corps humain imprimé. Ces informations orientent le bilan étiologique en identifiant les zones anatomiques concernées.(33)

#### ***I.2.1.2. Intensité de la douleur :***

- ✓ Echelle visuelle analogique (EVA) :

La forme classique comporte une ligne horizontale de 100 mm de long, sur laquelle le patient indique l'intensité de sa douleur en traçant un trait (forme papier) ou en déplaçant un curseur (réglette mécanique). Les échelles visuelles analogiques offrent une mesure continue, permettant une évaluation fine de l'intensité de la douleur.(33,34)

- ✓ Echelle numérique (EN) :

L'échelle numérique demande au patient d'attribuer une note de 0 à 10 à son ressenti, où 0 signifie « pas de douleur » et 10 représente la « douleur maximale imaginable».(33)

- ✓ Echelle verbale simple (EVS) :

Les échelles verbales simples évaluent l'intensité de la douleur en demandant au patient de choisir un adjectif descriptif, chaque choix correspondant à un score prédéfini. La mesure se limite généralement à cinq ou six niveaux. (33)

### **I.2.2. Types de douleur :**

Il existe plusieurs types de douleur que l'on peut classer selon leur mécanisme physiopathologique (excès de nociception, neuropathique, psychogène) ou leur durée d'évolution (aiguë ou chronique). (33)

#### **I.2.2.1. Selon le mécanisme physiopathologique :**

Pour les mécanismes physiopathologiques, trois types de douleurs peuvent être distingués :

- La douleur par excès de nociception : Ce type de douleur résulte d'une augmentation de la transmission des messages douloureux transportés par les fibres fines. La douleur postopératoire en est un exemple typique. Elle est généralement limitée dans le temps et souvent aiguë. Pour traiter ces douleurs, il est nécessaire d'utiliser des antalgiques (aspirine, paracétamol, etc.). (33)
- La douleur neuropathique : Également appelée douleur de désafférentation, elle résulte d'une lésion nerveuse responsable d'un dysfonctionnement dans la transmission et le contrôle des messages douloureux. (35)

Les principales causes de douleurs neuropathiques incluent l'amputation (membre fantôme), la douleur consécutive au zona (douleur post-zostérienne), les lésions nerveuses et la paraplégie. Les traitements de première intention ne sont pas les antalgiques classiques, mais plutôt certains antidépresseurs imipraminiques et antiépileptiques. (35)

- Les douleurs psychogènes regroupent toutes les douleurs qui ne peuvent pas être classées dans les deux catégories précédentes. Elles se caractérisent par l'absence de lésions apparentes et sont souvent liées à des problèmes psychologiques, psychiques ou sociaux. (32)

#### **I.2.2.2. Selon la durée d'évolution :**

La douleur peut également être classée en fonction de sa durée d'évolution :

- La douleur aiguë est une douleur vive, immédiate et généralement brève. Elle est causée par une stimulation nociceptive de l'organisme et joue un rôle de signal d'alarme. Sa durée d'évolution est généralement inférieure à trois mois. (33)
- La douleur chronique est une douleur qui persiste au-delà du délai habituel de cicatrisation (généralement trois mois). Contrairement à la douleur aiguë, qui est une réponse adaptée à une cause spécifique (par exemple, la cicatrisation après une blessure), la douleur chronique perd ce caractère adaptatif. Elle agit directement sur la personne qui en souffre, que ce soit immédiatement (d'emblée) ou de manière secondaire, et a également un impact sur son entourage familial et social, y compris son environnement

## CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES

---

professionnel (conditions de travail, etc.). Tous ces éléments doivent être pris en compte lors de la prise en charge pour une approche globale et efficace..(35)

### I.2.3. La Physiologie de la douleur :

#### *I.2.3.1. De la périphérie à la moelle épinière :*

La douleur résulte de l'excitation des nerfs, plus précisément de certaines fibres nerveuses, qui génèrent un « message nerveux » : le stimulus douloureux. Cet influx nerveux prend naissance au niveau des récepteurs spécialisés, appelés **nocicepteurs**, situés à l'endroit où l'organisme subit une agression. Ces nocicepteurs sont constitués de terminaisons nerveuses sensibles aux stimulations douloureuses. (34)

Ces récepteurs nociceptifs sont présents dans divers tissus, notamment la peau, les veines, les artères, les muqueuses, les tendons, les os et les viscères. (34)

Les informations sensorielles captées par les récepteurs cutanés sont transportées et traitées par deux systèmes distincts :

- Ce système correspond à la sensibilité musculaire, tendineuse et à une partie de la sensibilité tactile. Il est constitué de fibres nerveuses volumineuses, fortement myélinisées, qui assurent une transmission rapide de l'influx nerveux. (36)
- Ce système véhicule la sensibilité thermique (chaud et froid), la douleur et une partie de la sensibilité tactile. Il est composé de petites fibres nerveuses, peu ou pas myélinisées, qui transmettent l'influx nerveux plus lentement.

Les fibres nociceptives qui transmettent l'influx de la moelle épinière au thalamus, puis du thalamus au cortex, se distinguent par leur calibre et leur fonction :

- **Les fibres A alpha et A bêta :**

Ces fibres, de gros calibre et entourées de myéline, jouent un rôle d'accélérateur dans la transmission de l'influx nerveux. Elles sont responsables de la perception des différences de température (chaud, froid) et de pression. (36)

- **Les fibres A delta :**

Plus fines que les fibres A alpha et bêta mais également myélinisées, ces fibres transmettent l'influx nerveux environ 10 fois plus lentement. Elles sont spécifiquement activées par des stimulations mécaniques (pincement, piqûre) ou thermiques (chaleur). (36)

- **Les fibres C :**

Particulièrement fines et dépourvues de myéline en périphérie, ces fibres jouent un rôle prédominant dans la détection et le codage de l'intensité de la douleur. Leur vitesse de

## CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES

---

conduction est lente, et elles véhiculent l'influx nerveux perçu par le cerveau comme une douleur. (36)

Une lésion tissulaire aboutit à l'accumulation de substances algogènes (telles que la bradykinine, l'histamine, la sérotonine et les prostaglandines PGE-1 et PGE-2), qui sont impliquées dans la genèse des phénomènes douloureux. Ces substances sensibilisent les récepteurs des terminaisons nerveuses sensibles, les rendant plus réactives à l'action des médiateurs algogènes. (36)

### *1.2.3.2. De la moelle épinière au cerveau :*

Des faisceaux nerveux ascendants acheminent le message douloureux jusqu'aux zones cérébrales dédiées à la perception de la douleur. Ce message passe par plusieurs « points de contrôle ». Par exemple, au niveau du tronc cérébral, des neurones constituent des voies descendantes inhibitrices qui bloquent la perception de la douleur en inhibant les réflexes nociceptifs (c'est-à-dire l'enchaînement des mécanismes ascendants, allant de la périphérie vers le cerveau). (33)

Les systèmes **lemniscal** et **extra-lemniscal** convergent vers le thalamus, une zone profonde du cerveau où les informations sont traitées. Le thalamus intègre le message douloureux avec d'autres informations sensorielles, comme celles provenant de la vue, de l'ouïe et de l'équilibre. (33,36)

Après ce traitement, l'information est projetée au niveau du **cortex pariétal**, où elle acquiert une représentation consciente grâce aux neurones corticaux. (33,36)

- **Le système lemniscal** fournit des informations conscientes détaillées sur la localisation et la nature de la stimulation. (33,36)
- **Le système extra-lemniscal**, quant à lui, fonctionne comme un système d'alarme. Il permet des réactions rapides de retrait face à une agression (par exemple, retirer la main d'une source de chaleur) et des adaptations physiologiques, comme les réponses circulatoires aux changements de température. (33,36)

La différence entre ces deux systèmes explique pourquoi, en cas de lésion affectant uniquement l'un d'entre eux, on observe des symptômes neurologiques distincts. (33,36)

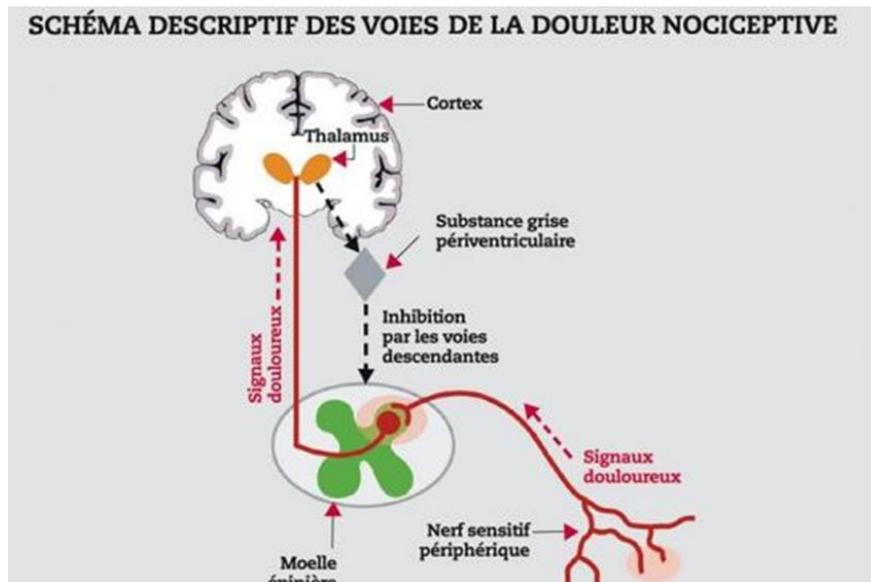


Figure 04 : Les voies de la douleur.(37)

### I.3. Infections bactériennes :

#### I.3.1. Les bactéries :

##### I.3.1.1. Définitions :

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires capables de se reproduire de manière autonome, contrairement aux virus qui nécessitent une cellule hôte pour se multiplier. Leur taille varie généralement entre **1 et 10  $\mu\text{m}$** , et leur poids est de l'ordre de  **$10^{-12}$  grammes**. Elles sont omniprésentes dans l'environnement : environ **8 000 espèces** sont connues, mais on estime qu'il en existerait **100 à 1 000 fois plus**. (38)

Les bactéries sont des organismes remarquablement adaptables. Elles peuvent être à l'origine de maladies graves ou simplement coloniser des surfaces, comme la peau. Par exemple, dans le système digestif, le **microbiote intestinal** est composé d'environ **1 000 milliards de bactéries**. Ce microbiote joue un rôle essentiel dans la digestion et la défense de l'organisme. Certaines bactéries sont même utilisées dans l'alimentation (comme les probiotiques) ou dans des médicaments pour rééquilibrer le microbiote et rétablir une fonction digestive normale, notamment après des épisodes de diarrhée. (39)

##### I.3.1.2. Classification des bactéries :

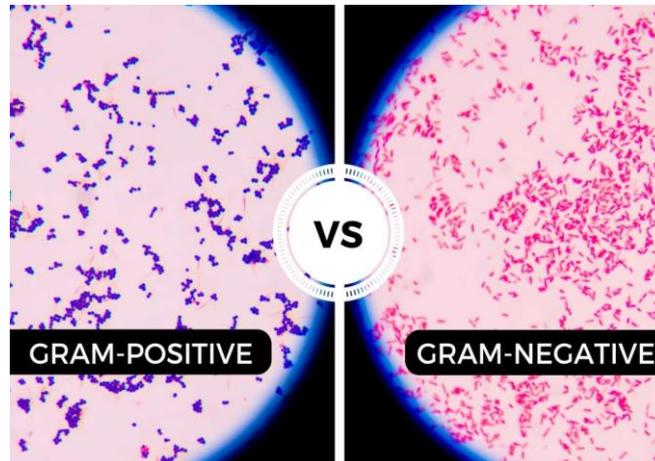
La **coloration de Gram** est une méthode de classification des bactéries découverte en 1884 par le pharmacien, médecin et bactériologiste danois **Hans Christian Gram**. Encore largement utilisée aujourd'hui, cette technique permet de distinguer les bactéries en deux grands groupes :

## CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES

---

- **Bactéries à Gram positif** (qui retiennent le colorant violet).
- **Bactéries à Gram négatif** (qui ne retiennent pas le colorant et prennent une teinte rose ou rouge).

Cette classification est essentielle pour identifier le type de bactérie impliqué dans une infection et pour guider le choix du traitement antibiotique approprié. (39)



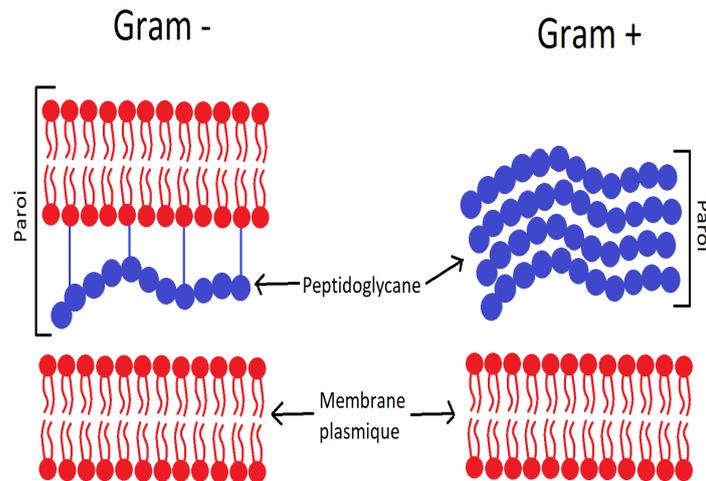
**Figure 05** : La coloration de Gram.(39)

- ✓ Bactéries gram positives :

Les bactéries Gram positives apparaissent **violettes** au microscope après la coloration de Gram. Cette caractéristique est due à leur paroi cellulaire, qui est particulièrement **épaisse et uniforme**. Cette paroi est recouverte d'une couche importante de **peptidoglycane**, un polymère complexe composé de deux parties principales.

**Exemples de bactéries Gram positives :**

- **Staphylococcus aureus** (staphylocoque doré).
- **Streptococcus pneumoniae** (pneumocoque).



**Figure 06** : La paroi des bactéries à Gram – bactéries à Gram +(39)

✓ Bactéries gram négatives :

Les bactéries à Gram négatif possèdent une paroi cellulaire plus complexe. La couche de peptidoglycane, plus fine que celle des bactéries à Gram positif, est entourée par une membrane externe composée de lipopolysaccharides (LPS) et de lipoprotéines. (40) La partie lipopolysaccharidique, qui contient des endotoxines, joue un rôle majeur dans le pouvoir pathogène de ces bactéries.

Les infections bactériennes à Gram négatif incluent, entre autres, les infections à **Escherichia coli (E. coli)** et **Pseudomonas spp.** (40)

Cependant, il est important de noter que la distinction entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif ne suffit pas pour classer efficacement ces micro-organismes. D'autres critères sont également pris en compte, tels que la morphologie bactérienne (coques, bacilles, etc.), leur mode de vie (aérobie ou anaérobie), leur mobilité, et bien d'autres caractéristiques. (3,40)

### **I.3.2. Maladies infectieuses :**

#### ***1.3.2.1. Définition :***

Une infection se définit comme le dépôt et la multiplication de micro-organismes dans les tissus ou sur les surfaces du corps, entraînant généralement des effets délétères. (41)

Les bactéries causent la majorité de leurs effets aigus en libérant des toxines, mais elles peuvent également provoquer des dommages en déclenchant une réponse inflammatoire. Cette réponse inflammatoire constitue une composante essentielle de la protection de l'hôte. Il est toutefois intéressant de noter que certaines bactéries virulentes, telles que les staphylocoques, sont capables d'inhiber partiellement l'inflammation pour faciliter leur survie et leur propagation. (42)

## CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES

### I.3.2.2. Types des infections :

#### I.3.2.2.1. Infections respiratoires :

L'air que nous inhalons contient des millions de particules en suspension, parmi lesquelles se trouvent des micro-organismes. La plupart de ces derniers sont inoffensifs (voir Tableau 02). Cependant, en présence d'une personne atteinte d'une infection des voies respiratoires, l'air peut être chargé d'un grand nombre de micro-organismes pathogènes susceptibles de provoquer des infections. (42)

**Tableau 02** : Principales causes des infections respiratoires.(41)

| La Maladie             | Définition   | Bactérie responsable   |
|------------------------|--|--|
| <b>Pharyngite</b>      | - Elle se définit par la triade suivante : mal de gorge, fièvre et inflammation du pharynx. (43)           | - Streptocoque du groupe A (SGA)<br>- Mycoplasma pneumoniae<br>- Chlamydia pneumoniae(41)  |
| <b>Laryngite aiguë</b> | - c'est une inflammation du larynx. (41)   | - Group A $\beta$ -hemolytic streptococcus<br>- M. catarrhalis<br>- H. influenzae<br>- Mycoplasma pneumoniae<br>- Chlamydia pneumoniae. (41)                 |
| <b>Sinusite</b>        | - c'est une inflammation des sinus paranasaux. (41)  | - Streptococcus pneumoniae<br>- Haemophilus influenzae<br>- Moraxella catarrhalis. (43)  |
| <b>Épiglottite</b>     | - c'est un état d'inflammation, d'œdème et obstruction de l'épiglotte et des structures environnantes.(41) | - Haemophilus influenzae<br>- Streptococcus Pneumoniae<br>-Corynebacterium diphtheriae<br>- Neisseria meningitidis. (44)                                     |
| <b>Bronchite aiguë</b> | - c'est Syndrome d'inflammation trachéale et bronchique associé à une infection respiratoire. (41)         | + Moins de 10% des cas sont causés par:<br>- Mycoplasma pneumoniae<br>- Chlamydia pneumoniae,<br>- Bordetella pertussis. (43)                                |
| <b>Pneumonie aiguë</b> | - c'est une infection du parenchyme pulmonaire. (44)   | - Streptococcus pneumoniae,<br>- Staphylococcus aureus<br>- Haemophilus Influenzae<br>- Enterobacteriaceae<br>- Legionella<br>- Pseudomonas aeruginosa. (44) |

## CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION, DE LA DOULEUR ET DES INFECTIONS BACTERIENNES

|                            |   |   |
|----------------------------|---|---|
| <b>Pneumonie chronique</b> | - Elle se caractérise par une toux persistante ou progressive, dyspnée, souvent avec production chronique d'expectorations, avec ou sans fièvre, durant des semaines ou des mois plutôt que des jours. (43) | - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .<br>- <i>Mycobacterium kansasii</i><br>- <i>Nocardia</i> spp.<br>- <i>Rhodococcus equi</i><br>- <i>Actinomyces</i> spp. (43) |
|----------------------------|---|---|

### 1.3.2.2.2. Infection urinaire :

Le système urinaire est l'un des sites les plus fréquemment touchés par les infections bactériennes, en particulier chez les femmes. Environ 20 à 30 % d'entre elles présentent une infection urinaire récurrente à un moment de leur vie, souvent sous forme de cystites ou d'urétrites. Chez les hommes, ces infections sont moins courantes et surviennent principalement après l'âge de 50 ans. Bien que la majorité des infections urinaires soient aiguës et de courte durée, elles contribuent néanmoins à une morbidité significative. Dans les cas graves, elles peuvent entraîner une perte de fonction rénale et des séquelles à long terme. (42)

*L'Escherichia coli* est la cause principale des infections urinaires ascendantes, mais d'autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, comme *Proteus mirabilis*, souvent associé aux calculs urinaires, sont également impliqués. Parmi les pathogènes courants dans les infections urinaires nosocomiales, on retrouve *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, et *Pseudomonas aeruginosa*. (42)

Parmi les bactéries Gram-positives, *Staphylococcus saprophyticus* se distingue par sa capacité à provoquer des infections urinaires, tandis que *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus* sont davantage associés aux infections chez les patients hospitalisés, notamment ceux atteints d'immunodéficience.

Dans le cas de disséminations urinaires d'origine hématogène, d'autres pathogènes peuvent être impliqués, tels que *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, ou encore *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose rénale. (42)

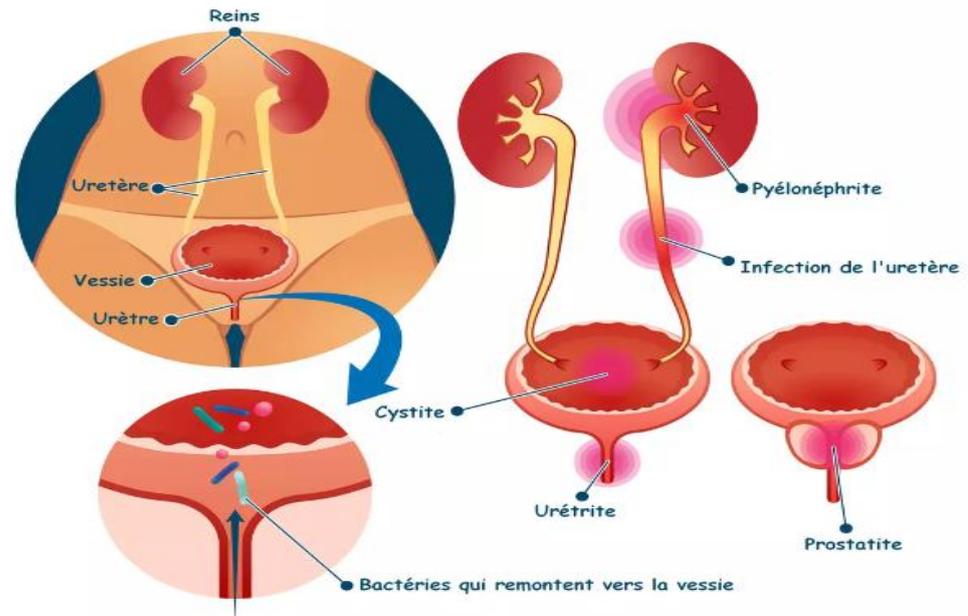


Figure 07 : Infection urinaire. (45)

#### ***1.3.2.2.3. Infection neurologique :***

Le cerveau et la moelle épinière sont protégés des agressions mécaniques, des déformations, et des infections grâce à leur confinement dans le crâne et la colonne vertébrale. Les vaisseaux sanguins et les nerfs traversant ces structures constituent cependant des voies potentielles d'invasion pour les bactéries. (42)

La **méningite** est une inflammation des méninges qui enveloppent et protègent le cerveau et la moelle épinière. Cette inflammation résulte généralement d'une infection du système nerveux central (SNC), qui peut être causée par des bactéries, des virus, ou, plus rarement, des parasites. (42)

#### ***Principaux agents étiologiques :***

- ***Streptococcus pneumoniae*** (pneumocoque) est la principale cause de méningite bactérienne dans le monde.
- ***Listeria monocytogenes*** est également un agent étiologique majeur. Les méningo-encéphalites causées par cette bactérie présentent un taux de mortalité atteignant jusqu'à 50 %, avec des séquelles neurofonctionnelles graves chez les survivants. (42)

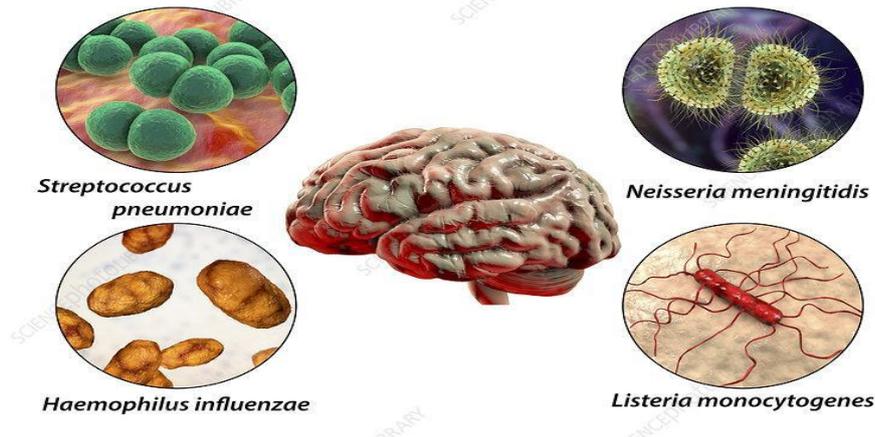


Figure 08 : Les principales causes des méningites bactériennes. (46)

#### I.3.2.2.4. Infections sexuellement transmises :

Les bactéries responsables des infections des systèmes reproducteurs sont généralement très sensibles aux contraintes environnementales, ce qui rend un contact intime indispensable pour leur transmission. La majorité de ces infections sont classées comme des infections sexuellement transmissibles (IST). Un aspect important des IST est que de nombreuses personnes infectées par les agents pathogènes les plus courants ne présentent aucun signe ou symptôme apparent, ce qui contribue à la propagation silencieuse de ces maladies. À ce jour, plus de **30 infections bactériennes, virales ou parasitaires** ont été identifiées comme étant transmissibles par voie sexuelle. (46)

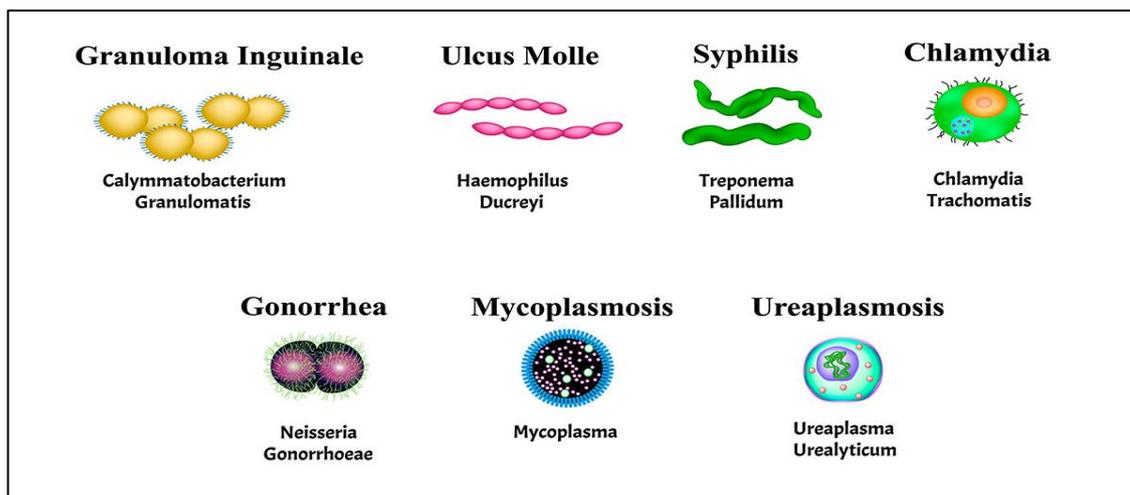


Figure 09 : Les principales causes d'infection bactérienne sexuellement transmise. (45)

### I.3.3. Résistance bactérienne :

La résistance bactérienne constitue une problématique majeure de santé publique, exacerbée par l'utilisation abusive ou inappropriée des antibiotiques en médecine humaine, vétérinaire, et dans l'agriculture. Ce phénomène complique le traitement des infections et entraîne une augmentation significative de la mortalité. En 2016, en France, les bactéries résistantes ont été responsables d'environ **140 000 infections hospitalières**, illustrant l'ampleur de cette crise. (47)

Les mécanismes de résistance incluent :

- **Des mutations génétiques** permettant aux bactéries de modifier leurs cibles ou leur métabolisme.
- **L'acquisition de gènes spécifiques** via le transfert horizontal, leur conférant la capacité de neutraliser l'effet des antibiotiques, ou d'empêcher leur pénétration dans la cellule bactérienne.

Face à cette situation alarmante, des stratégies innovantes sont en cours de développement :

- **Diagnostics moléculaires avancés** pour détecter rapidement les souches résistantes.
- **Modification des schémas thérapeutiques** pour réduire la pression sélective favorisant les résistances. (47)

À l'échelle mondiale, des plans d'action ont été mis en place pour surveiller et limiter l'antibiorésistance. Parmi les solutions prioritaires figurent :

- La conception de **nouvelles molécules** capables de contourner les mécanismes de résistance des pathogènes.
- Une attention particulière accordée aux bactéries Gram négatives, souvent associées à des infections sévères et difficiles à traiter.

Ces efforts combinés visent à anticiper et contrer les résistances émergentes, tout en promouvant un usage plus rationnel des antibiotiques.(47)

## CHAPITRE II : LE POIVRE NOIR

### II.1. Généralités :

Depuis l'Antiquité, les épices occupent une place essentielle à travers le monde, non seulement pour parfumer et conserver les aliments, mais aussi pour des usages médicaux et cosmétiques. Parmi elles, le poivre, surnommé "**or noir**" par les anciens commerçants, est aujourd'hui incontournable dans les cuisines des cinq continents. Il existe environ **700 espèces de poivre** recensées à travers le monde. En 2014, la production mondiale de poivre a atteint **463 000 tonnes**, dont **150 000 tonnes** produites par le Vietnam, qui en est le premier producteur mondial. (48, 49) Parmi les espèces cultivées, le **Piper nigrum** domine largement la production.

Dans l'océan Indien occidental, les îles abritent diverses espèces de poivres sauvages. Par exemple :

- **À La Réunion** : le **Piper borbonense** (Miq.) C. DC, endémique de l'île, a été identifié en 2011 par le Conservatoire National Botanique de Mascarin. Ses feuilles sont utilisées en pharmacopée, mais cette espèce reste sous-exploitée à ce jour.
- **À Madagascar** : les poivres sauvages du genre **Piper spp.**, appelés **Tsiperifery** (signifiant "poivre sauvage"), connaissent une exploitation croissante depuis une dizaine d'années. En 2015, près de **50 tonnes de poivre sec** ont été exportées, principalement vers l'Europe, notamment la France.

Ces poivres malgaches, très appréciés dans la haute gastronomie et par les amateurs, sont toutefois menacés par une **exploitation anarchique**, ce qui fragilise la ressource et la filière. De plus, la qualité mal maîtrisée du produit risque de détourner les utilisateurs. Pour garantir la durabilité de cette filière, plusieurs projets de recherche sont en cours à Madagascar et à La Réunion. Ces initiatives visent notamment la domestication et l'optimisation de la transformation de ces poivres sauvages. (50)

### II.2. Etude botanique

#### II.2.1. Description botanique

Le poivre noir (**Piper nigrum**) serait originaire des contreforts de l'Himalaya et du sud-ouest de l'Inde, s'étendant à l'Asie tropicale. (51)

Le poivrier noir est une grande liane qui s'accroche aux arbres pour croître. Il se caractérise par :

- **Ses feuilles** : vert foncé, longues et pointues.
- **Ses fleurs** : regroupées en épis d'environ **10 cm** de longueur.
- **Ses baies** : elles sont d'abord vertes, puis virent au rouge à maturité avant d'être récoltées pour produire différentes variétés de poivre (noir, blanc ou vert). (52)

**II.2.2. Classification(53)**

**Embranchement** : Spermaphytes

**Sous-embranchement** : Angiospermes

**Classe** : Dicotylédones

**Sous-classe** : Apétales

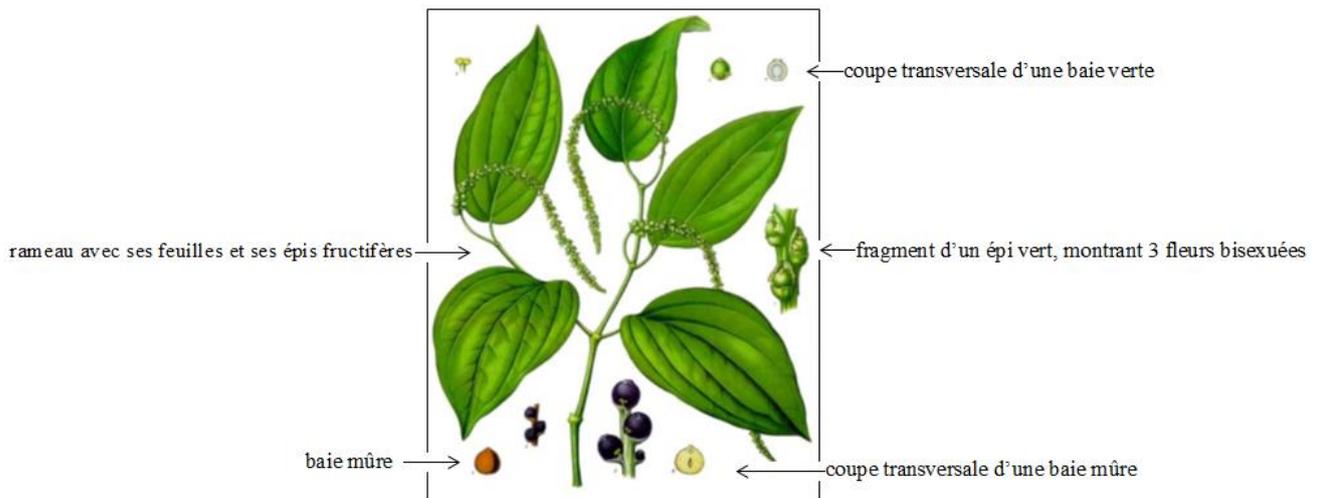
**Ordre** : Pipérales

**Famille** : Pipéracées

**Genre** : Piper

**Espèce** : nigrum

**II.2.3. Caractères végétatifs**



**Figure 10** : Schéma d'une branche de *Piper nigrum* L.(52)

**II.3. Profil chimique :**

Le poivre noir (**Piper nigrum**) est une épice dont la chimie a été largement étudiée. Les recherches menées sur de nombreuses espèces du genre **Piper** ont mis en évidence une grande diversité de composés bioactifs, notamment :

- **Alcaloïdes**
- **Amides**
- **Propénylphénols**
- **Lignanes et néolignanes**

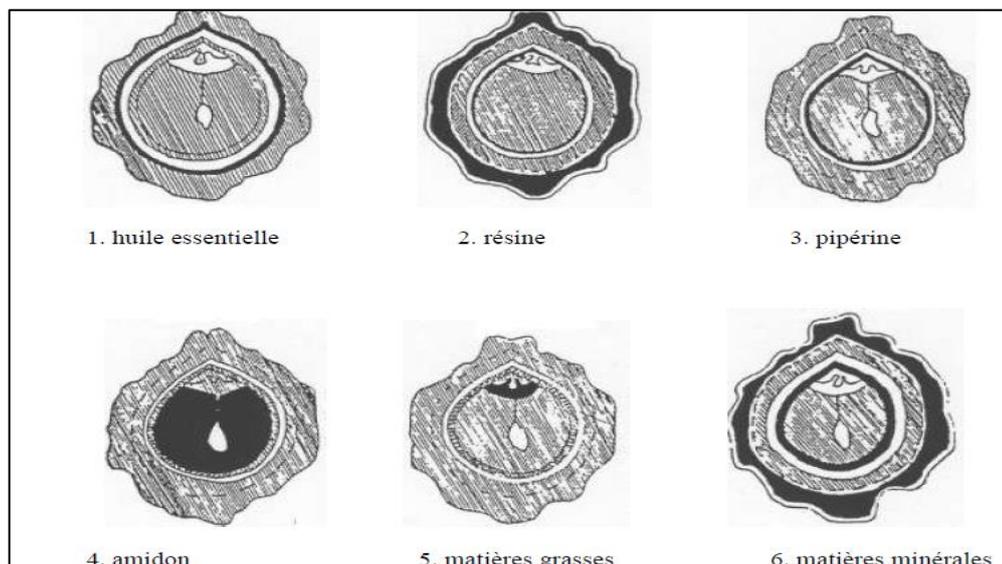
- **Terpènes**
- **Stéroïdes**
- **Kawapyrones**
- **Piperolides**
- **Chalcones et dihydrochalcones**
- **Flavones et flavanones**

Cette liste, bien que riche, n'est pas exhaustive, tant la diversité chimique du poivre est importante. (54,55)

En termes de pourcentage de la masse brute, le poivre noir se compose généralement de :

- **4 à 6% de matières minérales**
- **40 à 50% d'amidon**
- **5 à 10% de lipides**, principalement constitués d'acides gras tels que :
  - **Acide palmitique** : 16-30%
  - **Acide oléique** : 18-29%
  - **Acide linoléique** : 25-35%
  - **Acide linoléique** : 8-19%
- **10 à 12% de protides**
- **5 à 10% de résine**
- **1 à 3% d'huile essentielle**

Cette richesse chimique confère au poivre noir ses propriétés organoleptiques, médicinales et pharmacologiques, tout en faisant de cette épice un objet d'étude privilégié pour la recherche scientifique. (56–59)



**Figure 11** : Localisation des principaux constituants chimiques dans les différents tissus du fruit (coloriés en noir) (56)

**II.3.1. L'huile essentielle :**

L'huile essentielle de poivre noir (**Piper nigrum**) est localisée dans le mésocarpe interne du fruit. Elle est généralement extraite par distillation à la vapeur d'eau à partir des baies séchées, préalablement broyées. (60)

Cette huile se présente sous la forme d'un liquide transparent, souvent légèrement teinté de vert pâle, avec une odeur caractéristique de poivre très prononcée, mais dépourvue du caractère brûlant des baies entières.(60)

**Tableau 03 :** Les caractères organoleptiques et physicochimiques de l'huile essentielle de poivre noir (60)

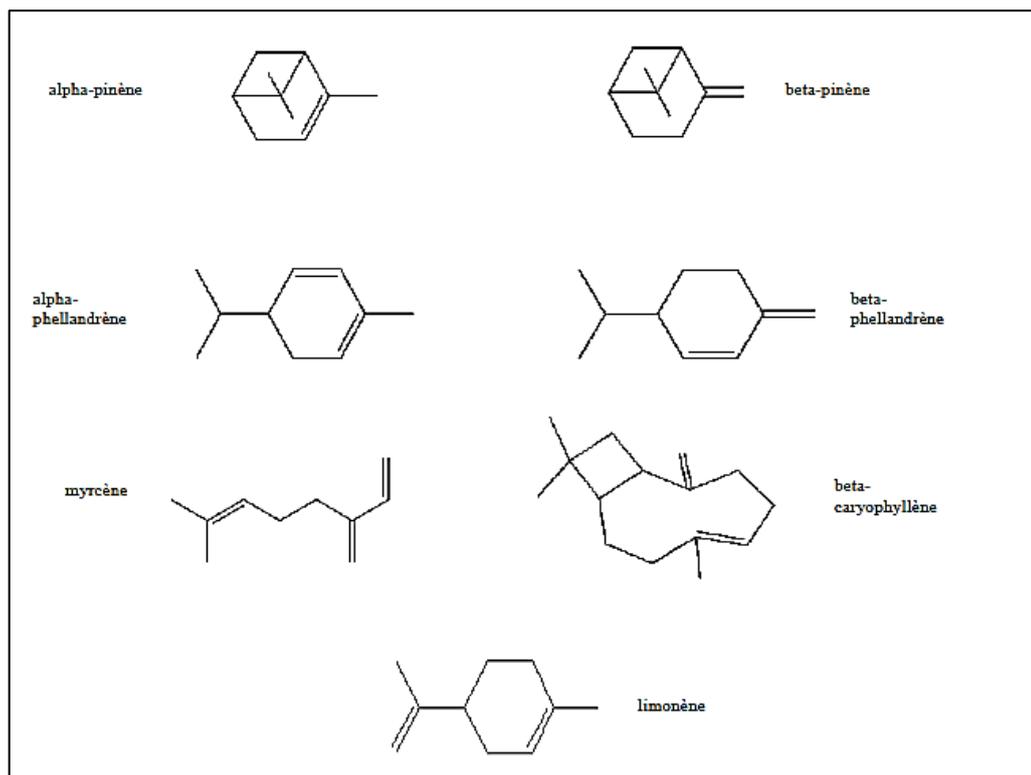
| CARACTERISTIQUES                         | SPECIFICATIONS                                  |
|--|---|
| <b>Aspect</b>                            | Liquide mobile et limpide                       |
| <b>Couleur</b>                           | Incolore à vert-bleuâtre                        |
| <b>Odeur</b>                             | Très forte rappelant celle des grains de Poivre |
| <b>Indice de réfraction à 20°C</b>       | 1,4800-1,4920                                   |
| <b>Pouvoir rotatoire à 20°C</b>          | -16° à 4°                                       |
| <b>Densité à 20°C</b>                    | 0,870-0,890                                     |
| <b>Miscibilité dans l'éthanol à 20°C</b> | 3 à 5 volumes d'éthanol à 95% (v/v)             |
| <b>Indice d'esters</b>                   | 11 max  |
| <b>Point de solidification</b>           | Inférieur à 20°C                                |
| <b>Point d'ébullition</b>                | Environ 167°C                                   |

L'huile essentielle possède une composition chimique complexe, dominée par des terpènes, répartis en plusieurs classes :

- **Monoterpènes** : alpha-pinène, bêta-pinène, limonène, myrcène, alpha-phellandrène, bêta-phellandrène.
- **Alcools monoterpéniques** : terpinène-4-ol (exemple).
- **Sesquiterpènes** : bêta-caryophyllène (exemple).

En plus de ces composés majoritaires, elle contient des dérivés de type phényléther, tels que l'eugénol, le safrole et la myristicine, mais en plus faibles proportions (Tableau 03).

L'odeur typique du poivre est le résultat d'un savant mélange des différents terpènes qui composent cette huile essentielle. (57)



**Figure 12 :** Structures chimiques des principaux terpènes.(61)

L'odeur typique du poivre résulte d'un savant mélange des différents terpènes présents dans son huile essentielle. Les caractéristiques de ces terpènes et de leurs contributions à l'arôme du poivre sont résumées dans le **Tableau 04**.

**Tableau 04 :** Concentrations et caractères organoleptiques des principaux terpènes composant l'huile essentielle du poivre noir.(61)

| Substances         | Concentration dans l'huile essentielle | Caractères organoleptiques                           |
|--------------------|--|--|
| alpha-pinène       | 1.1 à 16.2%                            | chaud, résiné, rosé, herbacé                         |
| beta-pinène        | 4.9 à 14.3%                            | sec, boisé, résiné                                   |
| alpha-phellandrène | 0.5 à 27.4%                            | frais, citronné, boisé, poivré, menthé               |
| bêta-phellandrène  | 15.8 à 24.4%                           | frais, menthé, poivré, brûlant à haute concentration |
| bêta-caryophyllène | 9.4 à 30.9%                            | boisé, épicé, sec                                    |
| limonène           | 15.8 à 24.4%                           | frais, léger, sucré, doux, orangé                    |

**II.3.2. La résine :**

Les transformations conduisant à la fabrication de résine sont effectuées le plus souvent au sein des pays producteurs, car les coûts y sont comparativement plus faibles que dans les pays consommateurs. (62)

Pour la même raison, la résine est souvent extraite à partir des **baies de poivre noir**, dont le coût est inférieur d'environ **30 % à 40 %** à celui du **poivre blanc**. En cas de rapprochement des prix entre le poivre blanc et le poivre noir, un **effet de substitution** pourrait se produire en faveur du **poivre blanc**, en raison de sa **meilleure qualité**. (62)

La résine fraîchement obtenue par épuisement avec des solvants (éthanol, acétone, éther de pétrole ou chlorure de méthylène) est un **liquide visqueux de couleur vert bleuâtre** lorsqu'elle est produite à partir de poivre noir. (62)

Cette préparation présente les **propriétés organoleptiques** les plus proches de celles du **poivre brut**. (62)

La résine est principalement concentrée dans le **fruit**, et plus spécifiquement dans l'**épicarpe**, le **mésocarpe** et les **téguments séminaux**. (62)

Elle possède une **saveur âcre et brûlante**, due à la présence de nombreux alcaloïdes, dont la **pipérine** (alcaloïde principal du poivre noir), ainsi que ses isomères tels que l'**isopipérine**, la **chavicine** et l'**isochavicine**. (Voir Tableau 05)

**Tableau 05 :** Point de fusion, longueur d'onde d'absorption et pouvoir piquant de la pipérine et de ses isomères.(62)

| Composés            | Point de fusion | Longueur d'onde du Maximum d'absorption dans l'uv | Pouvoir piquant |
|---------------------|-----------------|---|-----------------|
| <b>Pipérine</b>     | 129 C°          | 343 nm  | +++++++         |
| <b>Isopipérine</b>  | 86 C°           | 335nm   | +               |
| <b>Chavicine</b>    | 75 C°           | 321 nm  | ++              |
| <b>Isochavicine</b> | 103C°           | 336nm   | -               |

La **pipérine** a été le premier composé pharmacologiquement actif isolé à partir de différentes espèces de la famille des **Piperaceae**. De nombreux chercheurs ont identifié et isolé une variété de composés bioactifs dans cette famille, notamment :

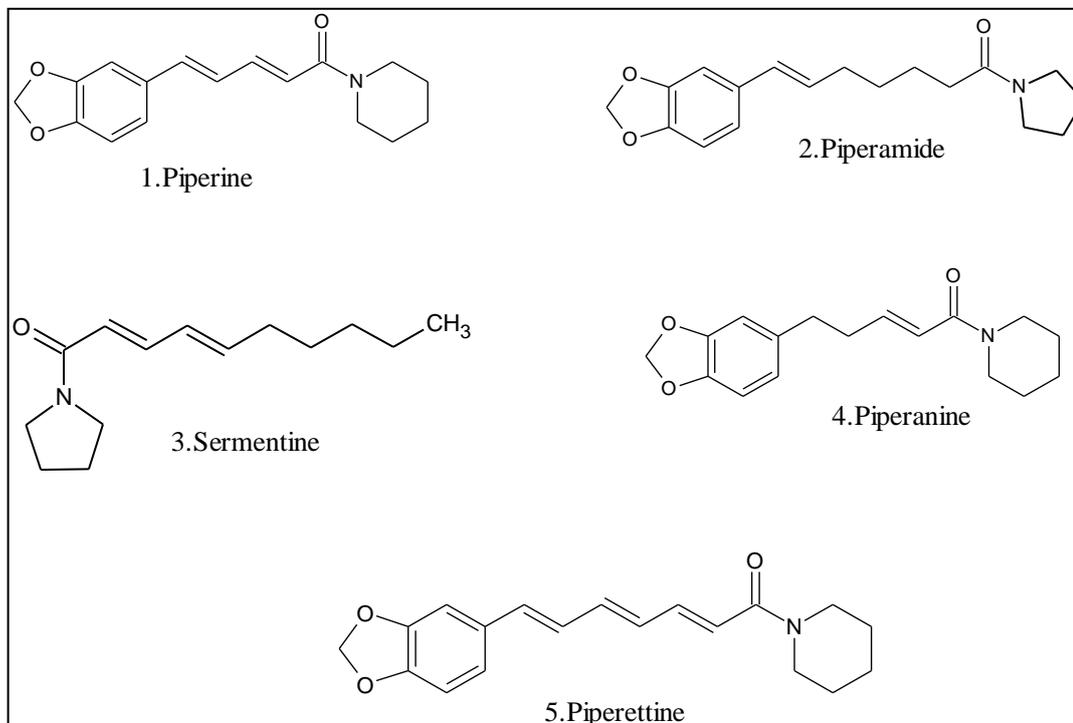
- **Composés phénoliques,**

- Flavonoïdes,
- Alcaloïdes,
- Amides,
- Stéroïdes,
- Lignanes,
- Néolignanes,
- Terpènes,
- Chalcones,

et de nombreux autres composés.

Certains des composés sont le brachyamide B, le dihydro-pipéricide, (2E, 4E) –N Eicosadiénoyl-peréridine, N-trans-féruloyltryamine, N-formylpipéridine, guineensine, pentadiénoyle sous forme de pipéridine, (2E, 4E) - Nisobuty- Idécadiénamide, isobutyl-eicosadiénamide, tricholéine, Trichostachine, isobutyl-eicosatriénamide, isobutyl-octadiénamide, Pipéramide, pipéramine, pipérettine, pipéricide, pipérine, pipéroléine B, Sarmentine, Sarmentosine, Retrofractamide A (Figure 13 et 14).

Différentes activités pharmacologiques ont été signalées en raison de la présence de ces composés phytochimiques.(53,54,59)



**Figure 13:** Alcaloïdes isolés du piper nigrum.(63)

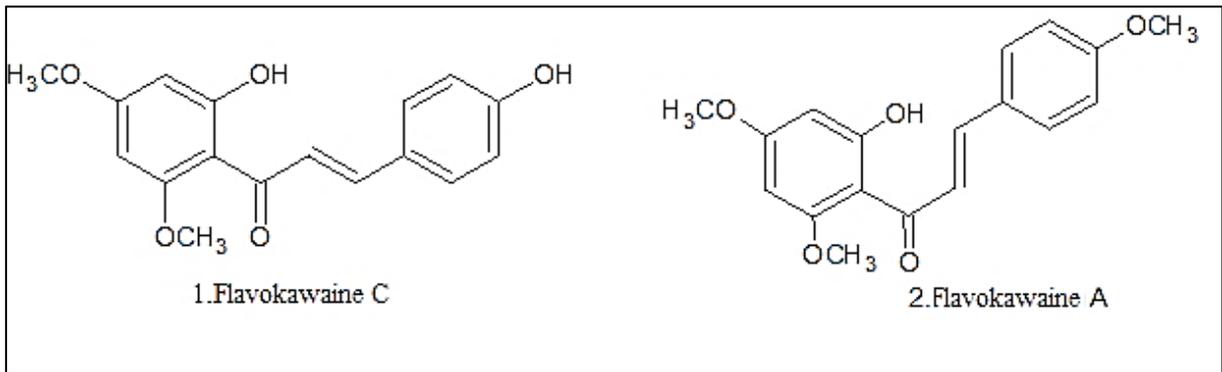


Figure 14 : Flavonoïdes isolés du piper nigrum.(54)

#### II.4. Domaine d'utilisation

De nombreux chercheurs ont exploré les propriétés du *Piper nigrum* en utilisant les dernières avancées scientifiques et technologies. *P. nigrum* est utilisé dans le traitement de divers maux, notamment le soulagement de la douleur, des frissons, des rhumatismes, de la grippe, des douleurs musculaires, des rhumes, de l'épuisement et des fièvres. Il est également utilisé comme tonique nerveux, pour améliorer la circulation sanguine, stimuler la salivation, encourager l'appétit et favoriser le péristaltisme. Le poivre noir et le poivre long (*P. longum*), ainsi que le gingembre, sont des ingrédients de la formule ayurvédique ancienne "Trikatu", qui est encore utilisée pour ses bienfaits digestifs. (57,64)

##### II.4.1. Activité antimicrobienne du poivre noir :

En 2007, Khan et Siddiqui ont évalué le potentiel antibactérien de la décoction aqueuse de *Piper nigrum* L. (poivre noir), *Laurus nobilis* L. (feuille de laurier), *Pimpinella anisum* L. (anis) et *Coriandrum sativum* L. (coriandre) contre différents isolats bactériens provenant de la cavité buccale de deux cents volontaires. Le poivre noir (décoction aqueuse) a montré la plus forte activité antibactérienne, comparable à celle de la décoction aqueuse de *Laurus nobilis* et *Pimpinella anisum*, à une concentration de 10 µL/disque.(65)

Dans une étude plus récente, des nanoparticules d'argent provenant de l'extrait de feuilles et de tiges de *Piper nigrum* ont été synthétisées, et leur activité antibactérienne a été évaluée contre les agents pathogènes des plantes agricoles. Ces nanoparticules d'argent ont montré une excellente activité antibactérienne contre les pathogènes végétaux. Les auteurs ont conclu que l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent présente des applications prometteuses pour améliorer et protéger les cultures dans le cadre de la nanotechnologie agricole. (66)

### **II.4.2. Activité antioxydante du poivre noir :**

Les plantes représentent une source importante d'activité antioxydante. Plusieurs études *in vitro* ont démontré que le poivre noir inhibe les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, qui sont connues pour causer des dommages oxydatifs. Le poivre noir présente une activité antioxydante notable, probablement en raison de la présence de flavonoïdes et de composés phénoliques. Il a la capacité de prévenir le stress oxydatif en inhibant la peroxydation des lipides, la lipoxygénase humaine, et l'activité des radicaux libres, comme l'ont montré des études *in vivo*. (67,68)

Une étude a évalué l'effet antioxydant de trois espèces de *Piper*, à savoir *P. nigrum*, *P. guineense* et *P. umbellatum*, en les administrant à des hamsters nourris avec un régime athérogène. Les animaux ont reçu des doses de ces espèces de *Piper*, soit 1 g/kg et 0,25 g/kg, pendant 12 semaines. Les résultats ont montré que ces espèces de poivre inhibaient considérablement les effets de l'alimentation athérogène, ce qui a conduit à une amélioration du profil lipidique et à la restauration des activités des enzymes antioxydantes. Cette étude a révélé un rôle protecteur antioxydant des extraits de *Piper* contre le stress oxydatif induit par l'alimentation athérogène dans les tissus rénaux, cardiaques et hépatiques. (53,69)

### **II.4.3. Activité anti cancéreuse du poivre noir :**

Le poivre noir a montré un effet inhibiteur sur la formation des tumeurs dans différents modèles expérimentaux. Plusieurs études ont révélé les effets antitumoraux de *P. nigrum* ou de la pipérine par administration orale. L'extrait alcoolique de poivre et la pipérine ont démontré des activités immunomodulatrices et antitumorales significatives. Des recherches ont également montré que la pipérine réduit le cancer du poumon en modifiant la peroxydation lipidique et en activant les enzymes de protection antioxydante. (Plus de détails dans le chapitre III) (59,68,70)

### **II.4.4. Activité anti-diarrhéique :**

L'extrait aqueux de poivre noir (ABPE), administré à des doses de 75, 150, 300 mg/kg, a été évalué pour son action anti-diarrhéique, anti-motilité et anti-sécrétoire chez la souris. La diarrhée a été induite par l'huile de ricin et le sulfate de magnésium pour l'évaluation de l'activité anti-diarrhéique, et la motilité gastro-intestinale a été mesurée à l'aide de la farine de charbon. L'ABPE a montré des effets anti-diarrhéiques, anti-motilité et anti-sécrétoire significatifs, en fonction de la dose. Les activités anti-motilité et anti-sécrétoire du poivre noir pourraient être dues à la présence de glucides et d'alcaloïdes, et l'activité anti-diarrhéique de l'ABPE pourrait être attribuée à ces effets. (71)

***II.4.5. Autres activités :***

Le poivre noir et la pipérine présentent de nombreuses autres activités, notamment antihypertenseur, antiplaquettaire, antipyrétique, antispasmodique, antifongique, anti-apoptotique, anti-métastatique, antimutagène, anti-spermatogénèse, antiasthmatique, ainsi que des propriétés insecticides et larvicides, entre autres.(59) Ces activités seront détaillées dans le chapitre III : *Les alcaloïdes du poivre noir*.

## CHAPITRE III : LES ALCALOÏDES DU POIVRE NOIR

Le terme *alcaloïde* a été introduit par W. Meisner au début du XIXe siècle pour désigner des substances naturelles se comportant comme des bases. (62)

Les alcaloïdes constituent une vaste classe de molécules d'origine naturelle, contenant principalement du carbone, de l'hydrogène, et, de manière caractéristique, de l'azote. La majorité d'entre eux possèdent une activité biologique marquée, ce qui leur confère depuis longtemps un intérêt thérapeutique. (62)

Les amides, qui représentent un sous-groupe spécifique des alcaloïdes, sont des composés organiques dérivés d'acides carboxyliques, caractérisés par la présence d'un groupe carbonyle lié à un atome d'azote. (72)

Dans le genre *Piper*, on distingue deux sous-groupes principaux d'alcaloïdes de type amide :

- **Amides de type pyrrolidine**
- **Amides de type pipéridine**

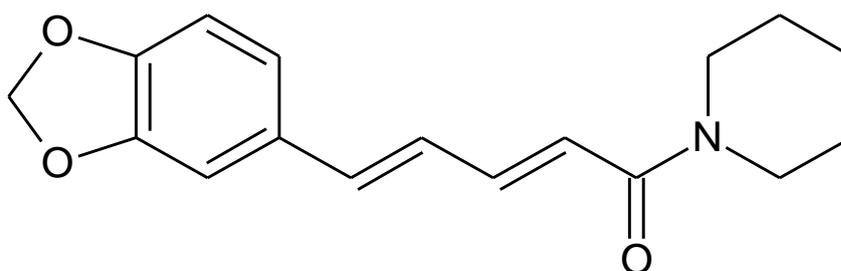
Parmi les composés les plus représentatifs de ces sous-groupes, on trouve la pipérine, la guinéensine, la pipérittine, le pipericide, la pipéranine, le (2E)-N-Feruloyltyramine et le N-Isobutyl-2E,4E-dodécadiénamide (Figure 16). (63,72)

Dans ce chapitre, nous examinerons les différentes propriétés physicochimiques et biologiques de l'alcaloïde le plus connu et principal responsable de l'activité biologique du poivre noir : la **pipérine**.

### III.1. Données chimiques :

#### III.1.1. Formule chimique :

La pipérine est un alcaloïde de formule chimique  $C_{17}H_{19}NO_3$ , avec un poids moléculaire de **285,34 daltons**. Elle fait partie de la plus grande classe des métabolites secondaires végétaux, les alcaloïdes, reconnus pour leur diversité chimique et leurs nombreuses activités biologiques.



**Figure 15** : Formule développée de la pipérine. (63)

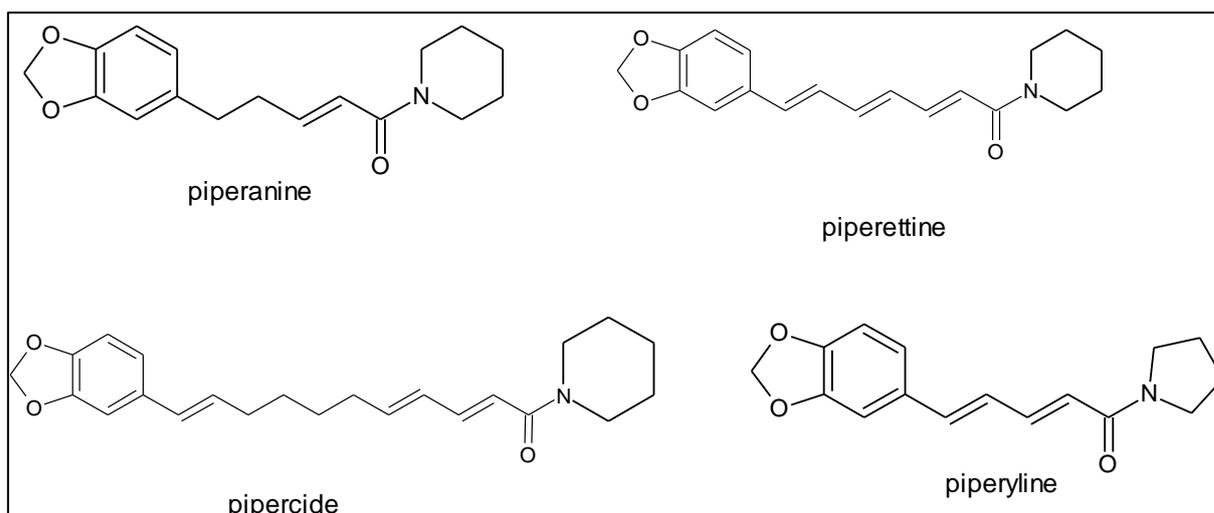


Figure 16 : Autres alcaloïdes isolés du poivre noir. (54)

### III.1.2. Caractère physique :

La pipérine se présente sous la forme de **cristaux jaune pâle**.

- **Solubilité :**
  - Insoluble dans l'eau.
  - Soluble dans l'éthanol et l'éther.
- **Caractère chimique :** La pipérine possède un caractère **faiblement basique**.
- **Point de fusion :** Il est compris entre **129 et 131 °C**. (73)

### III.1.3. Biosynthèse de la pipérine :

La pipérine, un alcaloïde appartenant à la classe des métabolites secondaires, est biosynthétisée par une série de réactions enzymatiques comprenant **condensation, décarboxylation, désamination oxydative et cyclisation**.

Les études suggèrent que la voie biosynthétique de la pipérine impliquerait l'**acide aminé L-lysine** comme précurseur. Ce processus biosynthétique se déroule en **deux étapes principales** :

#### Étape 1 :

Cette étape est principalement caractérisée par une réaction de condensation entre un N-hétérocycle pipéridine et le thioester piperoyl-CoA. Cette réaction fournit le potentiel de transfert de groupe nécessaire à la formation de la pipérine (Figure 17). (73)

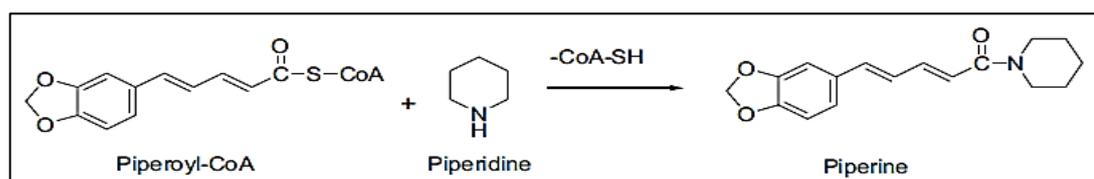
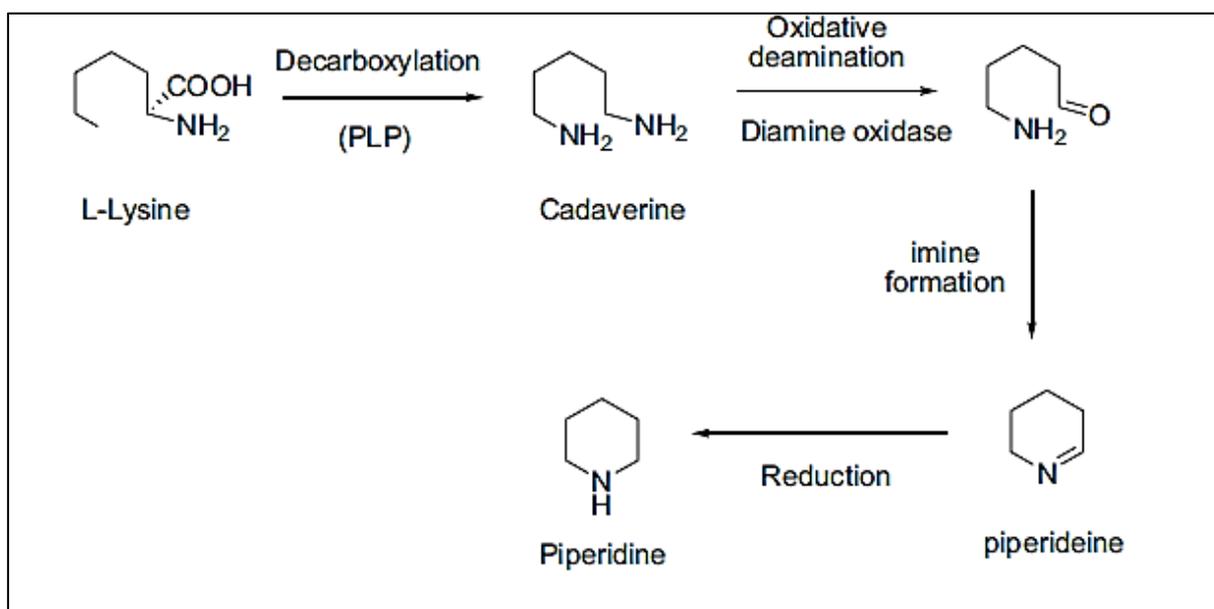


Figure 17 : Réaction catalysée par la pipéridine piperoyltransférase du poivre noir.(74)

La N-hétérocycle **pipéridine** est générée à partir de la **décarboxylation de l'acide aminé L-lysine** en présence de **phosphate de pyridoxal (PLP)**, produisant ainsi la **cadavérine**. Cette dernière subit ensuite une **désamination oxydative** catalysée par la **diamine oxydase**, ce qui conduit à la formation d'un **amino-aldéhyde**. (73)

Cet amino-aldéhyde subit une **cyclisation** pour former une **imine**, la  **$\Delta 1$ -pipéridéine**, qui est ensuite réduite en **pipéridine** (Figure 18). La pipéridine ainsi générée réagit avec le **pipéroyl-CoA** pour former la **pipérine** (Figure 18). (73)

Cependant, ce mécanisme proposé n'a pas encore été entièrement prouvé. Pour mieux comprendre ce processus, des études enzymatiques ont été menées sur la biosynthèse de composés analogues, tels que la **coumaroylagmatine** et la **feruloyltyramine**. Ces études montrent clairement que la formation de liaisons amides acides de ce type peut être assurée par des **dérivés intermédiaires acyl-CoA**. (75–78)



**Figure 18** : Biosynthèse de la pipéridine à partir de la L-Lysine.(79)

Il a été démontré qu'une nouvelle **acyltransférase**, obtenue à partir des pousses de *Piper nigrum*, est capable de synthétiser une quantité appréciable de pipérine en présence de **pipéroyl-coenzyme A** et de **pipéridine**. Cette enzyme représente ainsi une source enzymatique potentielle pour la biosynthèse de la pipérine. (73)

#### III.1.4. Technologies d'extraction :

La pipérine est un alcaloïde naturel au goût piquant et un métabolite secondaire extrait des plantes du genre *Piper*. Elle peut être obtenue ou isolée à partir de l'oléorésine de *Piper nigrum* ou *Piper longum*. Plusieurs méthodes d'extraction ont été utilisées pour isoler la

pipérine (Figure 19). Ces méthodes varient selon le **rendement** recherché et l'**objectif de l'opération**. (79,80)

Cependant, la majorité des amides de *Piper* sont de nature alcaloïdale, ce qui permet d'appliquer les procédures classiques d'extraction des alcaloïdes lors de leur isolement. La séparation et la purification finales d'un mélange d'alcaloïdes peuvent être réalisées par **précipitation fractionnée** ou par **crystallisation** sous forme de sels, tels que les oxalates, les tartrates ou les picrates. Les différentes procédures récentes utilisées pour l'extraction et la purification des alcaloïdes sont discutées ci-dessous. (80–82)



**Figure 19** : Aperçu de la pipérine obtenue.(73)

### ***III.1.4.1. Extraction en tant que composé organique général :***

Cette méthode a été utilisée pour isoler la pipérine. Le matériel végétal broyé est d'abord extrait à l'éthanol après un lavage à l'éther de pétrole afin d'éliminer les pigments liés à la chlorophylle. L'extrait obtenu est ensuite concentré sous pression réduite, ce qui donne une substance huileuse brun foncé. Cette substance est fractionnée à l'aide d'une colonne chromatographique remplie de gel de silice. Un solvant d'élution couramment utilisé est un mélange hexane/éther diéthylique dans un rapport de 1:2 (volume/volume). Les fractions obtenues sont ensuite analysées et regroupées à l'aide de chromatographie en couche mince (CCM). La pipérine ainsi que les amides apparentés se cristallisent généralement à partir des fractions concentrées. Les fractions impures peuvent être purifiées davantage par recristallisation à partir d'un mélange de dichlorométhane et d'hexane. (83)

### ***III.1.4.2. Extraction comme alcaloïde :***

Cette méthode a été utilisée par Gwendoline et ses collaborateurs pour isoler plusieurs composés, notamment la pellitorine, la pipérine, l'isobutylamide de 2,4-tétradécadiénoïque, ainsi que la pipéridine (E)-1-[3',4'-méthylènedioxy)cinnamoyl]. La plante séchée est d'abord

lavée à l'éther de pétrole, puis soumise à une macération ou à une extraction au Soxhlet à l'aide d'éthanol ou d'alcool aqueux à une concentration de 5 à 20 %. L'extrait obtenu est concentré sous pression réduite, puis acidifié avec un excès d'acide dilué (généralement de l'acide chlorhydrique aqueux à 5-10 %). La solution aqueuse est ensuite filtrée pour éliminer les matières non dissoutes, qui sont généralement non alcaloïdiques. Le filtrat est alcalinisé avec un excès de bicarbonate de sodium ou une solution concentrée d'ammoniac, pour atteindre un pH d'environ 10-11, libérant ainsi les alcaloïdes. Ces derniers sont extraits avec un solvant organique non miscible, comme le chloroforme ou le dichlorométhane, dans un entonnoir de séparation. La phase organique est soigneusement lavée avec de l'eau distillée, puis séchée à l'aide de sulfate de sodium anhydre. L'extrait organique est concentré sous pression réduite pour produire un extrait huileux, qui est ensuite séparé en fractions sur une colonne de gel de silice. Les fractions sont analysées et regroupées par chromatographie en couche mince (CCM). (83)

Les amides de type pipérine cristallisent à partir des fractions concentrées et sont purifiés par recristallisation. Par ailleurs, une autre approche consiste à alcaliniser initialement le matériel végétal par humidification avec de l'eau et de la chaux. La chaux se combine avec les acides, les tanins et autres substances phénoliques, libérant les alcaloïdes de leurs sels. Les alcaloïdes libres sont ensuite extraits avec un solvant organique, tel que le chloroforme, l'éther ou l'essence. L'extrait organique est concentré et acidifié pour isoler les alcaloïdes dans la phase organique. La couche aqueuse, contenant les sels alcaloïdes, est séparée, puis alcalinisée pour libérer les alcaloïdes. Enfin, la solution est extraite avec un solvant organique non miscible, tel que le chloroforme ou le dichlorométhane, pour obtenir les alcaloïdes libres. (83)

### ***III.1.4.3. Utilisation des techniques HPTLC et HPLC :***

Des techniques de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont été utilisées avec succès pour fractionner, isoler et identifier les composés de type pipérique. Ces méthodes ont également été développées pour mesurer les concentrations plasmatiques et tissulaires de pipérine chez les animaux.

Scott et ses collaborateurs ont employé de l'acétate d'éthyle comme solvant pour extraire les amides de piper à partir des matières végétales. (84,85)

### ***III.1.4.4. Extraction à l'aide de micro-ondes :***

La matière première est étalée sur un plateau en verre avec une épaisseur moyenne de 2 à 3 mm. Ce plateau est ensuite placé dans la cavité d'un four à micro-ondes d'une capacité de 25 dm<sup>3</sup>. Les particules sont exposées à un rayonnement micro-ondes pendant une période

prédéterminée de 2 minutes. Après l'exposition, elles sont retirées du four et mises en suspension dans de l'éther de pétrole. Des échantillons de la solution ont été prélevés à des intervalles de 15 minutes, puis analysés pour détecter la présence de pipérine. (86)

### III.1.5. Synthèse chimique de la pipérine et de ses analogues amides :

La synthèse stéréosélective de ce produit naturel, réalisée avec un bon rendement à partir de matières premières peu coûteuses et facilement disponibles, illustre l'utilité synthétique offerte par la réaction de Wittig et ses variations, telles que la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons. (73)

L'impact significatif de la réaction de Wittig sur la chimie organique synthétique moderne a été reconnu en 1979, lorsque le prix Nobel a été décerné, en partie, à Georg Wittig pour sa découverte et le développement de cette réaction. (73)

Dans la première étape, un ester phosphonate est préparé à partir du 4-méthyl-2-bromo-buténoate et du triéthylphosphite. Le produit obtenu, le 4-méthyl-2-(diéthoxyphosphinyl)-buténoate, réagit ensuite avec le méthanoate de sodium pour générer un carbanion d'ester phosphonate en présence de pipéronal. Ce carbanion subit une réaction de type Wittig avec le pipéronal pour former un alcène trans, le méthyle pipérate ((E, E)-5-(3,4-méthylènedioxyphényl)-2,4-pentadiénoate). Enfin, le méthyle pipérate réagit avec la pipéridine en présence de méthanoate de sodium et de méthanol pour donner la pipérine. (Figure 20). (73)

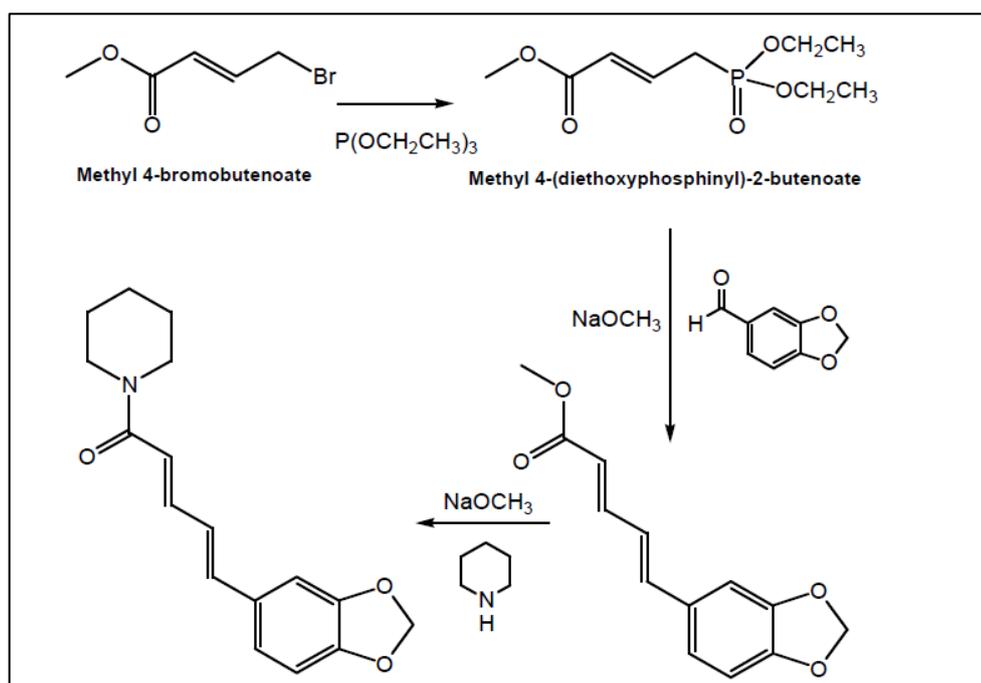
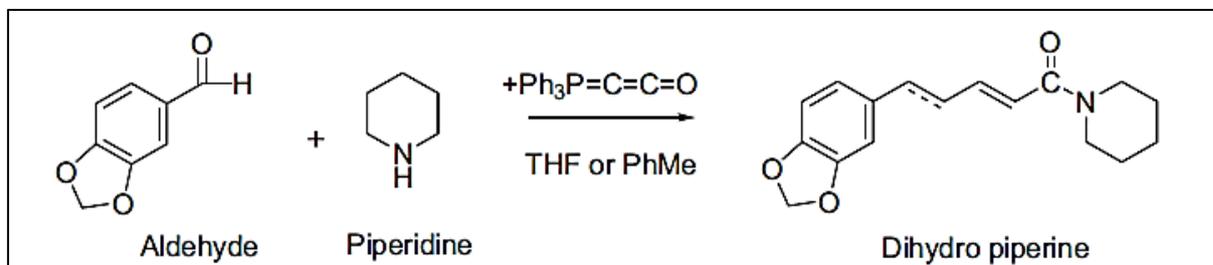


Figure 20 : Synthèse de la pipérine à partir de 4-méthyl-2-bromo-buténoate. (73)

Une méthode plus récente pour la préparation de la pipérine a été proposée par Schobert. Cette méthode repose sur une réaction intermoléculaire à trois composants impliquant des aldéhydes (aliphatiques ou aromatiques), des amines, et la céténylidène-triphénylphosphorane (Figure 21). (73,87)



**Figure 21** : Réaction à trois composants entre les aldéhydes, les amines et le céténylidène triphénylphosphorane.(87)

Certains amides possédant le squelette de l'acide pipérique ont été synthétisés en utilisant l'acide pipérique comme réactif de départ. Ce dernier peut être obtenu à partir de la pipérine par hydrolyse alcaline simple dans l'éthanol. Pour cela, l'hydroxyde de potassium ou le monohydrate de lithium peut être employé. L'acide pipérique est ensuite récupéré par relargage à l'aide d'acide chlorhydrique concentré après plusieurs heures de reflux. (80)

L'acide pipérique ainsi formé est converti en son chlorure, qui est ensuite réagi avec l'amine appropriée (Figure 22). Paula et ses collaborateurs (2000) ont utilisé du chlorure d'oxalyle, ajouté goutte à goutte à une solution d'acide pipérique dans le THF. La solution obtenue a été mélangée à température ambiante pendant 6 heures, puis l'excès de chlorure d'oxalyle a été éliminé sous pression réduite. Le chlorure de pipéronyle obtenu a été dissous dans le THF, et une solution d'amine appropriée a été ajoutée en présence de triéthylamine pour obtenir le pipéramide correspondant (Figure 16). Cette procédure synthétique est similaire au processus de biosynthèse, où l'amine est incorporée dans l'ester CoA piperoyl au cours d'une réaction de formation d'amide. (80)

(Les différentes méthodes de synthèse des amides seront détaillées dans le chapitre 04.)

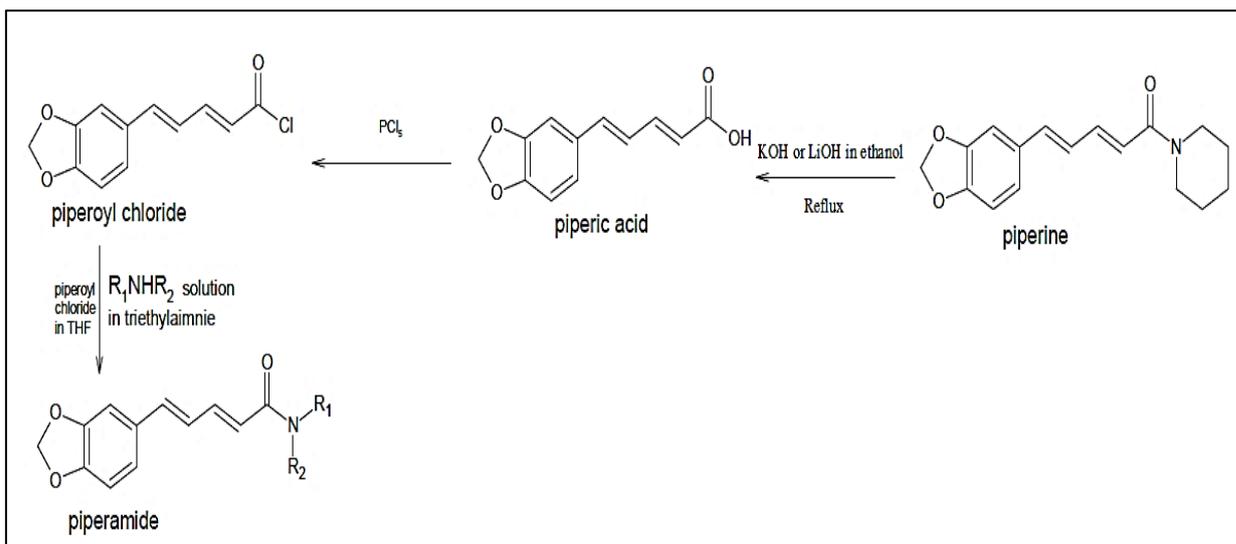


Figure 22 : Synthèse des analogues amides de la pipérine.(79)

### III.2. Données analytiques :

#### III.2.1. Caractéristiques chimiques :

Les chercheurs ont utilisé diverses techniques pour caractériser les amides de type pipérine, incluant des analyses chimiques et spectrales. Ces approches sont généralement applicables à la plupart des amides, en particulier ceux dont la structure est analogue à celle de la pipérine. En règle générale, les amides subissent une hydrolyse alcaline dans l'éthanol, ce qui permet d'obtenir des unités de base telles que la pipéridine, la pyrrolidine ou l'isobutylamine, ainsi que l'acide correspondant (acide pipérique, pipéronique ou guinéique), selon la nature de la chaîne carbonée de l'amide. D'autres manipulations chimiques incluent :

- **L'hydrogénation catalytique** de la chaîne carbonée  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturée ou la réduction au couple Zn-Cu des amides de type  $\Delta\alpha,\beta$ -dihydropipérine pour obtenir des dérivés perhydro. Cette réduction permet de confirmer la présence d'une conjugaison avec le carbonyle de la fonction amide. (79)
- **L'oxydation** avec du permanganate de potassium ou une ozonolyse pour former de l'acide pipéronal, de l'acide 3,4-méthylènedioxybenzoïque (acide pipérique) ou des dérivés 2-méthoxy, comme c'est le cas pour la wisanine. Ces transformations révèlent la présence d'une chaîne carbonée insaturée directement attachée au cycle aromatique. (79)
- **La préparation de dérivés DNPH** (2,4-dinitrophénylhydrazone) de piperonal ou de ses analogues, pour confirmer leur présence dans les produits. (79)

**III.2.2. Caractéristiques spectrales :**

En complément des méthodes de dégradation chimique, les analyses spectroscopiques ont été largement utilisées pour caractériser les amides de type pipérine.

La plupart de ces amides présentent soit une chaîne hydrocarbonée entièrement insaturée, soit une chaîne partiellement saturée avec un chromophore de type amide carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé. Ces propriétés se traduisent par des caractéristiques spectrales spécifiques observées dans les spectres infrarouges (IR) :

- Bande d'absorption à **1650  $\text{cm}^{-1}$**  : caractéristique du carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé.
- Bande à **1605  $\text{cm}^{-1}$**  : due à la double liaison trans conjuguée (CH=CH).
- Bande à **1000  $\text{cm}^{-1}$**  : correspondant à la liaison styrylique.
- Bande à **925  $\text{cm}^{-1}$**  : associée au groupe méthylènedioxy.

Cependant, les composés perhydro et  $\Delta\beta,\gamma$ -dihydropipérine ainsi que leurs amides apparentés ne présentent pas la bande d'absorption autour de **1605  $\text{cm}^{-1}$** . Les caractéristiques spectrales IR des amides de type pipérine sont résumées dans le tableau 06. (73)

Les caractéristiques spectrales de la pipérine et de ses analogues ont également été étudiées à l'aide des techniques RMN  $^1\text{H}$ , UV et MS :

- **RMN  $^1\text{H}$**  : Les signaux les plus significatifs dans la région des faibles champs comprennent :
  - **6,25 ppm** : protons éthyliques.
  - **6,65-7,65 ppm** : protons aromatiques.
  - **5,96 ppm** : protons du groupe méthylènedioxy.

Ces signaux ont été observés pour des composés tels que la pipérantine, la pipérine, la wisanine, la trichostachine et la sylvatine. Dans la région des champs élevés, les signaux représentent les protons de la fraction aminée aliphatique (isobutyle, pipéridyle). (88)

**Tableau 06 :** Données spectrales IR de la Guineensine et Sylvatine.(79)

| Données spectrales IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) |      |      |      |      |      |      |     |     |
|--|------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| <b>Guineensine</b>                         | 3300 | 1655 | 1630 | 1605 | 1545 | 1000 | 965 | 925 |
| <b>Sylvatine</b>                           | 3279 | -    | -    | 1605 | -    | 1000 | -   | 922 |

Les pics d'absorption UV des composés de type pipérine, indépendamment de la fraction aminée aliphatique, se situent à **250 nm, 304 nm et 378 nm**. Par exemple, la **pipérine** et la **piperlonguminine** présentent des caractéristiques UV identiques.

En revanche, les **tétrahydropipérines** et leurs analogues montrent des pics d'absorption à **232 nm et 285 nm**, qui sont proches de ceux des **3,4-méthylènedioxybenzènes** (Tableau 07) (88)

**Tableau 07** : Données spectrales UV de la Guineensine et Sylvatine.(79)

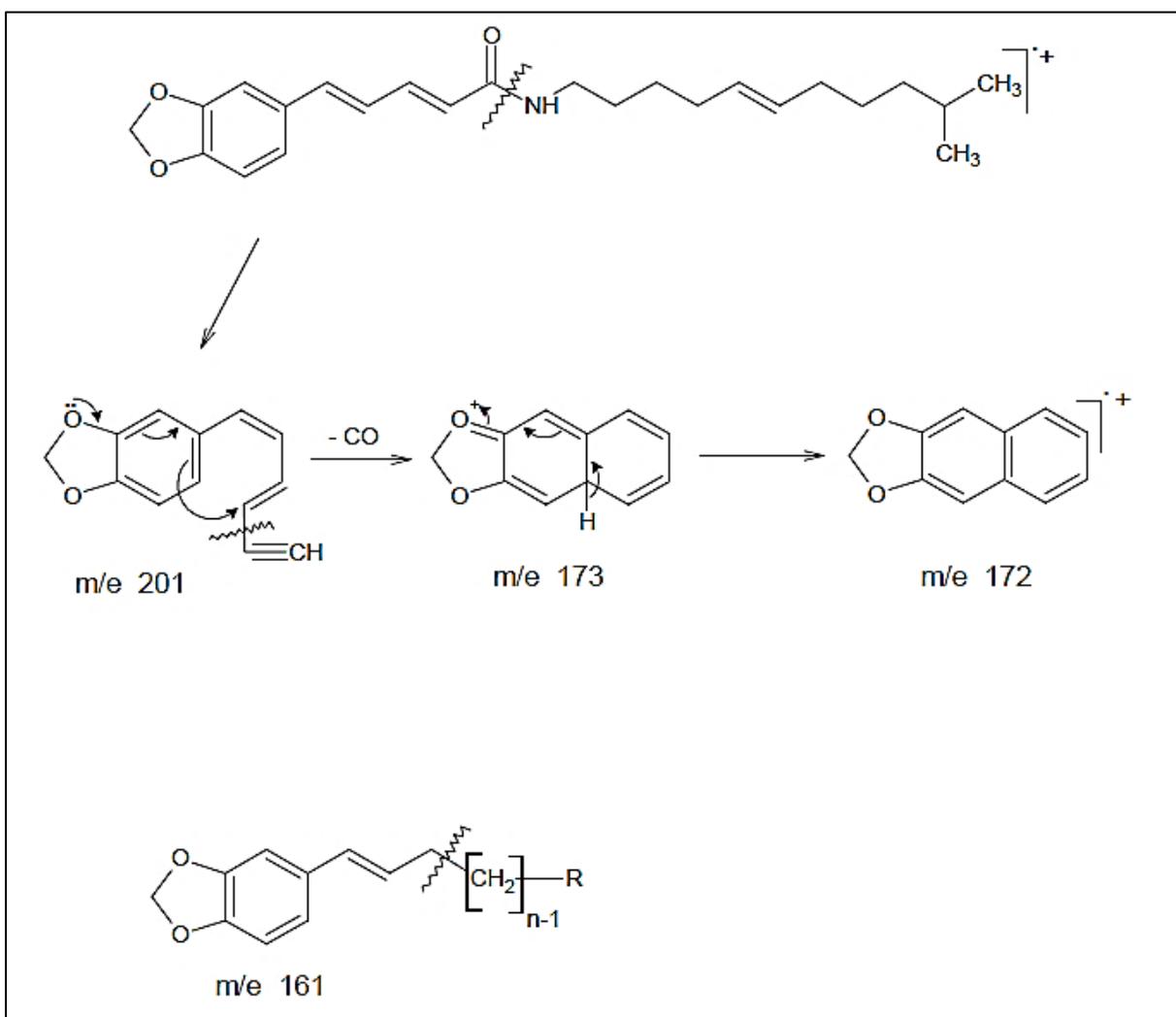
| Composés    | Données spectrales UV      |                |
|-------------|----------------------------|----------------|
|             | $\lambda_{\max}$ (Ethanol) | Log $\epsilon$ |
| Guineensine | 214                        | 4,15           |
|             | 261                        | 4,92           |
|             | 302                        | 3,81           |
| Sylvatine   | -                          | -              |
|             | 259                        | 4,69           |
|             | 304                        | 3,97           |

La distinction entre la **conjugaison** et la **non-conjugaison** du cycle aromatique avec le carbonyle de la fonction amide se reflète généralement dans les **absorptions IR et UV**, ainsi que dans les **modèles de fragmentation en spectrométrie de masse (SM)** de la pipérine et de ses amides apparentés (Tableaux 08).

Cette différence est illustrée par les données spectrales rapportées pour la **guineensine** et la **sylvatine**. Par exemple, le pic de SM à **m/z 161** est caractéristique de la guineensine, mais il est absent dans les spectres de la sylvatine et de la pipérine (Tableaux 08, Figure 23). (88)

**Tableau 08** : Fragmentation SM de la Guineensine et Sylvatine.(79)

|                  | Ions fragmentés (m/z) |                       |     |     |     |     |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|
|                  | <b>Guineensine</b>    | 383 (M <sup>+</sup> ) | 248 | 161 | 135 | 131 |
| <b>Sylvatine</b> | 383 (M <sup>+</sup> ) | 201                   | 173 | 172 | 171 |     |



**Figure 23** : Fragmentation SM de la sylvatine et la guineensine-type amide.(89)

La teneur en pipérine a été estimée et quantifiée à l'aide de diverses techniques analytiques, notamment la **spectrophotométrie UV**, la **densitométrie TLC-UV**, la **HP TLC** et la **HPLC**.

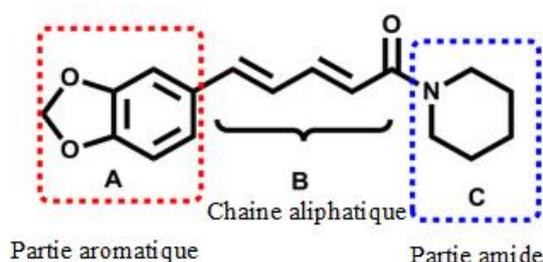
- **Mukherjee et al. (2000)** ont observé que la teneur en pipérine dans les fruits de **Piper nigrum** (poivre noir) se situait entre **3 % et 6 %**, tandis que dans les fruits de **Piper longum** (poivre long), elle variait de **0,6 % à 1,6 %**.
- **Santosh et al. (2005)** ont rapporté que la teneur en pipérine dans les fruits et les racines de **Piper longum** était respectivement de **0,879 %** et de **0,31 %**. Pour **Piper nigrum**, la teneur en pipérine dans les fruits était de **4,5 %**, mesurée par **RP-HPLC**.
- **Hue et al.** ont montré que le rendement total de la pipérine était de **0,79 %** en utilisant la technique **RP-HPLC** : **0,99 %** dans les racines fines, **0,14 %** dans les racines épaisses et **0,44 %** dans le cortex. (73,79)
- **Hamrapurkar et al. (2020)** ont rapporté que la pipérine, un alcaloïde majeur, peut être quantifiée avec une **excellente justesse** en un temps réduit grâce à la

méthode **HPTLC** (Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance). Les valeurs de justesse obtenues étaient de **98,57 %** pour **Piper nigrum** (poivre noir) et comprises entre **96,50 %** et **97,50 %** pour **Piper longum** (poivre long). (90)

### III.3. Données structure-activité :

La structure de la pipérine est composée de trois éléments principaux :

- 1- Le cycle de méthylènedioxyphényle (MDP).
- 2- La chaîne latérale avec les liaisons doubles conjuguées.
- 3- Fraction basique de pipéridine attachée par liaison carbonyle amide à la chaîne latérale et a un nombre possible de conformateurs.



**Figure 24** : Les différents fragments de la structure de la pipérine.(91)

De nombreux chercheurs ont rapporté que la **pipérine** aide à inhiber les **enzymes du cytochrome P450 (CYP)**, qu'elles soient **constitutives** ou **inductibles**. Pour étudier la relation structure-activité, **38 analogues de la pipérine** ont été synthétisés en modifiant :

1. Le **noyau phénylique**,
2. La **chaîne latérale**,
3. La **fraction de base** (pipéridine).

Ces analogues ont été testés pour leur capacité à inhiber les réactions de **monooxygénase**, notamment l'**AHH** (aryl hydrocarbon hydroxylase) et le **MOCD** (méthylcholanthrène oxydase), dans des fractions microsomales de foie de rat traité in vitro avec de l'**éthylcholanthrène** et du **phénobarbital**. (92)

Par conséquent, il a également été observé que le potentiel inhibiteur de la molécule mère est principalement perdu avec la modification de l'un des trois composants de la pipérine. L'étude conclut que si la saturation est effectuée dans la chaîne latérale, elle entraîne une inhibition accrue significative du cytochrome P450, tandis que les modifications du phényle et des fractions de base offrent une inhibition sélective soit constitutive, soit inductible CYP. Dans une autre étude, une nouvelle série d'analogues de la pipérine a été évaluée pour son interaction avec le **récepteur transitoire potentiel de la sous-famille V, membre 1**

(TRPV1), exprimé dans des cellules **HEK293** La pipérine est un puissant activateur du récepteur vanilloïde 1 (TRPV1), un canal cationique non sélectif identifié en 1997 comme étant le récepteur de la capsaïcine. Le TRPV1 joue un rôle essentiel dans la détection et la régulation de la température corporelle, ainsi que dans les sensations de chaleur et de douleur. (93)

Les études ont montré que la longueur de la chaîne carbonée des amides de pipérine influence leur potentiel agoniste. De plus, les modifications structurales, telles que la présence de doubles liaisons et la stéréochimie de la chaîne aliphatique, affectent directement la puissance et l'efficacité de ces composés, soulignant un niveau élevé de rigidité ou de planéité dans la structure de la pipérine. (93)

Il a également été observé que l'ouverture du cycle méthylènedioxy ou la modification du noyau hétérocyclique réduit ou abolit la réponse biologique. Les amides de pipérine inactifs ou dépourvus de potentiel agonistique, étudiés pour une éventuelle activité antagoniste, n'ont montré aucun effet significatif. (93)

Par ailleurs, une analyse quantitative de la relation structure-activité (QSAR) a été réalisée sur des entités chimiques dérivées de substances naturelles et synthétiques, afin de modéliser des inhibiteurs efficaces de la pompe à efflux NorA de *Staphylococcus aureus*. Les variables utilisées dans le modèle ont été sélectionnées grâce à la méthode d'approximation de la fonction génétique dans Cerius 2. Parmi les descripteurs étudiés, la surface partielle négative des composés s'est avérée cruciale, car son augmentation améliore l'activité inhibitrice. En revanche, une augmentation de la surface de l'ombre moléculaire dans le plan XZ diminue cette activité. La chaleur de formation a également été identifiée comme un paramètre important, bien qu'elle soit davantage explicative que prédictive. (94)

Ce modèle théorique, tout en offrant des informations sur les régions moléculaires importantes pour l'activité inhibitrice, ne permet pas de prédire avec précision l'efficacité de nouveaux composés, mais il constitue une base solide pour comprendre les relations structure-activité. (94)

### **III.4. Données pharmacologiques :**

De nombreux chercheurs ont mené des études approfondies sur le poivre noir et son principal composé actif, la pipérine, en utilisant les technologies scientifiques les plus récentes. Ces recherches ont permis de mettre en lumière les activités pharmacologiques importantes de la pipérine. Un résumé de ces activités est présenté dans le tableau 09.

**Tableau 09** : Les activités pharmacologiques de la pipérine.

|    | Activités                                | Références    |
|----|--|---------------|
| 01 | Antihypertensive                         | (95)          |
| 02 | Antiasthmatique                          | (59)          |
| 03 | Antimicrobienne                          | (65,66)       |
| 04 | Antioxydante                             | (67,70)       |
| 05 | Anticancéreuse                           | (68,70,96,97) |
| 06 | Anti-inflammatoire                       | (5,9,98)      |
| 07 | Hépatoprotéctrice                        | (99)          |
| 08 | Activité Digestive                       | (97,100)      |
| 09 | Antidépresseive                          | (101)         |
| 10 | Immunomodulateur                         | (102)         |
| 11 | Anticonvulsivante                        | (103)         |
| 12 | Analgésique                              | (5,6)         |
| 13 | Effet de la pipérine dans le métabolisme | (104)         |

#### **III.4.1. Activité anti-inflammatoire et analgésique :**

La pipérine présente un fort potentiel d'activité anti-inflammatoire, comme le montre un modèle avec gonflement des tissus des pattes arrière et arthrite chez les rats. L'administration de pipérine réduit également les dommages histologiques et l'activité de la myélodysse dans le pancréas, tout en améliorant de nombreux paramètres, tels que le poids pancréatique par rapport au poids corporel et les niveaux sériques d'amylase, de lipase et de trypsine. En outre, des études ont révélé que le prétraitement à la pipérine réduit la production de facteurs inflammatoires, comme le facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$ , l'interleukine (IL)-1b et l'IL-6, pendant la pancréatite aiguë induite par la céruléine. Les résultats *in vivo* montrent également que la pipérine diminue la mort cellulaire, l'activité des enzymes amylase et lipase, ainsi que la production de cytokines dans des cellules acineuses pancréatiques isolées traitées à la céruléine. De plus, la pipérine inhibe l'activation des protéines kinases mitogénisées activées (MAPK). (105)

Par ailleurs, une étude a mis en évidence l'action anti-inflammatoire de la pipérine, comparable à celle du curcuma dérivé de *Curcuma longa*. En plus de ses effets anti-inflammatoires, la pipérine présente également des propriétés antiarthritiques. (9)

La pipérine isolée de l'écorce de *Careya arborea* a également montré une activité analgésique centrale et périphérique importante à des doses orales de 10, 20 et 30 mg/kg de poids corporel contre les douleurs induites par l'acide acétique chez la souris. Tasleem et al. ont évalué et comparé l'activité analgésique et anti-inflammatoire de la pipérine ainsi que des extraits d'hexane et d'éthanol de *Piper nigrum* chez la souris et le rat, concluant que la pipérine

possède de puissantes activités analgésiques et anti-inflammatoires à différentes doses et selon différentes méthodes. Elle se manifeste par voie intrapéritonéale à 20 et 30 mg/kg, notamment par le biais d'essais de réaction sur plaque chaude et d'essais à l'acide acétique chez des souris, utilisant l'indométacine comme médicament de référence. (4)(5)

### ***III.4.2. Activité antioxydante :***

La pipérine, un composant naturel des épices, possède un excellent potentiel antioxydant, ce qui en fait un ingrédient précieux dans les préparations nutritionnelles et thérapeutiques. (106) Elle est utilisée comme co-adjuvant pour traiter et prévenir divers processus de vieillissement ainsi que les conditions associées, telles que l'athérosclérose, l'hypertension, le diabète, les tumeurs, l'obésité, l'hypertriglycéridémie, l'hypercholestéromie, le vieillissement de la peau, l'alopécie, la panniculopathie (cellulite), l'ostéoporose, le vieillissement cérébral (notamment les maladies d'Alzheimer et de Parkinson), la perte de mémoire, le stress, la dépression, les syndromes ménopausiques et l'hypertrophie bénigne de la prostate. (107) Une autre étude a montré que la pipérine peut protéger contre le stress oxydatif induit par le diabète, en réduisant les dommages oxydatifs pendant un traitement de 14 jours dans un modèle de diabète sucré. (53,108)

### ***III.4.3. Activité anticonvulsivante :***

L'activité anticonvulsive de la pipérine a été évaluée dans des modèles de convulsions induites par électrochocs maximaux (MES) et pentylènetétrazole (PTZ) chez la souris. La participation du récepteur cationique transitoire TRPV1 a été identifiée comme un facteur clé dans l'inhibition des convulsions causées par ces modèles. (103)

Un retard significatif dans l'apparition des crises myocloniques et des crises cloniques généralisées a été observé après l'administration de pipérine à des doses de 40 et 80 mg/kg. En outre, une réduction notable de l'incidence de l'extension tonique des membres postérieurs (THE) induite par MES et de la réactivité immunitaire des Fos induite par PTZ dans le gyrus denté a été constatée après administration de pipérine. (6)

Dans une autre étude, l'activité anticonvulsive de la pipérine a été également testée dans des modèles de crises d'épilepsie induites par le pentylènetétrazole (PTZ) et la picrotoxine (PIC) chez la souris. Un retard significatif dans l'apparition des crises a été observé après une injection intrapéritonéale de pipérine à des doses de 30, 50 et 70 mg/kg, comparé à des médicaments de référence tels que l'acide valproïque (200 mg/kg), la carbamazépine (30 mg/kg) et le diazépam (1 mg/kg). Ces résultats mettent en évidence les effets

anticonvulsivants de la pipérine, suggérant que ceux-ci pourraient être médiés par les voies gabaergiques. (6)

### **III.4.4. Activité antidépressive :**

La pipérine et son dérivé, l'antiépilépsirine, possèdent une activité antidépresseur qui a été étudiée à travers des modèles de dépression, tels que le test de natation forcée et le test de suspension de queue. (109)

Au cours de cette étude, les concentrations de monoamines dans le cerveau ainsi que les activités des monoamines oxydases A et B (MAO-A et MAO-B) ont été analysées. Les résultats montrent qu'après une administration chronique d'antiépilépsirine :

- Le niveau de dopamine augmente significativement dans le striatum, l'hypothalamus et l'hippocampe. (109)
- Le niveau de sérotonine augmente également dans l'hypothalamus et l'hippocampe.
- En revanche, un traitement chronique avec uniquement la pipérine améliore le niveau de sérotonine dans l'hypothalamus et l'hippocampe, mais n'a pas d'effet significatif sur le niveau de dopamine. Ni l'antiépilépsirine ni la pipérine n'ont montré d'influence notable sur le niveau de noradrénaline, quelle que soit la région du cerveau étudiée. (109)

Les essais d'activité des MAO ont indiqué que la pipérine et l'antiépilépsirine présentent une activité inhibitrice mineure sur ces enzymes. Selon Liet, le potentiel antidépresseur de la pipérine serait médié par la régulation du système sérotoninergique, tandis que l'effet antidépresseur de l'antiépilépsirine pourrait être attribué à une régulation conjointe des systèmes sérotoninergique et dopaminergique. (109)

Dans une autre étude, la pipérine a démontré une activité antidépresseur ainsi qu'un effet cognitif chez des rats mâles Wistar, traités à diverses doses (5, 10 et 20 mg/kg/jour). (110)

Par ailleurs, l'effet antidépresseur de la pipérine et ses mécanismes d'action potentiels ont été évalués dans un modèle de dépression induit par la corticostérone chez la souris. Après 3 semaines d'injections de corticostérone, un comportement dépressif a été observé chez les souris, caractérisé par :

- Une diminution significative de la consommation de saccharose.
- Une augmentation du temps d'immobilité dans le test de natation forcée et le test de suspension de queue.

Le traitement des souris avec la pipérine a permis de réduire significativement ces altérations comportementales et biochimiques induites par la corticostérone. Ces résultats indiquent que la pipérine produit un effet antidépresseur dans ce modèle de dépression. (101)

### ***III.4.5.Effet de la pipérine sur le tractus gastro-intestinal :***

La pipérine influence rapidement l'absorption des nutriments ainsi que celle des xénobiotiques gastro-intestinaux en exerçant un effet sur le métabolisme intestinal, hépatique et tissulaire. Il a été démontré que la pipérine forme des complexes polaires avec des xénobiotiques et des nutriments, agissant ainsi comme une molécule polaire. En conséquence, ces composés présentent un bon cloisonnement et sont capables de traverser les barrières membranaires. (111)

Des études ont également mis en évidence une neuro-régulation de l'ensemble du tractus gastro-intestinal (112,113), affectée par la pipérine. Celle-ci interagit directement avec la couche épithéliale intestinale, ce qui influence l'absorption des aliments, des nutriments et des médicaments. (114,115)

En outre, la pipérine inhibe la vidange gastrique ainsi que le transit gastro-intestinal, comme cela a été observé chez des rats et des souris. (116,117)

### ***III.4.6.Effet de la pipérine sur les pompes à efflux :***

En 2006, Inshad Ali Khan a signalé que la pipérine (un isomère trans), un constituant majeur du poivre noir, lorsqu'il est administré en combinaison avec la ciprofloxacine, il réduit considérablement les CMI et prévient également la concentration de la ciprofloxacine dans le cas du staphylococcus aureus, y compris le S. aureus résistant à la méticilline. L'accumulation accrue de bromure d'éthidium et, par conséquent, la diminution des effets de cette substance dans les souches sauvages et mutantes ont été observées en présence de la pipérine, ce qui suggère son implication dans l'inhibition des pompes à efflux bactériennes et prouve ainsi son rôle en tant qu'inhibiteur de pompe à efflux.(118)

### ***III.4.7.Effet de la pipérine au niveau rénal et hépatique :***

Actuellement, une étude menée par Begum et al. (2015) a examiné l'effet de la pipérine et de la metformine, administrées seules ou en combinaison, sur la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité induites par la gentamicine. Les résultats suggèrent que :

- La pipérine, à des doses de 50 mg/kg et 100 mg/kg,
- La metformine, à une dose de 100 mg/kg,
- Et une combinaison de pipérine (50 mg/kg) et de metformine (50 mg/kg) se sont révélées bénéfiques dans le traitement de ces toxicités induites par la gentamicine. (119)

Dans une autre étude, il a été constaté que la pipérine inhibait, de manière dose-dépendante, l'augmentation des concentrations sériques de GPT et de GOT dans un modèle de toxicité hépatique chez la souris causée par la D-galactosamine. (120)

L'activité hépato-protectrice de l'extrait méthanolique des fruits de poivre noir a également été évaluée dans des dommages hépatiques induits par l'éthanol et le CCl<sub>4</sub> chez des rats Wistar. Pour cela, l'éthanol-CCl<sub>4</sub> a été utilisé pour provoquer une hépatotoxicité, et les rats ont reçu :

- Un traitement prophylactique avec un extrait méthanolique de poivre noir (100 mg/kg et 200 mg/kg de poids corporel),
- Un prétraitement à la pipérine (50 mg/kg de poids corporel), pendant 15 jours. (120)

Les résultats ont montré une protection hépatique significative, comme en témoignent les paramètres biochimiques suivants :

- **Augmentation** des niveaux de triglycérides, d'alanine transaminase (ALT), d'aspartate transaminase (AST), de phosphatase alcaline (ALP) et de bilirubine après l'administration d'éthanol-CCl<sub>4</sub>. Ces niveaux ont été rétablis à la normale après le prétraitement avec l'extrait méthanolique de poivre noir et la pipérine. (120)
- **Diminution** des teneurs en superoxyde dismutase (SOD), en catalase et en glutathion réductase due à l'éthanol-CCl<sub>4</sub>, rétablies après le prétraitement. (120)
- **Réduction significative** des peroxydations lipidiques après prétraitement.

Les résultats obtenus étaient comparables à ceux du traitement avec Liv52 (1 mL/kg) administré pendant 15 jours. (120)

Les observations morphologiques et histopathologiques du foie ont corroboré les paramètres biochimiques, confirmant ainsi l'effet protecteur.

En conclusion, le poivre noir, grâce à la pipérine, possède une activité hépato-protectrice significative et un fort potentiel thérapeutique dans le traitement des affections hépatiques. (120)

### ***III.4.8.Effet antiplaquettaire de la pipérine :***

Les effets inhibiteurs de la pipérine, isolée des fruits du poivre long, sur l'agrégation des plaquettes lavées de lapin ont été étudiés. Les résultats montrent que la pipérine exerce une activité inhibitrice dépendante de la dose sur l'agrégation plaquettaire induite par :

- Le collagène,
- L'acide arachidonique (AA),
- Et le facteur d'activation plaquettaire (PAF).(121)

### *III.4.9. Effet de la pipérine sur le profil lipidique :*

Une étude menée par Peela a évalué les paramètres biochimiques tels que la glycémie et le profil lipidique avant et après l'administration de la pipérine. Les résultats ont montré que :

- **Effets bénéfiques sur les lipides** : La pipérine réduit le niveau de triglycérides et augmente le taux de HDL.
- **Aucun effet sur la glycémie** : Aucun rôle n'a été observé dans la réduction de la glycémie ni du cholestérol total. (122)

De plus, la pipérine empêche de manière significative l'accumulation de lipides plasmatiques et de lipoprotéines en modulant les enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique. (123)

En 2011, une étude s'est intéressée à l'effet de la pipérine sur la dyslipidémie induite par l'obésité. Les principaux résultats sont les suivants :

- La supplémentation en pipérine, combinée à une alimentation riche en graisses, réduit :
  - Le poids corporel,
  - Le taux de triglycérides,
  - Le cholestérol total,
  - Les concentrations de LDL et de VLDL,
  - La masse grasse.
- Elle augmente également les concentrations de HDL, le tout à faibles doses (40 mg/kg), sans provoquer de changements significatifs dans l'apport alimentaire.
- Cette action est supposée être liée à l'implication des récepteurs MC-4. (124)

Par ailleurs, la pipérine affecte la composition lipidique et certaines enzymes lipogènes dans les testicules du rat. Les observations sont les suivantes :

- À une dose orale de **5 et 10 mg/kg** de poids corporel :
  - **Diminution** de la teneur totale en lipides, principalement en raison d'une réduction des concentrations de phospholipides et de cholestérol libre. (125)
  - **Augmentation** marquée du cholestérol total et de l'ester de cholestérol. (125)
  - **Augmentation significative** du taux de triglycérides et de glycéride total, au détriment du diglycéride. (125)
- En ce qui concerne les enzymes lipogéniques :
  - À **fortes doses**, la malate déshydrogénase (MDH), l'enzyme malique (ME) et l'isocitrate déshydrogénase (ICDH) sont inhibées.
  - À **faibles doses**, seules les activités MDH et ME sont inhibées. (125)

### ***III.4.10. Activité anticancéreuse de la pipérine :***

De nombreuses études ont mis en évidence l'activité antitumorale de la pipérine, administrée par voie orale. L'extrait alcoolique de pipérine a démontré une efficacité notable grâce à ses activités immunomodulatrices et antitumorales. De plus, la pipérine réduit le cancer du poumon en modifiant la peroxydation lipidique et en activant les enzymes de protection antioxydante. (59,68,70)

Il a été rapporté que la pipérine inhibe la transition G1/S et réduit la prolifération des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine. (126)

Une étude a également exploré l'administration combinée de pipérine et de docetaxel pour évaluer l'activité pharmacocinétique du docetaxel **in vitro** et **in vivo**. Les résultats ont montré que l'utilisation nutritionnelle de la pipérine augmentait l'efficacité du docetaxel dans un modèle de xénogreffe, tout en réduisant les effets secondaires chez les souris. (96)

L'activité anticancéreuse de la pipérine a été démontrée contre diverses lignées cellulaires cancéreuses, notamment dans le cancer de la prostate. La pipérine inhibe de manière dose-dépendante la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate (LNCap, 22RV1, PC-3 et DU-145). Le traitement à la pipérine provoque également une apoptose par l'activation de la caspase-3 et le clivage des protéines PARP-1 dans les cellules PC-3, DU-145 et LNCap. (73)

La pipérine perturbe l'expression des récepteurs androgènes dans les cellules LNCap, entraînant une diminution significative du niveau d'antigène spécifique de la prostate (PSA). De plus, après traitement à la pipérine, l'expression des facteurs de transcription phosphorylés STAT-3 et du facteur nucléaire  $\kappa$ B est réduite dans les cellules LNCap, PC-3 et DU-145. (127)

Les études montrent également une réduction significative de la croissance tumorale, indépendante ou dépendante des androgènes, chez la souris. Enfin, la pipérine est reconnue comme une molécule non génotoxique, avec des propriétés anti-mutagènes et anti-tumorales. (127)

### ***III.4.11. Effet de la pipérine sur le métabolisme : un Bio-activateur :***

La pipérine a démontré des effets significatifs sur l'amélioration de la biodisponibilité de nombreux médicaments et nutriments d'importance thérapeutique. Elle agit en augmentant l'absorption des substances à partir du tractus gastro-intestinal grâce à divers mécanismes. En modifiant la dynamique des membranes et en augmentant leur perméabilité au site d'absorption, elle facilite ainsi le passage des composés bioactifs. (128)

De plus, la pipérine prolonge la demi-vie sérique de certaines substances, telles que le bêta-carotène et la coenzyme Q10, tout en réduisant le métabolisme de nombreux médicaments. Cette action est due à son rôle d'inhibiteur enzymatique, bloquant notamment des enzymes comme le cytochrome BS, CYP3A4, le cytochrome NADPH, l'Udpglucuronyl transférase, l'UDP-glucose déshydrogénase (UDP-GDH) et l'hydroxylase des hydrocarbures aryliques (AAH). (129)

L'inhibition enzymatique par la pipérine entraîne une biodisponibilité accrue de plusieurs médicaments et nutriments, notamment : amoxicilline, ampicilline, acéfotaxime, carbamazépine, ciprofloxacine, norfloxacine, métronidazole, oxytétracycline, nimésulide, pentobarbitone, phénytoïne, resvératrol, bêta-carotène, curcumine, acide gallique, tiferron, névirapine et spartéine. Ces améliorations se produisent par le biais de mécanismes variés, renforçant ainsi son rôle comme activateur de biodisponibilité et inhibiteur puissant du métabolisme des médicaments. (129)

### ***III.4.12. Activité Immunomodulatrice :***

L'activité immunomodulatrice in vitro de la pipérine a été étudiée pour évaluer son rôle dans l'amélioration de l'efficacité de la rifampicine dans un modèle murin d'infection à *Mycobacterium tuberculosis*. Les splénocytes de souris ont été utilisés comme modèle pour analyser les effets de la pipérine sur la production de cytokines, l'activation des macrophages et la prolifération des lymphocytes. Les résultats ont montré que les splénocytes des souris traitées avec la pipérine présentaient une augmentation significative de la sécrétion de cytokines Th-1 (IFN- $\gamma$  et IL-2), une activation accrue des macrophages et une prolifération améliorée des cellules T et B. La combinaison de la pipérine et de la rifampicine (1 mg/kg) a montré une efficacité protectrice contre *Mycobacterium tuberculosis*, attribuée à l'activité immunomodulatrice de la pipérine. (102).

### ***III.4.13. Effets de la pipérine sur le SNC et la conductivité nerveuse :***

Des études ont montré que le poivre noir, dont la pipérine est un constituant actif, a été traditionnellement utilisé comme stimulant nerveux. Ces recherches concluent que la pipérine est responsable de l'activité analeptique observée, probablement en raison de son effet sur la transmission des impulsions nerveuses dans le tronc cérébral. Plus récemment, l'activité pharmacologique de la pipérine, ainsi que celle de la capsaïcine, a été liée à son interaction avec divers neurotransmetteurs tels que la substance P, les neurokinines et le peptide lié au gène de la calcitonine. Ces neurotransmetteurs jouent un rôle clé dans la transmission nerveuse et la communication dans différentes régions du corps. (130,131)

L'interaction de la pipérine et de la capsaïcine avec les transmissions nerveuses a été mise en évidence par diverses études portant sur les récepteurs vanilloïdes récemment découverts. Ces récepteurs, présents dans les systèmes nerveux central et périphérique, sont capables de se lier à des composés naturels présentant une structure chimique similaire à la vanilline, tels que la pipérine, la capsaïcine et les gingérols. (132)

Les composés vanilloïdes, comme la pipérine, se fixent à ces récepteurs spécifiques, ce qui entraîne une diminution des transmetteurs impliqués dans la sensation douloureuse, notamment la substance P ainsi que certains acides aminés comme le glutamate et l'aspartate. (132) Une étude menée par Kawada et al. a conclu que la pipérine pourrait également jouer un rôle dans la neurorégulation en stimulant la sécrétion de neurohormones catécholamines, en particulier l'épinéphrine. (133)

La pipérine semble influencer à la fois le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique en modulant les taux sanguins de certains composés neurotropes et relaxants musculaires. Elle potentialise également le temps de sommeil induit par les barbituriques, comme l'hexabarbital, chez différents animaux de laboratoire. (134)

Par ailleurs, elle s'est révélée tout aussi efficace que des analeptiques connus, tels que le métrazol et le nikéthamide, pour contrer les dépressions respiratoires provoquées par les barbituriques chez les chiens. La pipérine a démontré une action prolongée pour inverser la dépression respiratoire induite par la morphine ou les barbituriques. Une autre étude a montré que la pipérine, administrée à des rats, réduit la perception de la douleur en stimulant la libération d'endorphines  $\beta$  dans le cerveau. (135)

De plus, des recherches récentes ont mis en évidence l'efficacité de la pipérine dans le traitement des troubles de l'humeur. (110) Enfin, la pipérine et ses dérivés ont montré une action anticonvulsive démontrée chez la souris et le rat. (136)

### **III.5. Données pharmacocinétiques :**

Lors de l'administration de pipérine à des rats albinos mâles, à une dose de 170 mg/kg par gavage ou 85 mg/kg par voie intrapéritonéale (i.p.), environ 97 % de la dose ont été absorbés, indépendamment du mode d'administration. Seulement 3 % de la dose administrée ont été excrétés sous forme de pipérine dans les selles, tandis que la pipérine n'était pas détectable dans l'urine. (137)

Lorsque de 100 à 1000  $\mu\text{g}$  de pipérine ont été incubés dans des sacs intestinaux de rats, environ 44 à 63 % de la pipérine ajoutée ont disparu du côté muqueux. (137,138)

L'absorption de la pipérine, maximale à 800  $\mu\text{g}$  par 10 ml, était d'environ 63 %. Les quantités absolues de pipérine absorbées *in vitro* dépassaient celles d'autres composés d'épices

structurellement similaires, comme la curcumine (137), indiquant que la pipérine ne subit aucun changement métabolique majeur lors de l'absorption. Lorsqu'elle était associée à des micelles mixtes, l'absorption intestinale in vitro de la pipérine était relativement plus élevée. (138)

En ce qui concerne son passage dans l'intestin, la concentration la plus élevée de pipérine dans l'estomac et l'intestin grêle a été atteinte après environ 6 heures. Des traces de pipérine ont été détectées dans le sérum, les reins et la rate entre 30 minutes et 24 heures après administration. Environ 1 à 2,5 % de la pipérine administrée par voie intrapéritonéale ont été retrouvés dans le foie de 0,5 à 6 heures après administration, comparativement à 0,1 à 0,25 % de la dose administrée par voie orale. L'excrétion accrue d'acides uroniques conjugués, de sulfates conjugués et de phénols suggère que la scission du groupe méthylènedioxy de la pipérine, ainsi que la glucuronidation et la sulfatation, sont les principales étapes de la disposition de la pipérine chez le rat. (139)

Après administration orale de 170 mg/kg de pipérine à des rats, les métabolites retrouvés dans l'urine entre 0 et 96 heures ont été identifiés comme l'acide pipéronilique, l'alcool pipéronique, et l'acide pipérional et vanillique sous forme libre, tandis que seul l'acide pipérique a été détecté dans la bile entre 0 et 6 heures. (139) Le rein semble être la principale voie d'excrétion des métabolites de la pipérine chez le rat, car aucun métabolite n'a été détecté dans les matières fécales. Dans une étude récente, un nouveau métabolite majeur a été détecté dans l'urine et le plasma des rats, identifié par chromatographie liquide haute performance (HPLC) comme l'acide 5-(3,4-méthylènedioxyphényl)-2,4-pentadiénoïque-N-(3-ylpropionique)-amide. Ce métabolite conserve l'anneau méthylènedioxy et les liaisons doubles conjuguées, tandis que l'anneau pipéridine est modifié pour former un groupe acide propionique. (141) Les données suggèrent que la pipérine est absorbée très rapidement à travers la barrière intestinale, agissant éventuellement comme une molécule apolaire et formant un complexe apolaire avec des médicaments et des solutés. Il peut moduler la dynamique de la membrane en raison de son partitionnement facile, contribuant ainsi à une perméabilité efficace à travers la barrière. (141)

Étant essentiellement insoluble dans l'eau, la pipérine est supposée être transportée par l'albumine sérique après son absorption intestinale. La liaison de la pipérine à l'albumine sérique a été étudiée à l'aide de techniques de fluorescence à l'état stationnaire et à résolution temporelle (142). La constante de liaison pour l'interaction de la pipérine avec l'albumine sérique humaine a été mesurée à  $0,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , avec une stœchiométrie de 1:1. Les mesures de fluorescence ont suggéré que la pipérine se lie au sous-domaine IB de l'albumine sérique,

ce qui est crucial pour comprendre son transport dans le sang dans des conditions physiologiques. (143)

### **III.6. Données cliniques :**

#### ***III.6.1. Effet de la pipérine sur la biodisponibilité orale des médicaments et des composés thérapeutiques naturels :***

La plupart des études cliniques chez les êtres humains ont porté sur l'amélioration de la biodisponibilité par administration concomitante de la pipérine avec divers médicaments. Dans ces essais, il a été constaté que divers groupes de médicaments étaient plus efficaces et restaient plus longtemps dans le plasma lorsqu'ils étaient administrés avec de la pipérine. L'une des premières études a été celle d'Atal et al. qui a utilisé la vasicine et la sparteine comme médicaments d'essai, en les associant à la pipérine. Ils ont constaté que les concentrations sanguines de la sparteine ont augmenté de plus de 100 %, tandis que celles de la vasicine ont augmenté de près de 233 % lorsqu'elles étaient administrées avec la pipérine. (144)

Sur la base de cette étude précoce, une autre série d'études sur les humains a étudié l'effet de la pipérine en co-administration avec la phénytoïne et a constaté qu'une seule dose quotidienne de pipérine diminuait l'absorption  $T_{1/2}$  et prolongeait l'élimination  $T_{1/2}$ , entraînant une SSC plus élevée par rapport à la phénytoïne seule. Ces résultats ont démontré la modification des paramètres pharmacocinétiques de ce médicament antiépileptique ainsi qu'une biodisponibilité accrue de la phénytoïne lorsqu'elle est administrée avec la pipérine. (145)

Une autre étude sur l'effet de la pipérine sur la biodisponibilité et la pharmacocinétique des médicaments propranolol et théophylline a mis en évidence un  $T_{max}$  antérieur, ainsi qu'une  $C_{max}$  et une SSC plus élevées chez les sujets ayant reçu de la pipérine avec le propranolol. Pour la théophylline, on a observé une  $C_{max}$  plus élevée, une demi-vie d'élimination plus longue et une SSC plus élevée. (146)

Shoba et al. ont signalé que l'administration concomitante de la pipérine et de la curcumine produisait des concentrations beaucoup plus élevées de ce composé bioactif (0,25 à 1 h après l'administration), ainsi qu'une augmentation de sa biodisponibilité de 2000 %. (147) La combinaison de dexibuprofène avec une formule multi-ingrédients (d'acide lipoïque, de curcumine et de pipérine) a réduit la douleur neuropathique de plus de 66 % chez les sujets atteints de sciatique lombaire et de syndrome du canal carpien, comparé à environ 40 % pour l'utilisation de dexibuprofène seul. (148)

En outre, il a été constaté que lorsque la pipérine a été combinée avec le  $\beta$ -carotène, une augmentation significativement plus grande (60 % de SSC en plus) dans le sérum du  $\beta$ -carotène s'est produite pendant la supplémentation orale avec ces deux composés. (149) Les mêmes auteurs ont constaté que la supplémentation en pipérine peut améliorer l'absorption de la coenzyme Q10, mais ont aussi démontré que cet effet dépend de la dose et du temps. (150) Un autre composé naturel, le resvératrol, est plus biodisponible lorsqu'il est co-administré avec de la pipérine. Une augmentation significative du flux sanguin cérébral pendant l'exécution des tâches a été observée en comparaison avec le placebo et le resvératrol seul. (104)

La pipérine s'est révélée très efficace pour améliorer les résultats du traitement antituberculeux avec la Risorine (capsules composées de Rifampicine 200 mg + Isoniazide 300 mg + Pipérine 10 mg) administrée avec de l'éthambutol et du pyrazinamide. (151) Les résultats ont montré que la Risorine fournissait plus de rifampicine dans le sang et maintenait des concentrations plus élevées par rapport à la thérapie conventionnelle à la rifampicine, tout en offrant un meilleur profil de sécurité, un taux de conversion plus élevé d'expectoration, et un taux de guérison plus élevé. (151,152)

Bedada et Boga ont étudié l'effet de la pipérine sur la pharmacocinétique de la chlorzoxazone chez des volontaires sains et ont observé une interaction significative entre ces deux composés. Cela s'est manifesté par une augmentation de la Cmax, de la SSC et de la T1/2, avec une diminution du Kel et du CL/F de la chlorzoxazone lorsqu'elle est administrée avec de la pipérine. (153) Les mêmes auteurs ont trouvé que la prise de pipérine améliore la biodisponibilité de la féxofénadine, où le traitement à la pipérine augmentait considérablement la Cmax et la SSC de ce médicament. (154) Une augmentation de 3 fois de la Cmax et de 1,5 fois de la SSC a été observée pour le tétrahydrocannabinol, tandis qu'une augmentation de 4 fois de la Cmax et de 2,2 fois de la SSC a été observée pour le cannabidiol administré conjointement avec la pipérine. (155)

### ***III.6.2.Effet de la pipérine sur le tractus digestif :***

La pipérine pure s'est avérée très bénéfique dans le traitement de la dysphagie, comme l'a montré l'essai de Rofes et al., réalisé sur 40 patients atteints de dysphagie, répartis aléatoirement en deux groupes recevant deux doses de pipérine (150  $\mu$ M ou 1 mM). La pipérine a amélioré la sécurité de l'ingestion en réduisant la prévalence des fausses routes, le score de gravité de l'échelle pénétration-aspiration et a raccourci le temps de fermeture du vestibule laryngé en fonction de la dose. (156)

Une autre étude a examiné l'efficacité de la pipérine co-administrée au lycopène et à la curcumine (PLC), en complément du détartrage et du surfaçage radiculaire (détartrage sous-gingival) (SRD) chez les patients atteints de gingivite modérée. Une réduction des paramètres cliniques était plus élevée dans le groupe d'essai recevant SRD + PLC que dans le groupe témoin (SRD seul) après 21 jours de traitement. (8)

### ***III.6.3.Effet de la pipérine sur le vitiligo :***

Deux essais cliniques ont évalué l'effet de la pipérine par voie locale sur le traitement du vitiligo et ont révélé des effets positifs. Chez les patients atteints de vitiligo facial, le traitement local à la pipérine combiné avec un traitement UVB à bande étroite (NB-UVB) a entraîné un taux de repigmentation significativement plus élevé aux intervalles de temps de 1, 2 et 3 mois après le traitement que dans le groupe témoin. (157)

Dans une autre étude, un extrait de fruit de *Piper nigrum* et de la pipérine pure ont été intégrés dans différentes pommades et appliqués pendant 12 semaines sur les différentes zones cutanées des patients atteints de vitiligo. Les résultats ont montré une plus grande efficacité de l'extrait de poivre noir que celle de la pipérine pure. (158)

Dans une étude de Donata et al., une préparation ayurvédique composée de gingembre séché, de poivre noir, de pippali et de racine de plumbago bleu fermentée dans l'urine de vache a été administrée deux fois par jour avant un repas aux patients vitiligo sous forme de boisson. Après six mois de traitement, seulement 40 % des patients ont montré un soulagement des symptômes. (159)

### ***III.6.4.Autres effets :***

Plusieurs études cliniques ont appliqué la pipérine comme agent de biodisponibilité pour les préparations de curcuminoïdes. Chez les sujets souffrant de complications pulmonaires chroniques dues à l'exposition à la moutarde soufrée et recevant une thérapie respiratoire standard, le traitement par combinaison de la pipérine et de curcuminoïdes pendant 4 semaines a considérablement amélioré le score du questionnaire respiratoire de St. George (SGRQ) ainsi que celui du test d'évaluation de la maladie pulmonaire obstructive chronique MPOC (CAT) (total et sous-échelle), augmenté la glutathion réductase et réduit le dialdéhyde malonique, améliorant ainsi la qualité de vie générale. (160)

Panahi et al. ont étudié l'efficacité de la supplémentation avec une préparation de curcuminoïdes contenant de la pipérine sur les mesures du stress oxydatif et de l'inflammation chez les patients atteints du syndrome métabolique. (161)

Les résultats du groupe d'essai ont démontré une amélioration des activités sériques du superoxyde dismutase et une réduction des concentrations du dialdéhyde malonique et des protéines C-réactives (CRP) par rapport au placebo. Dans le but de déterminer l'impact d'une consommation unique d'un CBF1 (capsaïcinoïdes, épigallocatechine gallate, pipérine, et L-carnitine) sur la satiété, la dépense énergétique au repos (REE), le quotient respiratoire, le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), les acides gras libres (FFA) et la libération de glycérol, Rondanelli et al. ont mené un essai clinique sur 37 adultes en surpoids, et les résultats ont montré une amélioration de tous les paramètres étudiés. (162)

CHAPITRE IV : LES ANALOGUES AMIDES DE LA PIPERINE ET  
LEURS METHODES DE SYNTHESE

IV.1. Les analogues de la pipérine :

Divers analogues d'amides de pipérine ont été synthétisés en utilisant des aldéhydes aromatiques substitués qui subissent généralement des réactions d'hydrolyse alcaline en présence d'éthanol, fournissant des unités de base telles que la pipéridine, la pyrrolidine ou l'isobutylamine, ainsi que leurs acides correspondants, tels que l'acide pipérique, l'acide pipérinique ou l'acide guinéensique (Figure 25), selon la nature du carbone de la chaîne de l'amide respectif. (99)

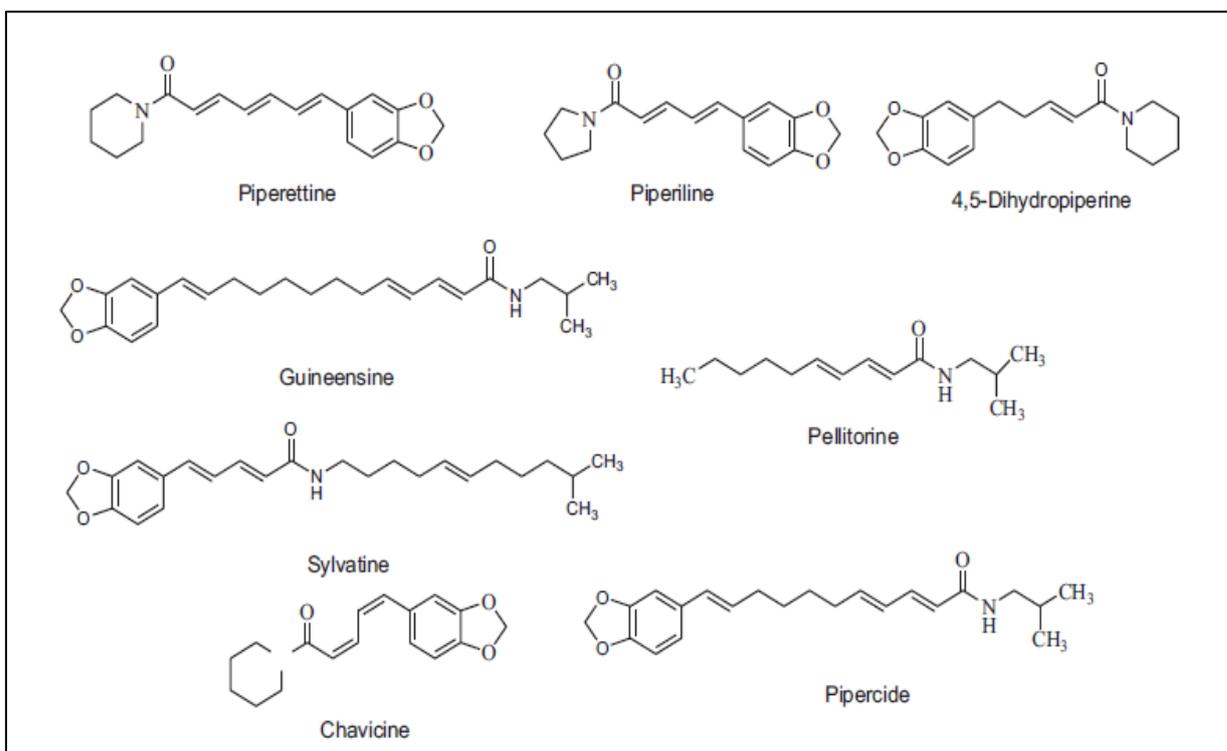


Figure 25 : Quelques analogues amides de la pipérine.(99)

Quelle que soit la potentialité de la pipérine, peu de travaux ont été menés pour étudier l'efficacité des analogues de la pipérine comme agents anti-inflammatoires, analgésiques et antibactériens. (99)

Les analogues nouvellement synthétisés de la pipérine ont augmenté la potentialité du composé naturel et apparaissent comme une nouvelle approche dans la découverte de nouveaux composés actifs. Il semble que la liaison amide joue un rôle important dans l'activité de la pipérine. Certaines études ont tenté de remplacer le noyau de pipéridine par

## CHAPITRE IV : LES ANALOGUES AMIDES DE LA PIPERINE ET LEURS METHODES DE SYNTHÈSE

différents groupements chimiques, tels que des acides aminés et des anilines substituées, etc.(99)

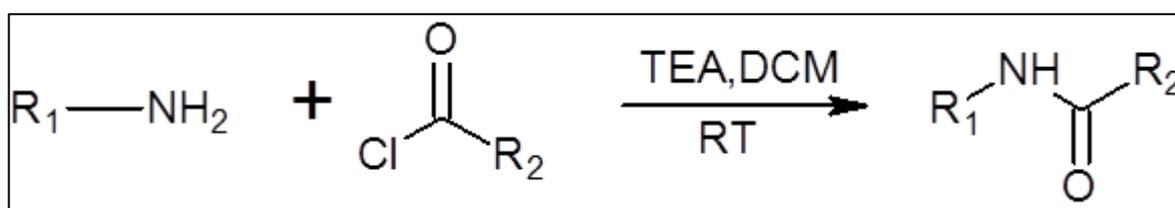
Certains amides de la pipérine ont été synthétisés à partir de l'acide pipérique comme substrat de départ. L'acide pipérique peut être obtenu à partir de la pipérine par hydrolyse alcaline simple dans l'éthanol, en utilisant de l'hydroxyde de potassium ou du monohydrate de lithium. L'acide pipérique formé est converti en son chlorure, qui est ensuite réagi avec l'amine appropriée. (10,163,164)

### IV.2. Méthodes de synthèse d'amide :

Les méthodes utilisées pour former un amide sont appelées méthodes de couplage. Le couplage consiste en une attaque du groupe amino d'un résidu sur l'atome de carbone carbonyle du composé contenant la fonction carboxyle, qui a été activé par l'introduction d'un groupe attracteur d'électrons. La forme activée peut être un réactif stable, tel que certains esters actifs ; un composé de stabilité intermédiaire, tel qu'un halogénure d'acyle, un azide ou un anhydride mixte ou symétrique, qui peut être isolé ou non ; ou un intermédiaire transitoire, qui n'est ni isolable ni détectable. (165)

#### IV.2.1. Amination des chlorures ou anhydrides d'acyle :

Le couplage direct entre un acide carboxylique et une amine n'est pas un choix adapté en chimie de synthèse, en raison de l'échange concomitant de protons entre l'acide et la base. La stratégie la plus courante est la conversion de l'acide en une forme activée (c'est-à-dire plus électrophile), comme le chlorure ou l'anhydride d'acyle (Figure 26). Ces espèces réagissent facilement avec les amines primaires et secondaires pour générer l'amide correspondant.(166)

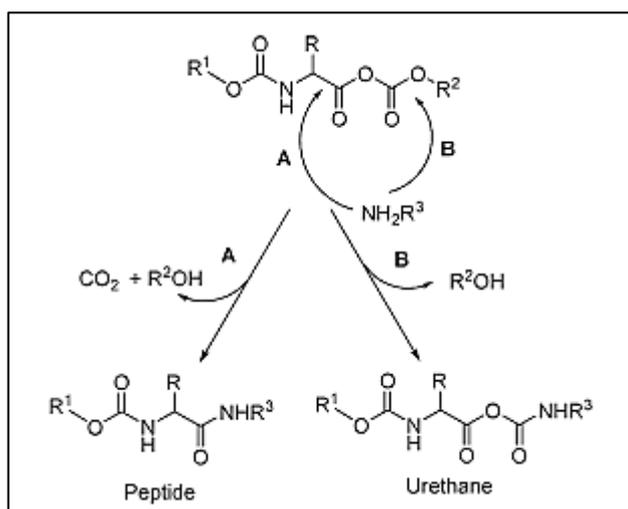


**Figure 26 :** Réaction d'amidification par les chlorures d'acyle. (166)

L'acylation de l'amine par le chlorure d'acyle est souvent appelée "réaction de Schotten-Baumann", du nom de ses inventeurs. (167)

La réaction se produit généralement rapidement à température ambiante dans des solvants aprotiques en présence d'une base adaptée, par exemple une amine tertiaire ou de la pyridine. La base en solution aqueuse est souvent ajoutée goutte à goutte, afin de créer à terme un système biphasique. (10)





**Figure 28** : Mécanisme de formation de liaisons amides à partir d'anhydride mixte.(168)

#### ***IV.2.2. Méthodes dérivées de chimie peptidique (intermédiaires d'ester actifs) :***

Des progrès considérables ont été réalisés dans la synthèse des amides au cours des trois dernières décennies, grâce aux travaux réalisés dans le domaine de la synthèse peptidique. Les réactifs de couplage peptidique disponibles sur le marché sont nombreux et variés. Toutefois, ils partagent tous un principe chimique fondamental : la synthèse d'un ester hautement activé. De nombreux réactifs de couplage peptidique sont spécifiquement destinés à la synthèse peptidique automatisée, tant en phase solide qu'en solution. Cependant, les mêmes stratégies de synthèse peuvent être utilisées en principe pour la synthèse de n'importe quel amide. (88)

Les réactifs les plus courants appartiennent à deux grands groupes : les carbodiimides et les aminium/uronium d'hydroxybenzotriazole, ainsi que les sels de phosphonium. (88)

##### ***IV.2.2.1. Méthode d'activation au carbodiimide :***

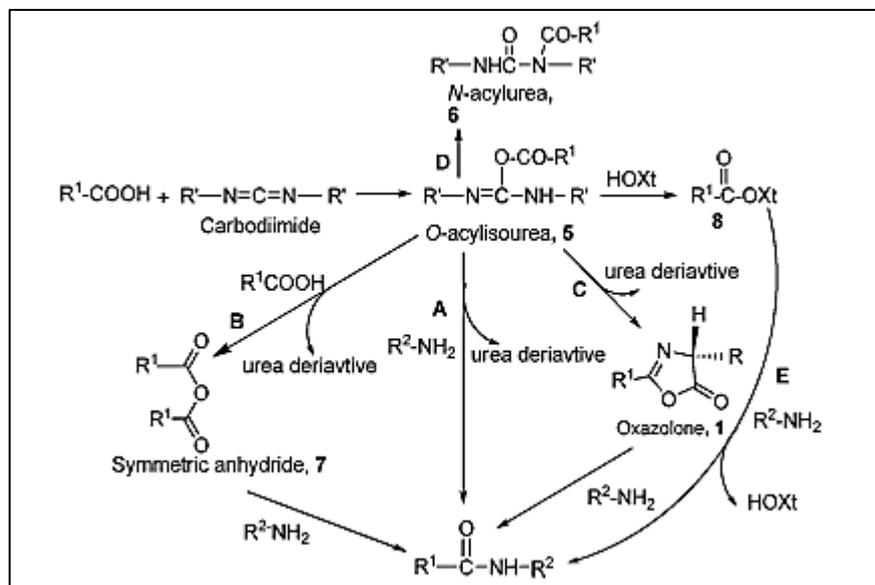
L'approche la plus traditionnelle utilisée pour former des liaisons peptidiques est la méthode du carbodiimide, utilisant le dicyclohexylcarbodiimide. Les carbodiimides contiennent deux atomes d'azote, qui sont faiblement alcalins, ce qui suffit à déclencher une réaction entre le carbodiimide et un acide pour générer de l'O-acylisourée. (88)

L'O-acylisourée d'un acide N-alkoxycarbonylamino ou d'un peptide est l'une des espèces actives les plus réactives et subit rapidement une aminolyse en présence de l'amine pour produire le peptide (voie A, Figure 28). Cependant, sous un excès d'acide carboxylique, l'O-acylisourée subit une attaque par une seconde molécule de l'acide pour donner l'anhydride symétrique (voie B, Figure 28), ce dernier étant alors aminolysé pour donner le peptide. Une

## CHAPITRE IV : LES ANALOGUES AMIDES DE LA PIPERINE ET LEURS METHODES DE SYNTHESE

troisième option est que certaines O-acylisourées cyclisent pour former l'oxazolone (voie C ; Figure 29), qui donne également le peptide par aminolyse. (88)

Cependant, l'oxazolone est moins réactif que d'autres dérivés et peut entraîner une racémisation. (169)



**Figure 29 :** Mécanisme de formation de liaisons amides à partir d'une réaction à médiation carbodiimide.(142)

Une quatrième réaction, qui est indésirable, peut se produire en raison de la réactivité élevée de l'O-acylisourée. Cette réaction consiste en son réarrangement (Voie D, Figure 29) vers la N-acylurée, une forme inerte stable de l'acide entrant. La réaction, qui est irréversible et consomme de l'acide de départ sans produire de peptide, est très rapide en N,N-diméthylformamide (DMF) et beaucoup plus lente en dichlorométhane (DCM). (170)

Les trois réactifs les plus courants pour ce groupe sont le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le diisopropylcarbodiimide (DIC) et le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC). Il faut noter que la synthèse de l'O-acyl-isourée bénéficie de l'utilisation de solvants apolaires lorsque cela est possible (par exemple, du DCM), mais de nombreux solvants aprotiques polaires peuvent également être utilisés. (170)

Les O-acyl-isourées comptent parmi les intermédiaires les plus actifs pour le couplage d'amides, mais elles sont susceptibles de se racémiser spontanément. Cette particularité doit être prise en compte dans la stratégie de synthèse. (170)

C'est également pour cette raison que l'activation de l'acide carboxylique en synthèse peptidique est généralement effectuée en présence d'additifs d'hydroxybenzotriazole, qui

## CHAPITRE IV : LES ANALOGUES AMIDES DE LA PIPERINE ET LEURS METHODES DE SYNTHESE

réagissent rapidement avec l'ester activé. Dans ce cas, l'étape d'activation est mieux décrite comme étant une activation en deux temps au DCC/hydroxybenzotriazole. (170)

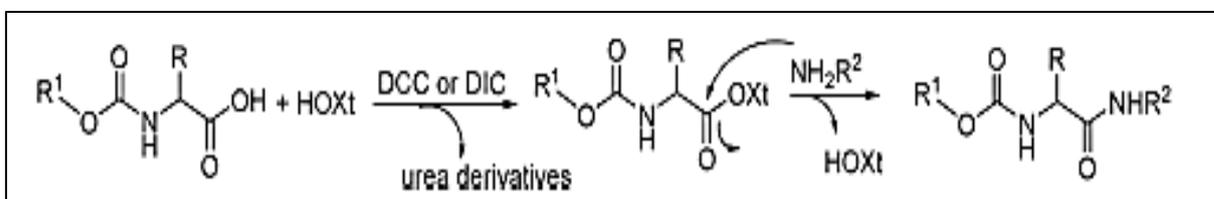
Cette deuxième étape de réaction génère un autre ester activé qui ne se racémise pas et qui conserve un niveau d'activation suffisant pour un couplage peptidique efficace. (171)

Les triazoles les plus courants pour cette application sont le 1-hydroxy-benzotriazole (HOBt) et le 1-hydroxy-7-aza-benzotriazole (HOAt). (171)

### IV.2.2.2. Méthode d'ester hautement activé :

Une approche unique à la synthèse des peptides est la préparation d'un dérivé de l'acide N-alkoxycarbonylamino, qui est assez stable pour être stocké et pourtant assez réactif pour se combiner avec un groupe amino lorsque les deux sont mélangés. Ces composés sont normalement obtenus en convertissant l'acide en ester actif par réaction avec un phénol substitué ou une hydroxylamine substituée, HOxt, en présence de carbodiimide. (88) (Figure 30)

Les esters actifs sont en fait des anhydrides mixtes formés à partir d'un acide carboxylique et d'un acide phénolique ou hydroxamique. Les substituants Xt sont conçus pour rendre le carbonyle de la fraction acyle sensible à une attaque nucléophile par une amine à température ambiante. Les esters actifs subissent une aminolyse en raison des propriétés électroattractrices de la fraction ester. (172)



**Figure 30 :** Formation de liaison amide à partir d'un ester activé.(88)

Plusieurs réactifs de couplage sont décrits en littérature, nous citons : sels de phosphonium, sels d'ammonium/uronium. (Figure 31)

#### ▪ Les sels de phosphonium :

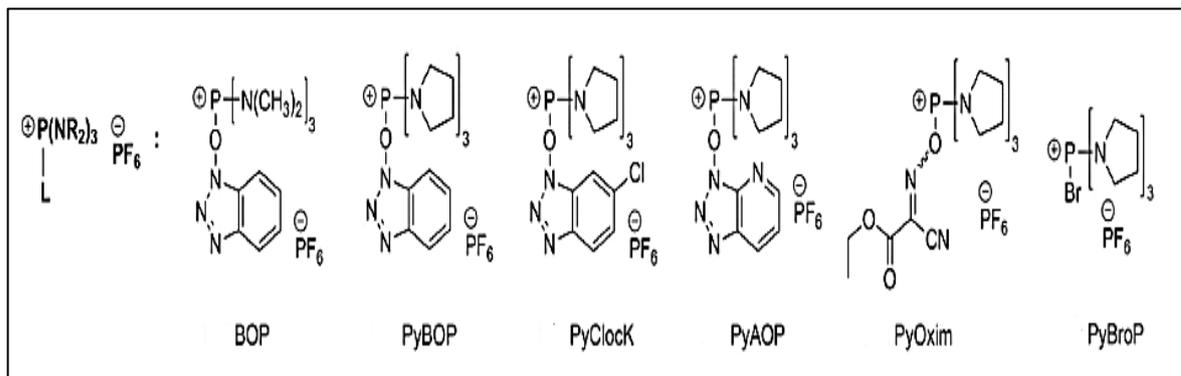
L'utilisation de sels de phosphonium comme réactifs de couplage pour la formation d'amides a été décrite pour la première fois par Kenner et ses collaborateurs en 1969. (173)

Les sels de phosphonium ont été largement adoptés pour favoriser le couplage de peptides par la formation de sel d'acylphosphonium après que Castro eut développé (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP). (173)

Depuis, de nombreux sels de phosphonium ont été mis au point, dont le benzotriazol-1-yloxy tri(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (Pybop), le (6-chloro-benzotriazol-1-

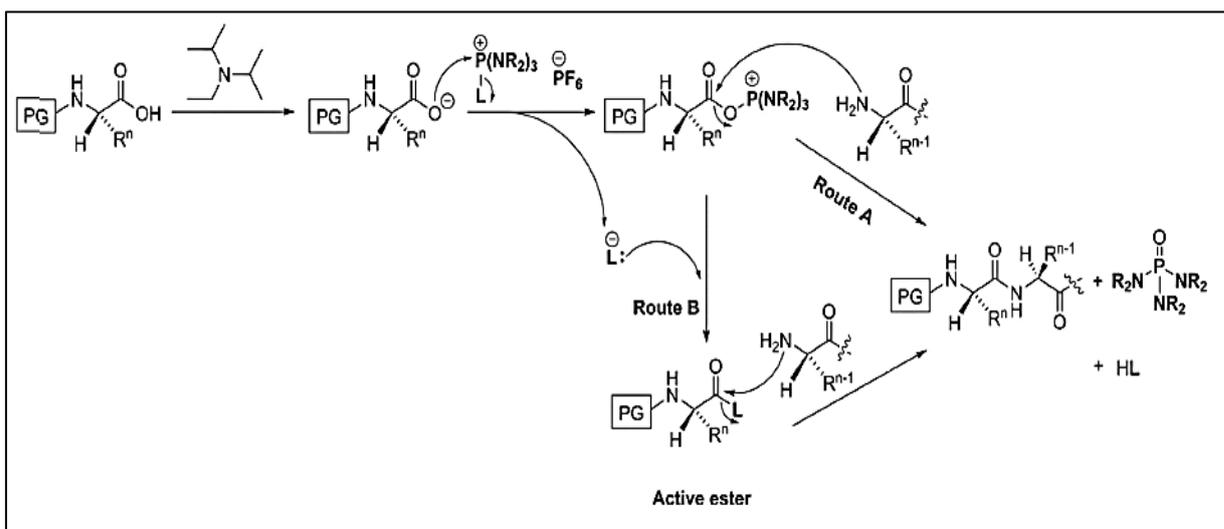
## CHAPITRE IV : LES ANALOGUES AMIDES DE LA PIPERINE ET LEURS METHODES DE SYNTHESE

oxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (Pyclock), et le [(7-azabenzotriazol-1-yl)oxy]tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (Pyaop). (173)



**Figure 31 :** Structure générale des sels de phosphonium.(88)

Les sels de phosphonium (Figure 31) sont faciles à manipuler et favorisent le couplage rapide des liaisons amides. Les couplages au sel de phosphonium sont effectués avec un excès d'une amine tertiaire, habituellement 2 équivalents de N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA) pour former l'ion carboxylate. L'attaque nucléophile initiale sur le sel de phosphonium par le carboxylate conduit à la formation d'un sel d'acyloxyphosphonium, qui est très réactif et est soit attaqué par une amine (Route A), soit par l'ester actif formant un oxyanion L (Route B), qui serait l'espèce prédominante et subit une aminolyse, conduisant à la formation de liaisons peptidiques. Enfin, il convient de souligner que l'inconvénient de l'utilisation de la BOP comme réactif de couplage est qu'elle produit de l'hexaméthylphosphorotriamide (HMPA) en tant que sous-produit toxique (Figure 32). (174)



**Figure 32 :** Mécanisme proposé de voie de couplage au sel de phosphonium.(88)

## CHAPITRE IV : LES ANALOGUES AMIDES DE LA PIPERINE ET LEURS METHODES DE SYNTHESE

### ▪ Les sels d'ammonium/uronium :

Les sels d'uronium et d'ammonium (Figure 33) portent un atome de carbone positif et sont utilisés comme réactifs de couplage dans la synthèse des liaisons amides. En 1978, Gross et ses collaborateurs ont introduit le 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylammonium hexafluorophosphate (HBTU) en tant que réactif de couplage pour la synthèse des peptides et l'ont initialement affecté à une structure de type O-uronium. Une analyse cristallographique par rayons X ultérieure a permis d'établir que l'HBTU actif et sa famille étaient des sels de type N-guanidinium plutôt que des sels d'O-uronium. (175)

D'après la structure du réactif HBTU, un certain nombre de sels de guanidinium ont été mis au point, notamment : 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylammonium tétrafluoroborate (TBTU), 2-(6-chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylammonium hexafluorophosphate (HCTU), 1-(diméthylamino)(diméthylimino)méthyl)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridine 3-oxyde hexafluorophosphate (HATU) (Carpino, 1993; Albericio et al., 1998), et 1-(pyrrolidin-1-ium-1-ylidène(pyrrolidin-1-yl)méthyl)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridine 3-oxyde hexafluorophosphate (Hapyu) (Figure 33). Dans les études comparatives, l'HATU a donné de meilleurs rendements de couplage avec moins d'énantiomérisation que le Pybop, HBTU ou TBTU. (175)

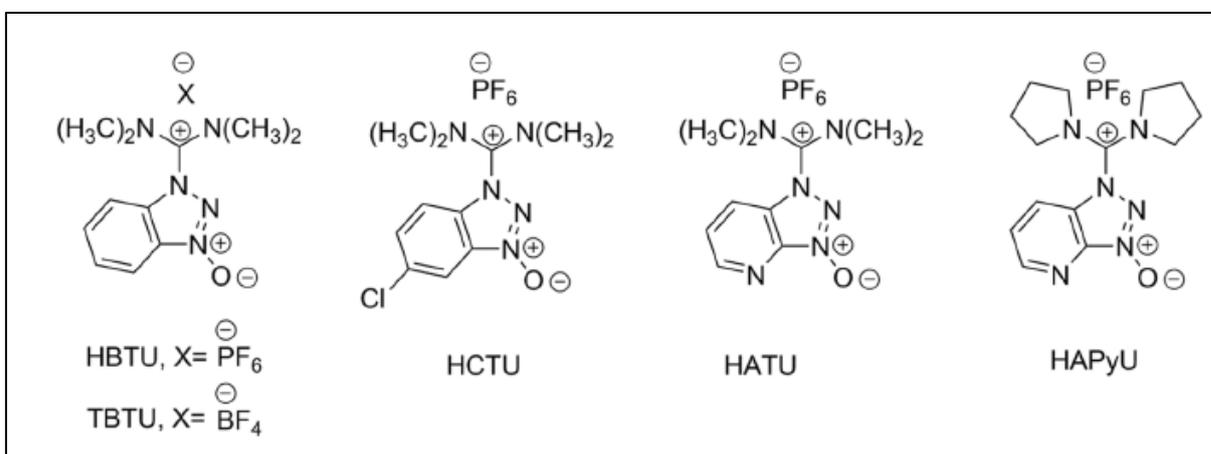
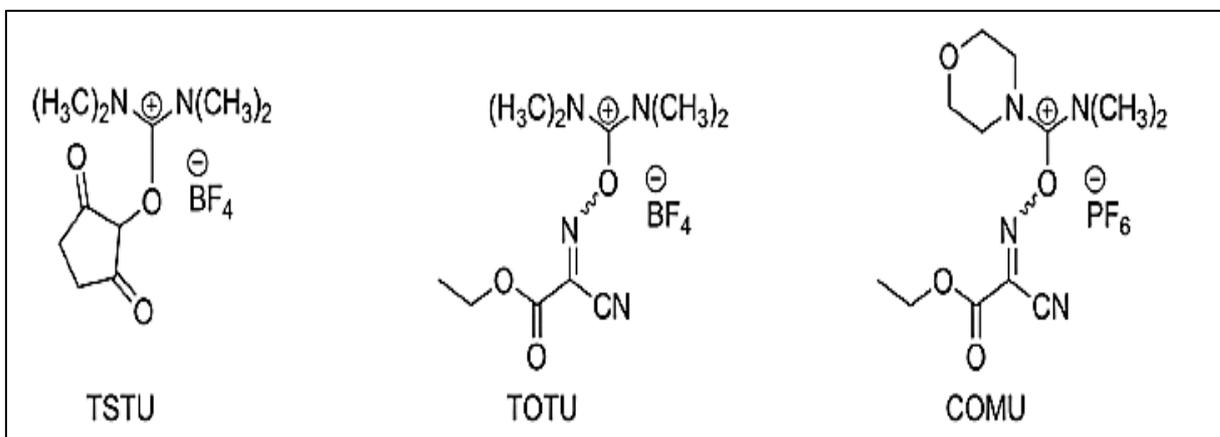


Figure 33 : Structure de Certains sels d'ammonium.(88)

Les sels d'O-uronium (Figure 34) connexes ont également été mis au point, notamment le 2-succinimido-1,1,3,3-tétraméthyluroniumtétrafluoroborate (TSTU) (101), le O-[(éthoxycarbonyl) cyanométhylénamino]-N,N,N',N'-tétraméthyluronium tétrafluoroborate (TOTU) et (1-cyano-2-éthoxy-2-oxoéthylidénaminooxy)diméthylamino-morpholino-carbénium hexafluorophosphate (COMU), un nouveau réactif qui produit des réactions de

## CHAPITRE IV : LES ANALOGUES AMIDES DE LA PIPERINE ET LEURS METHODES DE SYNTHÈSE

couplage avec des efficacités comparables à celles de l'HATU. Contrairement aux sels de phosphonium, les réactifs de couplage aminium/uronium présentent un inconvénient en raison de leur capacité à réagir avec le groupe amino N $\alpha$ -libre de la fraction entrante. (88)



**Figure 34** : Structure de Certains sels d'uronium.(88)

Le réactif de couplage ammonium/uronium ne peut pas être ajouté directement au groupe amino libre de la fraction entrante et au groupe carboxylique à coupler ; cela signifie que la préactivation du composant carboxylique est nécessaire. Normalement, la préactivation est réalisée en faisant réagir le composant carboxylique avec le réactif de couplage ammonium/uronium dans des conditions de réaction appropriées, en tenant compte du fait que le réactif de couplage aminium/uronium est le réactif limitant. Ensuite, le groupe amino de la fraction entrante est ajouté au mélange réactionnel pour réagir directement avec le carboxylate activé. (176)

Les esters activés peuvent être suffisamment couplés à une amine dans des conditions de réaction similaires à celles de la réaction de Schotten-Baumann (base, solvant aprotique, température ambiante). (176)

### IV.3. Les Protocoles de référence :

#### IV.3.1. Méthode de Schotten-Baumann :

Préparer une solution sous agitation composée de l'amine dans du DCM, ajouter une quantité équimolaire de base (par exemple, DIPEA) suivie de 1 à 2 équivalents de chlorure d'acyle. Agiter à température ambiante pendant 8 à 16 heures. La réaction est normalement neutralisée à l'eau et extraite avec du DCM ou d'autres solvants organiques, en fonction des caractéristiques de l'amide. (167)

***IV.3.2. Protocole de carbodiimide :***

Préparer une solution d'acide dans du DMF et ajouter 2 ou 3 équivalents de base. Refroidir la solution à 0°C, puis ajouter 2 équivalents de DCC ou d'EDC. Agiter à température ambiante pendant 30 à 60 minutes, puis diluer à l'eau et extraire avec un solvant organique en fonction des propriétés du produit de l'amide. Procéder à la purification du produit. (166)

***IV.3.3. Méthode au HATU/HBTU :***

Préparer une solution d'acide dans du DMF à 0°C, puis ajouter 2 équivalents de HATU (550 mg, 1,4 mmol) et 3 équivalents de base (par exemple, DIPEA ou TEA). Enfin, ajouter un léger excédent d'amine (par rapport à l'acide) et agiter à température ambiante pendant 30 à 60 minutes. Diluer à l'eau et extraire avec un solvant organique en fonction des propriétés du produit de l'amide. Procéder à la purification du produit. Le protocole de référence reste le même si d'autres activateurs sont utilisés. (164)

En cas d'utilisation de l'HBTU, le protocole reste similaire, mais il est souvent nécessaire d'augmenter la température de la réaction. Certains auteurs ont signalé des conditions de reflux et des temps de conversion légèrement plus longs, jusqu'à 2 ou 3 heures. (166,167)

***IV.3.4. Méthode d'utilisation combinée du carbodiimide et de l'hydroxybenzotriazole :***

Préparer une solution d'acide (700 mg, 3,2 mmol) dans du DMF (10 mL), ajouter 3 équivalents de base (par exemple, DIPEA, NH<sub>4</sub>Cl ou TEA) tout en refroidissant la réaction à 0°C. Traiter le mélange avec 2 équivalents d'éthylcarbodiimide (ou autre carbodiimide) et 2 équivalents d'HOBt (ou HOAt). Enfin, ajouter 1,5 équivalent d'amine. Agiter à température ambiante pendant 30 à 60 minutes. Neutraliser à l'eau et extraire avec un solvant organique en fonction des propriétés du produit de l'amide. Procéder à la purification du produit. (167)

---

## CHAPITRE V : LES METHODES *IN SILICO*

La découverte de médicaments est un processus long et coûteux, traditionnellement fondé sur des essais et erreurs expérimentaux. Cependant, l'essor des méthodes *in silico*, qui utilisent des outils informatiques pour modéliser et simuler des processus biologiques et chimiques, a révolutionné ce domaine. Ces techniques permettent d'accélérer le développement des médicaments en identifiant plus rapidement les molécules prometteuses, en prédisant leur interaction avec les cibles biologiques, et en optimisant leurs propriétés pharmacologiques. (177)

### V.1. Principes des Méthodes *In Silico* :

Les méthodes *in silico* reposent sur des approches de modélisation informatique pour prédire l'activité biologique, l'affinité de liaison et la toxicité potentielle des composés chimiques. Les techniques les plus courantes incluent le **criblage virtuel**, le **docking moléculaire**, la **dynamique moléculaire**, les **méthodes de modélisation quantitative de la relation structure-activité (QSAR)**, et les **simulations basées sur la chimie quantique**.(178)

#### V.1.1. Le criblage virtuel :

Le criblage virtuel est une méthode permettant de tester virtuellement des milliers, voire des millions de composés, afin d'identifier ceux qui pourraient présenter une activité thérapeutique. Contrairement au criblage à haut débit (HTS), qui est une méthode expérimentale, le criblage virtuel utilise des modèles informatiques pour prédire l'affinité des molécules candidates avec une cible biologique donnée (Figure 35). (179)

Le criblage virtuel peut être de deux types :

- *Le criblage basé sur la structure :*

Le criblage virtuel basé sur la structure (*Structure-Based Virtual Screening – SBVS*), également connu sous le nom de criblage virtuel basé sur la cible (*Target-Based Virtual Screening – TBVS*), nécessite la structure tridimensionnelle de la cible (généralement une protéine). Les composés chimiques sont « dockés » dans le site actif de la cible, et des scores sont calculés afin de prédire la probabilité d'une interaction efficace. (180)

- *Le criblage basé sur le ligand :*

Lorsqu'au moins un ligand de la cible étudiée est connu, un criblage virtuel basé sur les ligands (*Ligand-Based Virtual Screening – LBVS*) peut être mis en œuvre. Le principe fondamental de toutes les méthodes basées sur les ligands repose sur le fait que des molécules similaires ont tendance à présenter des profils d'activité similaires. (181)

La similarité des molécules peut être évaluée en recherchant des propriétés communes, qui seront utilisées comme descripteurs de similarité. En fonction du nombre de ligands de référence pour la cible et du type de descripteurs, différentes méthodes peuvent être employées : le criblage à l'aide de pharmacophores, la recherche de similarité et les méthodes QSAR. (181)

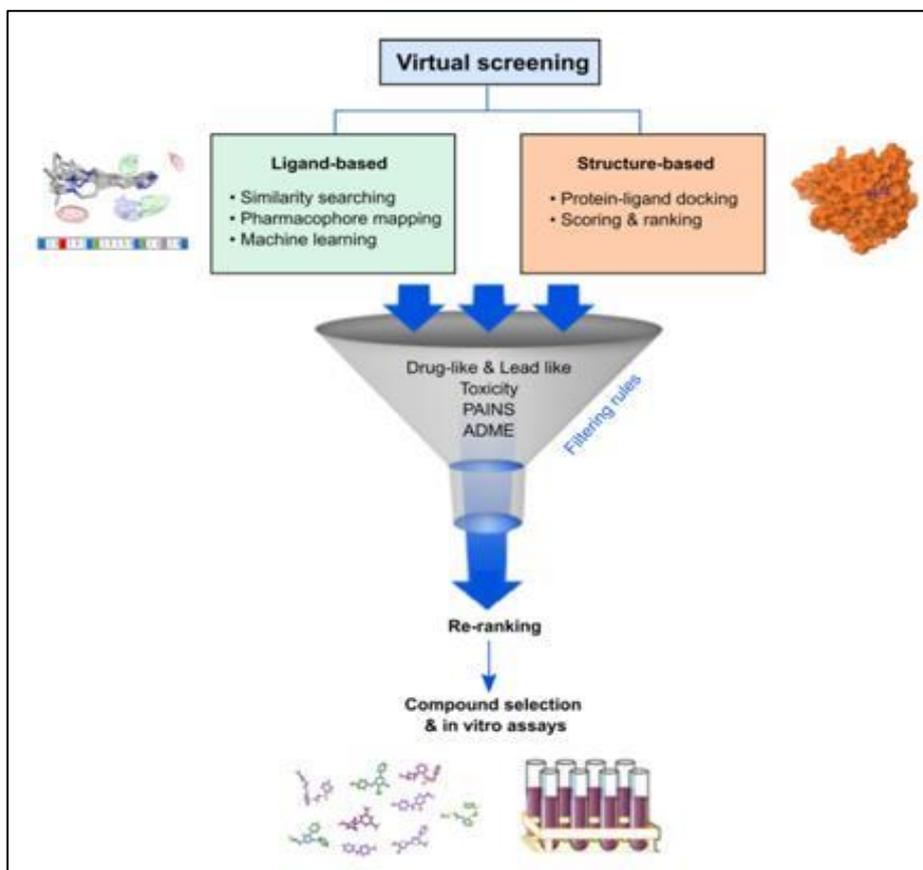


Figure 35 : Flux de travail du criblage virtuel.(182)

### V.1.2. Le docking Moléculaire :

Le docking moléculaire est une méthode *in silico* permettant de prédire la position d'une petite molécule (ligand) lorsqu'elle se lie à une macromolécule cible (protéine ou ADN). L'objectif est de trouver la meilleure orientation et conformation du ligand afin d'optimiser son interaction avec la cible, ce qui est essentiel pour prédire son efficacité thérapeutique (Figure 36). (183)

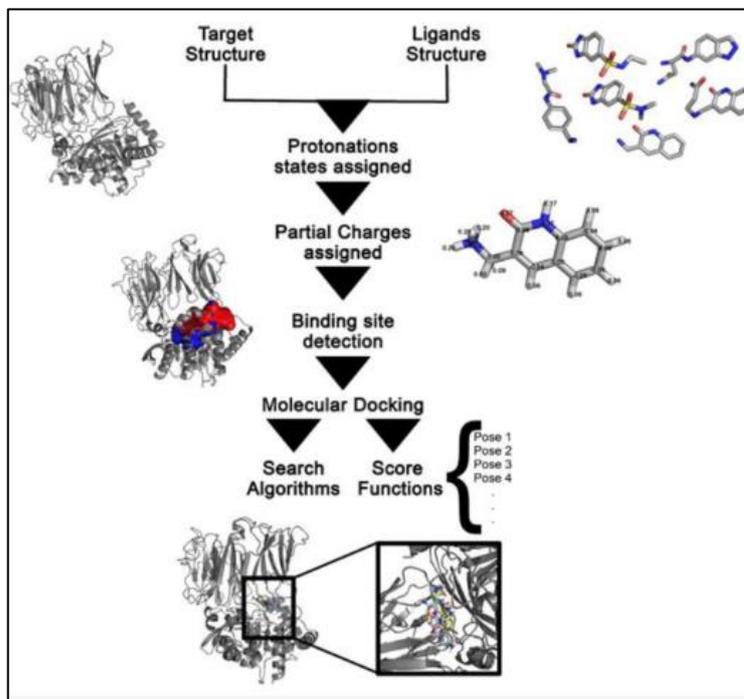
Cette technique utilise des algorithmes de recherche pour explorer les différentes positions et conformations du ligand dans le site actif de la protéine. Le processus est généralement divisé en deux étapes :

- *L'échantillonnage :*

Exploration de l'espace conformationnel du ligand pour générer un ensemble de poses possibles. (183)

▪ *Scoring* :

Évaluation de ces poses afin de déterminer celle qui présente la meilleure affinité de liaison avec la cible, souvent à l'aide de fonctions d'énergie simulant les interactions électrostatiques, hydrophobes et les liaisons hydrogène. (183)



**Figure 36** : Les différentes étapes du docking moléculaire.(184)

Le docking moléculaire peut être classé en trois types en fonction de la flexibilité des molécules en interaction : le ligand et le récepteur (protéine). (185)

▪ *Le docking moléculaire rigide* :

Dans cette approche, la protéine et le ligand sont considérés comme des entités rigides, c'est-à-dire que leur structure ne change pas et que leur géométrie interne reste fixe. Seules leurs positions peuvent varier, et l'échantillonnage prend en compte uniquement les trois degrés de liberté en translation et en rotation. Cette méthode est principalement utilisée pour l'amarrage entre deux macromolécules (protéine-protéine), où le nombre de degrés de liberté conformationnels est trop élevé pour être entièrement exploré. Cependant, les résultats obtenus sont souvent moins précis et peu fiables, ce qui limite son utilisation dans les études d'amarrage actuelles. Cette approche repose sur le principe de la serrure et de la clé. (185)

▪ *Le docking moléculaire semi-flexible :*

Dans cette approche, soit le ligand, soit le récepteur est considéré comme une entité rigide. Généralement, la structure du récepteur reste fixe tandis que la conformation du ligand peut varier. (186)

Les degrés de liberté conformationnels du ligand sont échantillonnés, en plus des six degrés de liberté associés à la translation et à la rotation (Figure 37). Le docking semi-flexible est la stratégie implémentée dans la plupart des outils de docking actuels (notamment *FlexX*, *Glide*, *DOCK*, *Surflex* et *PLANTS*), car il représente un bon compromis entre la rapidité des simulations – en raison du nombre limité de degrés de liberté – et la pertinence des résultats, qui sont plus précis et plus fiables que ceux obtenus par le docking moléculaire rigide. (185,187)

▪ *Le docking moléculaire flexible :*

Cette approche repose sur l'idée qu'une protéine n'est pas une entité rigide et passive lors de la liaison avec un ligand. Ainsi, tant le ligand que le récepteur sont considérés comme des entités flexibles. La structure de la molécule peut varier en modifiant les angles de torsion et les liaisons rotatives. Cette méthode permet de prédire la conformation ancrée avec une grande précision, se rapprochant ainsi des résultats expérimentaux. Toutefois, elle nécessite des calculs complexes et un temps de simulation important. Dans les approches de docking semi-flexible et entièrement flexible, le principe d'**ajustement induit** peut-être mis en œuvre (Figure 37). (188)

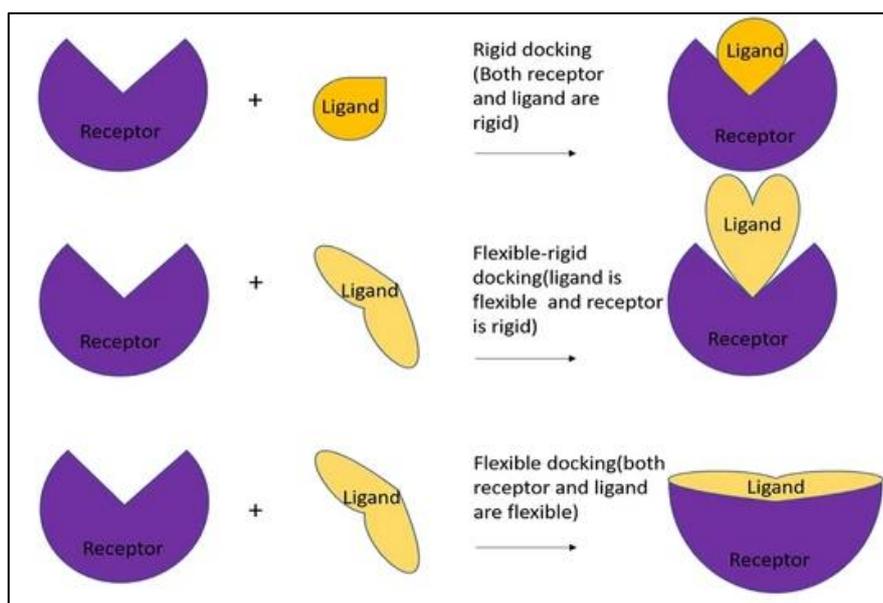


Figure 37 : Les différents types de docking moléculaire.(185)

### V.1.3. La dynamique moléculaire :

La dynamique moléculaire (DM) est une méthode qui simule le mouvement des atomes et des molécules au fil du temps en appliquant les principes de la mécanique classique. Cette technique permet d'étudier les mécanismes dynamiques à l'échelle atomique, fournissant ainsi des informations précieuses sur la flexibilité des protéines, les interactions ligand-récepteur et les processus de repliement des protéines. (187)

Les simulations de dynamique moléculaire prennent en compte l'énergie potentielle d'un système moléculaire, qui inclut les interactions de Van der Waals, les liaisons hydrogène et les forces électrostatiques (Figure 38). Les trajectoires des atomes sont calculées en résolvant les équations du mouvement de Newton pour chaque atome du système. (189)

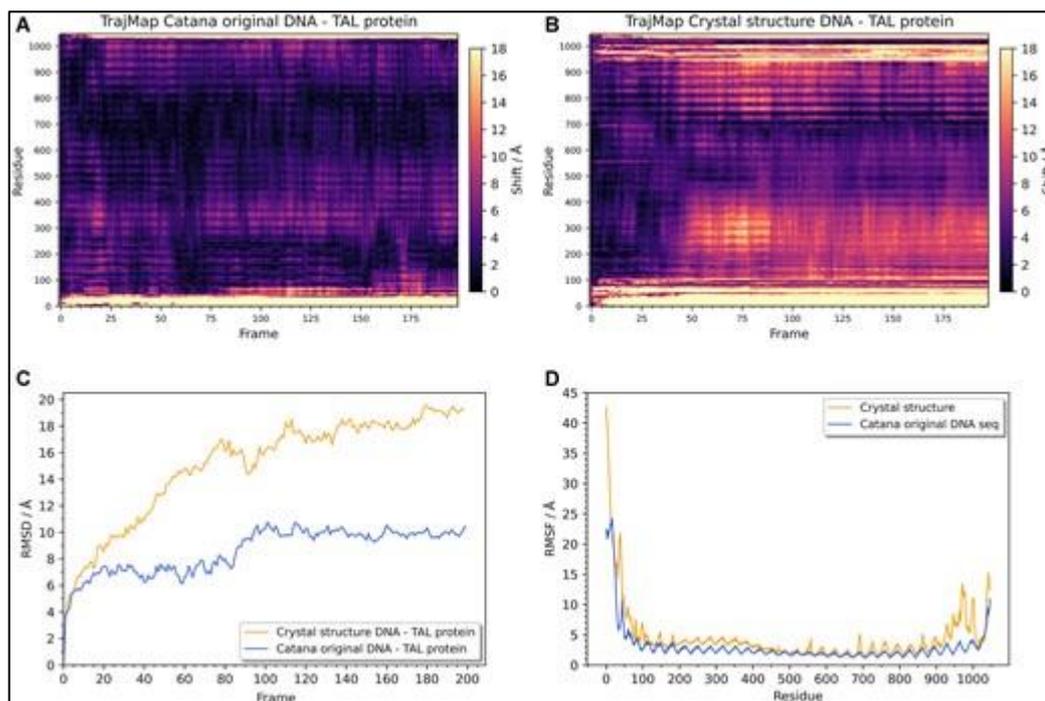
La DM repose sur la résolution des équations de Newton pour chaque atome du système étudié. La force  $\mathcal{F}_i$  agissant sur un atome  $i$  est liée à son accélération  $a_{i\_i}$  par la seconde loi de Newton, selon l'équation 01 :

$$\mathcal{F}_i = m_i a_i$$

Où  $m_i$  est la masse de l'atome, et  $a_i$  est l'accélération. Les forces qui agissent sur chaque atome sont dérivées du gradient de l'énergie potentielle du système, qui est une fonction des positions des atomes.(190)

L'énergie potentielle du système est souvent exprimée à l'aide d'un **champ de force**, intégrant plusieurs contributions :

- Énergie de liaison : Modèle les liaisons covalentes entre les atomes.
- Énergie angulaire : Modèle les angles de liaison entre les triplets d'atomes.
- Énergie dièdre : Modèle les rotations autour des liaisons.
- Interactions de Van der Waals : Modèle les forces d'attraction et de répulsion non-liaison.
- Interactions électrostatiques : Modèle les interactions entre les charges partielles des atomes.(191–193)



**Figure 38** : Analyse de simulations de dynamique moléculaire d'une protéine TAL en complexe avec l'ADN. (194)

Les logiciels de dynamique moléculaire (*GROMACS*, *AMBER*, *CHARMM* et *Desmond*) sont capables de simuler des systèmes très complexes, comprenant des milliers à des millions d'atomes. Ces simulations permettent d'étudier la stabilité des complexes ligand-récepteur, les changements conformationnels des protéines et les voies de signalisation intracellulaires. (195,196)

#### V.1.4. La modélisation QSAR :

La modélisation **QSAR** (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) est une méthode statistique qui établit une relation entre les propriétés structurales des molécules et leurs activités biologiques. Son principe repose sur l'hypothèse que des composés ayant des structures similaires auront des activités biologiques similaires. Les modèles QSAR sont construits à partir de données expérimentales existantes, en utilisant des **descripteurs moléculaires** pour capturer les caractéristiques chimiques et physiques des molécules. (197)

Ces descripteurs peuvent inclure :

- La charge électrostatique.
- La surface accessible au solvant.
- Le moment dipolaire.
- La flexibilité moléculaire. (196,197)

Une fois ces descripteurs calculés, des algorithmes de **machine learning** ou des méthodes de **régression linéaire** sont utilisés pour établir une corrélation entre ces descripteurs et l'activité biologique observée. (196,197)

### V.1.5. La chimie quantique :

Les méthodes de chimie quantique sont utilisées pour calculer avec précision les propriétés électroniques des molécules. Elles sont essentielles pour comprendre les mécanismes de réaction chimique, l'affinité de liaison et la réactivité. Contrairement à la mécanique moléculaire, qui traite les atomes comme des entités simples, la chimie quantique prend en compte les électrons et les interactions quantiques entre eux. (200)

Les calculs de chimie quantique, notamment ceux basés sur la **Théorie de la Fonctionnelle de la Densité** (*Density Functional Theory*, **DFT**), permettent de prédire les états électroniques des molécules, les énergies d'interaction ainsi que les spectres **RMN** ou **IR**. Ces méthodes sont cruciales pour explorer les détails des mécanismes de liaison au niveau atomique, identifier les sites réactifs des molécules et étudier les effets des mutations sur les protéines. (201)

## V.2. Applications des méthodes *In silico* dans la découverte des médicaments :

### V.2.1. Identification de nouveaux ligands :

L'identification de nouveaux ligands est une étape cruciale dans la découverte de médicaments. Les méthodes **in silico** permettent de cribler des bibliothèques de composés afin de sélectionner ceux qui ont le plus de chances de se lier à une cible biologique spécifique. Cette approche est particulièrement utile pour les cibles thérapeutiques complexes, telles que les **récepteurs couplés aux protéines G** (*GPCRs*), où le criblage expérimental peut être difficile et coûteux. (179)

Des exemples notables incluent l'identification d'inhibiteurs de **protéines kinases**, qui sont des cibles essentielles dans le traitement du **cancer**. Grâce au **criblage virtuel**, plusieurs inhibiteurs de kinases ont été découverts, dont certains sont désormais utilisés en clinique. (179)

### V.2.2. Optimisation des composés :

Après l'identification d'un ligand prometteur, ses **propriétés pharmacologiques** doivent souvent être optimisées pour améliorer son **efficacité**, sa **sélectivité** et sa **pharmacocinétique**. Les méthodes **in silico** jouent un rôle clé dans cette optimisation en permettant de prédire l'impact des **modifications structurelles** sur l'activité biologique. (183)

Les **simulations de dynamique moléculaire** et les modèles **QSAR** sont largement utilisés pour explorer les relations **structure-activité** (*Structure-Activity Relationship, SAR*) et guider la modification des structures chimiques. Par exemple, l'ajout ou la modification de **chaînes latérales** d'un ligand peut améliorer son **profil pharmacocinétique** ou réduire son **potentiel de toxicité**. (183)

### V.2.3. Prédiction de la toxicité :

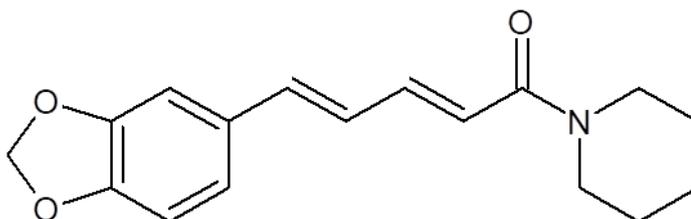
La **toxicité** est l'une des principales causes d'échec des nouveaux médicaments lors des essais cliniques. Les méthodes **in silico** sont de plus en plus utilisées pour évaluer la **toxicité potentielle** des nouveaux composés dès les premières étapes du développement. Ces approches incluent des **modèles prédictifs** basés sur la structure chimique ainsi que l'**identification de cibles hors cible** (*off-target effects*), qui pourraient entraîner des **effets secondaires indésirables**. (183)

PARTIE B.

REVUE PRATIQUE

## I. PRESENTATION DU TRAVAIL

Le **poivre noir** (*Piper nigrum*) possède de nombreuses propriétés : il est **réchauffant**, **fébrifuge**, **diurétique** et **stimulant digestif**. En médecine traditionnelle chinoise, il est également utilisé comme **calmant naturel**. (49, 90,105) Les études **phytochimiques** sur le *Piper nigrum* ont révélé la présence de divers **composés phénoliques**, notamment des **flavonoïdes**, des **alcaloïdes**, des **amides** et des **stéroïdes**. Parmi ces constituants, l'un des plus étudiés est la **pipérine** (Figure 39), un **alcaloïde majeur** responsable de ses propriétés pharmacologiques et de son goût piquant caractéristique. (54)



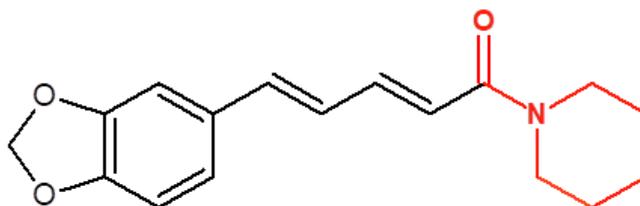
**Figure 39** : la structure chimique de la pipérine.(150)

La **pipérine** s'est avérée posséder diverses **activités pharmacologiques**, notamment des **effets anti-inflammatoires**, **antimicrobiens**, **antioxydants** et **anticancéreux**, entre autres. (120, 126, 143, 147,150)

Dans le but d'**amplifier son activité biologique**, de nombreux **dérivés** ont été synthétisés et leurs **propriétés pharmacologiques** ont été évaluées. (9, 79, 151,152)

Au cours de ces études, les **pharmacomodulations** ont principalement porté sur des **remplacements bioisostériques**, notamment la **substitution de la liaison amide par une liaison ester** et la **modification du noyau pipéridine** par l'introduction de **différents groupements R**. (149, 149,150)

La **modélisation des pharmacophores** (Figure 40) est l'un des concepts **in silico** les plus prometteurs. Elle repose sur la **combinaison de la chimie médicinale et de la chimie computationnelle** et permet de **cribler et d'optimiser** les composés principaux en vue du développement du candidat-médicament final.

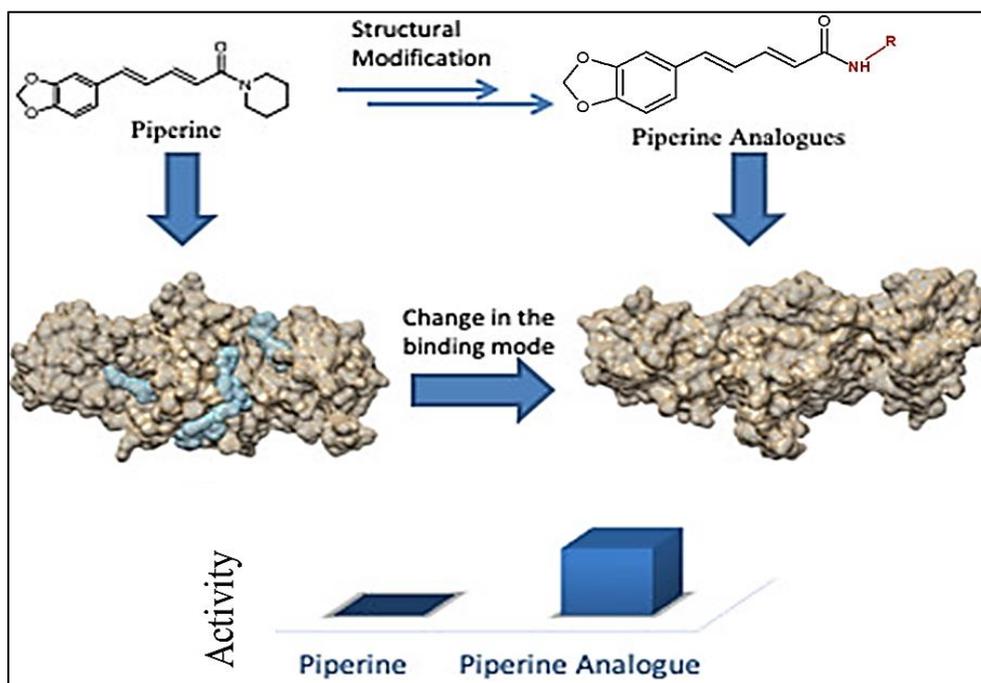


**Figure 40** : Pharmacophore.

Des études ont révélé que le **noyau pipéridine** et la **liaison amide** constituent les éléments clés de l'**activité biologique** de la pipérine. Leur **pharmacomodulation** a ainsi permis d'**identifier les substituants les plus prometteurs** pour différentes **activités biologiques**. (92)

Le travail que nous présentons ici s'inscrit dans la continuité de ces recherches et poursuit les objectifs suivants :

- ✓ Objectif principal :
- Concevoir et synthétiser de **nouveaux analogues amides de la pipérine**, en remplaçant le **noyau pipéridine** par des **amines aromatiques cycliques ou acycliques** diversement substituées.
- Ces analogues seront évalués pour leurs **activités anti-inflammatoires et analgésiques (étude in vivo)** ainsi que leurs **propriétés antibactériennes (étude in vitro)**.
- L'**étude in silico** inclura le **docking moléculaire, l'évaluation ADMET et la dynamique moléculaire** afin d'optimiser la sélection des analogues les plus prometteurs. (Figure 41)



**Figure 41 :** Variations structurales envisagées autour du pharmacophore.

- ✓ Objectif secondaire :
- **Optimiser** les méthodes d'**extraction et d'isolement** de la **pipérine** à partir du **poivre noir**.
- Évaluer son **activité anti-inflammatoire, analgésique et antibactérienne** afin de mieux comprendre ses effets pharmacologiques. (Figure 42)

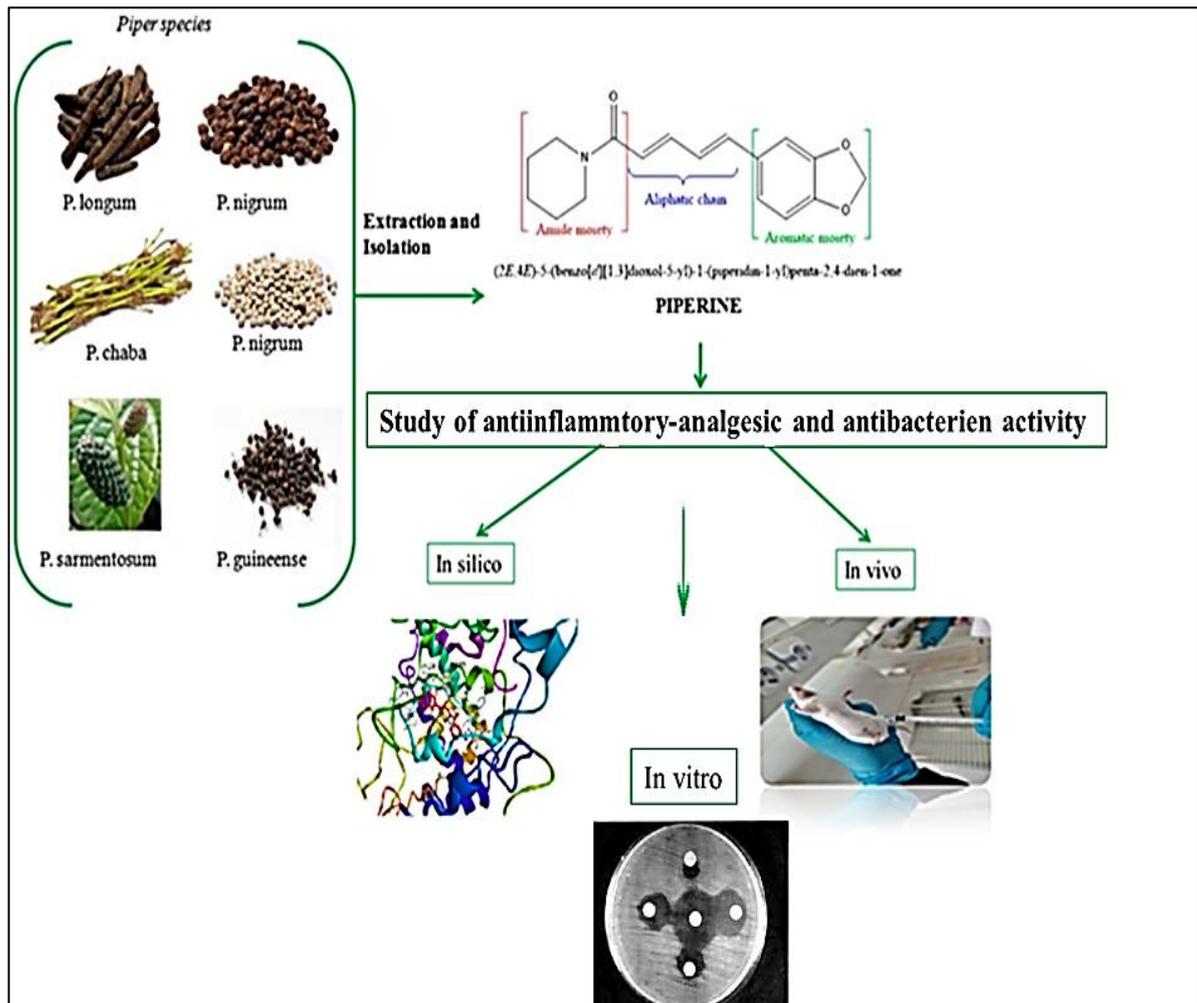


Figure 42 : Isolation et évaluation de l'activité biologique de la pipérine.

## II. MATERIELS ET METHODES

### II.1. Identification botanique des fruits du poivre noir :

Cette analyse consiste en une étude **macroscopique** et **microscopique** des **fruits secs** et de la **poudre** de poivre noir, réalisée au sein du laboratoire de **Pharmacognosie** du département de **Pharmacie** de Constantine. Le travail a été mené entre **décembre 2021** et **mars 2022**.

#### II.1.1. Matériel végétal :

Les fruits de poivre noir ont été achetés dans le **magasin d'épices Sabih**, situé dans la région du **Wad El-Had, Daksi**, dans la **Wilaya de Constantine**. (Figure 43)

❖ Ils présentent les données suivantes :

- **Nom de produit** : poivre noir
- **Pays de récolte** : India
- **Date de production** : 2020
- **Date d'expiration** : 2024

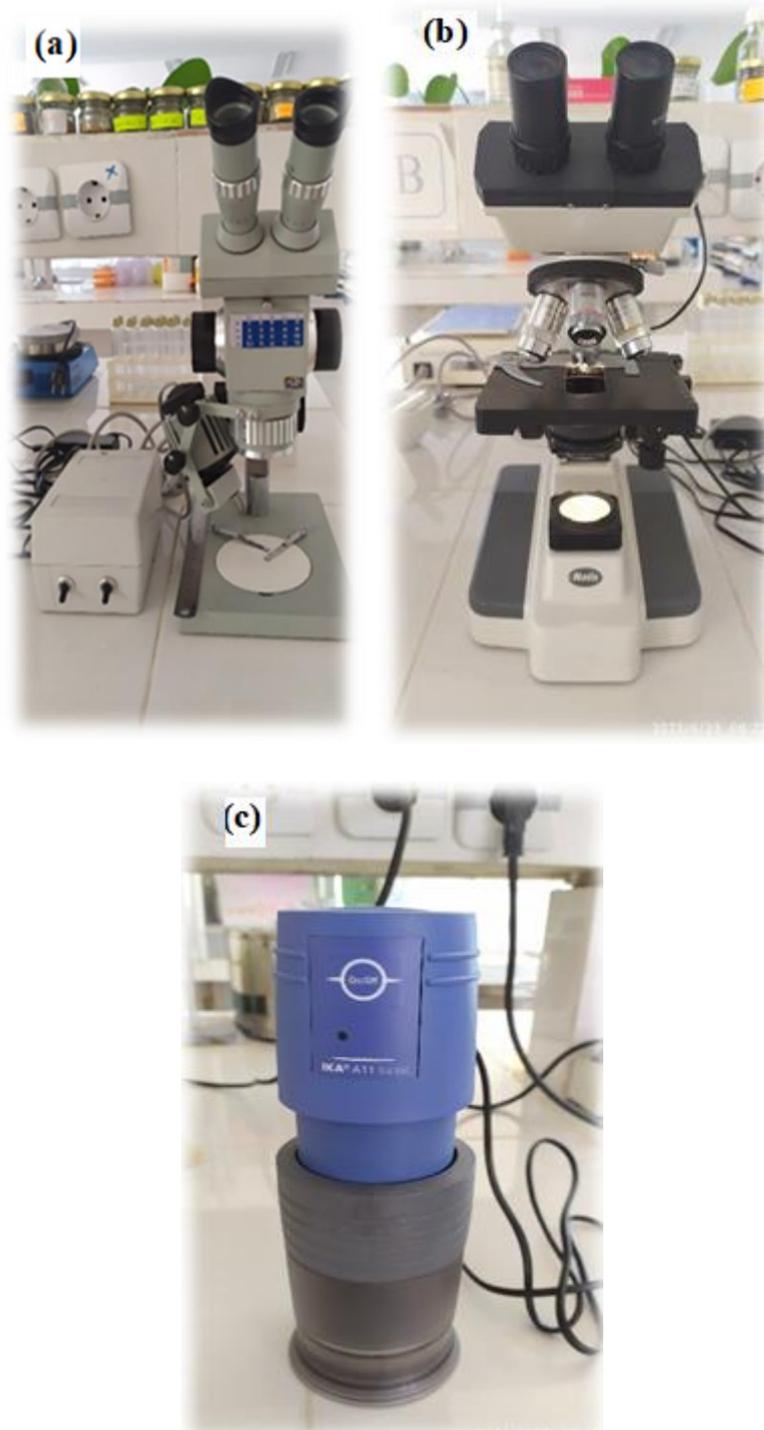


**Figure 43** : les fruits du poivre noir.

#### II.1.2. Matériels de laboratoire :

Le matériel utilisé pour l'identification botanique est : (Figure 44)

- Loupe binoculaire (Cari Zeiss ®).
- Microscope optique (Mortic ® Sérié B1).
- Broyeur électrique (IKA ®).
- Pince, lame à rasoir.
- Lame, lamelle, verre à montre.
- Tamis, spatule.
- Règle, pissette.



**Figure 44 :** (a) Loupe binoculaire, (b) Microscope optique, (c) Broyeur électronique.

**II.1.3. Réactifs chimiques :** (Figures 45,46,47)

- Solution hydro-alcoolique.
- Hydrate chloral.
- Eau distillée.
- Eau de javel dilué à ½.
- La soude à 5%

- Acide acétique. (N° de Lot F228/LAB-HOEYWELL)
- Vert de méthyl.
- Rouge Congo / Carmin.



**Figure 45 :** Réactifs de double coloration.



**Figure 46 :** Extrait hydro-alcoolique de nos fruits du poivre Noir



**Figure 47 :** Hydrate chloral + La poudre de poivre noir.

#### **II.1.4. Méthodes :**

##### ***II.1.4.1. Analyse macroscopique :***

###### ***II.1.4.1.1. Test morphologique :***

Les grains de poivre noir ont été examinés à l'œil nu et à l'aide d'une loupe binoculaire.

###### ***II.1.4.1.2. Test organoleptique :***

Les trois caractères organoleptiques suivants : couleur, saveur et odeur des fruits du poivre noir ont été vérifiés.

##### ***II.1.4.2. Analyse microscopique :***

###### ***II.1.4.2.1. Montage de la poudre :***

La pulvérisation des fruits du poivre noir a été faite à l'aide d'un broyeur électrique avant l'observation microscopique.

L'examen microscopique a été réalisé sur une très faible quantité de poudre déposée sur une lame avec l'addition d'une goutte de réactif éclaircissant représenté par l'hydrate chloral référé pharmacopée puis recouverte d'une lamelle, cette dernière a été montée en 45° pour éviter la formation des bulles d'air.

L'examen a été fait par la suite au grossissement 10 x 40 pour identifier les différents caractères et éléments. **(Voir annexe N°04)**

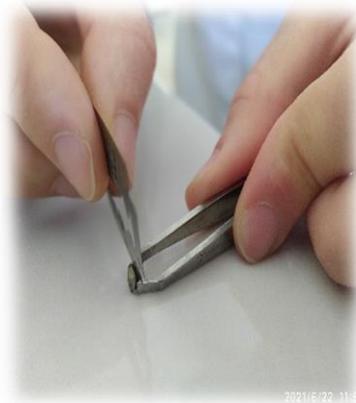
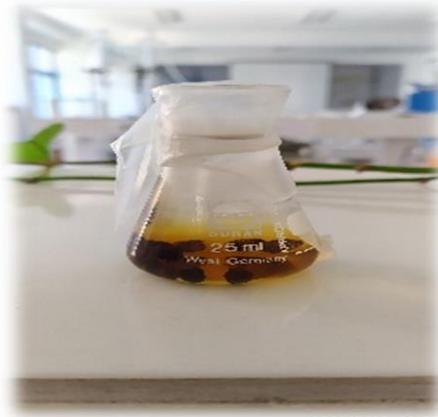
###### ***II.1.4.2.2. Les coupes histologiques :***

Des coupes transversales très fines ont été réalisées à l'aide d'une lame à rasoir à partir des fruits de poivre déjà disposés dans une solution hydro-alcoolique pendant deux jours d'avance. (Figure 48)

Ces coupes ont été traitées par la technique de double coloration qui consiste à :

- Placer les coupes 15 à 20 min dans l'eau de javel diluée pour la destruction du contenu cellulaire en maintenant intact les parois.
- Placer les coupes 30 s dans du NaOH à 5% pour éliminer les substances de réserve surtout l'amidon.
- Mettre les coupes 30 s dans l'eau additionnée de quelques gouttes d'acide acétique pour la neutralisation de milieu et la fixation des colorants.
- Mettre les coupes dans le vert de méthyl pendant 2 min pour la coloration des parois lignifiées ou sclérifiées en vert.
- Mettre les coupes pendant 15 à 30 min dans le rouge Congo pour la coloration des parois celluloses en rose.

- ✚ Un lavage à l'eau distillée a été fait après chaque étape sauf après l'étape de l'acide acétique.
- Collecter les coupes dans un verre de montre rempli d'eau distillée, placer les coupes sur une lame, ajouter une goutte d'eau et après recouvrir avec une lamelle. (**Voir annexe N°05**)
- Observer au faible grossissement 10 x 4, puis au fort grossissement 10 x10 et 10 x 40. (165)



**Figure 48 :** Réalisation des coupes transversales.

## II.2. Isolation de la pipérine à partir du poivre noir

Quatre méthodes d'extraction ont été réalisées au **laboratoire de Chimie Thérapeutique et de Pharmacognosie** du **département de Pharmacie de Constantine**, durant la période allant de **janvier à mars 2021** :

- **Méthodes classiques** : chauffage à reflux, macération dans l'acide acétique, et Soxhlet.
- **Méthodes récentes (chimie verte)** : extraction par micro-ondes.

### II.2.1. Matériels :

#### ✓ Petits matériels de laboratoire :

- Bécher, entonnoir.
- Erlenmeyer, ballon.
- Ampoule à décanter 500 ml.

#### ✓ Appareillages : (Voir Annexe N°06)

- Le montage de chauffage à reflux type IKA® (S/N : M 496580/04).
- Evaporateur rotatif type IKA® HB 10 (S 99).
- Filtre sous vide (Vacuubrand®) (SN : 40213807).
- Balance électrique type RADWAG® (S/N : 468842).
- Broyeur type Kh-chenAid®.
- Extracteur soxhlet IKA®.

### II.2.2. Réactifs chimiques :

#### ❖ Produit naturel :

- La poudre de poivre noir.

#### ❖ **Tableau 10** : Les réactifs chimiques utilisés dans l'isolation de la pipérine

| Noms des Réactifs         | Structure chimique   | N° de lot          | Fabricant      |
|---------------------------|--|--------------------|----------------|
| Ethanol à 96°             | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH                               | 19H204004          | LAB-HONEYWELL  |
| Hydroxyde de potassium    | KOH  | 19H214110          | VWR CHEMICALS  |
| Acide acétique            | CH <sub>3</sub> COOH   | F2280              | LAB-HOEYWELL   |
| Chloroforme               | CHCl <sub>3</sub>  | #STBF1452V         | SIGMA-ALDRICH  |
| Bicarbonate de sodium 10% | NaHCO <sub>3</sub>   | 319901000-1118-011 | BIOCHEM        |
| Sulfate de sodium         | NaSO <sub>4</sub>  | 18I134102          | VWR CHEMICALS  |
| Ether diéthylique         | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | 70220              | RIEDEL-DE HAËN |

### *II.2.3. Méthodes d'extraction :*

#### *II.2.3.1. Extraction par chauffage à reflux :*

Les fruits du poivre noir ont été préalablement pulvérisés à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine.

Dans un ballon de 500 ml surmonté d'un réfrigérant serpentin, ont été introduits successivement :

- ✓ 100 g de la poudre.
- ✓ 250 ml d'éthanol à 95°.

Le ballon a été placé dans un chauffe ballon à 80°C environ, initialement préchauffé pendant 2 heures. **(c)**

Le mélange a été filtré dans un dispositif de filtration sous vide. **(d)**

Le filtrat obtenu est placé dans un évaporateur rotatif à 60°C pour le concentrer et éliminer l'éthanol. **(e)**

10 ml de KOH alcoolique à 10% a été ajouté à la solution concentrée et filtrer. **(f)**

L'eau distillée a été ajoutée jusqu' à l'apparition des cristaux en forme d'aiguille de la pipérine brute. **(g)**

Après 24h, les cristaux ont été filtrés sur Büchner et séchés à l'étuve (80°C) sur un verre de montre préalablement pesé. **(Voir annexe N° 07)**

La recristallisation a été fait dans l'éther.

***II.2.3.2. Extraction par l'acide acétique glacial :***

L'extraction a été réalisée par macération de 25 g de poudre dans 300 ml d'acide acétique glacial pendant 24h.

L'extrait obtenu a été dilué après filtration avec un volume égal d'eau distillé puis séparé par le chloroforme dans une ampoule à décanter. Après, l'extrait de chloroforme a été lavé avec du bicarbonate de sodium à 10% pour éliminer l'acidité.

Le mélange obtenu a été séché par le sulfate de sodium pour éliminer les traces d'eau puis concentré à 60 °C dans l'évaporateur rotatif.

Le résidu a été dissous dans une quantité minimale de chloroforme. Puis, la solution obtenue est laissée reposer pendant 24h.

L'éther diéthylique a été ajouté jusqu' à l'apparition des cristaux en forme d'aiguille de la pipérine brute. **(Voir annexe N° 08)**

***II.2.3.3. Extraction par Soxhlet :***

92 g de poudre a été extraite avec 1L d'éthanol à 95° dans un extracteur soxhlet à une température d'environ 80 C° pendant 2 à 3h.

La solution a été concentrée dans un évaporateur rotatif à 60°C pendant 1h puis 10 ml de KOH à 10% a été ajouté à cette dernière.

L'eau distillée a été ajouté jusqu' à l'apparition des cristaux en forme d'aiguille de la pipérine brute.

Après 24h, les cristaux ont été filtrés sur Büchner et séchés à l'étuve (80°C) sur un verre de montre préalablement pesé. **(Voir annexe N°09)**

**II.2.3.4. Extraction au micro-onde :**

Les fruits du poivre noir ont été préalablement pulvérisés à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine.

Dans un Erlenmeyer de 500 ml, ont été introduits successivement :

- ✓ 100 g de la poudre.
- ✓ 150 ml d'éthanol absolu. **(a)**

L'erenmeyer a été placé dans un micro-onde à 400 w, pendant 4-5 minutes. **(b)**

Le mélange a été filtré dans un dispositif de filtration sous vide. **(c)**

Refaire la même étape sur le même filtrat en ajoutant 100 mL d'éthanol absolu. **(d) (e)**

Le filtrat obtenu est placé dans un évaporateur rotatif à 60°C pour le concentrer et éliminer l'éthanol. **(f)**

40 ml de KOH alcoolique à 10% a été ajouté à la solution concentrée. **(g)**

Après filtration, l'eau distillée a été ajoutée jusqu'à l'apparition des cristaux en forme d'aiguille de la pipérine brute. **(h)**

Après 24h, les cristaux ont été filtrés sur Büchner et séchés à l'étuve (80°C) sur un verre de montre préalablement pesé. **(i) (Voir annexe N° 10)**

La recristallisation a été fait dans l'éther.

✚ Calcul du rendement :

Selon les normes de la pharmacopée européenne 8<sup>ème</sup> édition, le rendement en pipérine (Rp) isolée du poivre noir exprimé en pourcentage (%) est calculé selon **équation 02** comme suit :

$$Rp (\%) = M1/M2 \times 100$$

**M1** = la masse de la pipérine isolée (g).

**M2** = la masse de poivre noir utilisé (g).

### **II.3. Identification de la pipérine isolée :**

Elle consiste à déterminer les propriétés **physico-chimiques** de la pipérine isolée, ainsi qu'à réaliser l'analyse spectrale en **UV**, **IR** et **RMN**. Cette identification a été effectuée au **laboratoire de Chimie Analytique**, dans les **laboratoires ISOPHARM**, et au **CRAPC**. Ce travail a été mené au cours du **mois d'avril 2021**.

#### **II.3.1. Matériels :**

Le matériel utilisé pour le contrôle analytique est :

✓ **Petits matériels de laboratoire :**

- Pipette de 1000µl.
- Verre de montre.
- Tubes à essais.
- Balance.
- Fioles jaugées.
- Eprovette.
- Béchers.
- Spatules.
- Entonnoir.

✓ **L'appareillage :**

- Un banc kofler.
- Une balance de précision.
- Un spectrophotomètre UV (GENESYS UV 10 S-UV-VIS).
- Un spectrophotomètre IR. (Thermo-scientific Nicolet iS10 par ATR).

**II.3.2. Réactifs :**

- La pipérine extraite.
- L'eau distillée.
- Le chloroforme. (N° de lot : #STBF1452V/SIGMA-ALDRICH)
- L'éthanol. (N° de Lot: 19H204004/LAB-HONEYWELL)

**II.3.3. Logiciel d'interprétation de la courbe UV :**

- Vision lite™ version 5.1.(Figure 49)



**Figure 49 :** Logiciel d'analyse du spectre UV.

**II.3.4. Méthodes :****II.3.4.1. Les caractères organoleptiques et la solubilité :**

- ✓ **Caractères organoleptiques :** les caractères organoleptiques (couleur, odeur et saveur) ont été déterminés.
- ✓ **Test de solubilité :** la solubilité de la pipérine isolée a été testée dans différentes solvants :
  - **Tube 01 :** dans l'eau distillée.
  - **Tube 02 :** dans l'éthanol.
  - **Tube 03 :** dans le chloroforme.

#### *II.3.4.2. Le point de fusion :*

La substance finement pulvérisée est desséchée pendant 24 heures.

Une quantité suffisante de la pipérine desséchée est introduite sur la plaque chauffante du banc kofler (Figure 50) et faite passer à l'aide de l'index du banc kofler jusqu'au passage à l'état liquide.



**Figure 50 :** Le banc kofler.

#### *II.3.4.3. Identification par spectrophotométrie d'absorption UV :*

Dans une fiole de 10 ml, ont été introduits successivement :

- ✓ 6.5mg de la pipérine isolée.
- ✓ 10ml de méthanol

Pour obtenir une solution mère de **0,65 mg/mL**.

Deux dilutions au 1/10 ont été réalisées pour avoir une solution finale de **0,0065 mg/mL**.

Une lecture au spectrophotomètre a été réalisée dans l'intervalle (200nm-400nm), en utilisant le méthanol comme blanc.

Le spectre d'absorption a été tracé à l'aide du logiciel **Visionlite™** (Figure 51)



**Figure 51 :** Spectrophotomètre UV-visible.

#### ***II.3.4.4. Identification par spectrophotomètre IR :***

Type d'équipement : spectrophotomètre IR thermo-scientific Nicolet iS10 par ATR (Figure 52)

Une lecture par spectroscopie dans l'IR de la pipérine isolée a été réalisée.

Le principe de l'ATR est de faire subir au faisceau optique plusieurs réflexions à l'interface entre l'échantillon et un cristal parallélépipédique.

La technique ATR est idéal, elle consiste à déposer une quantité d'échantillon sur le cristal, le faisceau IR initial d'intensité  $I$  (source) traverse le cristal et subit une réflexion totale à l'interface cristal-échantillon puis est dirigé vers le détecteur.

La réflexion totale atténuée est communément appelée ATR (Attenuated Total Reflection).



**Figure 52 :** Spectrophotomètre IR.

#### ***II.3.4.5. Identification par spectrophotomètre RMN :***

Il est indéniable que la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN est la méthode d'analyse spectroscopique la plus utilisée. Quand on place des noyaux  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  dans un champ magnétique, leurs spins nucléaires sont parallèles ou antiparallèles à celui-ci. Lorsqu'une radiofréquence est utilisée, une absorption d'énergie se produit et les spins nucléaires se déplacent d'un état fondamental de basse énergie vers un autre de plus haute énergie. On observe une amplification et une manifestation de signaux d'absorption RMN lors de l'absorption de cette énergie.(202)

- *Méthode de travail :*

Dans notre travail, nous avons préparé les échantillons par dissolution de 30 mg de pipérine dans 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{DMSO-d}_6$ , l'échantillon a été placé dans un portoir spécial dans l'appareil de RMN Bruker® 400, puis l'analyse a été programmé avec un courant de champ magnétique de 100 ampère, la fréquence était de 400 méga Hertz, selon le protocole interne au CRAPC Bousmail-Tipaza. L'appareil RMN Bruker® 400 est connecté avec un micro-ordinateur d'analyse de résultats utilisant le logiciel TopSpin 3.5. (Voir annexe N°26).

#### **II.4. Evaluation *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire et analgésique de la pipérine isolée :**

Dans un premier temps, une étude de l'activité **anti-inflammatoire** a été réalisée à l'aide de la méthode de l'œdème de la patte chez la souris. (203)

Dans un second temps, l'étude de l'activité **analgésique** a été effectuée par le test de **RANDALL-SELITTO**, ou méthode de la pression de la queue chez la souris. (204)

Ce travail a été mené durant la période allant de **décembre 2021 à avril 2022**.

#### ***II.4.1. Matériels :***

##### ***II.4.1.1. Matériel animal :***

L'étude a été réalisée sur des souris Swiss Albinos mâles, pesant entre 23g et 27g provenant de l'animalerie du campus Chihani Bachir Faubourg.

Conditions d'élevage : les souris sont réparties en groupes comportant 6 souris chacun dans des cages en polypropylène soumis à un cycle jour/nuit de 12 heures chacun (12 heures d'éclairage et 12 heures d'obscurité), maintenues à une température ambiante et à un taux d'humidité contrôlé. L'eau et l'aliment sont fournis à volonté.

**II.4.1.2. Matériel végétal :**

La pipérine a été extraite à partir des fruits du poivre noir par plusieurs méthodes (Soxlet ; chauffage à reflux, macération ...).

**II.4.1.3. Réactifs chimiques et solutions :**

Plusieurs réactifs chimiques et solutions ont été utilisés dans l'expérience :

- Aspirine (Lot N° 248719 684, Laboratoire FLUKA)
- Tramadol (Lot N°24002, Laboratoire MERINAL)
- Une solution de NaCl à 2 g/l.
- Une solution de Carragénine à 0.2% : préparée dans de l'eau distillée.
- Du DMSO (Diméthylesulfoxyde)
- Une solution de Triton.
- Une solution d'aspirine à 15mg/ml : 10 ml de solution a été préparée en solubilisant 150 mg d'aspirine dans un 1ml de DMSO, et en complétant à 10ml avec de l'eau distillée.
- La première solution de pipérine : 10 ml de solution est préparée en solubilisant 94 mg de pipérine dans un 1ml de DMSO, et en complétant à 10ml avec de l'eau distillée, obtenant ainsi une solution à 9.4 mg/ml. (**Voir annexe N°14**).
- La deuxième solution de pipérine : 10 ml de solution est préparée en solubilisant 96 mg de pipérine dans un 1ml de DMSO, et en complétant à 10ml avec de l'eau distillée, obtenant ainsi une solution à 9.6 mg/ml.
- Une solution de Tramadol à 1,4mg/ml : 10 ml de solution est préparée en solubilisant 14 mg de tramadol dans un 1ml de DMSO, et en complétant à 10ml avec de l'eau distillée

**II.4.1.4. Appareillage, instruments et consommable :****✓ Analgésimètre :**

C'est un appareil constitué d'une pince instrumentée, il se compose d'une unité de stimulation « la pince », d'une unité de contrôle électronique et d'une pédale pour fixer la valeur affichée sur l'écran.

Cet appareil permet de mesurer le seuil de douleur mécanique supportée par l'animal de laboratoire, et ce en appliquant une pression sur la queue de la souris par le biais de la pince et en observant la réaction de l'animal nous permettant d'enregistrer le chiffre à partir duquel la souris réagit (figure 53).



**Figure 53 :** Analgésimètre. (BIOSEB)

✓ *Pléthysmomètre LE 7500 :*

Cet outil est utilisé pour la mesure de faibles changements de volume, pour l'évaluation de l'activité inflammatoire induite expérimentalement chez les rongeurs et pour tester des propriétés anti-inflammatoires de substances test.

Le pléthysmomètre digital LE 7500 est constitué des éléments suivants :

- Une unité sentinelle LE 7500 : composée d'une électrode Platiniun, d'une valve, d'une fiole sentinelle et d'un conteneur. (Figure 54)
- Une unité contrôle LE 7500 : reçoit les informations de l'unité sentinelle et les transforment en millilitres.
- Accessoires : pédale.



**Figure 54 :** Pléthysmomètre. (BIOSEB)

Plusieurs appareils et instruments ont été utilisés à côté de l'analgésimètre et du pléthysmomètre :

- ✓ Une balance analytique. (Type RADWAG® (S/N : 468842).
- ✓ Un chronomètre.
- ✓ Une boîte de contention.
- ✓ Un agitateur magnétique. (VELP Scientifica)
- ✓ Un vortex

A côté de ces appareils et instruments, on a utilisé du consommable :

- ✓ Seringue de 1 ml.
- ✓ Seringue de 5ml.
- ✓ Parafilm.

#### **II.4.2. Méthodes :**

##### **II.4.2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vivo par la méthode d'induction de l'œdème de la patte chez la souris :**

- ✓ Principe :

Nous avons choisi comme protocole expérimental, un modèle d'inflammation aiguë, le test de l'œdème plantaire. Ce modèle consiste en l'induction d'un œdème localisé mesurable par le pléthysmomètre. L'agent phlogogène sélectionné est la carraghénine, qui est injectée dans la région sub-plantaire de la patte postérieure gauche de la souris (figure 55).(7,203)



**Figure 55 :** Injection de carraghénine dans la région sub-plantaire de la patte postérieure gauche d'une souris.

✓ Mode opératoire :

Une demi-heure avant l'injection de 0.1 ml de carragénine à 0.2%, trois lots de six souris chacun ont reçu par voie intra-péritonéale les différents produits.

- **Le lot contrôle négatif (Témoin) :** chaque souris a reçu 0.5 ml de DMSO à 10% dans de l'eau distillée.
- **Le lot test (Pipérine) :** chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution de pipérine à une dose de 50mg/kg.
- **Le lot de contrôle positif (référence) :** chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution d'aspirine à une dose de 150 mg/kg. (**Voir annexe N° 11**)

Le volume de la patte a été mesuré, à l'aide d'un pléthysmomètre avant l'induction de l'œdème et 30minutes, 1heure, 2 heures et 3 heures après induction. (**Voir annexe N°12**)

Avant de procéder à la mesure des différents volumes, on a procédé à une étape très importante qui est la calibration du pléthysmomètre, cette dernière doit se faire régulièrement :

Avant de commencer il faut fixer la touche calibration sur le volume souhaité (1, 3 ou 5 ml) au dos du pléthysmomètre, dans notre cas on a choisi le volume de 1ml.

On a commencé la calibration par remplir le réservoir de l'unité sentinelle, à partir du conteneur en ouvrant le petit robinet, jusqu'au trait de jauge par la solution de NaCl dosée à 2g/l et une goutte de triton (ou bien on verse directement la solution de calibration fournie avec l'appareil lorsqu'elle est disponible), on appuie ensuite sur le bouton check solution pour vérifier sa salinité qui doit être comprise entre 40 et 160.

Ensuite il faut mettre le volume de calibration de 1 ml (qui accompagne l'appareil) dans le réservoir. Après 15 minutes on a appuyé sur la pédale, l'écran affiche le zéro, on a retiré le volume et on a séché bien à l'aide d'un papier propre et après on a remis dans le réservoir, l'écran doit afficher une valeur très proche de 1 pour dire que l'appareil est calibré.

L'importance de l'évolution de l'œdème a été estimée par la détermination des pourcentages d'augmentation moyens de l'œdème en fonction du temps, calculés selon **l'équation 03** suivante :

$$\% \text{ Augmentation d'œdème (\%AUG)} = [(V_t - V_0) / V_0] \times 100.$$

- **V<sub>0</sub> :** Le volume initial de la patte avant de provoquer l'œdème.
- **V<sub>t</sub> :** Le volume de la patte au temps t après l'injection de carragénine.

L'activité anti-inflammatoire des solutions testées a été estimée par la détermination du pourcentage d'inhibition de l'œdème, calculé selon la formule suivante **l'équation 04** :

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times [(\% \text{AUG contrôle négatif} - \% \text{AUG traité}) / \% \text{AUG contrôle négatif}].$$

#### **II.4.2.2. Evaluation de l'activité analgésique (Test de la pression de la queue) :**

Le travail a été réalisé au niveau du **laboratoire de pharmacologie** au sein de la **faculté de médecine de Constantine**, il s'agit de la mesure de la tolérance de la douleur par analgésimètre.

##### ✓ Principe :

Dans cette étude, nous avons mesuré la réponse comportementale des souris à un stimulus mécanique douloureux exercé par le biais de la pince d'un Analgésimètre (rodent pincher-analgesia meter bioseb) sur la queue des souris.

Nous appliquons une force mécanique graduelle sur la queue prise entre les extrémités de la pince jusqu'à ce que la réponse comportementale de l'animal apparaisse (retrait de la queue, torsions, cris...). Nous mesurons en grammes la pression supportée par la souris, ce qui permet de déterminer son seuil de tolérance de la douleur.(205)

##### ✓ Mode opératoire :

Nous introduisons doucement la souris dans un dispositif de contention conique, puis nous pinçons lentement la base de la queue (à environ 2 cm de son extrémité), nous observons quand elle manifeste des signes de nociception (en commençant à se débattre par grincement, en bougeant son corps pour tenter de libérer sa queue de la pince ou en poussant des cris). À ce moment, nous appuyons sur la pédale pour enregistrer la valeur obtenue, c'est le seuil de tolérance de la douleur par la souris.

Trois lots de 6 souris chacun ont été étudiés. Tous les produits sont administrés par voie intrapéritonéale à raison de 0,5 ml et les mesures sont prises avant et 30 min, 60 min et 120 min après l'administration des produits. (**Voir annexe N°11**)

- **Le lot contrôle négatif (Témoin négatif) :** chaque souris a reçu 0.5 ml d'une solution de DMSO à 10% dans de l'eau distillée.
- **Le lot test (Pipérine) :** chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution de pipérine à une dose de 150 mg/kg.
- **Le lot de contrôle positif (Tramadol) :** chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution de Tramadol à une dose de 30 mg/kg.

#### **II.4.2.3. Analyse statistique :**

Les résultats de l'ensemble des tests réalisés sont exprimés en moyenne plus ou moins l'écart type. En utilisant le logiciel IBM SPSS Statistics 26.0, les moyennes ont été comparées via des tests de student (sur échantillons indépendants). Une différence significative est représentée à une p-value  $\leq 0,05$ .

#### **II.5. Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de la pipérine isolée et de l'acide pipérique synthétisé :**

Une évaluation de l'activité **antibactérienne** a été réalisée au niveau du **Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques (CRSP)** et du **Centre Hospitalo-Universitaire de Constantine (CHU)** durant la période allant de **janvier 2023 à avril 2023** sur des souches bactériennes **Gram positif** et **Gram négatif**.

##### **II.5.1. Matériels :**

- **Appareillage :**

- Balance analytique ADAM NBL 214
- Vortex R800011451
- Spectrophotomètre UV ZUZI UCF 2009005

- **Matériel de laboratoire :**

- Boîtes de pétri.
- Tubes à essai.
- Eppendorf
- Micropipette de 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l et de 1 ml.
- Pince stérile.
- Tube à culture
- Bec bunsen
- Anse de platine
- Ecouvillon stérile
- Papier (Whatman n° 1) de 6 mm de diamètre.
- Pipette pasteur.
- Une règle graduée

- **Réactifs :**

- Diméthyl sulfoxyde DMSO
- Eau physiologique 0.9% NaCl

**II.5.2. Les microorganismes utilisés :**

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été effectuée sur deux groupes de bactéries : bactérie Gram négatif à savoir *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et bactérie Gram positif : *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. (Tableau 11)

**Tableau 11** : Les souches bactériennes utilisées. (Figure 56)

| Bactérie                      | Gram    | Référence  |
|-------------------------------|---------|------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Négatif | ATCC 27853 |
| <i>Escherichia coli</i>       | Négatif | ATCC 25922 |
| <i>Bacillus subtilis</i>      | Positif | ATCC 6633  |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | Positif | ATCC 25923 |

**II.5.3. Milieux de culture :**

- Gélose Nutritive (GN) : milieu d'isolement non sélectif.
- Gélose Mueller Hinton : milieu d'étude de la sensibilité des bactéries.

**II.5.4. Méthode :**

Deux méthodes ont été utilisées : la méthode de diffusion sur disques et la méthode de diffusion sur puits.

**II.5.4.1. Méthode de diffusion sur disques :**

- Préparation des échantillons à tester :

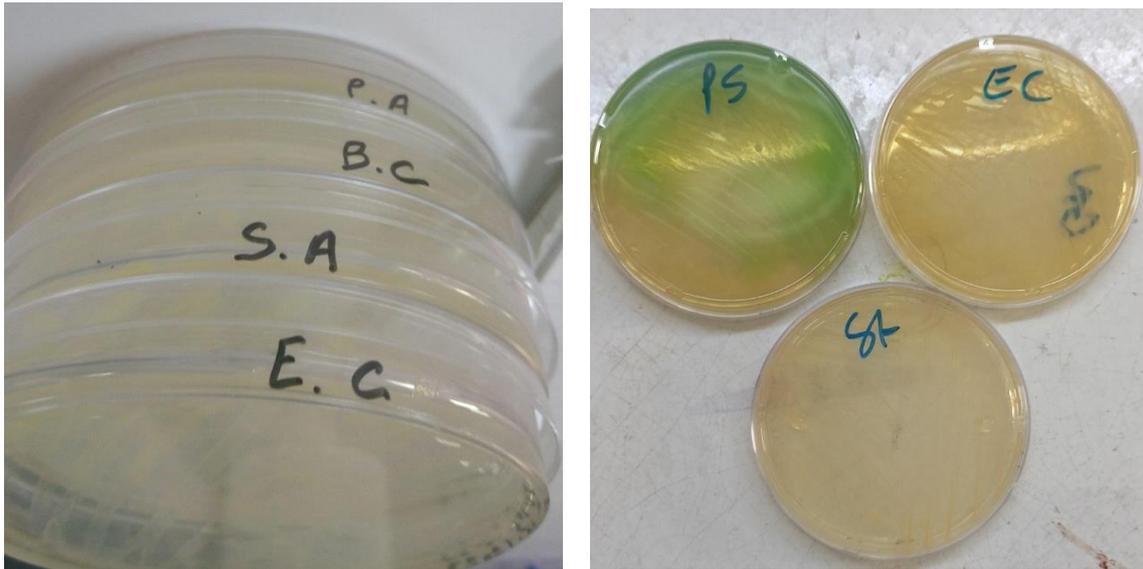
La pipérine isolée et l'acide pipérique synthétisé ont été dissous dans le DMSO pour préparer les concentrations avec des dilutions successives.

La concentration de la solution mère a été de 1 mg/ml. Deux dilutions ont été faites pour obtenir deux solutions de concentration : 0.5mg/ml et 0.25mg/ml.

Un autre essai a été fait au niveau de CHU Constantine sur trois souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) en utilisant des concentrations élevées : 100 mg/ml, 50 mg/ml et 10 mg/ml.

- Préparation de pré culture :

La culture bactérienne a étéensemencée dans des boîtes de pétri contenant la gélose nutritive GN et ont été incubées pendant 18 à 24h à 37°C dans le but d'obtenir des cultures jeunes.



**Figure 56 :** Souches bactériennes utilisées sur GN.

- Préparation de l'inoculum (suspension bactérienne) :

A l'aide d'une anse de platine 2 ou 3 colonies bactériennes isolés et parfaitement identiques ont été raclés et déchargés dans des tubes contenant 9 ml de l'eau physiologique (0,9 NaCl) et les suspensions bactériennes ont été par la suite homogénéisées à l'aide d'un vortex.

La turbidité a été ajustée par le spectrophotomètre pour que la D.O à 620 nm soit comprise entre 0.08 et 0.1 qui correspond à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes /ml afin d'obtenir une concentration identique dans toutes les suspensions bactériennes.

- Préparation du milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé dans le travail est le Muller Hinton.

Après liquéfaction totale des géloses par ébullition dans un bain-marie et refroidissement léger ; elles ont été coulées dans des boîtes de pétri avec épaisseur de 4 mm.

La gélose a été laissée refroidir jusqu'à solidification

- Ensemencement :

Un écouvillon stérile a été trempé dans l'inoculum bactérienne et étalé à la totalité de la surface de gélose du haut en bas par stries trop serrées et l'opération a été répétée quatre fois en tournant la boîte.

Pour chaque boîte, l'écouvillon utilisé a été rechargé de nouveau pour une même suspension bactérienne. **(Voir annexe N°16)**

- Application des disques :

A l'aide d'une pince bactériologique stérile, un disque de papier filtre stérile de 6 mm de diamètre (Whatman n° 1) a été placé à la surface de la gélose puis imprégné d'un volume de

10µl des solutions de la pipérine, l'acide pipérique et solution de DMSO comme témoin négatif. Un disque d'antibiotique (Amoxicilline) à 10 µg/disque a été déposé comme contrôle positif.

Pour le deuxième essai, les disques ont été imprégnés dans la solution avant leur dépôt sur la gélose et le Ceftazidime à 30 µg/disque a été utilisé comme contrôle positif.

Toutes les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures, l'expérience a été répétée deux fois pour chaque espèce bactérienne et pour chaque produit.

Après l'incubation, la lecture a été faite par la mesure avec précision des diamètres des halos d'inhibition autour des disques à l'aide d'une règle graduée.

### ***II.5.4.2. Méthode de diffusion sur puits :***

Le même protocole de diffusion sur disque a été utilisé avec augmentation de concentration pour l'acide pipérique et la pipérine avec des concentrations de 1 mg/ml, 10 mg/ml et 50 mg/ml.

- Préparation des puits :

A l'aide d'une pipette pasteur stérile des puits d'environ 6 mm de diamètre ont été réalisés sur la gélose MH et remplis avec 100 µl des solutions d'échantillons et de témoin (DMSO) l'expérience a été répétée deux fois pour chaque espèce bactérienne et pour chaque extrait.

Les boîtes de pétri ont été laissées sur la paillasse pendant 30 minutes et mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. (**Voir annexe N°16**)

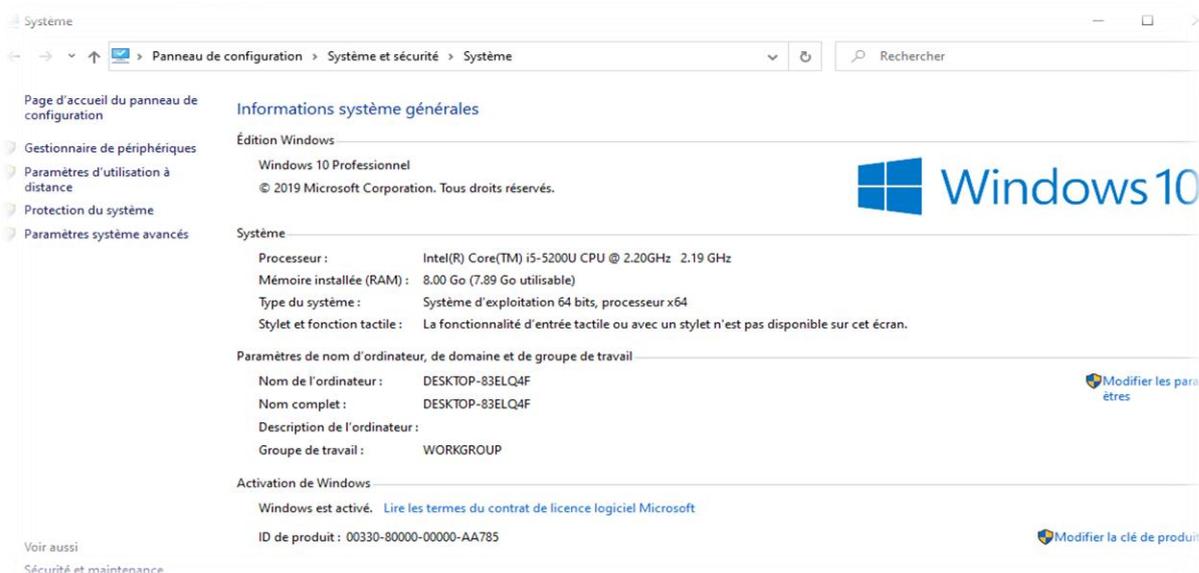
## II.6. Etude *in silico* (ADME/T, Docking moléculaire, Dynamique moléculaire) des analogues amides de l'acide pipérique :

Des **études chimiométriques** pour les molécules conçues ont été effectuées avant la synthèse. L'étude consiste en une évaluation **in silico** des propriétés **ADME/T** et de l'activité **anti-inflammatoire** (COX-2) et **antibactérienne** (**E. coli**, **Pseudomonas aeruginosa**, **Staphylococcus aureus**, **Bacillus subtilis**) de la pipérine et des analogues amides de l'acide pipérique. Ce travail a été mené durant la période allant de **janvier 2022 à mai 2023**.

### II.6.1. Matériels :

#### ➤ Microordinateur :

Dans le travail présent nous avons utilisé un micro-ordinateur puissant ayant une mémoire vive de 8GO, carte graphique hd5500 et processeur Intel (R) Core (TM) i5. On signale que tous les programmes utilisés dans cette étude sont installés sous le système d'exploitation Windows 10 ; 64bits. (Figure 57)



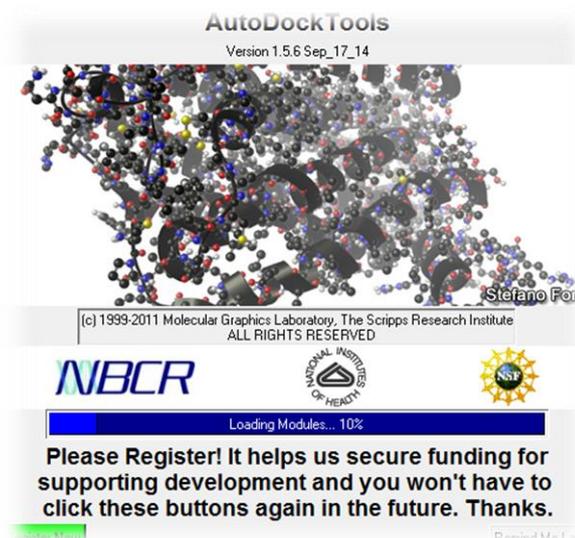
**Figure 57** : Caractéristiques générales du microordinateur utilisé dans notre travail.

#### ➤ Programmes et serveurs :

Afin de réaliser de notre travail plusieurs programmes ont été utilisés :

#### ✓ Autodock tools:

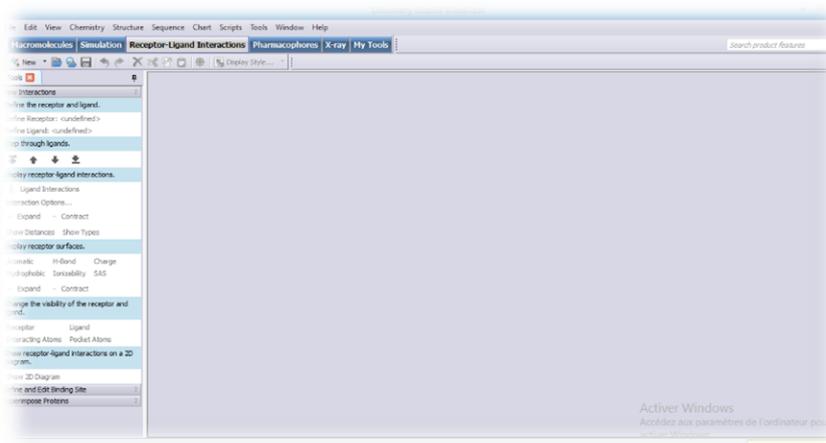
Le récepteur et les ligands utilisés dans ce travail étant en général sous le format PDB sont convertis au format pdbqt par le programme AutoDock Tools.(11) Aussi il s'agit d'une interface qui nous a permis de lancer le docking moléculaire par autodock4.2. (Figure 58)



**Figure 58 :** Logiciel autodock tools.

✓ **Accelry Discovery Studio :**

Le programme Discovery Studio 2020 a été utilisé afin de séparer les complexes [ligands-récepteur] en format pdb.(206) (Figure 59)



**Figure 59 :** L`interface du programme Discovery Studio 2020.

✓ **Open Babel :**

Le programme « Open Babel » version (2.4.1) est un programme gratuit qui nous a facilité la conversion des données biologiques d'un format à un autre. Les différents formats que « Open Babel » prend en charge comprennent : pdb, mol, mol2, sdf, smi...etc.(207) (Figure 60)

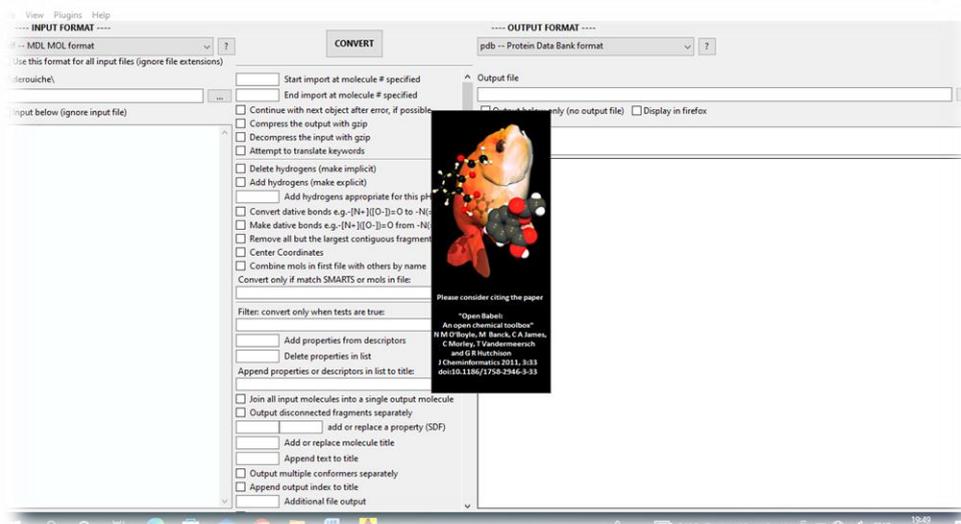


Figure 60 : Logiciel Open Babel

✓ **Chem sketch :**

Un logiciel de dessin, qui nous permet de schématiser des structures chimiques, il comprend également des fonctionnalités telles que le calcul des propriétés moléculaires (le poids moléculaire, la densité ....etc), le nettoyage et la visualisation des structures 2D et 3D(208).(Figure 61)

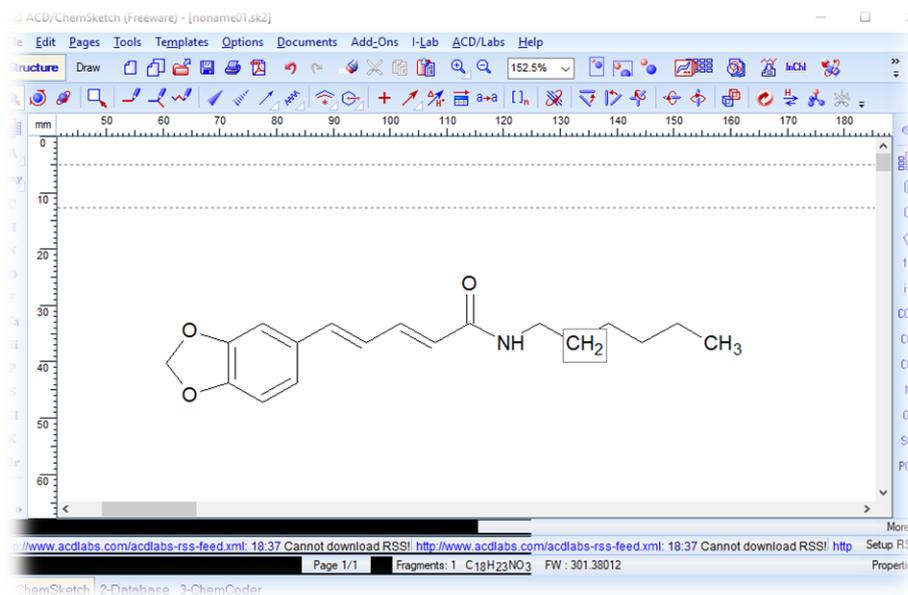
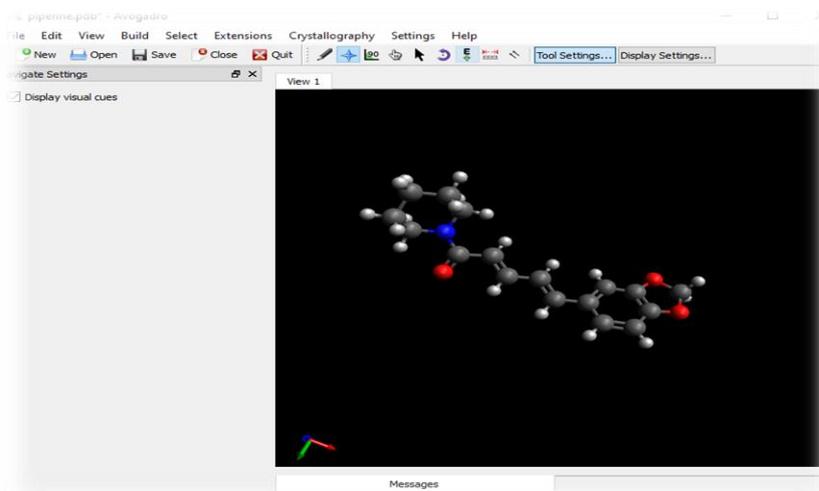


Figure 61 : Logiciel ChemsSketch.

✓ **Avogadro :**

Il nous a permis de faire la préparation conformationnelle des ligands en 3D.(209) (Figure 62)



**Figure 62 :** Logiciel Avogadro.

✓ **GROMACS 2023 :**

Est une version récente d'un logiciel libre de dynamique moléculaire, utilisé pour simuler les mouvements et interactions d'atomes dans des systèmes biologiques comme les protéines et les membranes. Il est optimisé pour les calculs rapides sur processeurs et GPU, avec des améliorations en termes de précision, performance et interface utilisateur.(210)

✓ **PyMol :**

Est un logiciel de visualisation moléculaire utilisé principalement pour afficher, manipuler et analyser des structures biomoléculaires tridimensionnelles, Il permet de visualiser des structures issues de bases de données comme le PDB, et d'illustrer les résultats de modélisations, de simulations (dynamique moléculaire), ou de techniques expérimentales.(211)

✓ **VMD (Visual molecular dynamics) :**

Est un logiciel de visualisation moléculaire utilisé principalement pour l'analyse et la visualisation de simulations de dynamique moléculaire (MD), ainsi que pour le rendu graphique de structures biomoléculaires en 3D.(212)

✓ **SwissADME :**

Ce serveur permet de calculer des descripteurs physicochimiques ainsi que des propriétés pharmacocinétiques des composés chimiques. On peut consulter ce serveur via le lien:<http://www.swissadme.ch/>.(213)

### ✓ **PréADMET :**

PreADMET est un serveur en ligne permettant de prédire les données ADMET. Dans le présent travail, ce serveur a été utilisé pour prédire plusieurs critères régissant la toxicité potentielle de nos composés. On peut consulter ce serveur via le lien : <https://preadmet.bmdrc.kr/>(214)

### ✓ **CASTp (Computed Atlas of Surface Topography of proteins)(215)**

Ce serveur permet de déterminer le site actif des différentes protéines utilisées dans notre étude. On peut consulter ce serveur via le lien: <http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?2r7g>.

### ✓ **Zincpharmer :**

Ce serveur permet de déterminer le modèle pharmacophore pour la conception de nos analogues amides.(216)

### ✓ **SwissParam :**

Est un serveur entièrement automatique qui fournit une topologie et des paramètres pour les petites molécules organiques, compatibles avec le champ de force de tous les atomes CHARMM, à utiliser avec CHARMM et GROMACS. On peut consulter ce serveur via le lien: <http://swissparam.ch/>

### ➤ **Banques de Données :**

#### « PDB » (Protein Data Bank)

La PDB est la principale source de données de biologie structurale qui permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines et cibles biologiques. On peut consulter cette banque de données via le lien: <https://www.rcsb.org/>.

## **II.6.2. Méthodes :**

### **II.6.2.1. Etude ADME des ligands :**

Chaque molécule potentiellement médicamenteuse doit de se conformer à plusieurs critères de base, tels que son faible coût de production, être soluble, stable, brevetable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité.(213)

➤ **Propriétés physico-chimiques :**

Dans cette perspective, nous avons utilisé le serveur SuissADME afin de simuler certaines propriétés physicochimiques des ligands en utilisant la Règle de Lipinski et Veber. Ce serveur sert également à calculer la solubilité dans l'eau et l'accessibilité à la synthèse chimique.

En 1997 Lipinski et al ont proposé « la règle de 5 » également appelée « règle de LIPINSKI » permettant de déterminer si un composé chimique possède des caractéristiques médicamenteuses précises. Selon cette règle, un composé possède toutes les chances d'être disponible oralement s'il respecte au moins 3 des 5 critères suivants :

- Possède une masse moléculaire inférieure à 500 daltons.
- Un coefficient de partition (log P) ou une lipophilie entre -2 et 5.
- Ne possède pas plus de 5 donneurs de ponts hydrogène (OH et NH).
- Ne possède pas plus de 10 accepteurs de ponts hydrogène (O et N).
- Le nombre de fonctions rotatables (flexibles et linéaires) inférieur à 15 (217)

➤ **Propriétés pharmacocinétiques :**

Le serveur précédent nous a également servi à calculer les propriétés pharmacocinétiques de nos similaires, en l'occurrence la pénétration de la barrière hémato-encéphalique, l'absorption gastro-intestinale (GI), la perméabilité cellulaire et l'inhibition des différents cytochromes P450.(217)

**II.6.2.2. Tests de fiabilité du protocole de docking réalisé par Auto Dock 4.2 (Redocking) :**

Le redocking consiste à tenter de repositionner un ligand dans son site de liaison à partir du complexe L-R correspondant, duquel le composé a été préalablement extrait. En d'autres termes, un site apte à lier le ligand que l'on souhaite docker est préparé à partir du complexe L-R d'intérêt, d'où l'appellation "redocking".(218)

✓ **RMSD : L'écart quadratique moyen ou (root mean square deviation) :**

Un moyen largement utilisé pour comparer les structures de biomolécules ou de corps solides qui consiste à translater et à faire pivoter une structure par rapport à l'autre pour minimiser la déviation quadratique moyenne (RMSD).(218) (L'équation 05)

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{je=1}^N \delta_{je}^2}$$

**Équation 05 :** Formule du RMSD.(219)

Où  $N$  est le nombre d'atomes dans le ligand et  $\delta_i$  est la distance euclidienne entre la  $i$  ème paire d'atomes correspondants. (219)

Dans l'ensemble, un RMSD inférieur à 2Å pour une pose est considéré comme une réussite du docking.

✓ **Analyse visuelle :**

Ayant pour but la comparaison visuelle de la superposition des ligands séparés de ces récepteurs téléchargés de la PDB avec ceux qui résultent du selfdock.

**II.6.2.3. Etude de docking moléculaire par l'Auto dock 4.2 :**(11)

La Cyclo-oxygénase 2 (PDB ID : 1cvu) a été choisie comme cible pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et 4 espèces bactériennes, *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID : 6m1s), *Escherichia coli* (PDB ID : 5l3j), et *Staphylococcus aureus* (PDB ID : 5a5x), *Bacillus subtilis* (PDB ID : 3zih) pour évaluer l'activité antibactérienne des différents analogues de l'acide pipérique et de la molécule mère (pipérine).

Le docking protéine-ligand est utilisé pour vérifier la structure, la position et l'orientation d'une protéine quand elle interagit avec les petites molécules comme les ligands. Son but est de prédire et de classer les structures résultant de l'association entre un ligand donné et une protéine cible d'une structure 3D connue.

➤ **Préparation des protéines :**

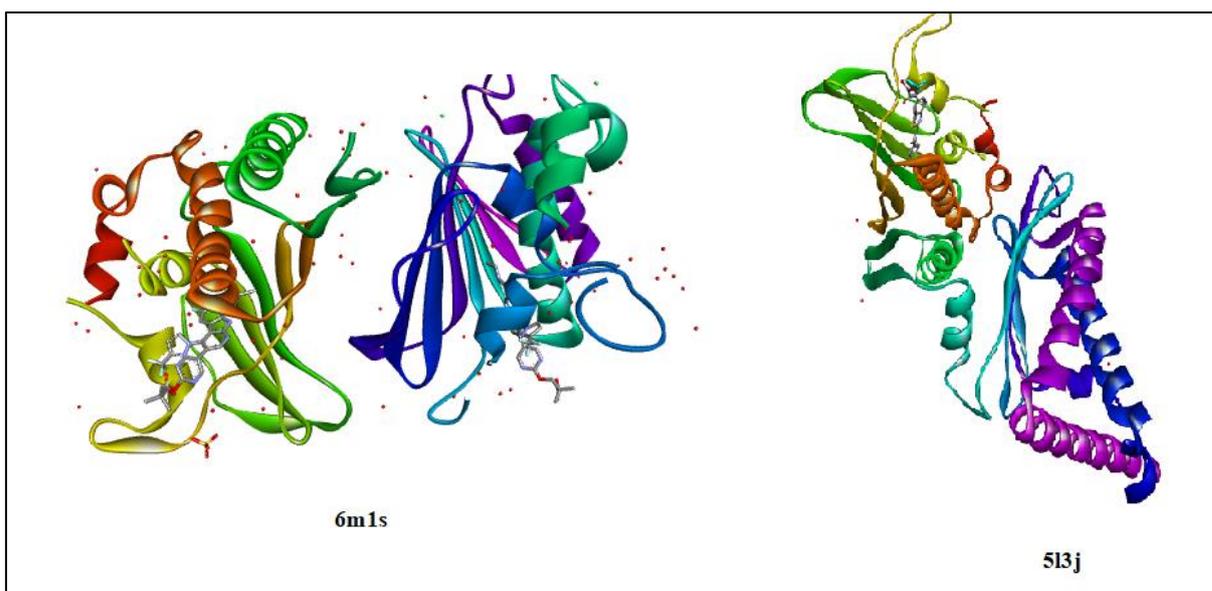
Nous avons choisi pour l'activité anti-inflammatoire la cyclooxygénase 2 comme cible biologique (1CVU : 2.40 Å). Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, des protéines bactériennes à Gram négatif et positif ont été choisies : *Escherichia coli* (ADN gyrase) : 5L3J (2.83 Å), *Pseudomonas aeruginosa* (ADN gyrase) : 6m1s (2.25 Å), *Staphylococcus aureus* (PFP) 3vsl (2.04 Å), *Bacillus subtilis* (SepF, C-terminal domain): 3zih (2 Å) à partir de la banque de donnée PDB (protein data bank). En effet, Nous avons choisi des structures

déterminées par diffraction des rayons X, avec de bonnes résolutions. Les complexes ont été téléchargés au format Pdb (**Figure 63**).

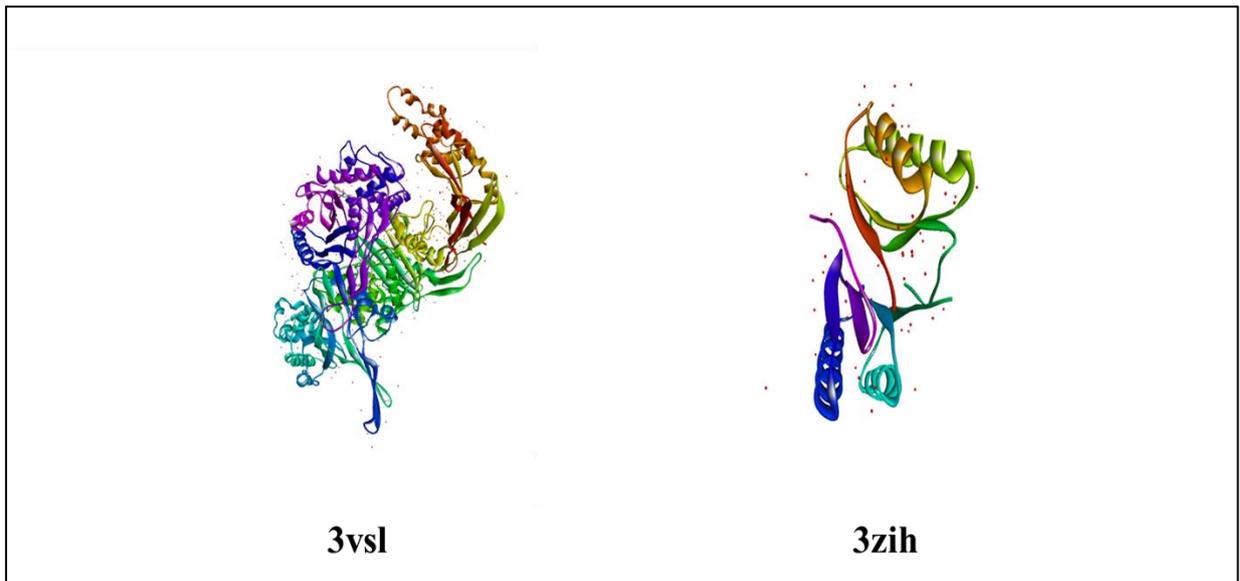
-Avant de les utiliser par Auto Dock 4.2, les 5 complexes sont séparés de leur ligand de référence, s'il existe, afin d'obtenir un récepteur avec un site actif libre, cette étape est réalisée par le logiciel Discovery Studio. Elle a compris l'élimination des molécules d'eau, des ligands de co-cristallisation et des chaînes non favorables pour avoir un modèle simplifié de la protéine (Figure 63 à 68).

-Les récepteurs sont ensuite préparés par réparation des atomes manquants et en définissant les charges partielles de leurs atomes par le programme Autodock Tools qui attribue des charges de type "Kollman". (220,221)

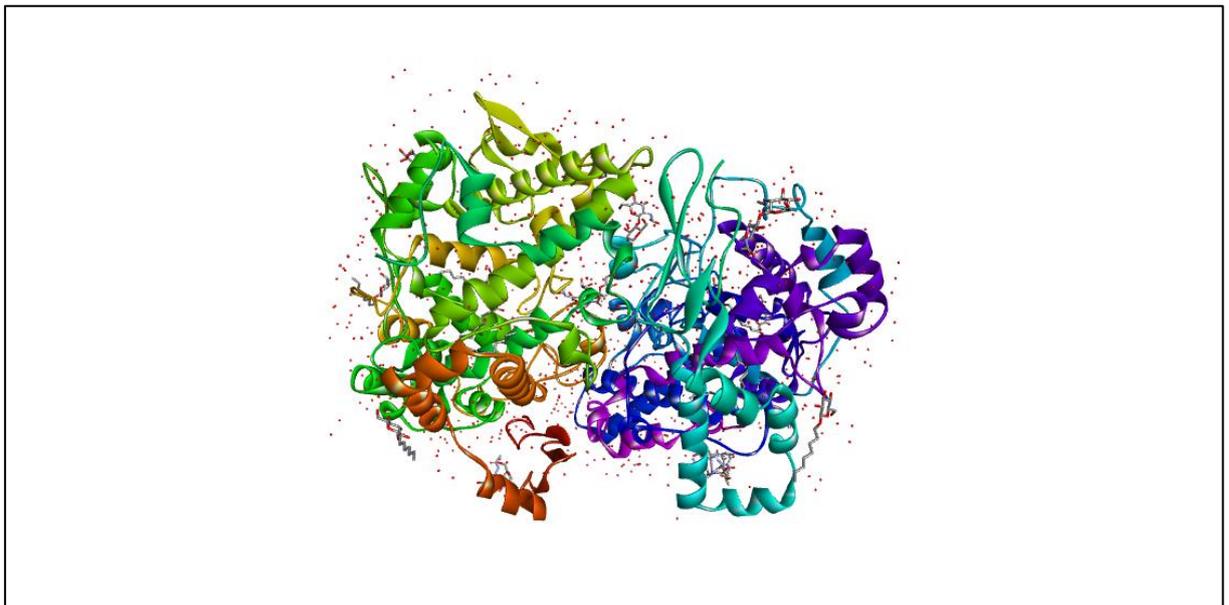
Il est aussi nécessaire de rajouter à ces récepteurs les hydrogènes dits polaires. Les fichiers des protéines ainsi préparées sont convertis par Autodocktools au format pdbqt (format propre à Autodock).



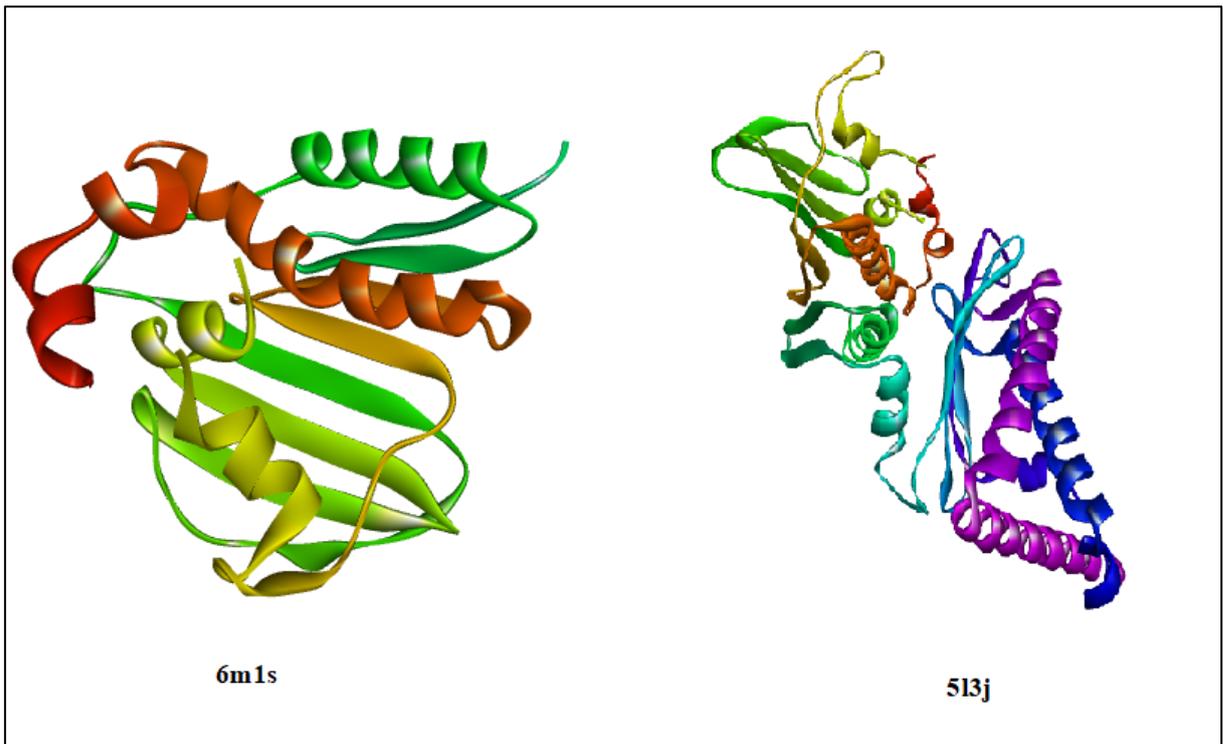
**Figure 63** : Les protéines *Pseudomonas aeruginosa* (6m1s) et *E.Coli* (5L3J) non simplifiées.



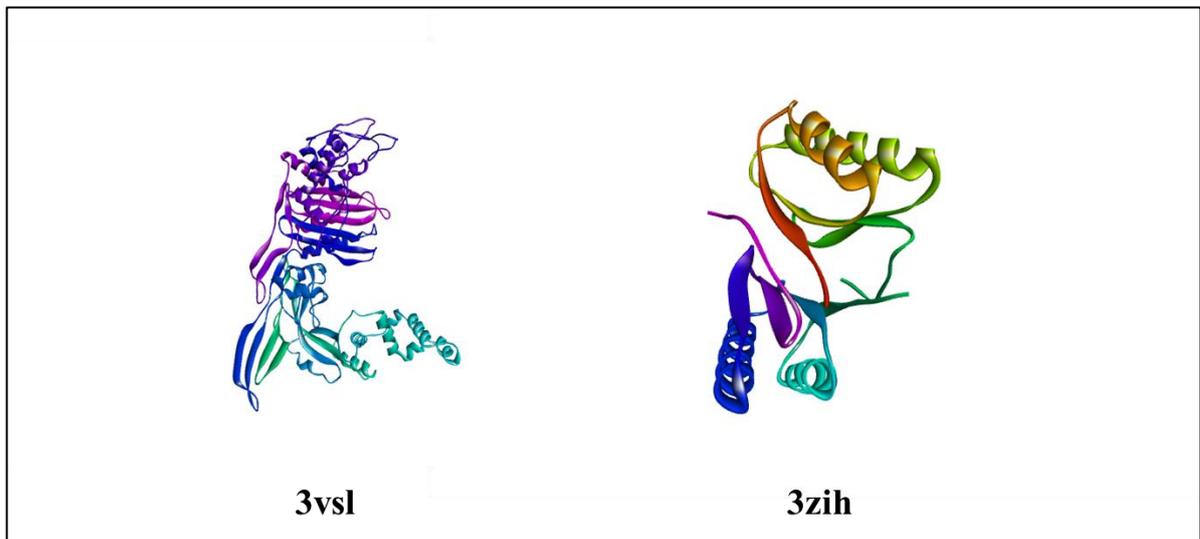
**Figure 64 :** Les protéines *Staphylococcus aureus* (3vsl) et *Bacillus subtilis* (3zih) non simplifiées.



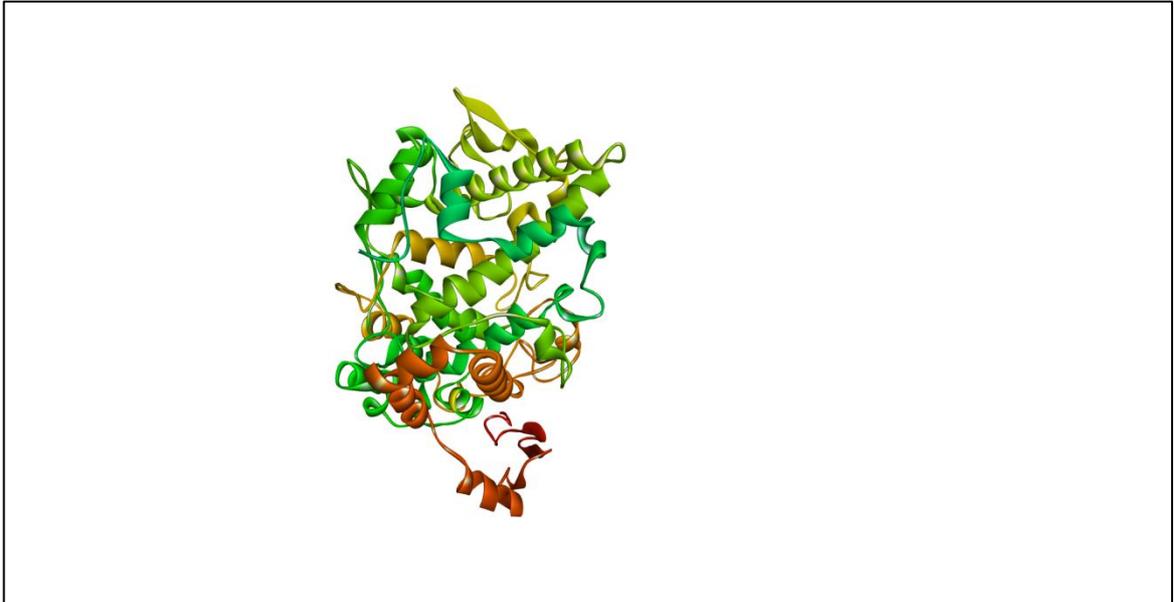
**Figure 65 :** La protéine de cyclooxygénase 2 (1CVU) non simplifié.



**Figure 66 :** Les protéines *Pseudomonas aeruginosa* (6m1s) et *E.Coli* (5L3J) simplifiées.



**Figure 67 :** Les protéines *Staphylococcus aureus* (3vsl) et *Bacillus subtilis* (3zih) simplifiées.



**Figure 68 :** La protéine de la cyclo-oxygénase 2 (1CVU) simplifiée.

➤ **Préparation des ligands :**

Tous les ligands ont été schématisés en utilisant le logiciel Chems sketch. Ensuite, à l'aide d'Avogadro, nous avons optimisé leurs géométries par addition des hydrogènes et charges selon le pH ainsi qu'une minimisation de leur énergie. Enfin, les molécules ainsi obtenues sont enregistrées au format pdb. (Figure 69)

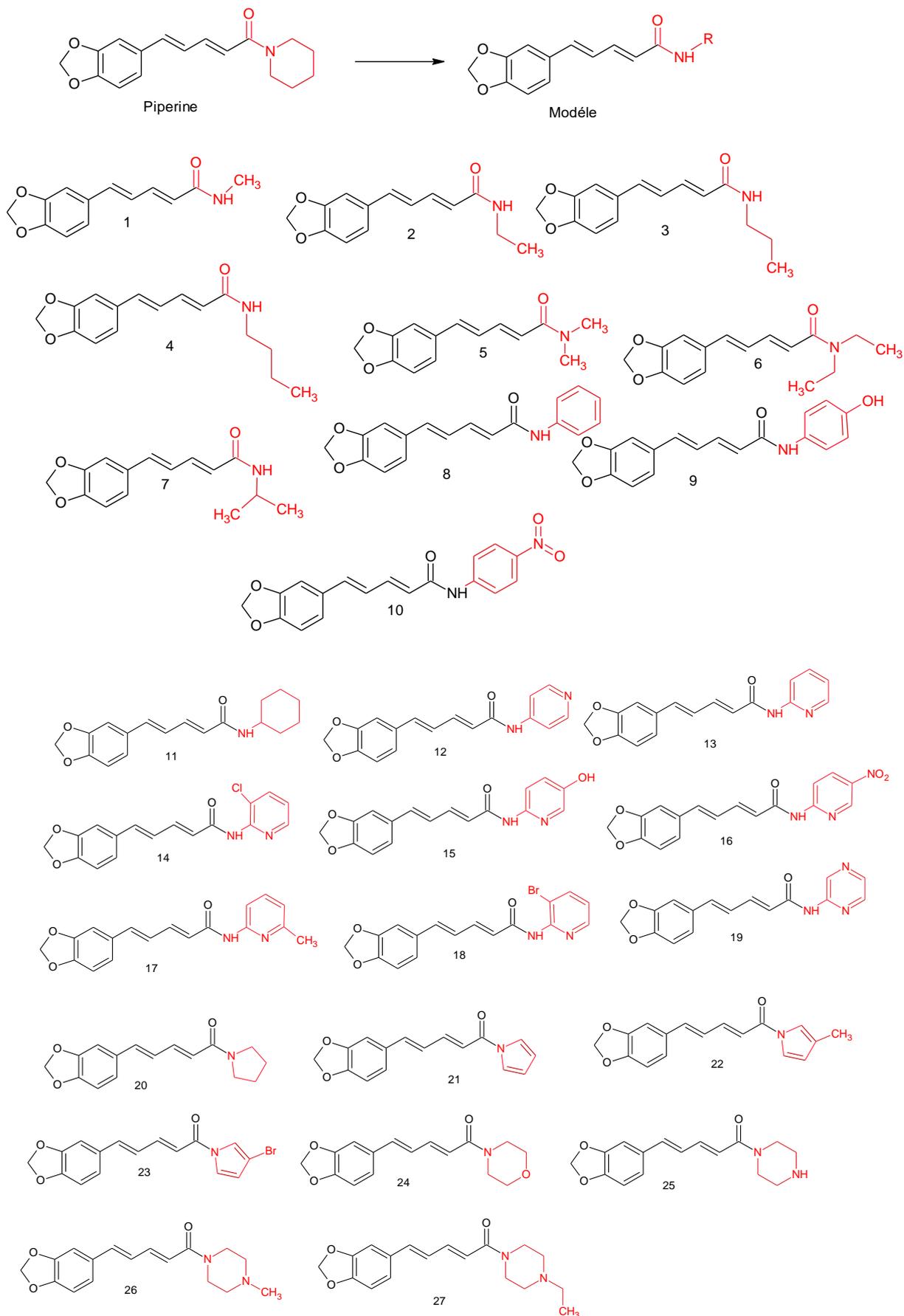


Figure 69 : Structure des différents analogues amides conçus.

➤ **Etapes d'amarrage moléculaire :**

Nous avons réalisé cette étape avec le programme AutoDock 4.2, nécessitant la présence de la protéine et des ligands sous format pdbqt. En ce qui concerne le site actif, nous avons fait recours au serveur CASTp (Computed Atlas of Surface Topography of proteins) et le logiciel Discovery Studio qui nous ont permis de déterminer le site actif. Les centres de la boîte d'amarrage ont été déterminés par les coordonnées suivantes : (Figure 70)

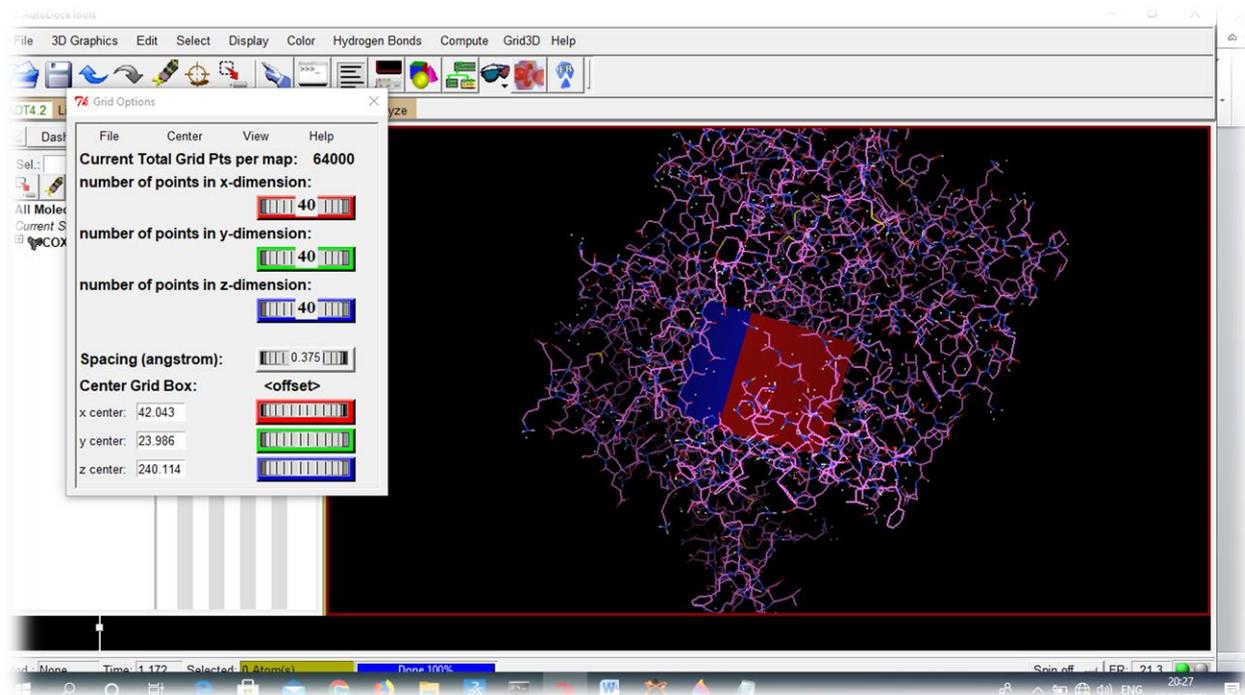
**6m1s** (X = 22.036, Y = 1.331, Z = 41.041). (Espacement de 0.375, dimension 40 × 40 × 40).

**5l3j** (X = -11.954, Y = 20.488, Z = 23.401). (Espacement de 0.375, dimension 40 × 40 × 40).

**3vsl** (X = 50.821, Y = -31.114, Z = 25.054). (Espacement de 0.375, dimension 40 × 40 × 40).

**3zih** (X = -18.394, Y = -23.322, Z = 11.863). (Espacement de 0.375, dimension 50 × 70 × 90).

**1cvu** (X = 27.588, Y = 23.209, Z = 46.329). (Espacement de 0.375, dimension 60 × 50 × 55).

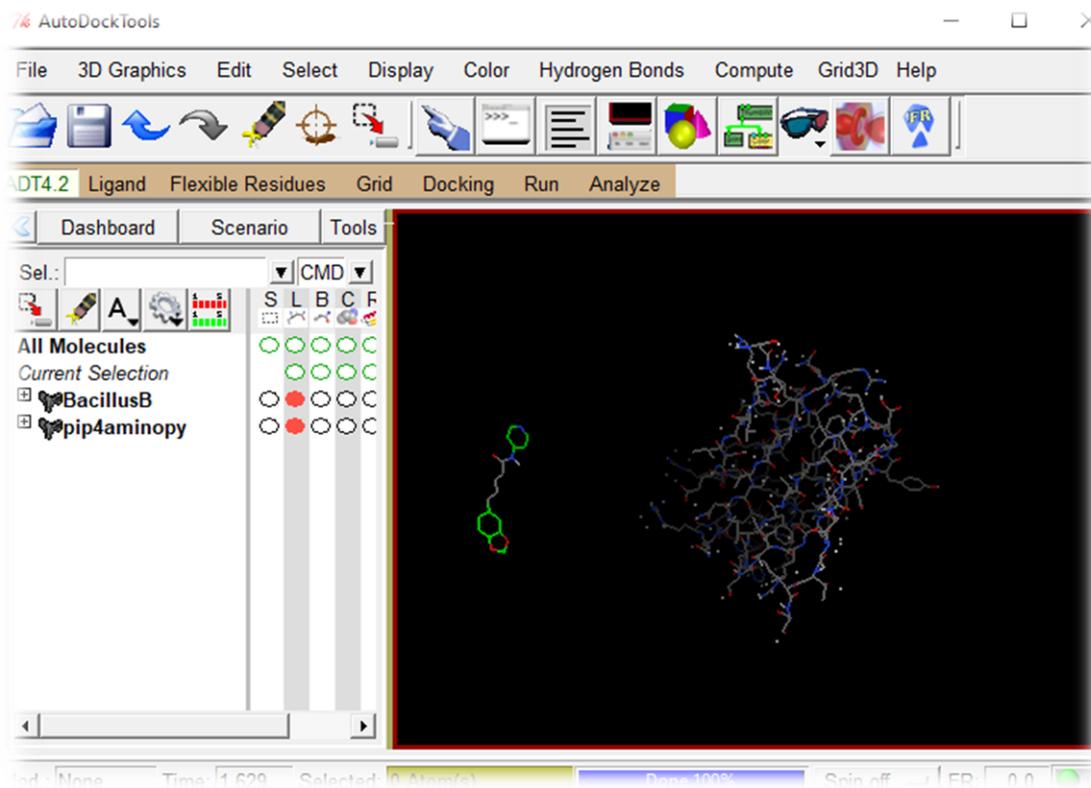


**Figure 70 :** Détermination de l'espace d'amarrage moléculaire.

Le docking moléculaire permet de générer les différentes conformations de chaque ligand étudié au sein du site actif, classées par leur score d'affinité décroissant.

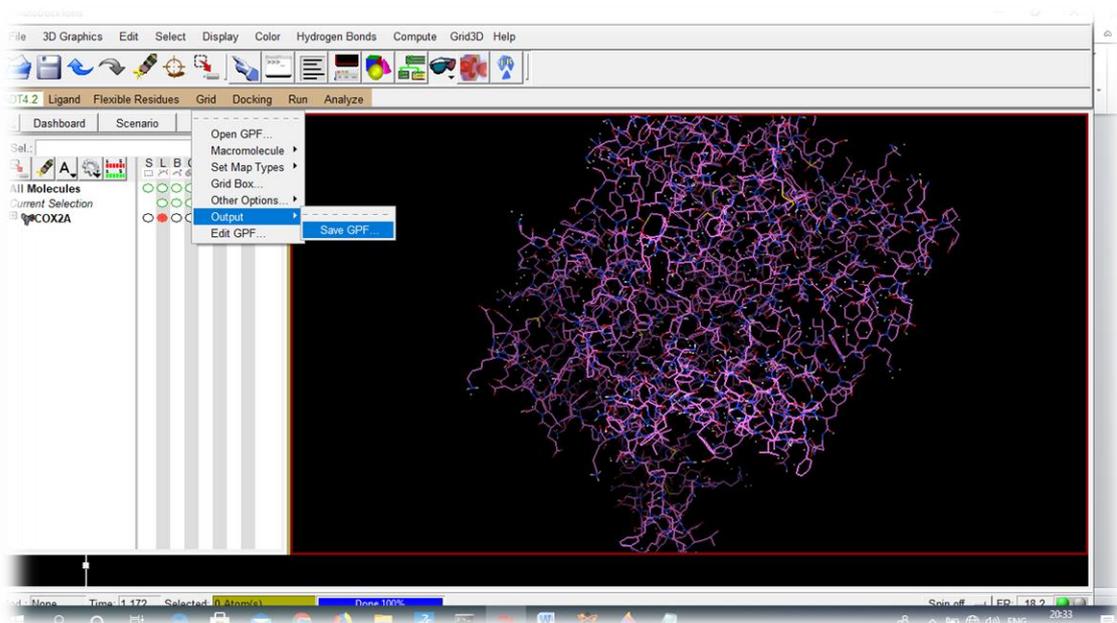
L'amarrage moléculaire se déroule comme suit :

-La première étape consiste à importer le ligand et le récepteur dans l'espace de travail de l'autodock tools (étape de préparation). (Figure 71)



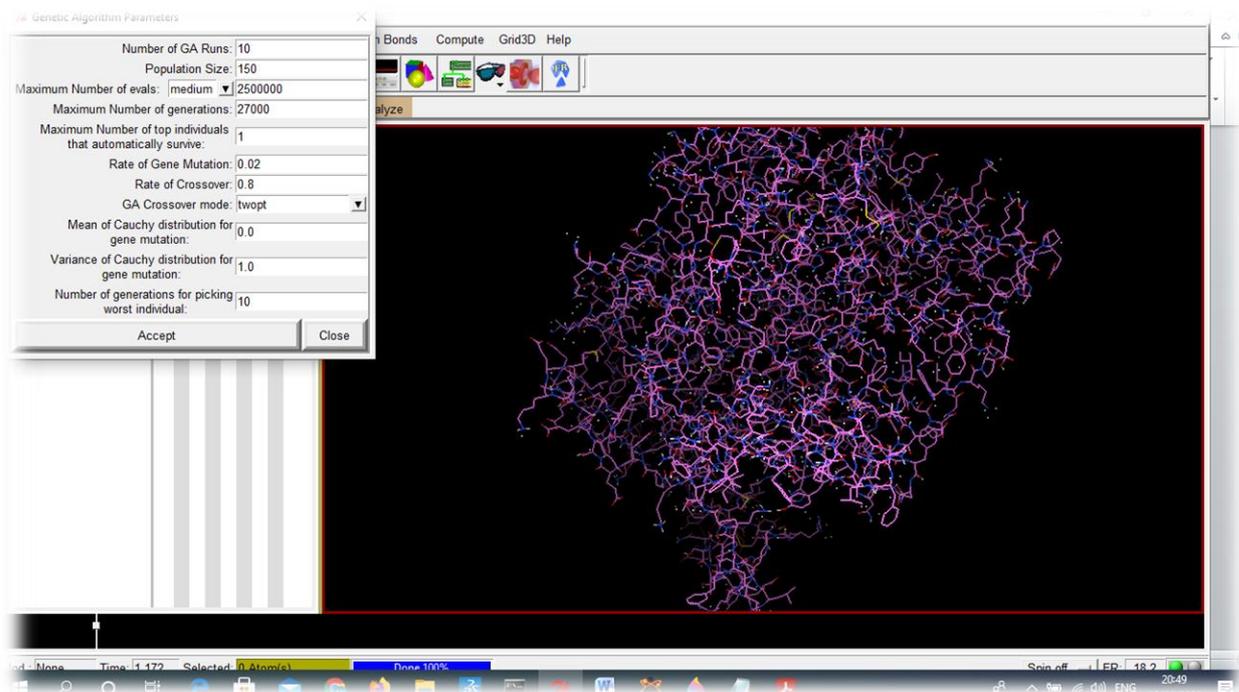
**Figure 71 :** Importation de la protéine et le ligand dans l'espace de travail.

-La seconde étape consiste à préparer les paramètres de la boîte de docking (grid box) et enregistrer les paramètres en gpf file. (Figure 72)



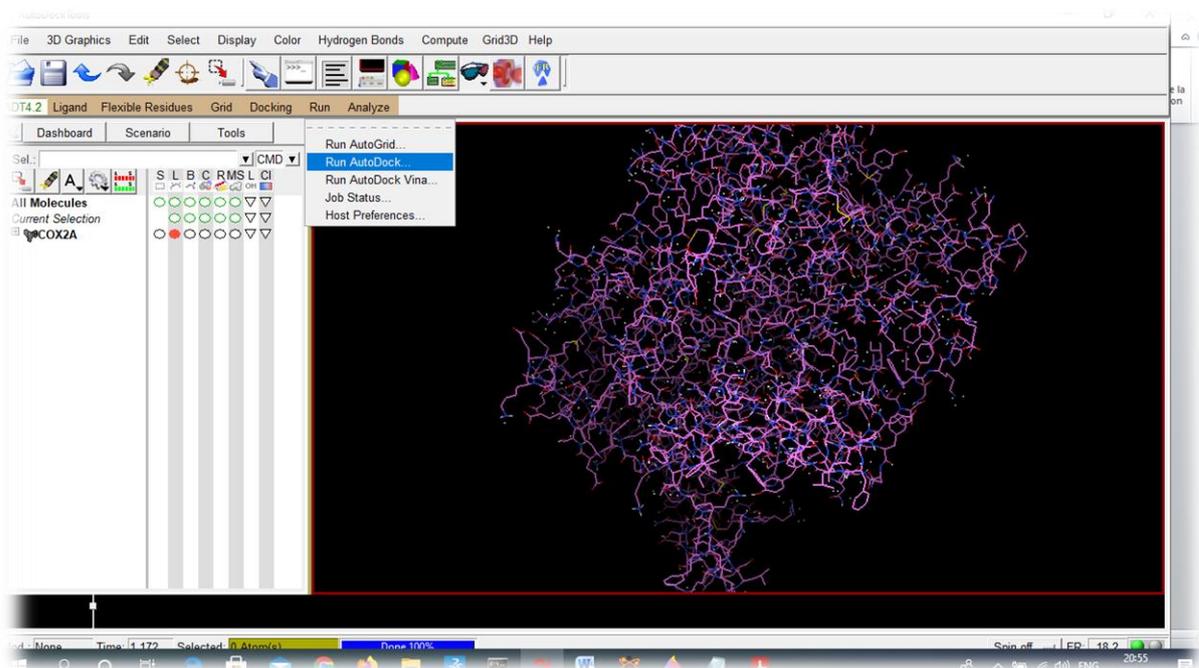
**Figure 72 :** Préparation des paramètres de la boîte de docking (gpf file)

-La troisième étape consiste à préparer les paramètres de docking moléculaire (dpf file). L'algorithme génétique Lamarckien (LGA) (Morris et al., 1998) a été utilisé avec une taille de population de 150 individus, le nombre maximal de générations et évaluations énergétiques est de 27 000 et 2,5 millions respectivement. Selon l'énergie libre ( $\Delta G$ ) et la constante d'inhibition ( $K_i$ ) pour chaque ligand, seule la meilleure conformation (celle avec la plus faible énergie de liaison) a été considérée pour chaque ligand.(222) (Figure 73)



**Figure 73** : Détermination des paramètres de docking moléculaire (dpf file).

-La quatrième étape consiste à exécuter les paramètres du grid box (gpf) et de docking moléculaire (dpf) par les exécutables autogrid et autodock successivement. (Figure 74)



**Figure 74 :** Exécution des paramètres du grid box (gpf) et de docking moléculaire (dpf).

➤ **Analyse des résultats :**

Pour chaque ligand, nous avons choisi la conformation la plus favorable qui correspond à la plus faible énergie d'interaction vis-à-vis du site actif de l'enzyme. Cette étape d'analyse et de visualisation des interactions protéine-ligands concerne seulement les ligands qui ont des énergies d'interaction plus faibles par rapport à celle de la pipérine.

**-Visualisation :**

La visualisation moléculaire est un aspect clé de l'analyse et de la communication des études de modélisation. Nous avons utilisé Discovery Studio pour visualiser les conformations et les interactions hydrophobes et hydrogènes qui peuvent s'établir entre chaque inhibiteur et le site actif de l'enzyme. En plus, ce programme permet la présentation 2d des complexes afin de mieux comprendre les modes de liaisons des inhibiteurs avec le site actif.(206)

**II.6.2.4. Etude de dynamique moléculaire des meilleurs analogues avec la cyclooxygénase 2 (COX2) :**

La méthode de simulation de la dynamique moléculaire est basée sur la deuxième loi de Newton ou l'équation du mouvement ; c'est une simulation qui suit les mouvements atomiques/moléculaires dans les systèmes pour une période donnée. Le meilleur conformère de l'enzyme COX2 avec des ligands a été suivi par un calcul de dynamique moléculaire.

Les simulations de dynamique moléculaire (MD) ont été réalisées à l'aide de GROMACS 2023 sur les complexes amarrés. Le SwissParam basé sur le Web a été utilisé pour préparer les ligands à l'aide du champ de force CHARMM36 (223,224). Les complexes ligand-protéine ont été solvatés dans une boîte cubique avec des modèles d'eau TIP3P, et des contre-ions ont été ajoutés au système pour atteindre la neutralité électrostatique (225). L'algorithme de descente la plus raide a été utilisée pour minimiser l'énergie, avec un maximum de 100 000 marches. Ensuite, les structures ont été stabilisées à une force maximale de 1 000 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-1</sup>, suivie d'un équilibrage NVT à 300 K et d'un ensemble NPT pour une simulation MD de 100 ns (226,227). Les paramètres thermodynamiques des racines, à savoir l'écart quadratique moyen (RMSD), la fluctuation quadratique moyenne (RMSF) et le rayon de giration (Rg), ont été utilisés pour calculer la stabilité du complexe protéine-ligand. Enfin, la trajectoire de simulation MD a été visualisée à l'aide de Pymol 2.5.4 (Schrödinger) (211) et du logiciel VMD (212).

### **II.6.2.5. Etude de la toxicité des meilleurs analogues :**

Le test d'Ames (1975) est le test de génotoxicité le plus répandu. On y utilise des souches de bactéries (*Salmonella typhimurium*) qui ont perdu par mutation la faculté de synthétiser un acide aminé, l'histidine ; on cultive ces bactéries sur des milieux sans histidine, en présence de substance à tester (native ou traitée avec des enzymes hépatiques). Si la substance n'est pas mutagène, le développement des bactéries n'a pas lieu ; dans le cas contraire, la substance provoque une mutation "réverse", qui redonne aux bactéries la faculté de synthétiser l'histidine et donc de se développer.(228)

La cancérogénèse est une étape permettant de détecter un éventuel pouvoir cancérigène du produit, qui sera administré au long cours (2ans ou plus), chez 2 espèces (généralement rat et souris) avec 3 niveaux de doses. La voie d'administration sera identique à celle utilisée en clinique. Il est nécessaire d'apporter la preuve de l'exposition au produit par des mesures 56 répétées de concentration plasmatique. (214)

Les tests d'inhibition du gène hERG, (tests pour les nouveaux médicaments réservés aux essais). Ce test sert habituellement à révéler le mécanisme qui sous-tend différents cas d'arythmie associée aux canaux ioniques et à dévoiler l'inhibition du courant ionique comme un effet primaire ou secondaire du produit pharmacologique. (229)

Également, des tests utilisant des espèces aquatiques ; poissons ex : (*Daphnia*, *Medaka*, *Minnow*) et algues peuvent être utiles pour vérifier la toxicité d'un candidat médicament. Les

paramètres généralement mesurés lors de ces essais sur les différentes espèces sont : la mobilité, croissance et reproductibilité...etc. (214)

Dans notre travail, ces paramètres ont été calculés et déterminés en utilisant le serveur : PreADMET. Il faut tenir compte que les composés doivent être convertis au format mol pour afin d'établir le filtrage.

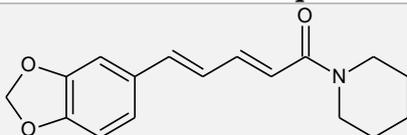
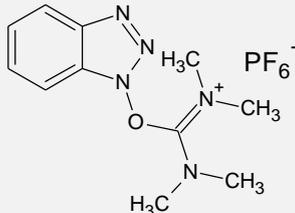
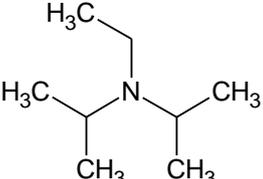
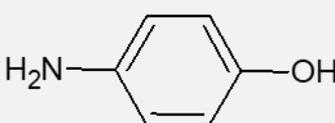
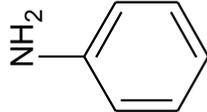
## II.7. Hémisynthèse des meilleurs analogues amides de l'acide pipérique (Analogues 08,09) :

- ❖ **Remarque :** La synthèse de l'analogue 10 n'a pas été réalisée en raison d'un défaut du réactif 4-nitroaniline. Ce travail a été mené au cours du mois de septembre 2024.

### II.7.1. Matériels :

- ✓ **Réactifs chimiques :**

**Tableau 12 :** Les réactifs nécessaires pour la synthèse d'analogues

| Noms des Réactifs  | Structure chimique  | N° de lot             | Fabricant         |
|--|---|-----------------------|-------------------|
| <b>Pipérine</b>  |   | Isolée du poivre noir | /                 |
| <b>Hydroxyde de potassium</b>  | KOH   | 19H214110             | VWR CHEMICAL S    |
| <b>Ethanol absolu</b>  | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH  | K48572883649          | Merck KGaA        |
| <b>Dichlorométhane</b>   | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | K53147550             | Merck KGaA        |
| <b>2-(1Hbenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate (HBTU)</b> |   | 10225744              | Thermo Scientific |
| <b>N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA)</b>   |  | 2109200919            | VWR CHEMICAL S    |
| <b>Hydroxyde de sodium</b>   | NaOH  | 243-ch017             | CHIM-OZA          |
| <b>Acide chlorhydrique</b>   | HCl   | SZBG2750H             | Honeywell         |
| <b>4 Aminophénol</b>   |  | 301310250-0118-011    | Biochem           |
| <b>Aniline</b>   |  | 22K024001             | VWR CHEMICAL S    |

- ✓ **Petit matériel de laboratoire :**

- Ballon de 500 ml
- Ballon de 250 ml
- Bain d'eau glacée

- Verre de montre
- Tige de verre
- Pipette graduée
- Pissette d'eau distillée
- Pince en bois
- Spatule
- Réfrigérant à air
- Réfrigérant
- Bécher
- ✓ **Appareillage**
- Agitateur magnétique (VELP Scientifica)
- Balance (RADWAG)
- Chauffe ballon (ELECTRITHERMAL)
- Pompe à vide (VACUMBRAND)
- Etuve (MEMMERT)
- Evaporateur rotatif (IKA)
- Machine de glace (SIMAG)

### II.7.2. Méthodes :

#### II.7.2.1. Obtention de l'acide pipérique : (10,80,163)

L'acide pipérique a été obtenu par hydrolyse en milieu basique.

Dans un ballon à fond rond on a introduit successivement :

- ❖ 7 g de pipérine.
- ❖ 40 mL de KOH éthylique. (5 gr de KOH dans 40 mL d'éthanol absolu) **(a)**

On l'a chauffé dans un système de chauffage à reflux pendant 5 heures sous agitation magnétique. **(b)**

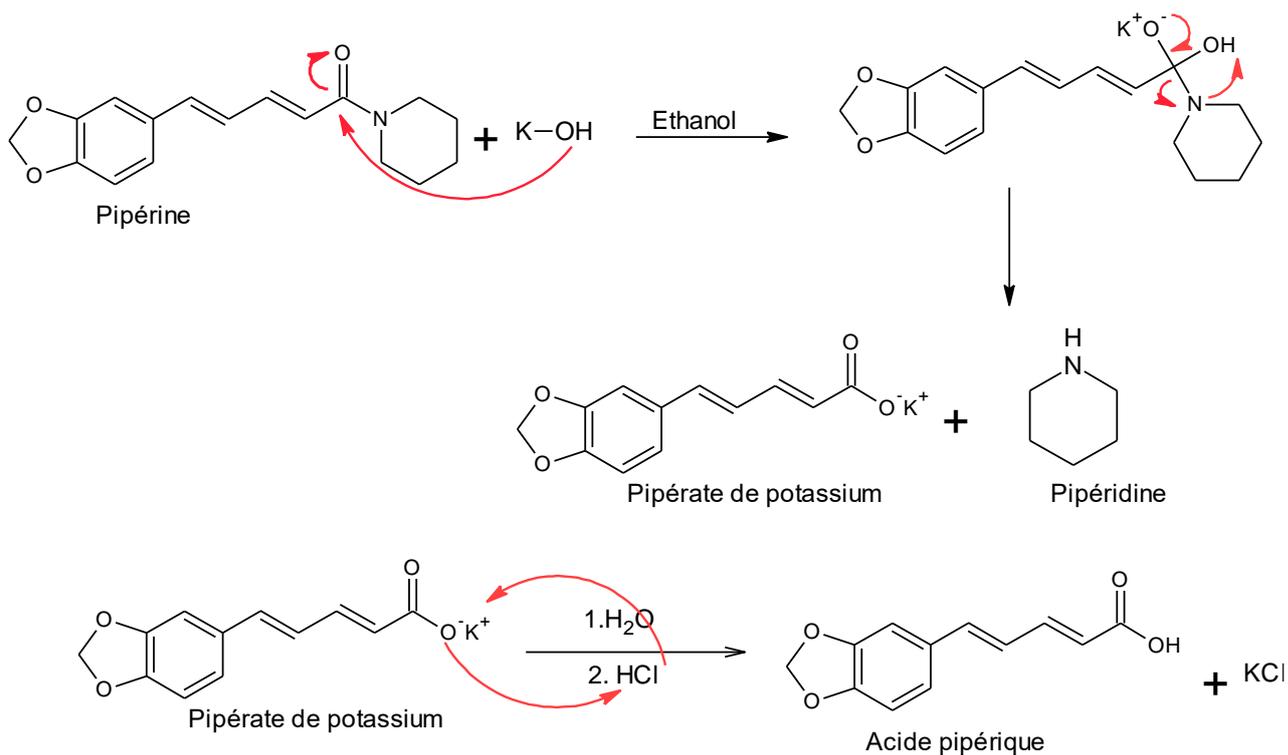
Le pipéiate de potassium obtenu après évaporation de l'éthanol et de pipéridine. Le précipité obtenu a été dissous dans de l'eau distillée. **(c)**

0,1 ml de HCl ont été ajoutés à la solution, jusqu'à l'apparition des cristaux d'acide pipérique. **(d)**

Ensuite, nous avons filtré les cristaux sur Büchner et les avons rincés avec le minimum d'eau distillée glacée. **(e)**

La recristallisation du produit a été réalisée dans l'éthanol. **(Voir annexe N°17)**

✓ Schéma réactionnel :



### II.7.2.2. Obtention des analogues amides de l'acide pipérique : (88,167)

Dans un ballon à fond rond ont a introduit successivement :

- ✓ 2,8 g d'acide pipérique
- ✓ 20 ml de dichlorométhane

On a agité le mélange à une température de  $0-5\text{ C}^0$ , (a) ensuite on a ajouté le 2-(1Hbenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate (HBTU) tout en maintenant l'agitation à  $0-5\text{ C}^0$  pendant 30 min. (b)

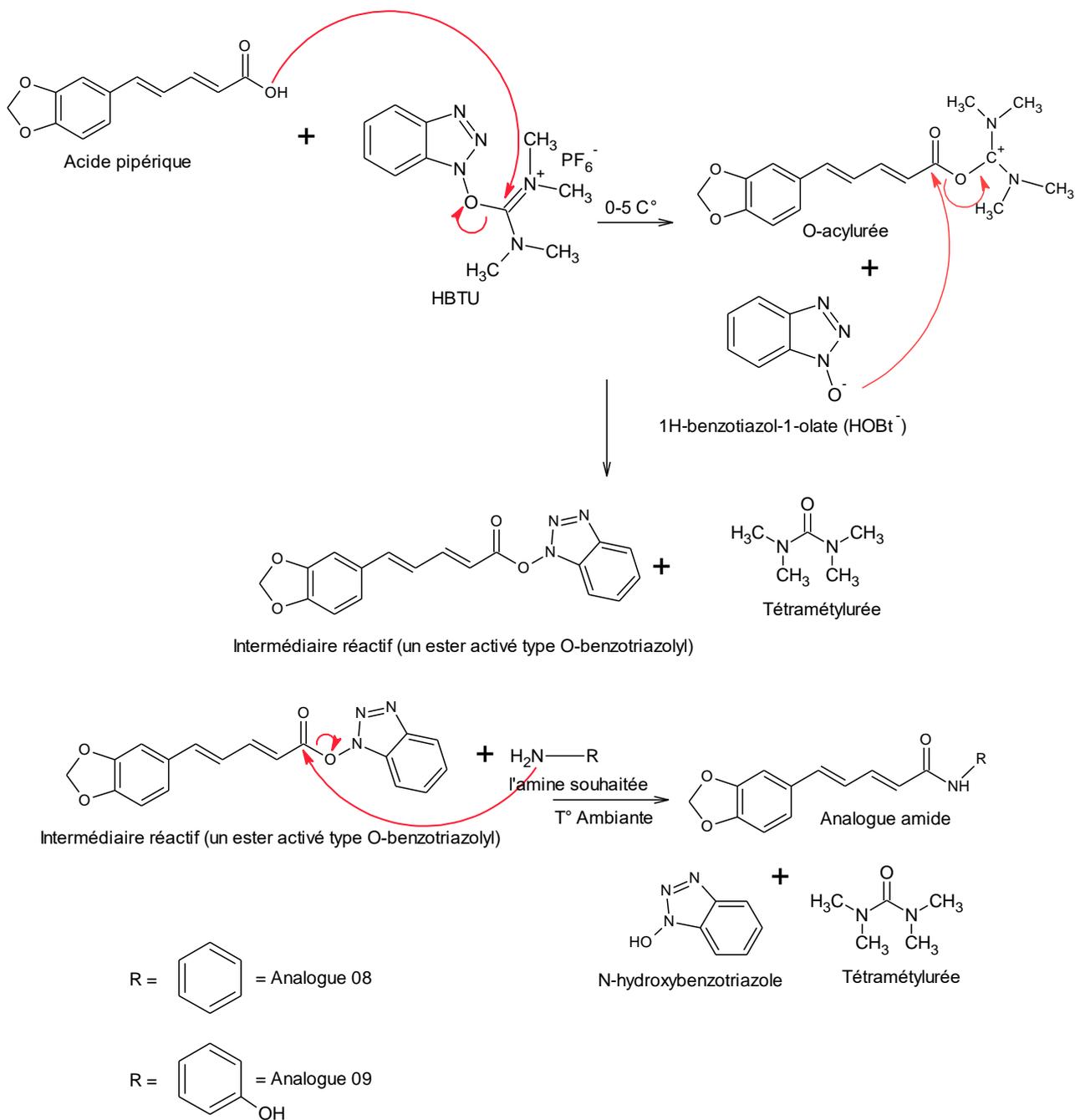
A ce mélange, 2,60 ml de N,N diisopropyléthylamine (DIPEA) et 2,5 g d'amine appropriée ont été ajoutés suivi d'une agitation à température ambiante pendant 6 h. (c)

A la fin de la réaction, le mélange brut a été lavé avec de l'HCl puis une solution de NaOH (d) et concentré (e) pour donner le produit brut. (f)

La purification a été réalisée par technique de recristallisation (eau/éthanol).

(Voir annexe N°18,19)

✓ Schéma réactionnel :



**II.8. Identification de l'acide pipérique et de ses analogues amides hémisynthétiques :**

Cette étape consiste à déterminer les propriétés organoleptiques et physico-chimiques de l'acide pipérique et de ses analogues amides synthétisés, ainsi que l'analyse spectrale par IR et RMN, réalisée au niveau du **laboratoire pharmaceutique Isopharm** et du **Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC)**. Ce travail a été mené au cours du **mois de septembre 2024**.

**II.8.1. Matériels :**

Le matériel utilisé pour le contrôle analytique est :

✓ **Petits matériels de laboratoire :**

- Pipette de 1000 $\mu$ l.
- Verre de montre.
- Tubes à essais.
- Balance.
- Fioles jaugées.
- Eprouvette.
- Bêchers.
- Spatules.
- Pissette.
- Entonnoir.

✓ **L'appareillage :**

- Le banc kofler.(Wagner Munz)
- La balance de précision.(RADWAG)
- Spectrophotomètre IR. (thermo-scientific Nicolet iS10 par ATR).
- Résonance magnétique nucléaire (BRUKER 400 MHz)

**II.8.2. Réactifs et produits :**

- L'acide pipérique synthétisé.
- Les amides synthétisés. (Analogue 08 et 09)
- DMSO<sub>6</sub>.

### II.8.3. Méthodes :

#### II.8.3.1. Les caractères organoleptiques :

Les caractères organoleptiques (couleur, odeur et saveur) ont été déterminés.

#### II.8.3.2. Le point de fusion :

La substance finement pulvérisée est desséchée pendant 24 heures.

Une quantité suffisante de la poudre desséchée est introduite sur la plaque chauffante du banc kofler et faite passée à l'aide de l'index du banc kofler jusqu'au passage à l'état liquide.

#### II.8.3.3. Spectrophotomètre UV :

Remarque : La méthode a été réalisée seulement pour l'acide pipérique synthétisé.

Dans une fiole de jauge de 10 ml, ont été introduits successivement :

- ✓ 11,6 mg de l'acide pipérique.
- ✓ 10 ml de méthanol

Pour obtenir une solution mère de **1,16 mg/mL**.

Deux dilutions ont été réalisées, La première a été de 1/10 et la deuxième de 1/2 pour obtenir une solution finale de 0,058 mg/ml.

Une lecture au spectrophotomètre a été réalisée dans l'intervalle (200nm-400nm), en utilisant le méthanol comme blanc.

Le spectre d'absorption a été tracé à l'aide du logiciel **Visionlite™**

#### II.8.3.4. Spectrophotomètre IR:

Type d'équipement : spectrophotomètre IR thermo-scientific Nicolet iS10 par ATR

Une lecture par spectroscopie dans l'IR des analogues a été réalisée.

Le principe de l'ATR est de faire subir au faisceau optique plusieurs réflexions à l'interface entre l'échantillon et un cristal parallélépipédique.

La technique ATR est idéale, elle consiste à déposer une quantité d'échantillon sur le cristal, le faisceau IR initial d'intensité I (source) traverse le cristal et subit une réflexion totale à l'interface cristal-échantillon puis est dirigé vers le détecteur.

La réflexion totale atténuée est communément appelée ATR (Attenuated Total Reflection).

#### II.8.3.5. Spectrophotomètre RMN :

- *Caractéristiques de l'équipement* :

Muni d'un électro-aimant supraconducteur de marque BRUKER (Figure 75) activement blindé de fréquence 400 MHz, piloté par une console de type AVANCE III HD correspondant

à un champ magnétique du 9.4 Tesla ainsi qu'un logiciel d'exploitation TOPSPIN 3.5 PL6. (Voir Annexe N°26)

Equipé d'un passeur d'échantillons de 24 positions et d'un système de liquéfaction d'azote BNL (Bruker Nitrogen Liquefier).

Doté de trois têtes de mesures (BBO liquides, CPMAS solides, HRMAS pâtes et gels), donnant ainsi la possibilité de réaliser des expériences RMN 1H, 13C, 15N, 31P, RMN 2D et autres.



**Figure 75 :** Résonance magnétique nucléaire (RMN).

- *Méthode de travail sur nos échantillons :*

En vue de confirmation de la structure chimique de l'intermédiaire (Acide pipérique) et des analogues synthétisés, les produits finis (Acide pipérique, Analogue08, Analogue 09) ont été analysés par Résonance Magnétique Nucléaire RMN au niveau de Centre de Recherche et Analyse Physico - Chimique CRAPC Bousmail-Tipaza.

Nous avons préparé les échantillons par dissolution d'environ 30 mg de produit synthétisés dans 300 ul de DMSO<sub>d6</sub>, les échantillons sont placés dans un portoir spécial dans l'appareil de RMN Bruker® 400,

Nos produits ont été examinés par la RMN H<sup>1</sup> et la RMN C<sup>13</sup>.

## **II.9. Evaluation *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des analogues amides de l'acide pipérique synthétisés :**

Comme pour la pipérine, une étude de l'activité anti-inflammatoire a été faite par la méthode de l'œdème de la patte chez la souris. (203)

Dans un second temps, l'étude de l'activité analgésique a été faite par le test de **RANDALL-SELITTO**, ou méthode de la pression de la queue chez la souris (204)

Ce travail a été mené dans la période allant de **Septembre 2024 au Octobre 2024**.

### **II.9.1. Matériels :**

#### **II.9.1.1. Matériel animal :**

L'étude a été réalisée sur des souris Swiss Albinos mâles, pesant entre 23g et 27g provenant de l'animalerie du campus Chihani Bachir Faubourg.

Conditions d'élevage : les souris sont réparties en groupes comportant 6 souris chacun dans des cages en polypropylène soumis à un cycle jour/nuit de 12 heures chacun (12 heures d'éclairage et 12 heures d'obscurité), maintenues à une température ambiante et à un taux d'humidité contrôlé. L'eau et l'aliment sont fournis à volonté.

#### **II.9.1.2. Produits testés :**

Les analogues 08,09 et l'acide pipérique ont été obtenus par une synthèse chimique réalisée au sein du laboratoire de Chimie Thérapeutique Faculté de Médecine de Constantine et du centre de recherche en science pharmaceutique.

#### **II.9.1.3. Réactifs chimiques et solutions :**

Plusieurs réactifs chimiques et solutions ont été utilisés dans l'expérience :

- Aspirine (Lot N<sup>o</sup> 248719 684, Laboratoire FLUKA)
- Tramadol
- Une solution de NaCl à 2 g/l.
- Du DMSO (Diméthylsulfoxyde).
- Une solution de carraghénine à 0.2% : préparée dans de l'eau distillée.
- Une solution de Tritton.
- Une solution d'aspirine à 15mg/ml : 10 ml de solution est préparée en solubilisant 150 mg d'aspirine dans un 1ml de DMSO, et en complétant à 10ml avec de l'eau distillée.
- La solution de l'analogue 08 : 10 ml de solution est préparée en solubilisant 95.2 mg de l'analogue 8 dans un 1ml de DMSO, et en complétant à 10ml avec de l'eau distillée, obtenant ainsi une solution à 9.52 mg/ml.

- La solution de l'analogue 9 : 10 ml de solution est préparée en solubilisant 98.8 mg de l'analogue 9 dans un 1ml de DMSO, et en complétant à 10ml avec de l'eau distillée, obtenant ainsi une solution à 9.88 mg/ml.
- La solution de l'acide pipérique : 10 ml de solution est préparée en solubilisant 96 mg d'acide pipérique dans un 1ml de DMSO, et en complétant à 10ml avec de l'eau distillée, obtenant ainsi une solution à 9.6 mg/ml.

### II.9.2. Méthodes :

#### *II.9.2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vivo par la méthode d'induction de l'œdème de la patte chez la souris :*

##### ✓ **Principe :**

Nous avons choisi comme protocole expérimental, un modèle d'inflammation aiguë, le test de l'œdème plantaire. Ce modèle consiste en l'induction d'un œdème localisé mesurable par le pléthysmomètre. L'agent phlogogène sélectionné est la carraghénine, qui est injectée dans la région sub-plantaire de la patte postérieure gauche de la souris. (7,203)

##### ✓ **Mode opératoire :**

Une demi-heure avant l'injection de 0.1 ml d'une solution de carraghénine à 0.2%, quatre lots de six souris chacun ont reçu par voie intra-péritonéale les différentes solutions.

- **Le lot contrôle négatif (Témoin négatif) :** chaque souris a reçu 0.5 ml d'une solution de DMSO à 10% dans de l'eau distillée.
- **Le lot test 1 (Analogue 8) :** chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution d'analogue 8 à une dose de 200 mg/kg.
- **Le lot test2 (Analogue 9) :** Chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution d'analogue 9 à une dose de 200 mg/kg
- **Le lot test3 (Acide pipérique) :** Chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution d'acide pipérique à une dose de 200 mg/kg
- **Le lot de contrôle positif (référence) :** chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution d'aspirine à une dose de 200 mg/kg.

Avant de procéder à la mesure des différents volumes, on procède à une étape très importante qui est la calibration du pléthysmomètre, cette dernière doit se faire régulièrement :

Avant de commencer il faut fixer la touche calibration sur le volume souhaité (1, 3 ou 5 ml), dans notre cas on a choisi le volume de 1ml.

On commence la calibration par remplir le réservoir de l'unité sentinelle, à partir du conteneur en ouvrant le petit robinet, jusqu'au trait de jauge par la solution de NaCl dosée à 2g/l et une goutte de triton (ou bien on verse directement la solution de calibration fournie avec l'appareil lorsqu'elle est disponible), on appuie ensuite sur le bouton check solution pour vérifier sa salinité qui doit être comprise entre 40 et 160.

Ensuite il faut mettre le volume de calibration de 1 ml (qui accompagne l'appareil) dans le réservoir. Après 15 minutes on appuie sur la pédale, l'écran affiche le zéro, on retire le volume et on le sèche bien à l'aide d'un papier propre et après on le remet dans le réservoir, l'écran doit afficher une valeur très proche de 1 pour dire que l'appareil est calibré.

#### ***II.9.2.2. Evaluation de l'activité analgésique périphérique (Test de la pression de la queue) :***

Il s'agit de la mesure de la tolérance de la douleur par analgésimètre.

##### **✓ Principe :**

Nous avons évalué la réponse comportementale des souris face à un stimulus mécanique douloureux, en utilisant un Analgésimètre à pince (rodent pincher-analgesia meter bioseb) appliqué sur leur queue. Une force mécanique graduelle est exercée sur la queue maintenue entre les mâchoires de la pince, jusqu'à ce que la souris manifeste une réaction comportementale (retrait de la queue, torsions, vocalisations, etc.). La pression tolérée par l'animal, mesurée en grammes, permet ainsi de déterminer son seuil de tolérance à la douleur.(205)

##### **✓ Mode opératoire :**

La souris est doucement introduite dans un dispositif de contention conique, puis la base de sa queue est pincée lentement, à environ 2 cm de son extrémité. Nous observons les signes de nociception qu'elle manifeste, tels que des grincements, des mouvements corporels pour libérer sa queue ou des vocalisations. Dès l'apparition de ces réactions, nous appuyons sur la pédale pour enregistrer la valeur obtenue, correspondant au seuil de tolérance à la douleur (seuil de nociception) de la souris. **(Voir Annexe N°13)**

Cinq lots de six souris ont été étudiés. Tous les produits sont administrés par voie intrapéritonéale à raison de 0,5 ml, et les mesures sont effectuées avant l'administration ainsi qu'à 30, 60 et 120 minutes après celle-ci.

- **Le lot contrôle négatif (Témoin négatif) :** chaque souris a reçu 0.5 ml d'une solution de DMSO à 10% dans de l'eau distillée.

- **Le lot test 1 (Analogue 8) :** chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution d'analogue 8 à une dose de 150 mg/kg.
- **Le lot test2 (Analogue 9) :** Chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution d'analogue 9 à une dose de 150 mg/kg
- **Le lot test3 (Acide pipérique) :** Chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution d'acide pipérique à une dose de 150 mg/kg
- **Le lot de contrôle positif (Tramadol) :** chaque souris a reçu 0.5 ml de la solution de tramadol à une dose de 30 mg/kg.

### **II.9.3. Remarque :**

L'appareillage et la méthodologie d'analyse des résultats sont détaillés dans la section dédiée à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique de la pipérine.

## II.10. Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des analogues amides de l'acide pipérique hémisynthétiques :

Une évaluation de l'activité antibactérienne des analogues 08 et 09 a été réalisée au **Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques (CRSP)** au cours du mois d'**octobre 2024**, sur des souches bactériennes Gram-positives et Gram-négatives.

### II.10.1. Matériels :

- **Appareillage :**

Le matériel et l'équipement utilisés pour évaluer l'activité antibactérienne des analogues 08 et 09 sont déjà décrits dans la section consacrée à l'évaluation de l'activité antibactérienne de la pipérine et de l'acide pipérique.

### II.10.2. Les microorganismes utilisés :

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été effectuée sur deux groupes des bactéries (Tableau 13) : bactérie Gram négatif à savoir *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et bactérie Gram positif : *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*.

**Tableau 13 :** Les souches bactériennes utilisées.

| <b>Bactérie</b>               | <b>Gram</b> | <b>Référence</b> |
|-------------------------------|-------------|------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Négatif     | ATCC 27853       |
| <i>Escherichia coli</i>       | Négatif     | ATCC 25922       |
| <i>Bacillus subtilis</i>      | Positif     | ATCC 6633        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | Positif     | ATCC 25923       |

### II.10.3. Milieux de culture :

- Gélose Mueller Hinton : milieu d'étude de la sensibilité des bactéries.

### II.10.4. Méthode de diffusion sur puits :

Le même protocole que celui appliqué pour l'acide pipérique et la pipérine a été utilisé, avec des concentrations testées de 1 mg/mL, 10 mg/mL et 50 mg/mL.

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, des puits d'environ 6 mm de diamètre ont été réalisés sur la gélose MH. Ces puits ont été remplis avec 50 µL des solutions d'échantillons et du témoin (DMSO). Chaque expérience a été répétée deux fois pour chaque espèce bactérienne et pour chaque analogue. Les boîtes de Pétri ont été laissées à température ambiante pendant 30 minutes, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures

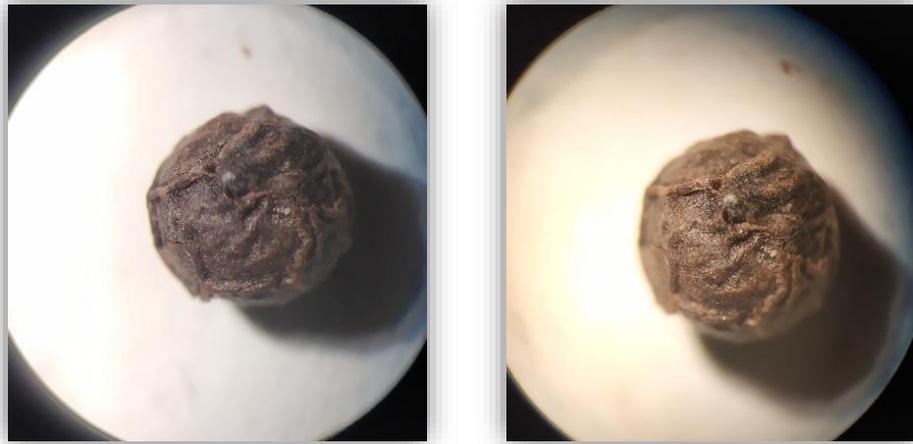
### III. RESULTATS ET DISCUSSION

#### III.1. Identification botanique des fruits du poivre noir :

##### III.1.1. Analyse macroscopique :

##### III.1.1.1. Test morphologique :

Les fruits sont de forme sphérique ou arrondie de 0,5 à 0,6 cm de diamètre, de couleur brunes ou noires foncées avec la présence de rides à sa surface. (Figure 76)



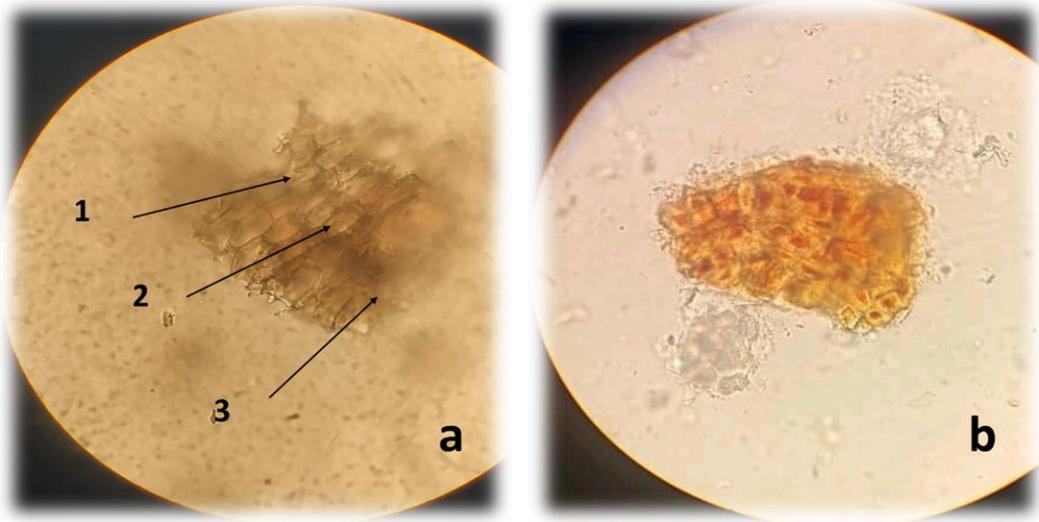
**Figure 76 :** L'aspect de fruit de poivre sous la loupe binoculaire.

##### III.1.1.2. Tests organoleptiques :

- ✓ **La couleur :** brune ou noire foncée.
- ✓ **La saveur :** brûlante, piquante et chaude.
- ✓ **L'odeur :** épicée et poussiéreuse

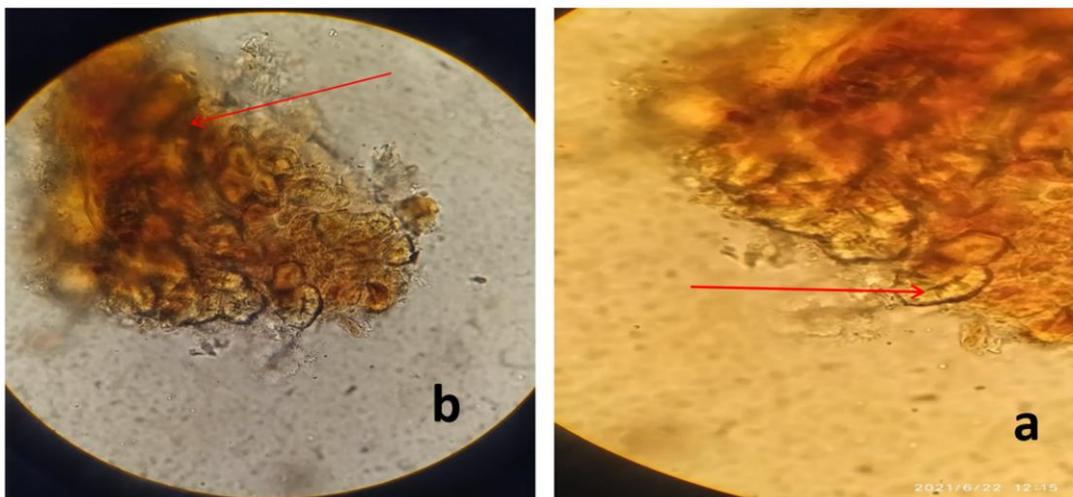
##### III.1.2. Analyse microscopique :

##### III.1.2.1. Montage de la poudre :



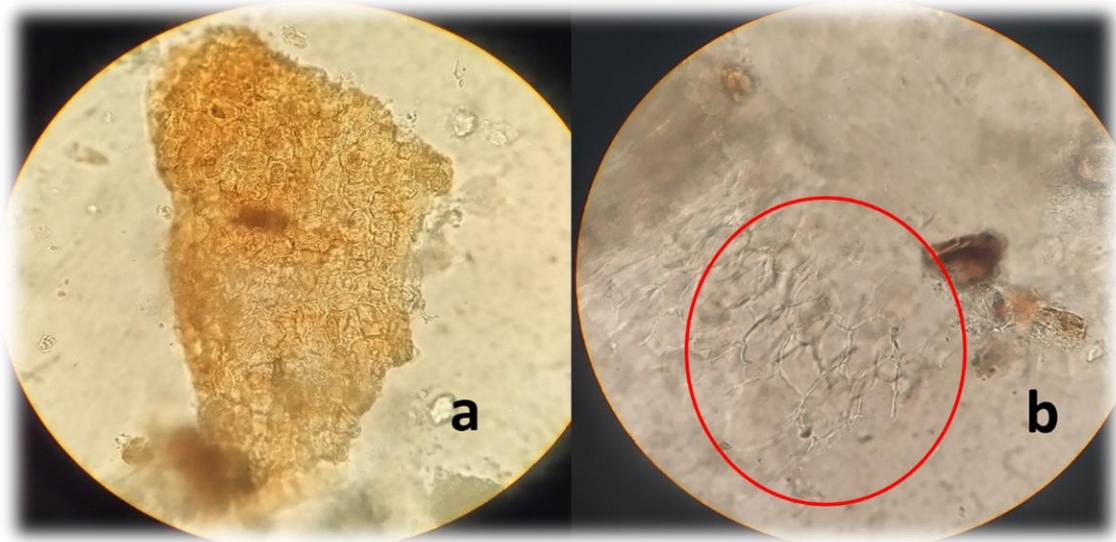
**Figure 77** : Fragment de mésocarpe, d'endocarpe et de tégument de la poudre des fruits du poivre noir observé au microscope optique (G x 10) x 40.

**a** : Fragment de : mésocarpe (1), endocarpe (2) et tégument (3) vu en section transversale, **b** : endocarpe vu de face.

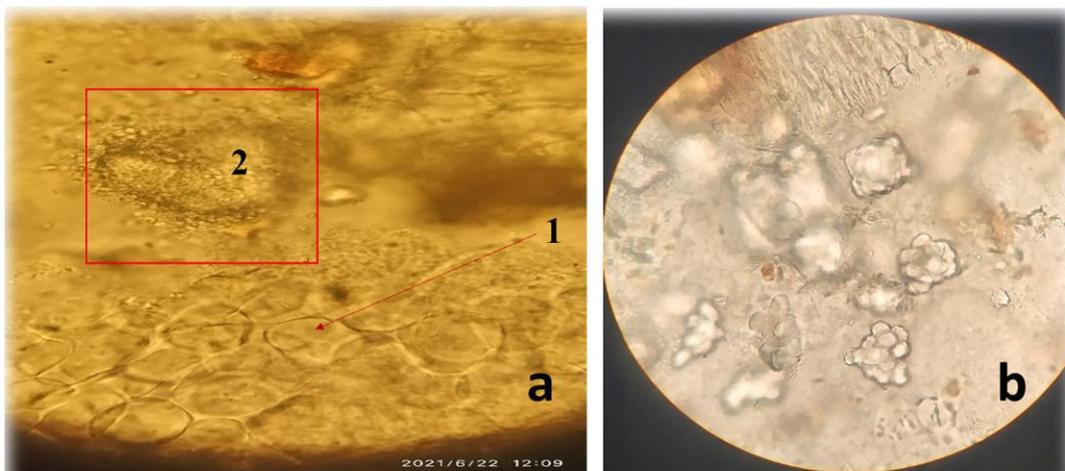


**Figure 78** : Cellules sclérifiées d'endocarpe avec cellules à pigment de la poudre des fruits du poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40.

**a**: Cellules sclérifiées d'endocarpe, **b**: cellules à pigment. (Vue de face)

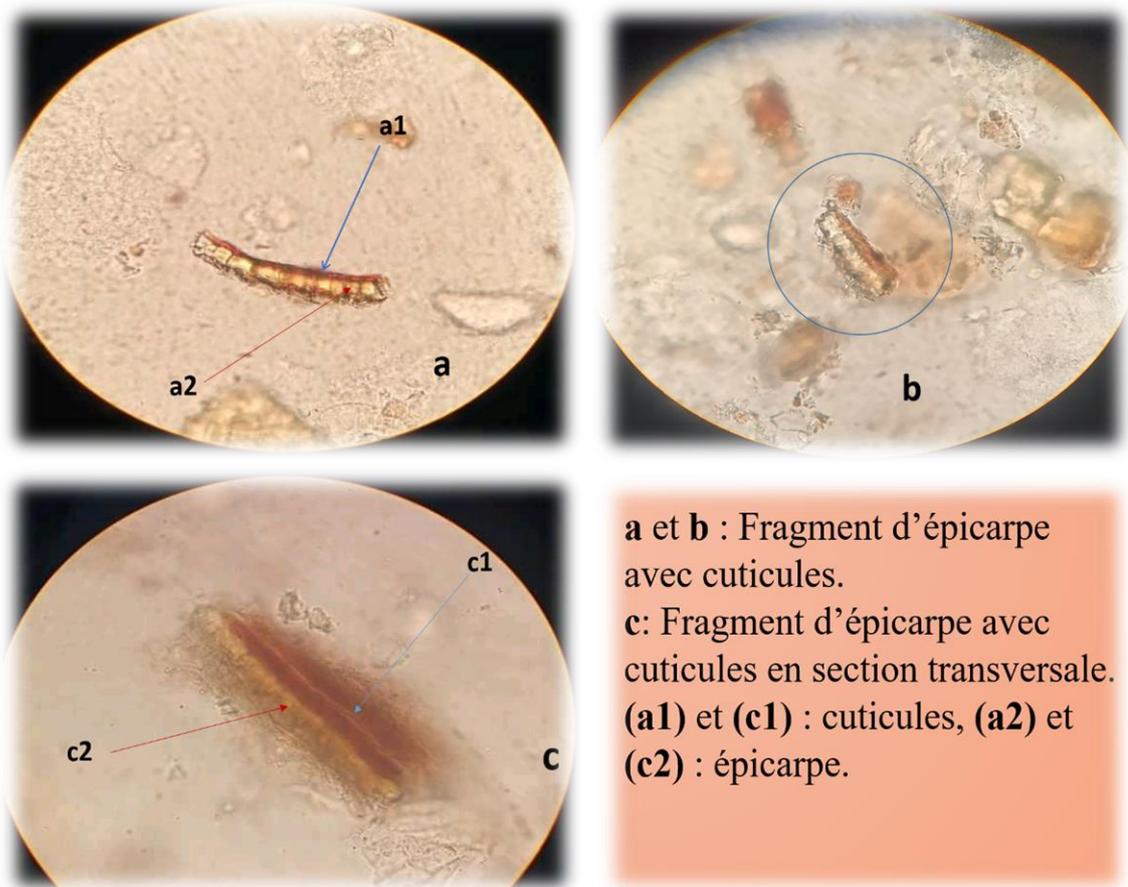


**Figure 79 :** Fragment parenchymateux d'endocarpe de la poudre des fruits du poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40.

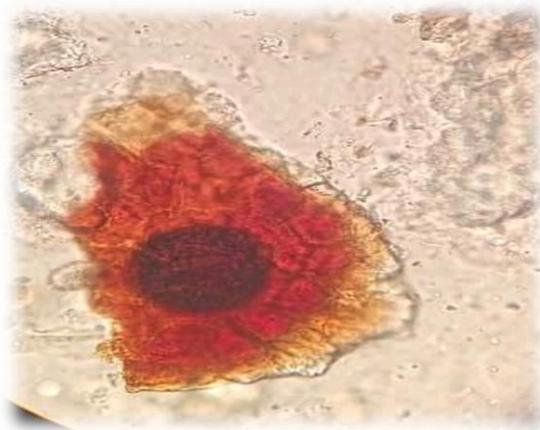


**a:** Cellules de réserves d'albumen avec des grains d'aleurone: cellules d'albumen (1) et grains d'aleurone (2)  
**b:** grains d'aleurone en amas isolées.

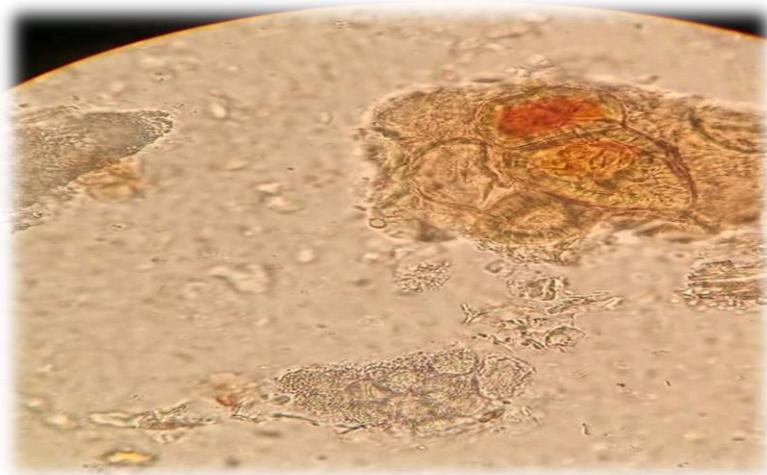
**Figure 80 :** Cellules de réserves d'albumen avec des grains d'aleurone de la poudre des fruits du poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40.



**Figure 81** : Fragment d'épicerpe avec cuticules de la poudre des fruits du poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40.

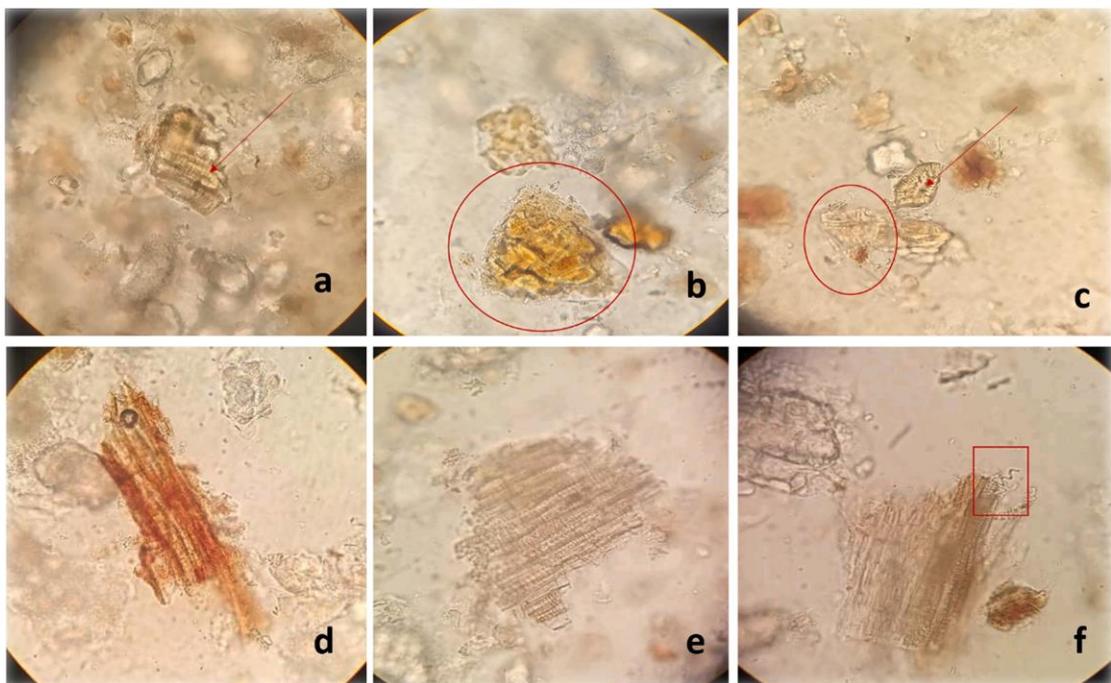


**Figure 82** : Canal sécréteur de la poudre des fruits du poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40.



**Figure 83 :** Cellules scléreuses avec cellules de réserve de la poudre des fruits du poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40.

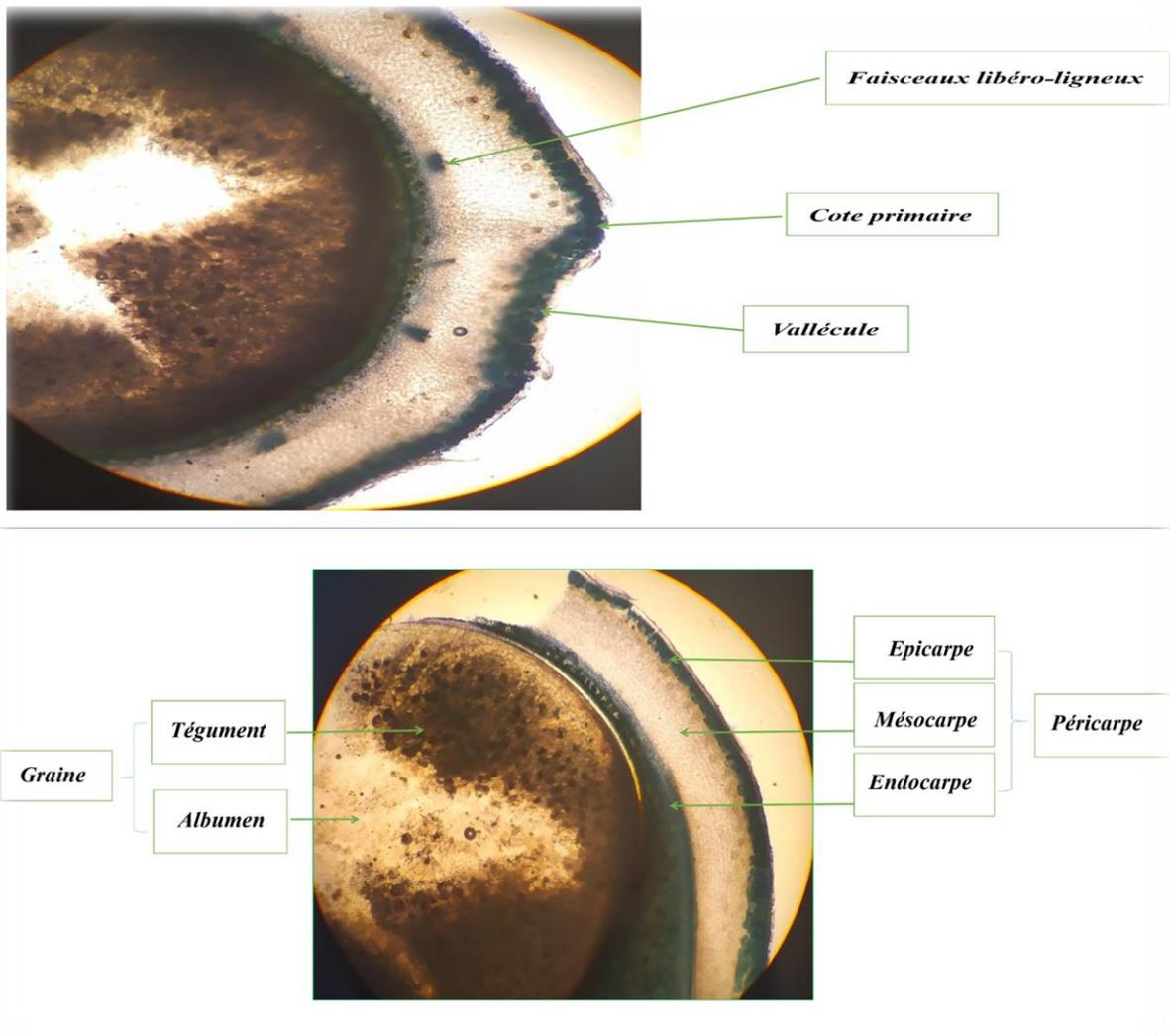
**a :** Cellules scléreuses de mésocarpe et d'endocarpe, **b:** cellules de réserve.



**Figure 84 :** Autres éléments de la poudre des fruits du poivre noir observés au microscope optique (G x 10) x 40.

**a :** Sclérite, **b:** Cellules scléreuses isolées, **c:** Cellules scléreuse avec Sclérite (sclérenchyme),  
**d :** Fragment de fibres sclérifiés, **e** et **f :** fragment de tissu vasculaire (**f** tissu spiralé)

III.1.2.2. Les coupes histologiques des fruits du poivre noir :



**Figure 85 :** Aspect microscopique des coupes transversales du fruit du poivre noir.

❖ *Discussion :*

L'ensemble des résultats des divers essais botaniques pratiqués sur les fruits du poivre noir concordent avec les données fournies par la littérature permettant de confirmer leurs caractères organoleptiques, morphologiques et microscopiques. Ces études permettent également de vérifier la pureté de notre drogue.

**III.2. Isolation de la pipérine à partir du poivre noir :**

**III.2.1. Le rendement d'extraction :**

Après la réalisation des 4 méthodes d'extraction de la pipérine à partir de la poudre de poivre noir, nous avons obtenu les valeurs de rendement en % indiquées dans le tableau suivant :

**Tableau 14 :** Rendement de la pipérine isolée du poivre noir en (%)

| Méthode d'extraction             | Chauffage à reflux | Acide acétique glacial | Soxhlet | Micro-onde |
|----------------------------------|--------------------|------------------------|---------|------------|
| Masse de poudre utilisée (g)     | 100 g              | 25 g                   | 92 g    | 100g       |
| Masse de la pipérine obtenue (g) | 3,1 g              | 0,1 g                  | 2,1 g   | 3,0g       |
| Rendement en %                   | 3,1 %              | 0,5 %                  | 2,2 %   | 3 %        |

**❖ Discussion :**

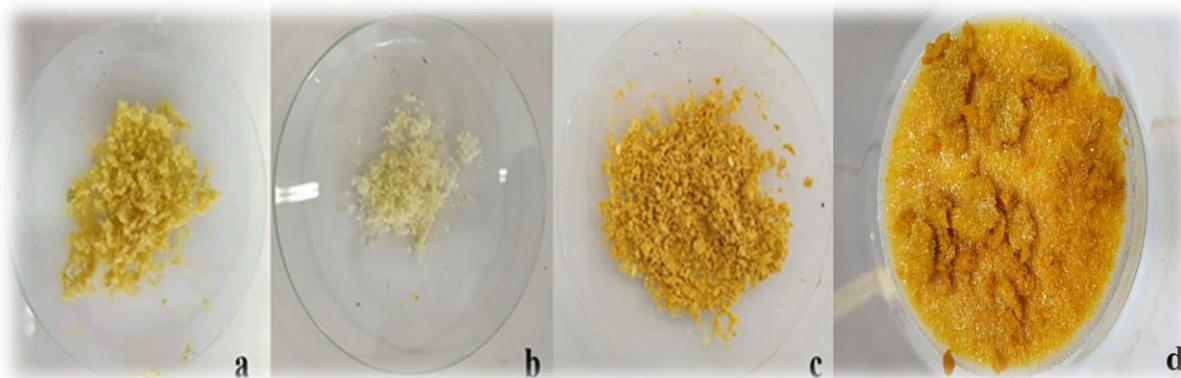
La pipérine a été isolée du poivre noir à l'aide de quatre méthodes différentes, soit le chauffage à reflux, soxhlet et l'acide acétique glacial, qui ont donné un rendement en pipérine de 3,1 %, 2,2 % et 0,4 % respectivement. On a découvert que la quantité de pipérine obtenue était plus importante dans l'extrait obtenu par la méthode de chauffage à reflux, mais que le produit final obtenu n'était pas de nature cristalline (figure N°86). Le produit obtenu par l'autre méthode d'extraction de la pipérine à l'aide d'acide acétique glacial a produit des cristaux de pipérine clairs en forme d'aiguille. Par conséquent, la méthode d'extraction à l'acide acétique glacial et de recristallisation à l'éther après lavage alcalin s'est avérée la plus efficace pour isoler la pipérine avec une plus grande pureté.

**III.3. Identification de la pipérine isolée :**

Une batterie de tests physicochimiques (Aspect, solubilité, point de fusion, test chimique) et spectrales (UV, IR, RMN) ont été réalisés pour identifier la pipérine isolée.

**III.3.1. L’aspect de la pipérine :**

La couleur de la pipérine varie du jaune pâle au jaune orangé, avec la présence ou l’absence de la forme cristalline. (Tableau 15)



**Figure 86 :** La forme de la pipérine isolée de chaque extraction.

**Tableau 15 :** Les caractères organoleptiques de la pipérine.

|                | <b>Chauffage à reflux<br/>(a)</b>   | <b>Acide acétique<br/>(b)</b> | <b>Soxhlet<br/>(c)</b>    | <b>Micro-onde<br/>(d)</b>           |
|----------------|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| <b>Couleur</b> | Jaune                               | Jaune claire                  | Jaune foncé vers l’orange | Jaune foncé                         |
| <b>Aspect</b>  | Aspect cristallin moins différencié | Cristaux en forme d’aiguille  | Pas de cristallisation    | Aspect cristallin moins différencié |

❖ **Discussion :**

Les résultats concordent avec les données fournies dans la partie théorique (voir la pharmacopée européenne 8ème édition). Elles prouvent que la pipérine obtenue par extraction par l’acide acétique a une meilleure qualité par rapport aux autres méthodes.

**III.3.2. Tests chimiques :**

Tous les tests chimiques pour les alcaloïdes ont été positifs. En effet, une couleur rouge sang a été obtenue avec le H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Aussi, un précipité brun rougeâtre a été obtenu avec le réactif de Dragendroff.

**III.3.3. Test de solubilité :**



**Figure 87 :** Test de solubilité de la pipérine.

**Tableau 16 :** Résultats du test de solubilité.

| Tube | Solvant       | Résultats          |
|------|---------------|--------------------|
| 01   | Eau distillée | Insoluble          |
| 02   | Ethanol       | Soluble            |
| 03   | Chloroforme   | Faiblement soluble |

❖ **Discussion :**

Tous les tests de solubilité pour la pipérine ont été conformes. (Figure 87)

**III.3.4. Point de fusion :**

Son point de fusion est de 129°C. Il est conforme aux normes décrites dans les données bibliographiques (129-131°C).(230) (Figure 88)

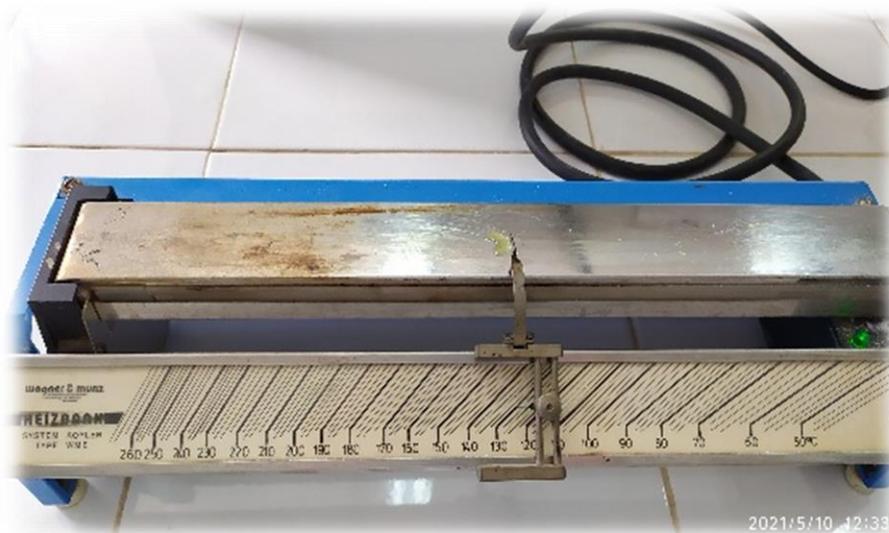


Figure 88 : Point de fusion de la pipérine isolée.

### III.3.5. Analyse au spectrophotomètre UV de la pipérine :

La pipérine isolée possède un maximum d'absorption à 344 nm dans l'UV, similaire à celui de la pipérine de référence. (Figure 89 et 90)

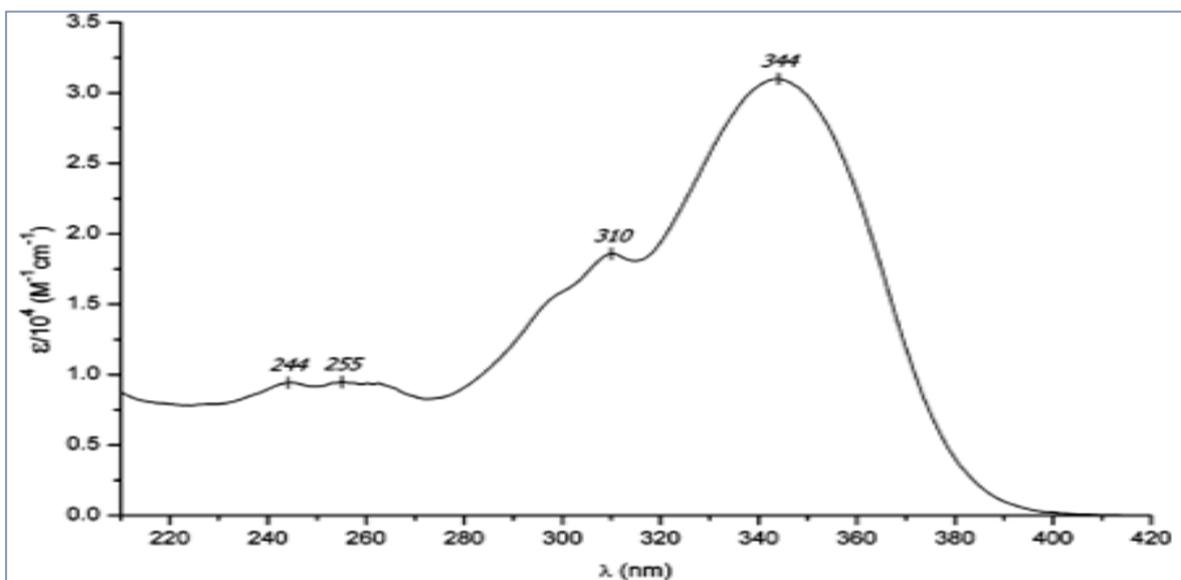
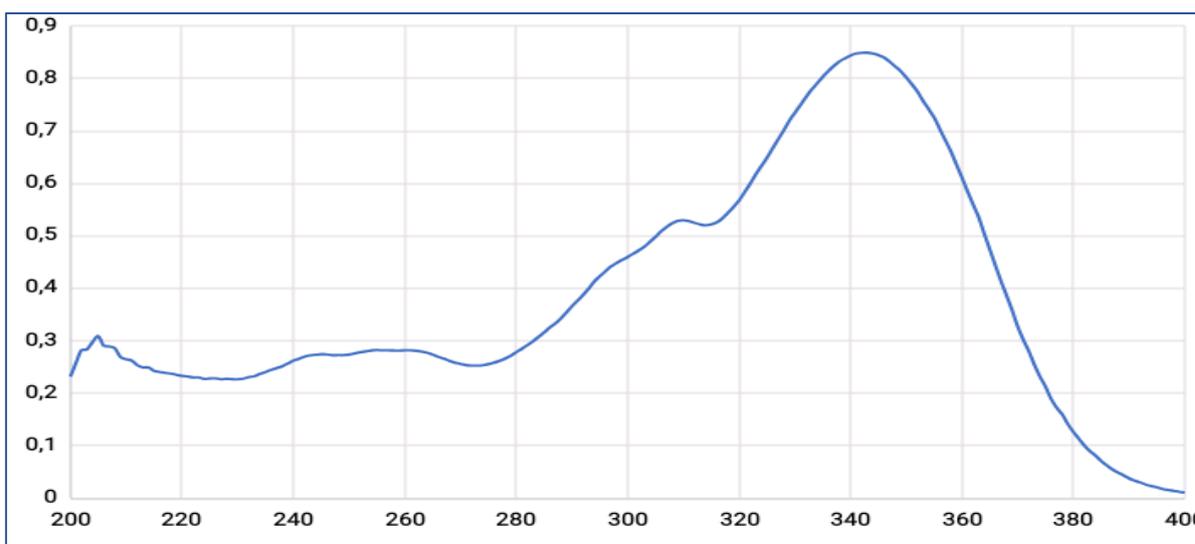


Figure 89 : Spectre UV d'absorption de la pipérine de référence.(83)



**Figure 90** : Le spectre UV d'absorption de la pipérine isolée.

❖ *Discussion* :

La valeur maximale d'absorption de la pipérine dans la théorie dans le méthanol est de 345 nm, elle présente également un pic à 310nm. Le  $\lambda_{max}$  de la pipérine isolée était de 344nm et cette pipérine isolée présentait également un pic à 310nm semblable aux spectres théoriques de la pipérine. (83)

**III.3.6. Analyse spectroscopique par IR :**

Le spectre obtenu est comparable à celui de la référence : (Figure 91 et 92)

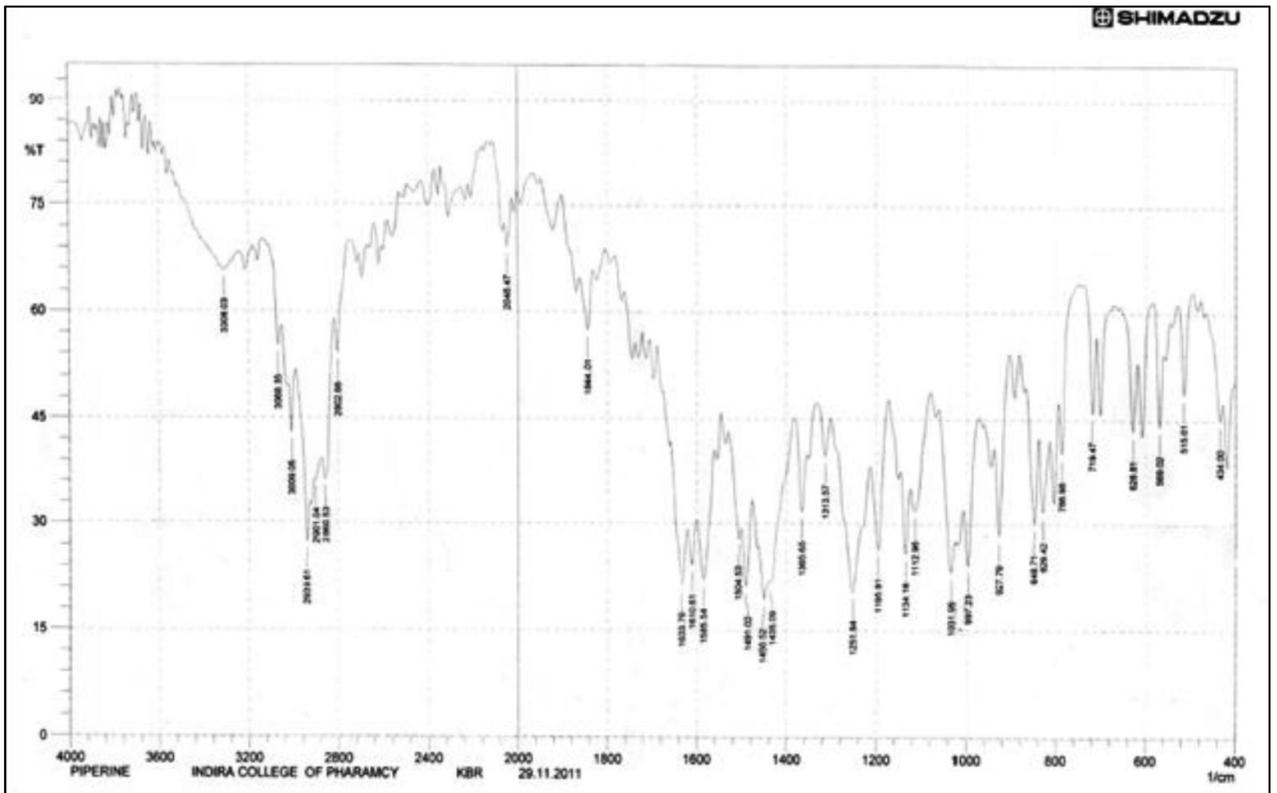


Figure 91 : Spectre IR de la pipérine de référence(83)

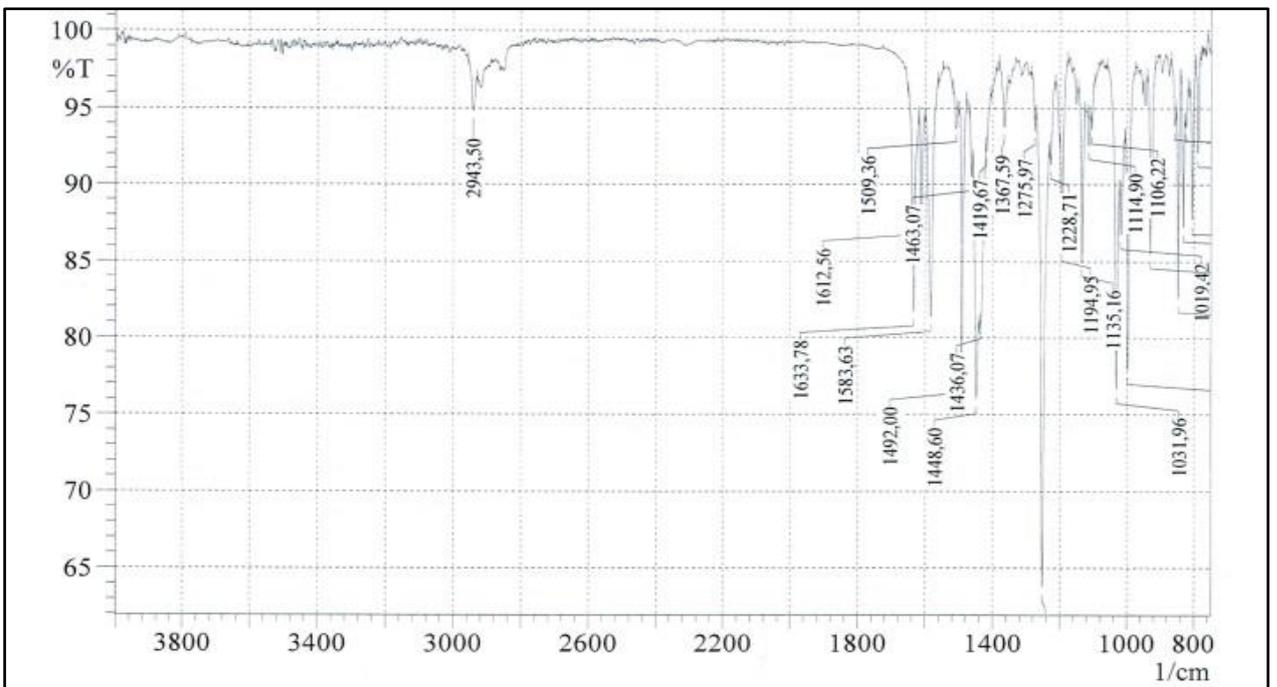


Figure 92 : Spectre IR de la pipérine isolée.

❖ *Discussion :*

Comme le montre le tableau ci-dessous, les pics de toutes les liaisons étaient présents dans les cristaux de la pipérine isolés, ils étaient situés à proximité des valeurs IR standard de chaque groupe fonctionnel.

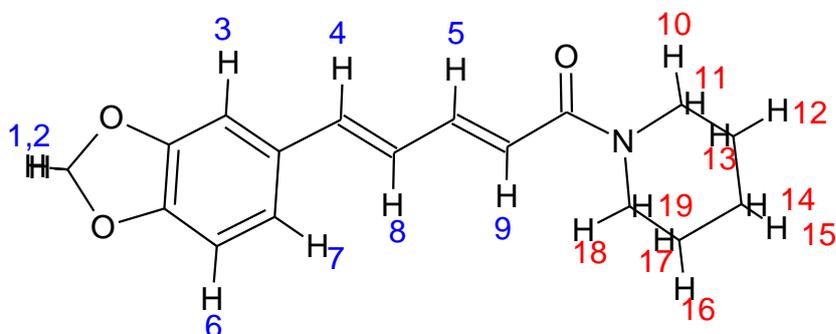
**Tableau 17 :** Etude comparative des bandes d'absorbance de la pipérine.

| Type de phénomène                            | Valeurs théoriques(83) | Valeurs obtenues |
|--|------------------------|------------------|
| <b>Étirement C-H aromatiques</b>             | 3000                   | 2943             |
| <b>C=C (diène) symétrique et asymétrique</b> | 1635                   | 1663             |
|  | 1608                   | 1612             |
| <b>C=C Aromatique (Benzène)</b>              | 1608                   | 1612             |
|  | 1580                   | 1583             |
|  | 1495                   | 1509             |
| <b>-CO-N (Amide)</b>                         | 1635                   | 1663             |
| <b>Flexion CH<sub>2</sub></b>                | 1450                   | 1448             |
| <b>=C-O-C asymétrique</b>                    | 1250                   | 1228             |
|  | 1190                   | 1194             |
| <b>Étirement symétrique =C-O-C</b>           | 1030                   | 1031             |
| <b>Étirement C-O</b>                         | 930                    | 929              |
| <b>flexion en plan du phényl C-H</b>         | 1132                   | 1135             |
| <b>Flexion C-H du trans -CH=CH-</b>          | 995                    | 990              |

Les deux spectres montrent des bandes significatives dans les mêmes régions, ce qui suggère qu'ils représentent bien la pipérine, la position des bandes principales reste cohérente entre les deux spectres, ces similitudes confirment que les deux spectres proviennent de la même substance.

**III.3.7. Analyse spectroscopique par RMN : (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-(piperidin-1-yl)penta-2,4-dien-1-one.**

**RMN H<sup>1</sup>** : Selon la structure de la pipérine, voici les types de protons que nous attendons de trouver dans ce composé :



- *Protons vinyliques* : Les protons des doubles liaisons conjuguées devraient se situer entre **6,0 et 8,0 ppm** en raison de la délocalisation électronique dans le système conjugué. La multiplicité dépendra du couplage avec les autres protons vinyliques.
- *Protons aromatiques du benzodioxole* : Les protons du noyau aromatique (benzodioxole) devraient apparaître dans la région **6,5 à 8,0 ppm**. Les protons du méthylène entre les deux atomes d'oxygène (-O-CH<sub>2</sub>-O-) apparaîtraient en **5,8 à 6,2 ppm** en raison du blindage causé par les atomes d'oxygène.
- *Protons de la pipéridine* : Les protons liés aux carbones adjacents à l'azote (protons alpha) apparaîtront dans la région **3,0 à 4,0 ppm**. Les autres protons dans la pipéridine devraient apparaître entre **1,0 et 3,0 ppm**.(202,231) (Figure 93)

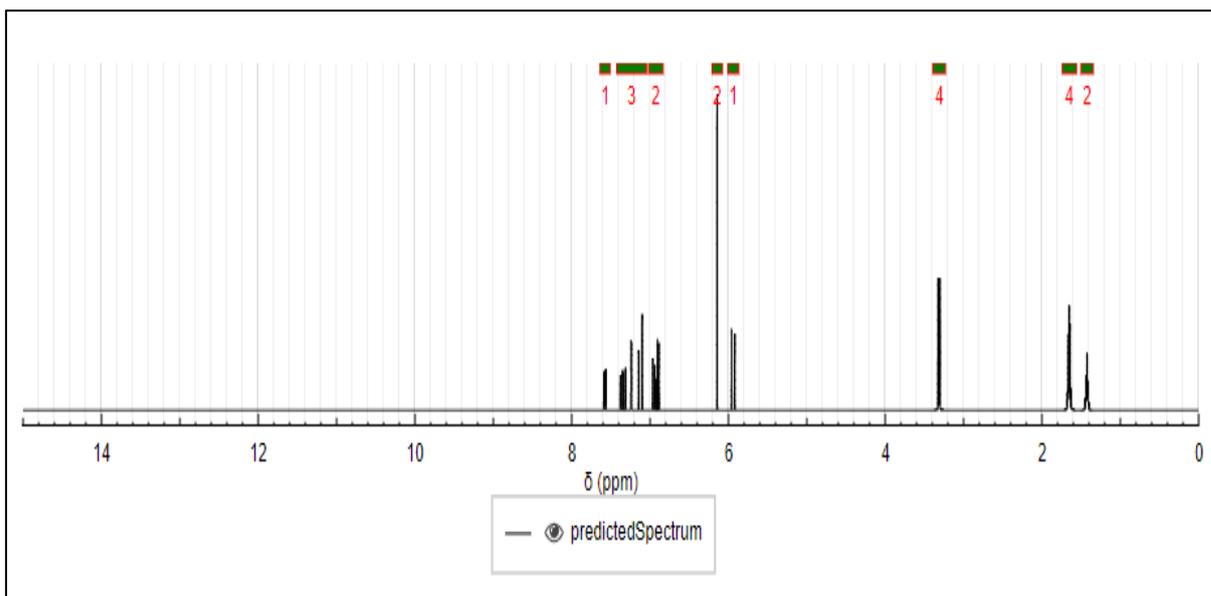


Figure 93 : Spectre RMN  $\text{H}^1$  théorique de la pipérine prédit par le serveur nmrdB.(232)

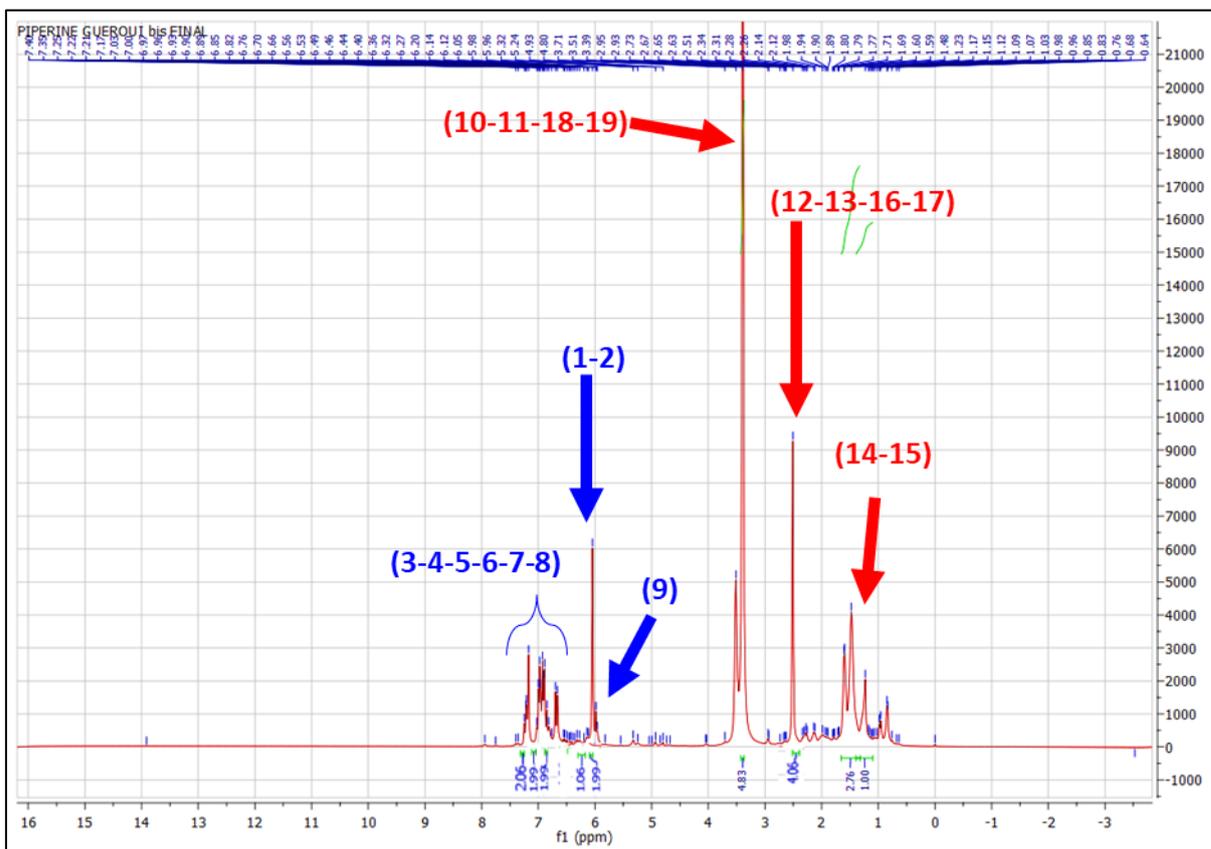


Figure 94 : Spectre RMN  $\text{H}^1$  de la pipérine isolée.

**Interprétation :**

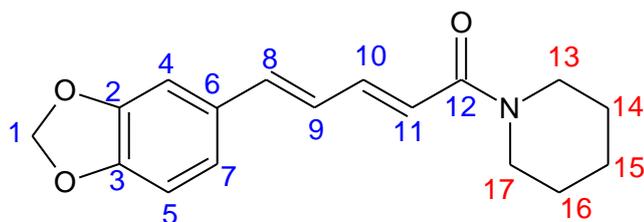
- *Protons aromatiques (7.9 - 7.2 ppm) :* Les protons du cycle benzodioxole sont bien détectés dans cette région. Leur multiplicité est complexe en raison des couplages entre les protons voisins du cycle aromatique.
- *Protons vinyliques (C=CH) (6.8 - 6.5 ppm) :* Les protons des doubles liaisons conjuguées du système penta-2,4-diène apparaissent dans cette région. Leur multiplicité est également en accord avec les attentes.
- *Protons du groupe O-CH<sub>2</sub>-O (vers le 6 ppm) :* Les protons du méthylène relié à l'oxygène dans le benzodioxole sont observés comme un singulet dans cette région, correspondant à deux protons équivalents.
- *Protons de la pipéridine : CH<sub>2</sub>-N (2.4 - 2.1 ppm) :* Le groupe méthylène adjacent à l'azote de la pipéridine est bien observé ici, comme un multiplet dû aux couplages avec les autres protons du cycle.
- *CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> (1.8 - 1.0 ppm) :* Les protons des autres méthylènes de la pipéridine sont également bien présents dans cette région, formant des multiplets. (Figure 94) (Tableau 18)

**Tableau 18 :** Analyse du spectre RMN H1 de la pipérine.

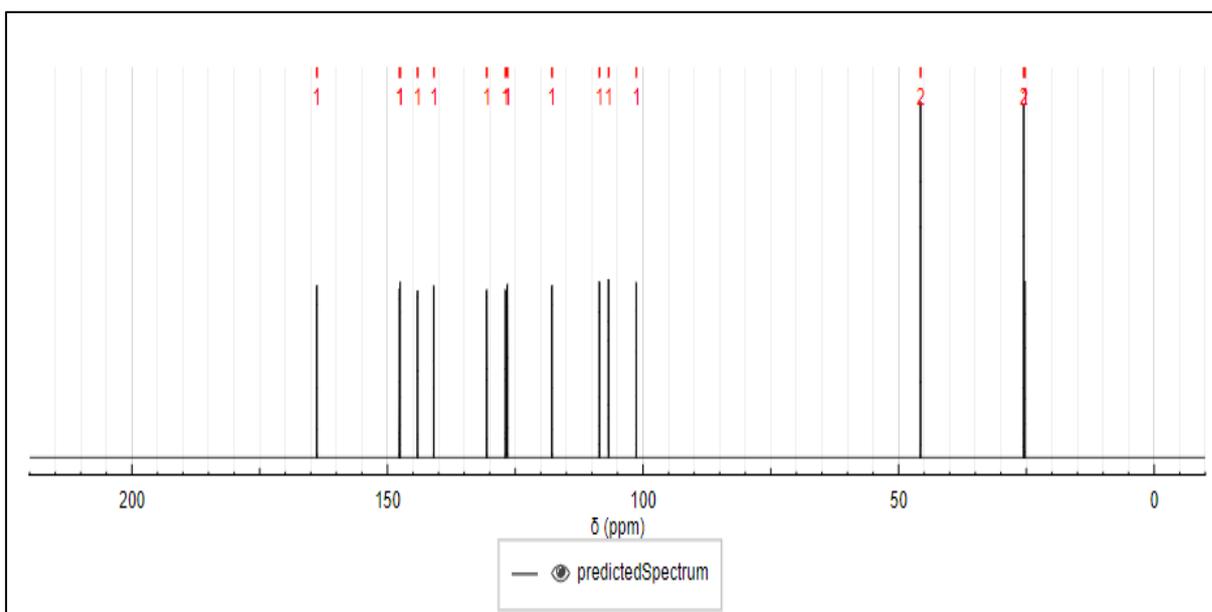
| Déplacement chimique (ppm) | Attribution  |
|----------------------------|--|
| 7.9 - 7.2 ppm              | Protons aromatiques du cycle benzodioxole                                      |
| 6.8 - 6.5 ppm              | Protons vinyliques (C=CH) du système conjugué                                  |
| 5.8 - 5.5 ppm              | Protons sur les doubles liaisons du penta-2,4-dienamide                        |
| 6.5 - 6.0 ppm              | Protons du groupe O-CH <sub>2</sub> -O dans le cycle benzodioxole              |
| 2.4 - 2.1 ppm              | Protons alpha à l'azote dans le cycle pipéridine (CH <sub>2</sub> -N)          |
| 1.8 - 1.0 ppm              | Protons des méthylènes du cycle pipéridine (CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> ) |

Le spectre RMN H1 expérimental est cohérent avec les déplacements chimiques attendus pour la molécule **(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-(piperidin-1-yl)penta-2,4-dien-1-one**. Les attributions des pics correspondant aux protons aromatiques, vinyliques, et aux groupes méthylènes du cycle pipéridine sont bien alignées avec la structure de la molécule.

**RMN C<sup>13</sup>** : Selon la structure de la pipérine, voici les types de carbones que nous attendons de trouver dans ce composé :



- *Carbones du noyau benzénique (aromatique)* : Les carbones du noyau aromatique résonnent typiquement dans la région de **115 à 140 ppm**. Pour la pipérine, les quatre carbones aromatiques distincts produiront des signaux dans cette région.
- *Carbones sp<sup>2</sup> des doubles liaisons conjuguées (C=C)* : Les carbones de la double liaison conjuguée avec le noyau aromatique résonneront dans la région **120 à 150 ppm**.
- *Carbones de la chaîne aliphatiques (C-C)* : Les carbones sp<sup>3</sup> (aliphatiques) de la chaîne de pipéridine résonnent généralement entre **20 et 50 ppm**, avec des variations dues à la proximité des hétéroatomes ou des doubles liaisons.
- *Carbones du groupement amide (C=O)* : Le carbone du carbonyle (C=O) du groupement amide résonne vers **165 à 175 ppm**.(202,231) (Figure 95)



**Figure 95** : Spectre RMN C<sup>13</sup> théorique de la pipérine prédit par le serveur nmrdB.(232)

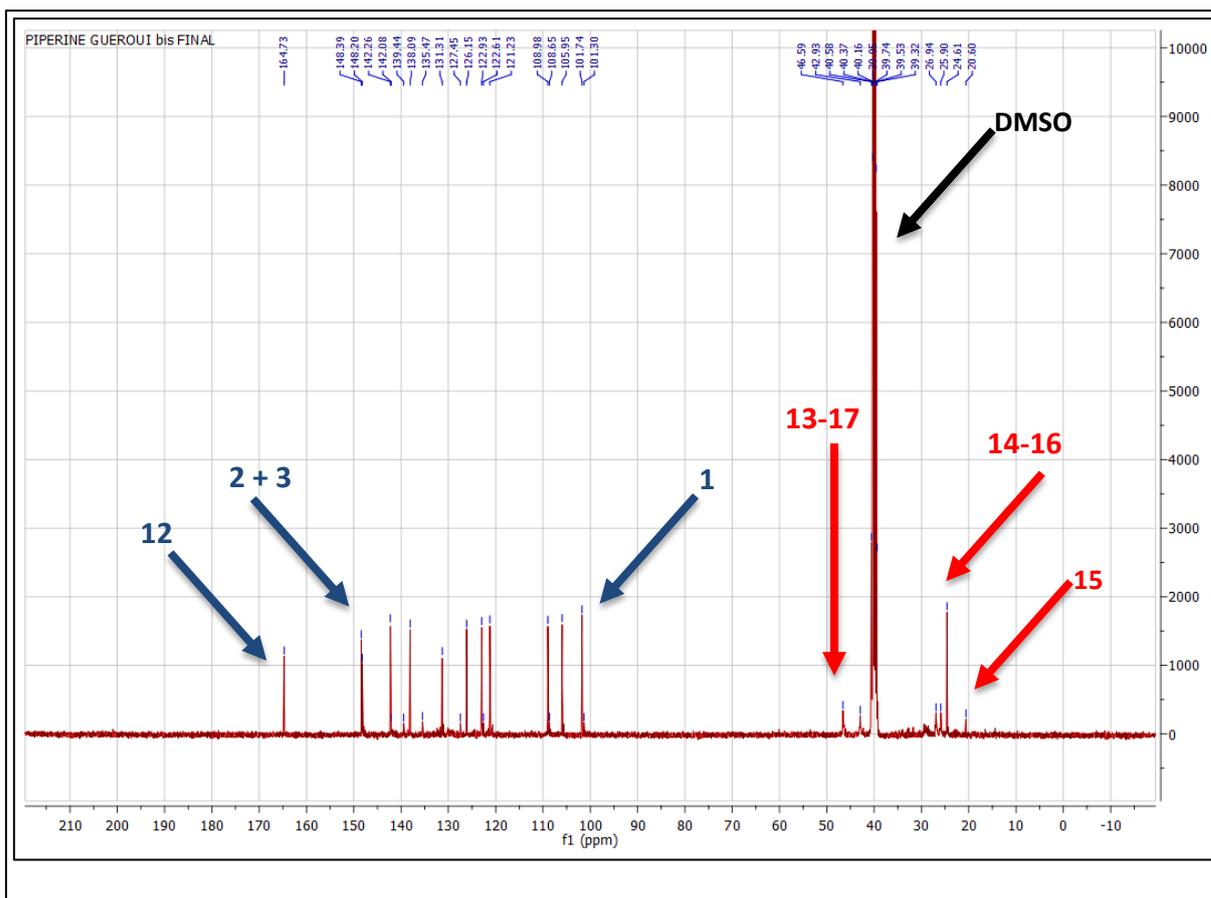


Figure 96 : Spectre RMN C<sup>13</sup> de la pipérine isolée.

### Interprétation :

Le spectre expérimental montre des pics similaires à celle du théorique :

**Entre 20 et 50 ppm** : Des pics correspondant aux carbones sp<sup>3</sup> de la pipéridine, avec un signal fort autour de **46 ppm**.

**Entre 100 et 150 ppm** : De nombreux pics correspondant aux carbones sp<sup>2</sup>, du système conjugué et du cycle aromatique, tout comme dans le spectre théorique.

**Vers 165 ppm** : Ce signal correspond bien au carbone carbonylé, en accord avec le spectre théorique.

**Vers 100 ppm** : Ce signal correspond bien au carbone du méthylène du groupe O-CH<sub>2</sub>-O.

**Vers 150 ppm** : Ce signal correspond bien aux deux carbone (2,3) du cycle benzodioxole.

### Concordance globale :

**Pipéridine (20-50 ppm)** : Les deux spectres montrent des pics dans cette région, attribuables aux carbones sp<sup>3</sup> du cycle pipéridinique. (Figure 96)

**Système conjugué et aromatique (100-150 ppm)** : Les pics nombreux dans cette région correspondent aux carbones sp<sup>2</sup>, aussi bien dans le spectre théorique qu'expérimental.

**Carbone carbonylé (~165-170 ppm)** : Ce pic est présent dans les deux spectres, correspondant au groupement cétone conjugué.

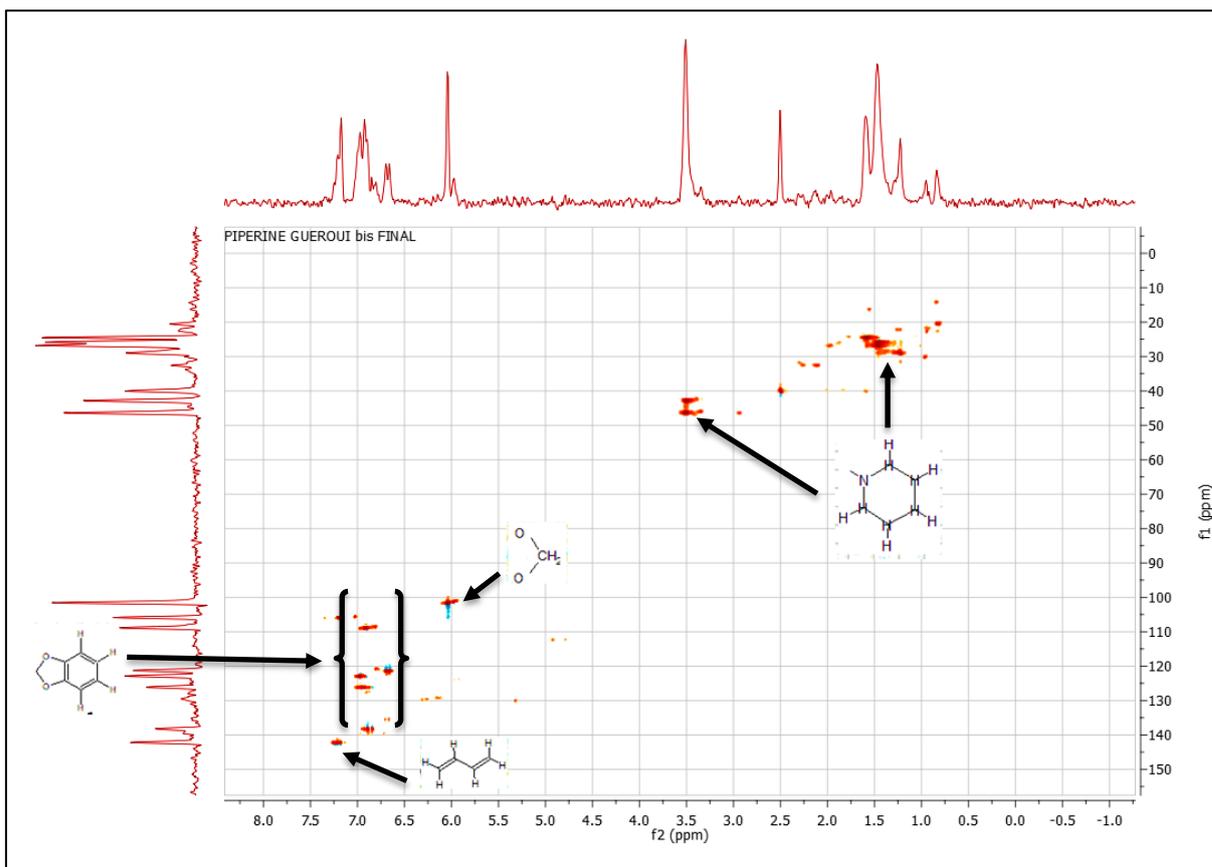
**Tableau 19** : comparaison des déplacements chimiques observés dans les spectres théorique et expérimental.

| Carbone   | Déplacement chimique théorique (ppm) | Déplacement chimique expérimental (ppm)  | Attribution   |
|---|--------------------------------------|--|---|
| <b>Cétone (C=O)</b>   | 165 – 170                            | 164.73   | Carbone carbonylé conjugué au système penta-2,4-diène   |
| <b>Carbones vinyliques (C=C) et Carbones aromatiques (sp<sup>2</sup>)</b> | 110 – 150                            | 122.28, 122.45, 127.12, 128.31, 138.97, 139.74, 108.98, 109.55, 121.74, 122.15, 122.83, 123.31 | Système conjugué, carbones vinyliques du penta-2,4-diène et le Cycle aromatique du benzodioxole |
| <b>Carbone méthylène (O-CH<sub>2</sub>-O)</b>                             | Vers 100                             | 101,74   | Méthylène du benzodioxole (O-CH <sub>2</sub> -O)  |
| <b>Carbones sp<sup>3</sup> de la pipéridine</b>                           | 25 – 40                              | 25.92, 26.92, 39.54, 40.16, 39.93  | Pipéridine, carbones sp <sup>3</sup>  |

Selon le tableau ci-dessus les résultats expérimentaux et théoriques sont en très bonne concordance. Les déplacements chimiques observés sont bien attribués aux différents types de carbones présents dans la molécule.

#### Les Corrélations proton H et carbone C :

L'analyse du spectre **HSQC** de la pipérine a permis de confirmer la connectivité directe entre les noyaux de carbone et d'hydrogène de la molécule, facilitant ainsi une caractérisation précise de sa structure. (Figure 97)



**Figure 97** : HSCQ de la pipérine isolée.

Les protons aromatiques (6-8 ppm) ont montré des corrélations avec les carbones du cycle benzodioxole (120-140 ppm), confirmant la présence du noyau aromatique. De plus, les protons vinyliques de la chaîne penta-2,4-diénamide ont été identifiés dans la région 5-6 ppm, avec des carbones associés entre 110 et 130 ppm, correspondant aux doubles liaisons de la structure. Le groupe méthylène (-OCH<sub>2</sub>-) du noyau benzodioxole a été identifié grâce à des signaux spécifiques dans la région 5-6 ppm pour les protons et 100-110 ppm pour les carbones.

Les protons aliphatiques de la pipéridine apparaissent dans la région de 1-4 ppm, avec des corrélations associées aux carbones saturés situés entre 10 et 40 ppm. Ces signaux sont caractéristiques des carbones sp<sup>3</sup> du cycle hexagonal, où chaque proton lié à un carbone est identifié.

**III.4. Evaluation *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire et analgésique de la pipérine isolée :**

**III.4.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire par induction de l'œdème de la patte chez la souris :**

L'œdème a été déterminé par une augmentation progressive du volume de la patte (Tableau 20) et caractérisé par un pourcentage d'augmentation qui est plus important chez le lot de contrôle négatif, et significativement diminué en présence de pipérine et d'aspirine (Figure 98).

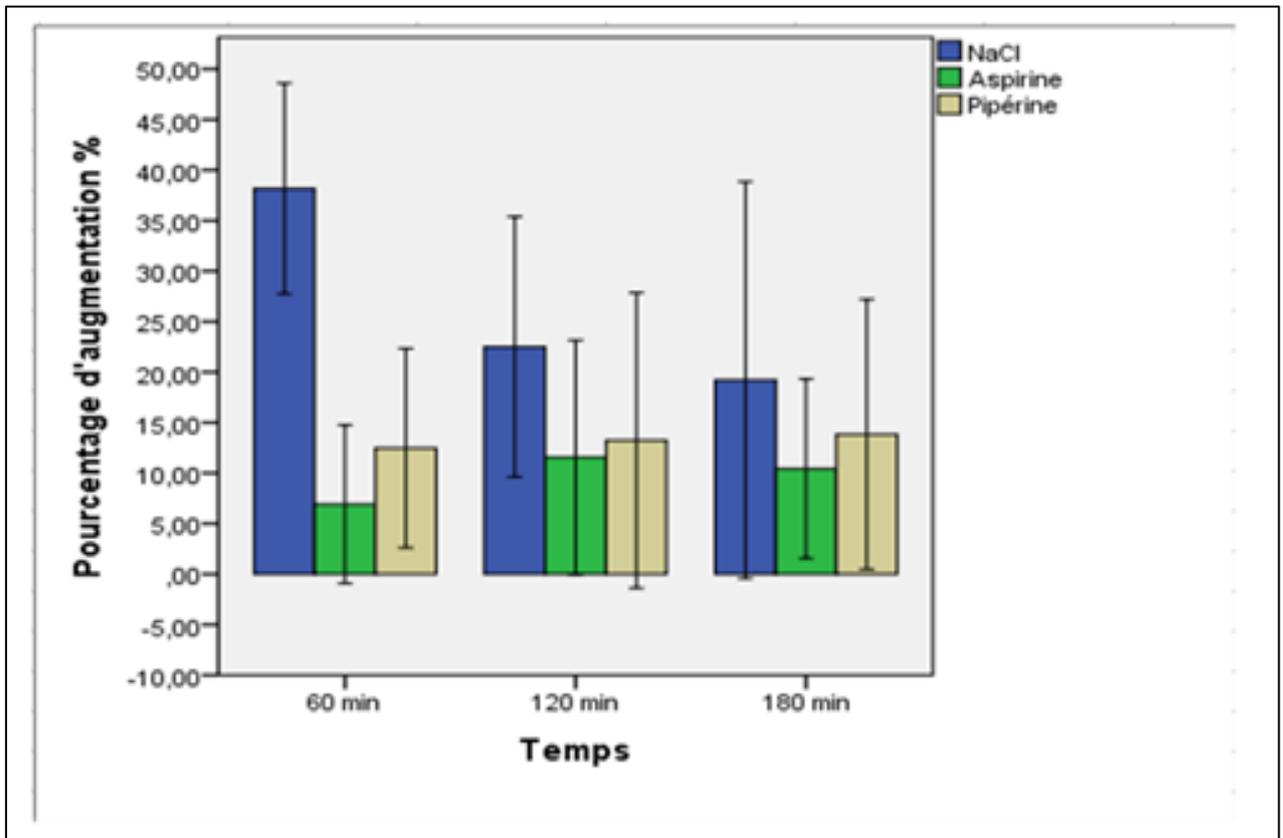
L'activité anti-inflammatoire des solutions testées a été évaluée par la détermination du pourcentage d'inhibition de l'œdème caractéristique de chaque substance testée (Figure 99).

**Tableau 20 :** Volume moyen de la patte postérieure gauche avant et après différents temps de l'injection de carragénine dans les trois lots.

| Lot               | Volume moyen de la patte postérieure gauche en ml |                                 |                 |                |
|-------------------|---|---------------------------------|-----------------|----------------|
|                   | Avant injection                                   | Après l'injection des solutions |                 |                |
|                   |   | 60 min                          | 120 min         | 180 min        |
| <b>Témoin (-)</b> | 0.1044±0.00648                                    | 0.140±0.00527                   | 0.122±0.00976   | 0.1156±0.00988 |
| <b>Référence</b>  | 0.1±0.00707*                                      | 0.1044±0.00689*                 | 0.1056±0.00503* | 0.1089±0.1006* |
| <b>Pipérine</b>   | 0.0889±0.00889*                                   | 0.0967±0.0085*                  | 0.0933±0.0085*  | 0.0956±0.0093* |

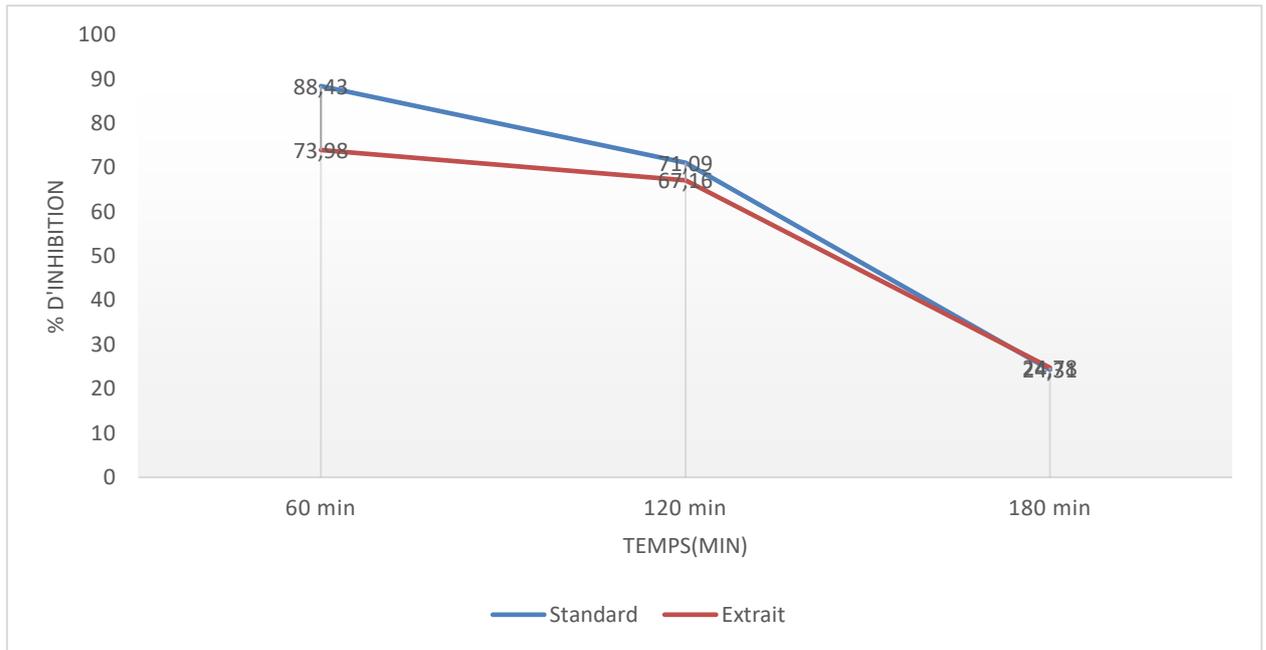
Les résultats sont exprimés en Moyenne ± SEM, n=9 dans chaque lot.

\* représente des différences significatives par rapport au témoin (p< 0,05)



Les résultats sont exprimés en Moyenne  $\pm$  écart type, n=9 dans chaque lot. La lettre alphabétique A, représente des différences significatives par rapport au témoin à  $p < 0,05$ .

**Figure 98 :** Pourcentages d'augmentation de l'œdème induit par la carragénine en fonction du temps dans les trois lots.



**Figure 99 :** Pourcentages d’inhibition de l’œdème par la pipérine (extrait) et l’aspirine (standard).

Après l’injection de carragénine chez le lot témoin, on observe un œdème caractérisé par un pourcentage d’augmentation de 38,17+/-10,41%. En présence de l’aspirine à 150mg/kg, on note une diminution importante dans la première heure 6,91+/-7.83%, cette diminution est significative par rapport au lot témoin.

L’administration de la pipérine, après une heure, a diminué le pourcentage d’augmentation jusqu’à 12,48+/-9,86%, mais sans différence significative par rapport au lot témoin dans les trois heures après l’injection de carragénine.

A partir de la figure 98, on a remarqué l’absence de différence significative dans le pourcentage d’augmentation entre le groupe testé et le groupe traité par la substance de référence durant les 3 heures.

Dans la figure 99, on observe le pourcentage d’inhibition de l’œdème par l’aspirine à 150mg/kg et par la pipérine à 50mg/kg, on n’a remarqué aucune différence significative entre le lot traité par l’aspirine et lot test.

❖ **Discussion :**

La mesure de l’œdème est un excellent outil pour la quantification de l’inflammation cutanée induite par les agents phlogogènes.

L’œdème podal est une méthode largement utilisée pour étudier le processus inflammatoire de la peau, ainsi qu’identifier les agents anti-inflammatoires qui pourraient être utiles dans la

recherche de composés anti-inflammatoires qui agissent à différents niveaux. Ce test nous a fourni des preuves que la pipérine a un effet anti-inflammatoire.

Les résultats de cette étude montrent que la pipérine réduit de manière significative le volume de l'œdème de la patte de souris induit par la carragénine, suggérant ainsi un effet anti-inflammatoire de cet alcaloïde. Dans nos conditions expérimentales, l'effet anti-inflammatoire de la pipérine est observé à une dose de 50 mg/kg dès la première heure, avec des pourcentages d'inhibition similaires à ceux de la solution de référence (aspirine à 150 mg/kg).

Ces résultats concordent avec ceux de deux autres études :

- Etude de Jeffrey Raj et al., 2020 : Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation par la pipérine, par rapport aux témoins, a montré des résultats significatifs : 56 % dans le modèle d'œdème de la patte induit par la carragénine, et 40 % dans le modèle d'arthrite induite par le formol.
- Etude de Farhana Tasleem et al, 2014 : La pipérine a montré une inhibition de l'œdème à toutes les doses de 5, 10 et 15 mg/kg par rapport au contrôle, mais avec une activité moindre par rapport au standard. Le composé a montré une activité maximale à une dose de 15 mg/kg après 120 minutes, mais toujours inférieure au standard.

**III.4.2. Evaluation de l'activité analgésique (Test de la pression de la queue) :**

Le **tableau 21** représente l'effet de la pipérine testée sur la valeur du seuil de nociception.

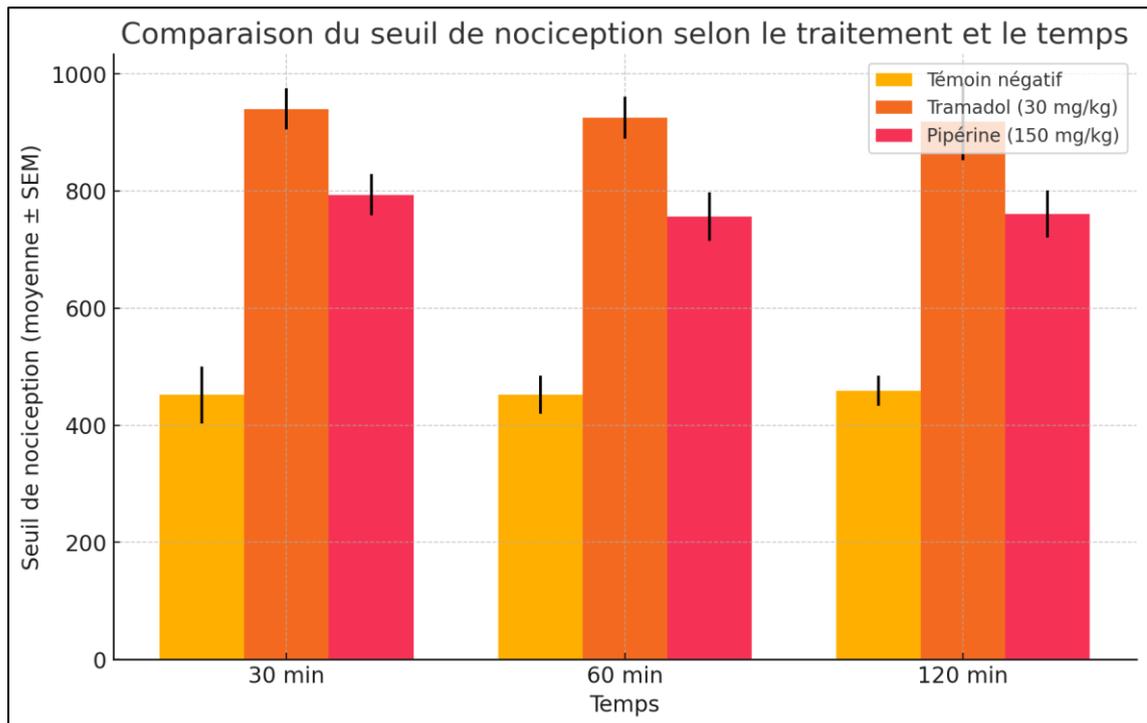
Il a été révélé que l'effet analgésique de la pipérine ainsi que ceux du tramadol étaient significatifs à 30 min, 60 min et 120 min par rapport au témoin négatif.

**Tableau 21** : Seuils de nociception des souris des différents lots par la méthode de la pression de la queue.

| La moyenne de la valeur du seuil de nociception |                   |                   |                  |
|---|-------------------|-------------------|------------------|
| Traitement                                      | 30min             | 60min             | 120min           |
| Témoin négatif                                  | 451,6667±48,6894  | 451,6667±32,2407  | 458,8333±26,1412 |
| Tramadol (30mg/kg)                              | 940,1667±35,2840* | 924,8333±35,8073* | 918,5±65,7075*   |
| Pipérine (150mg/kg)                             | 793,29±35,179*    | 756,14±41,515*    | 760,71±40,045*   |

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. n=6 dans chaque lot. \*représente des différences significatives par rapport au témoin

✓ Analyse des résultats :



✓ **Figure 100** : Evolution du seuil de nociception en fonction du temps.

**Témoin négatif** : Les valeurs moyennes du seuil de nociception pour le groupe témoin négatif sont relativement constantes, variant légèrement de  $451,67 \pm 48,69$  à  $458,83 \pm 26,14$ . Cela suggère une absence d'effet analgésique notable.

**Tramadol (30 mg/kg)** : Le tramadol est utilisé ici comme contrôle positif en raison de son efficacité analgésique bien connue. Les valeurs de nociception augmentent significativement par rapport au témoin négatif, avec des moyennes allant de  $940,17 \pm 35,28$  à  $918,5 \pm 65,71$ , indiquant une forte action analgésique dès 30 minutes après l'administration, qui persiste jusqu'à 120 minutes.

**Pipérine (150 mg/kg)** : La pipérine montre également une augmentation significative du seuil de nociception par rapport au témoin négatif, avec des valeurs moyennes allant de  $793,29 \pm 35,18$  à  $760,71 \pm 40,05$ . Les valeurs indiquent une activité analgésique significative. Cela suggère que la pipérine possède des propriétés analgésiques notables.

### ✓ Discussion :

Une réduction significative de la sensibilité de l'animal à la douleur induite par la pression a démontré l'effet protecteur périphérique de la pipérine, comparable à celui du tramadol. Les résultats de cette étude renforcent l'hypothèse selon laquelle la pipérine agit sur des récepteurs spécifiques liés à la douleur, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du seuil de nociception observée.

Ces résultats concordent avec plusieurs autres études qui ont également montré les effets analgésiques de la pipérine :

- Étude de Jeffrey Raj et al., 2020 : La pipérine a montré un effet analgésique significatif de 40 à 55 % dans la méthode de la " pression de la queue ", de 58 % dans la méthode de la plaque chaude, et de 54 % dans le modèle de contorsions induites par l'acide acétique, par rapport aux contrôles négatifs.
- Étude de A. Bukhari et al., 2013 : L'administration intrapéritonéale (i.p.) de pipérine (30, 50 et 70 mg/kg) a significativement réduit ( $P < 0,01$ ) les contorsions induites par l'acide acétique chez la souris, un effet similaire à celui de l'indométacine (20 mg/kg, i.p.). Dans le test de la pression de la queue, la pipérine (30 et 50 mg/kg, i.p.) ainsi que la morphine (5 mg/kg, i.p.) ont entraîné une augmentation significative ( $P < 0,01$ ) du temps de réaction des souris. Par ailleurs, le prétraitement des animaux avec de la naloxone (5 mg/kg, i.p.) a inversé les effets analgésiques de la pipérine et de la morphine dans le test de la pression de la queue.

**III.5. Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de la pipérine isolée et de l'acide pipérique hémisynthétique :**

L'évaluation de l'activité antibactérienne de la pipérine et l'acide pipérique qui a été réalisée dans un premier temps au niveau du Centre de Recherche des Sciences Pharmaceutique (CRSP) Constantine.

Deux méthodes ont été utilisées sur quatre types de bactéries : *Staphylococcus aureus* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*.

Le pouvoir antibactérien a été déterminé en mesurant les diamètres des zones d'inhibition après 24h d'incubation à 37 C°.

**III.5.1. Méthode de diffusion sur disque :**

**III.5.1.1. Essai 01 :**

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 22 :** Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion sur disque.

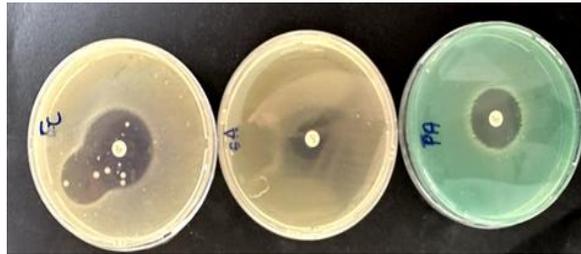
|                               | Diamètre d'inhibition (mm) |                               |          |     |   |                 |     |   |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------|-----|---|-----------------|-----|---|
|                               | Témoin négatif (DMSO)      | Témoin positif (amoxicilline) | Piperine |     |   | Acide pipérique |     |   |
|                               |                            |                               | 0.25     | 0.5 | 1 | 0.25            | 0.5 | 1 |
| <i>Bacillus subtilis</i>      | -                          | 12.52                         | -        | -   | - | -               | -   | - |
| <i>Escherichia coli</i>       | -                          | 27.63                         | -        | -   | - | -               | -   | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -                          | 7.88                          | -        | -   | - | -               | -   | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | -                          | 16.62                         | -        | -   | - | -               | -   | - |

(-) : absence de l'activité antibactérienne

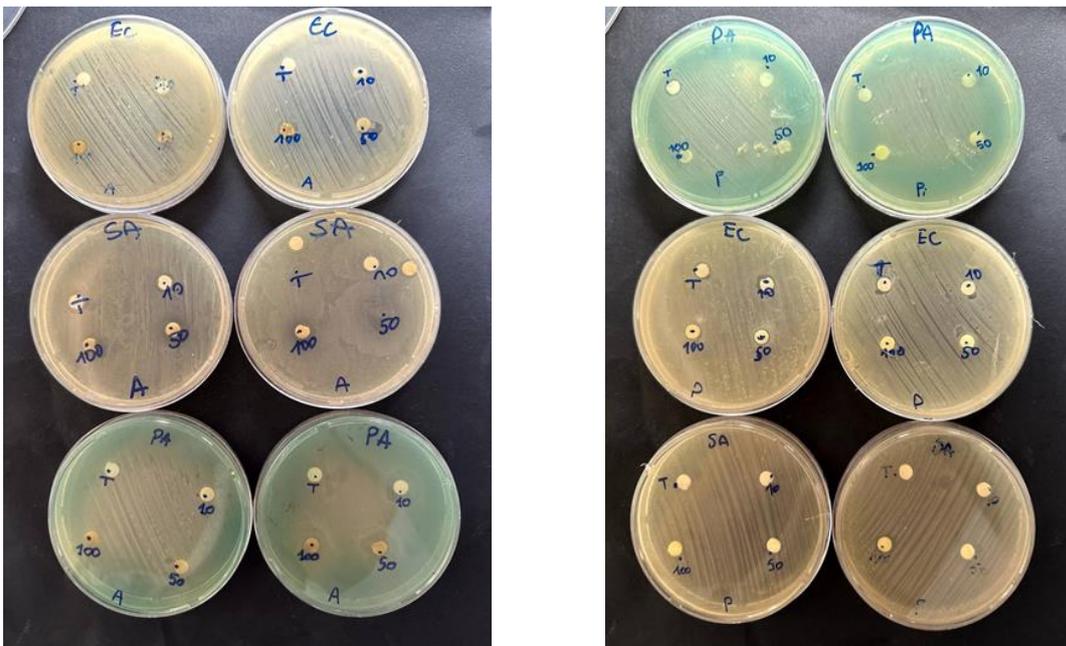
**III.5.1.2. Essai 02 :**

Un deuxième essai a été réalisé pour la pipérine et l'acide pipérique au niveau du CHU Constantine avec trois souches bactériennes (*E. coli*, *S.aureus* et *P. aeruginosa*.) en utilisant la méthode de diffusion sur disque avec des concentrations de l'ordre de 100 mg/ml, 50 mg/ml et 10 mg/ml.

Les résultats n'ont montré aucune activité contre les souches utilisées pour les deux produits (la pipérine et l'acide pipérique) comme le montre les figures ci-dessous.



**Figure 101 :** zone d'inhibition de ceftazidime.



**Figure 102 :** L'action de la pipérine (à droite) et de l'acide pipérique (à gauche) sur les souches bactériennes : *E. coli*, *S.aureus* et *P. aeruginosa*.

**III.5.2. Méthode de diffusion sur puits :**

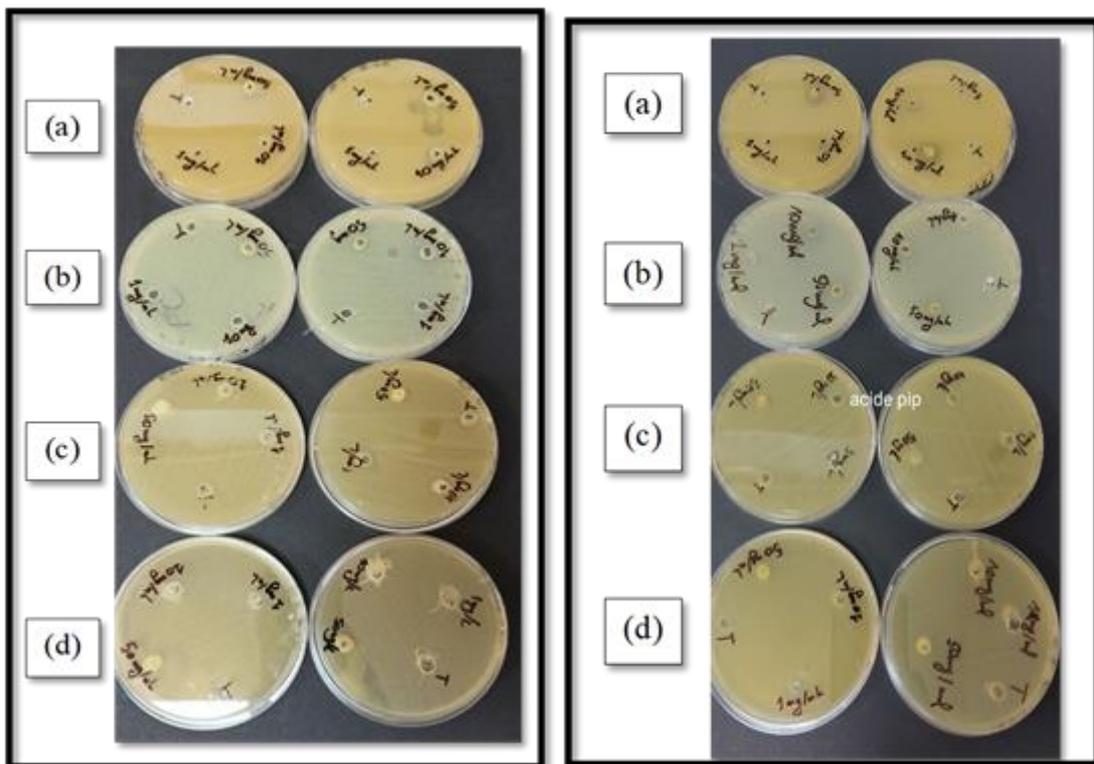
L'absence d'une activité antibactérienne de la pipérine, malgré la présence de plusieurs études qui prouvent le contraire (107,138,139) , nous ont poussé à changer la méthode en augmentant les concentrations.

La manipulation est réalisée au niveau de CRSP et voici les résultats obtenus. (Tableau 23) (Figure 103)

**Tableau 23** : Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion sur puits.

|                               | Diamètre d'inhibition (mm) |          |    |      |                 |    |      |
|-------------------------------|----------------------------|----------|----|------|-----------------|----|------|
|                               | Témoin négatif (DMSO)      | Piperine |    |      | Acide pipérique |    |      |
|                               |                            | 1        | 10 | 50   | 1               | 10 | 50   |
| <i>Bacillus subtilis</i>      | -                          | -        | -  | 10.4 | -               | -  | 10.3 |
| <i>Escherichia coli</i>       | -                          | -        | -  | -    | -               | -  | -    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -                          | -        | -  | -    | -               | -  | -    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | -                          | -        | -  | -    | -               | -  | -    |

(-) : absence de l'activité antibactérienne



**Figure 103** : l'action de la pipérine (à gauche) et de l'acide pipérique (à droite) sur les souches bactériennes : (a) *B. subtilis* (b) *E. coli* (c) *P. aeruginosa*, (d) *S. aureus*.

### ❖ Discussion :

*La pipérine* : Notre étude avait pour but de montrer par preuves la présence ou non d'une activité antibactérienne pour la pipérine.

Une série d'études a montré un effet inhibiteur significatif contre diverses bactéries à Gram-négatives et à Gram-positives (233,234), alors que certaines études(235–237) incluant la nôtre ont révélé que le pipérine n'avait aucune activité antibactérienne. Cela peut être attribuées à des différences dans :

- les méthodes microbiologiques : pour surmonter ce problème, deux méthodes d'identification de la sensibilité antibactérienne ont été utilisées.
- les solvants utilisés pour l'extraction : selon article (233) l'extrait éthanolique a prouvé la meilleure activité antibactérienne, l'une des raisons du choix de ce solvant.
- des micro-organismes testés : plusieurs espèces bactériennes à gram positive et négative ont été testé, même les souches ont été changées par changement de lieu de travail.

Certaines références (233,236) ont montré que l'absence d'une activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries gram positive est à cause de leur paroi épaisse.

*L'acide pipérique* : L'acide pipérique est un dérivé hémi-synthétique de la pipérine. Il existe peu d'études sur son activité antibactérienne parmi eux il y a l'article (238) qui montre une activité antibactérienne contre *Staphylococcus epidermidis* surtout, contrairement à notre étude l'acide pipérique ne présente aucune activité antibactérienne.

**III.6. Etude in silico (ADMET, Docking moléculaire, dynamique moléculaire) des analogues amides de l'acide pipérique :**

**III.6.1. Etude ADME des ligands :**

Avant de proposer les composés comme étant de nouvelles molécules actives, il était indispensable de commencer notre travail par l'application de la règle de 5 de Lipinski et celle de Veber. On a également déterminé les propriétés pharmacocinétiques in silico. Les mêmes propriétés ont été également prédites pour la pipérine et des médicaments de référence (Diclofénac et Ciprofloxacine) afin d'établir une comparaison.

**❖ Propriétés physico-chimiques :**

Selon Lipinski, tous les composés ne validant pas au moins trois des 5 conditions sont susceptibles de poser des problèmes d'absorption par voie orale. Dans notre cas, Tous les composés ainsi que la pipérine, répondent parfaitement aux critères de la règle de Lipinski.

Ces composés, ont également respecté les 2 critères de la règle de Veber, concernant la surface polaire qui est largement inférieure à 140 Å<sup>2</sup>, ainsi que le nombre de liaisons rotatables qui n'a pas dépassé 10. Ce qui favorise une bonne biodisponibilité orale.(213,217)

On note que tous les composés ont présenté une solubilité dans l'eau plus au moins bonne. Ce qui leurs favorise le passage dans la circulation sanguine. (Tableau 24)

Par rapport à l'accessibilité à la synthèse, tous les composés peuvent être chimiquement synthétisables, comme les résultats le montrent les valeurs n'ont pas dépassé l'échelle de 10.(Tableau 25)

**Tableau 24 :** les règles de LIPINSKI.

| Composés          | Masse moléculaire g/mol | Coefficient de partition log P | Nombre de donneurs d'hydrogène | Nombre d'accepteur d'hydrogène | Liaisons rotatables |
|-------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| Pipérine          | 285.34                  | 3.38                           | 0                              | 3                              | 4                   |
| (Acide pipérique) | 218.21                  | 2.20                           | 1                              | 4                              | 3                   |
| 1                 | 231.25                  | 2.55                           | 1                              | 3                              | 4                   |
| 2                 | 245.27                  | 2.79                           | 1                              | 3                              | 5                   |
| 3                 | 259.30                  | 3.07                           | 1                              | 3                              | 6                   |
| 4                 | 273.33                  | 3.36                           | 1                              | 3                              | 7                   |
| 5                 | 245.27                  | 2.98                           | 0                              | 3                              | 4                   |

| Composés   | Masse moléculaire g/mol | Coefficient de partition log P | Nombre de donneurs d'hydrogène | Nombre d'accepteur d'hydrogène | Liaisons rotatables |
|------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| 6          | 273.33                  | 3.43                           | 0                              | 3                              | 6                   |
| 7          | 259.30                  | 3.14                           | 1                              | 3                              | 5                   |
| 8          | 293.32                  | 3.00                           | 1                              | 3                              | 5                   |
| 9          | 309.32                  | 2.70                           | 2                              | 4                              | 5                   |
| 10         | 338.31                  | 2.77                           | 1                              | 5                              | 6                   |
| 11         | 299.36                  | 3.45                           | 1                              | 3                              | 5                   |
| 12         | 294.30                  | 2.61                           | 1                              | 4                              | 5                   |
| 13         | 294.30                  | 2.38                           | 1                              | 4                              | 5                   |
| 14         | 328.75                  | 2.90                           | 1                              | 4                              | 5                   |
| 15         | 310.30                  | 1.99                           | 2                              | 5                              | 5                   |
| 16         | 339.30                  | 1.89                           | 1                              | 6                              | 6                   |
| 17         | 308.33                  | 2.54                           | 1                              | 4                              | 5                   |
| 18         | 373.20                  | 2.98                           | 1                              | 4                              | 5                   |
| 19         | 295.29                  | 1.93                           | 1                              | 5                              | 5                   |
| 20         | 271.31                  | 3.22                           | 0                              | 3                              | 4                   |
| 21         | 267.28                  | 3.07                           | 0                              | 3                              | 4                   |
| 22         | 281.31                  | 3.33                           | 0                              | 3                              | 4                   |
| 23         | 346.18                  | 3.44                           | 0                              | 3                              | 4                   |
| 24         | 287.31                  | 3.09                           | 0                              | 4                              | 4                   |
| 25         | 286.33                  | 3.08                           | 1                              | 4                              | 4                   |
| 26         | 300.35                  | 3.37                           | 0                              | 4                              | 4                   |
| 27         | 314.38                  | 3.55                           | 0                              | 4                              | 5                   |
| Diclofénac | 296.15                  | 1.98                           | 2                              | 2                              | 4                   |

|                       |        |      |   |   |   |
|-----------------------|--------|------|---|---|---|
| <b>Ciprofloxacine</b> | 331.34 | 2.24 | 2 | 5 | 3 |
|-----------------------|--------|------|---|---|---|

**Tableau 25** : Propriétés physicochimiques de la pipérine et ses analogues.

| <b>Composés</b>          | <b>Poids moléculaire (g/mol)</b> | <b>Tpsa Å<sup>2</sup></b> | <b>Lipinski</b> | <b>Veber</b> | <b>Solubilité dans l'eau</b> | <b>Accessibilité de synthèse</b> |
|--------------------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------|--------------|------------------------------|----------------------------------|
| <b>Pipérine</b>          | 285.34                           | 38.77                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.92                             |
| <b>(Acide pipérique)</b> | 218.21                           | 55.76                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.74                             |
| <b>1</b>                 | 231.25                           | 47.56                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.73                             |
| <b>2</b>                 | 245.27                           | 47.56                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.85                             |
| <b>3</b>                 | 259.30                           | 47.56                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.88                             |
| <b>4</b>                 | 273.33                           | 47.56                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.92                             |
| <b>5</b>                 | 245.27                           | 38.77                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.84                             |
| <b>6</b>                 | 273.33                           | 38.77                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 3.06                             |
| <b>7</b>                 | 259.30                           | 47.56                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.93                             |
| <b>8</b>                 | 293.32                           | 47.56                     | OUI             | OUI          | Modérément soluble           | 2.87                             |
| <b>9</b>                 | 309.32                           | 67.79                     | OUI             | OUI          | Modérément soluble           | 2.92                             |
| <b>10</b>                | 338.31                           | 93.38                     | OUI             | OUI          | Modérément soluble           | 2.96                             |
| <b>11</b>                | 299.36                           | 47.56                     | OUI             | OUI          | Modérément Soluble           | 3.04                             |
| <b>12</b>                | 294.30                           | 60.45                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.79                             |
| <b>13</b>                | 294.30                           | 60.45                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.89                             |
| <b>14</b>                | 328.75                           | 60.45                     | OUI             | OUI          | Modérément soluble           | 2.92                             |
| <b>15</b>                | 310.30                           | 80.68                     | OUI             | OUI          | Soluble                      | 2.96                             |
| <b>16</b>                | 339.30                           | 106.27                    | OUI             | OUI          | Soluble                      | 3.07                             |
|                          |                                  |                           |                 |              |                              |                                  |

| Composés       | Poids Moléculaire (g/mol) | Tpsa Å <sup>2</sup> | Lipinski | Veber | Solubilité dans l'eau | Accessibilité de Synthèse |
|----------------|---------------------------|---------------------|----------|-------|-----------------------|---------------------------|
| 17             | 308.33                    | 60.45               | OUI      | OUI   | Soluble               | 2.98                      |
| 18             | 373.20                    | 60.45               | OUI      | OUI   | Modérément soluble    | 2.93                      |
| 19             | 295.29                    | 73.34               | OUI      | OUI   | Soluble               | 3.07                      |
| 20             | 271.31                    | 38.77               | OUI      | OUI   | Soluble               | 2.84                      |
| 21             | 267.28                    | 40.46               | OUI      | OUI   | Modérément soluble    | 2.80                      |
| 22             | 281.31                    | 40.46               | OUI      | OUI   | Soluble               | 2.90                      |
| 23             | 346.18                    | 40.46               | OUI      | OUI   | Modérément soluble    | 2.85                      |
| 24             | 287.31                    | 48.00               | OUI      | OUI   | Soluble               | 3.03                      |
| 25             | 286.33                    | 50.80               | OUI      | OUI   | Soluble               | 3.06                      |
| 26             | 300.35                    | 42.01               | OUI      | OUI   | Soluble               | 3.16                      |
| 27             | 314.38                    | 42.01               | OUI      | OUI   | Soluble               | 3.27                      |
| Diclofénac     | 296.15                    | 49.33               | OUI      | OUI   | Modérément soluble    | 2.23                      |
| Ciprofloxacine | 331.34                    | 74.57               | OUI      | OUI   | Très soluble          | 2.51                      |

❖ **Propriétés pharmacocinétiques :**

Il est indispensable de faire une analyse des propriétés pharmacocinétiques afin d'affirmer notre sélection et d'aller vers le ou les composés ayant le plus de chance d'être un médicament candidat.(Tableau 26)

Tableau 26 : Propriétés pharmacocinétiques de la pipérine et ses analogues.

| Composés                 | GI absorption | BBB Perméabilité | P-gp substrat | CYP1A2 inhibition | CYP2C19 Inhibition | CYP2C9 Inhibition | CYP2D6 Inhibition | CYP3A4 inhibition |
|--------------------------|---------------|------------------|---------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Pipérine</b>          | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>(Acide pipérique)</b> | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Négative           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>1</b>                 | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>2</b>                 | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>3</b>                 | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>4</b>                 | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>5</b>                 | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>6</b>                 | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Négative          | Négative          | Positive          |
| <b>7</b>                 | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>8</b>                 | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>9</b>                 | Elevé         | Négative         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>10</b>                | Elevé         | Négative         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>11</b>                | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Positive          |
| <b>12</b>                | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>13</b>                | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>14</b>                | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>15</b>                | Elevé         | Négative         | Négative      | Positive          | Négative           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>16</b>                | Elevé         | Négative         | Négative      | Positive          | Négative           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>17</b>                | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |

| Composés              | GI absorption | BBB Perméabilité | P-gp substrat | CYP1A2 inhibition | CYP2C19 Inhibition | CYP2C9 Inhibition | CYP2D6 Inhibition | CYP3A4 inhibition |
|-----------------------|---------------|------------------|---------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>18</b>             | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Positive          |
| <b>19</b>             | Elevé         | Positive         | Négative      | Négative          | Négative           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>20</b>             | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>21</b>             | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>22</b>             | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>23</b>             | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Négative          | Négative          |
| <b>24</b>             | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>25</b>             | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>26</b>             | Elevé         | Positive         | Négative      | Négative          | Positive           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>27</b>             | Elevé         | Positive         | Négative      | Négative          | Positive           | Négative          | Négative          | Négative          |
| <b>Diclofenac</b>     | Elevé         | Positive         | Négative      | Positive          | Positive           | Positive          | Positive          | Négative          |
| <b>Ciprofloxacine</b> | Elevé         | Négative         | Positive      | Négative          | Négative           | Négative          | Négative          | Négative          |

Comme pour la pipérine, une absorption gastro-intestinale élevée a été constatée pour tous les analogues. Pour la perméabilité hématoencéphalique, les analogues 9, 10, 15, 16 ne passent pas la barrière hématoencéphalique contrairement à la pipérine et au reste des analogues qui traversent la BHE, ce qui nous renseigne sur leur bon passage à travers les différentes membranes de l'organisme. Comme pour la pipérine, les 27 similaires ne sont pas transportés par la glycoprotéine P. A l'exception des analogues 15, 16, 1,26, 27, tous les similaires inhibent le CYP1A2 et CYP2C19. Tous les similaires inhibent la CYP2C9 sauf les analogues 1, 2, 5, 6, 15, 19, 20, 24, 25, 26,27. La CYP2D6 et CYP3A4 ne sont pas inhibés par la pipérine et les 27 analogues sauf une exception pour les analogues 6, 11, 18 qui inhibent la CYP3A4. Nous avons pris WLogP et XLogP3 (valeurs de LogP atomistes), qui se sont avérés être les plus pertinents pour la LogP expérimentale (Pyka et coll., 2006). Le XLogP3 des analogues varie de 1.83 à 4,79, tandis que WLogP varie de 0.55 à 3,76. Le score de

biodisponibilité prévue par le serveur est de 0,55 qui est équivalent à la biodisponibilité prévue des anti-inflammatoires et antibiotiques commerciaux (par exemple, Ciprofloxacine : WLogP -1.18, et diclofénac WLogP -4.36), le score de biodisponibilité pour la ciprofloxacine -0,55, et 0.85, pour la diclofénac. (191)

En résumé, les analogues qui traversent la barrière digestive, ne sont pas transportés par la glycoprotéine P, et n'inhibent pas les enzymes CYP3A4 de manière significative sont les meilleurs candidats. Par conséquent, les meilleurs analogues seraient :

- **Analogues 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27** : Ils traversent la barrière digestive, ne sont pas transportés par la glycoprotéine P, et n'inhibent pas les enzymes CYP3A4 de manière significative.

### III.6.2. Test de fiabilité du protocole de docking moléculaire par Auto Dock 4.2 :

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition des différentes protéines par les analogues amides de l'acide pipérique, on a jugé utile d'évaluer tout d'abord la performance de l'Auto dock 4.2 utilisé dans cette étude en faisant appel à l'analyse visuelle et au calcul du RMSD.

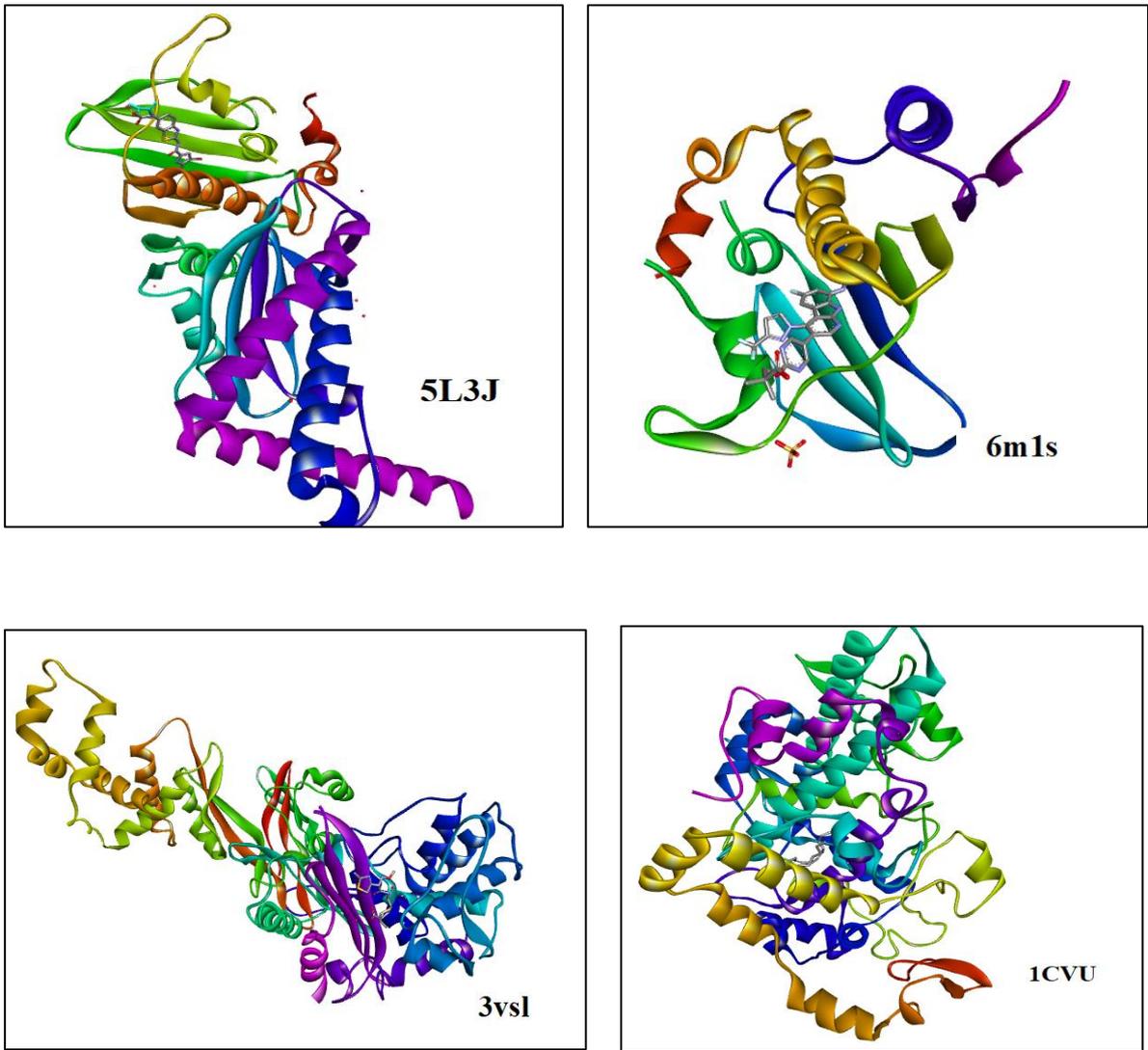
#### ❖ *RMSD : L'écart quadratique moyen ou (root mean square deviation).*

Avant de réaliser l'étude d'amarrage moléculaire, le protocole d'amarrage a été validé. Les ligands sélectifs co-cristaux ont donc été retirés des complexes protéiques-ligands cristallisés énumérés dans le PDB et de nouveau dockés dans le site de liaison des protéines. La déviation quadratique moyenne (RMSD) des ligands dans les conformations complexes de co-cristaux et les conformations les mieux ancrées étaient inférieures à 2Å. La plupart des ligands présentaient des écarts négligeables (Tableau 27). Cela indique la capacité du protocole d'amarrage à reproduire les modes d'interaction et les orientations des ligands de co-cristaux.

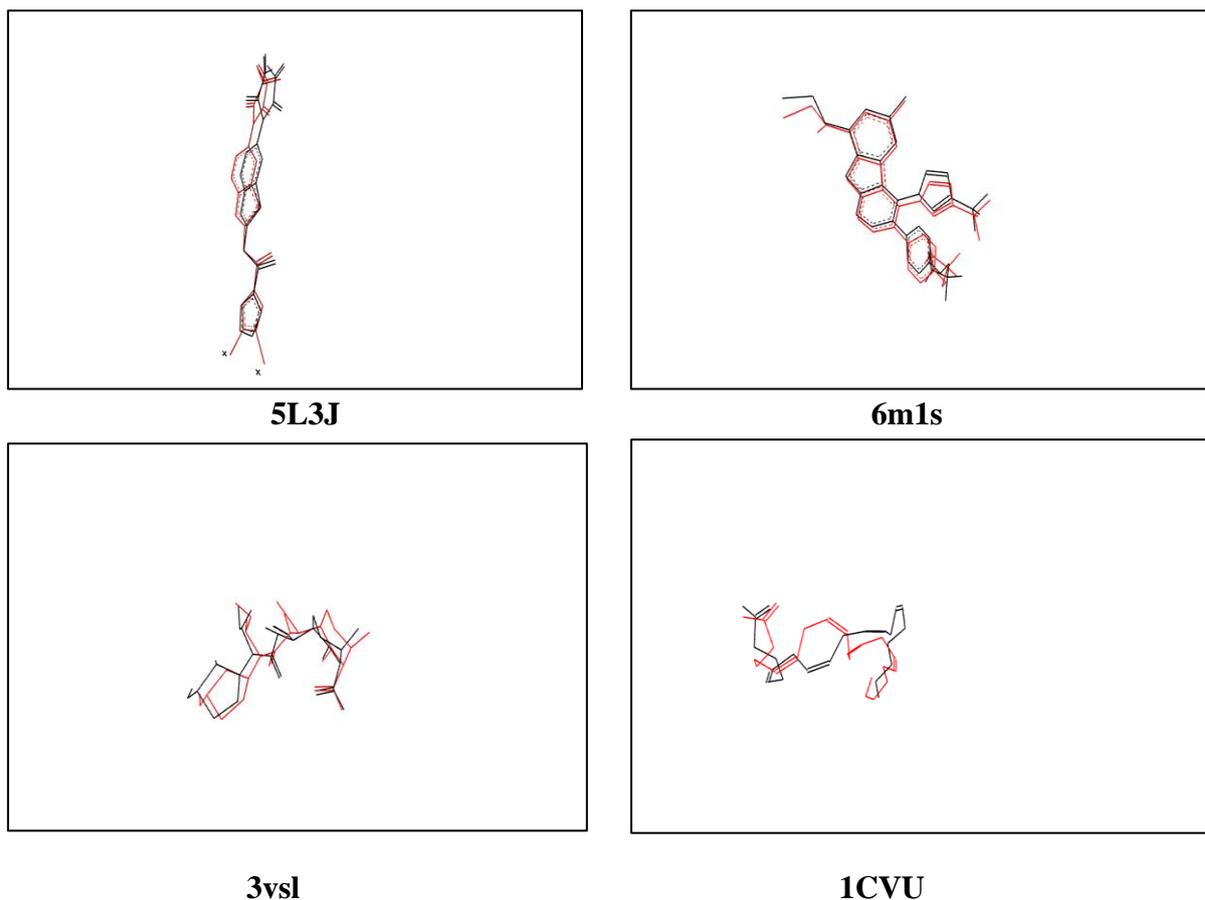
**Tableau 27** : Les 4 complexes utilisés pour tester la fiabilité du protocole de docking par Auto dock 4.2.

| Code de l'enzyme | Code de l'inhibiteur | RMSD (Å <sup>0</sup> ) |
|------------------|----------------------|------------------------|
| 5L3J             | 6G9                  | 0,54                   |
| 6m1s             | EZ9                  | 0,72                   |
| 3vsl             | CEF                  | 0,86                   |
| 1CVU             | ACD                  | 0,72                   |

❖ *L'analyse visuelle :*



**Figure 104 :** Structures 3D des 4 complexes issus de la PDB.



**Figure 105 :** Comparaison des conformations obtenues par rayon-X (colorés en noir) et par docking moléculaire avec AutoDock 4.2 (colorés en rouge).

Les figures 104 et 105 montre qu'on a une bonne superposition des poses simulées par auto dock 4.2 (colorés en rouge) et celles du ligand naturel (colorées en noir).

### III.6.3. Etude de docking moléculaire :

*Evaluation de l'activité anti-inflammatoire et antibactérienne des analogues conçus par le programme Autodock 4.2 :*

Dans le but de trouver de nouvelles molécules ayant une activité anti-inflammatoire et antibactérienne puissante, nous avons choisi comme point de départ de notre étude la pipérine dont l'effet anti-inflammatoire et antibactérien ont été prouvés in vivo et in vitro (5,10,59,73,98). Alors, nous avons étudié l'activité de la pipérine et des 27 analogues vis à vis des protéines cibles : Cyclo-oxygénase 2 (1cvu), *E.Coli* (5lj3), *Pseudomonas Aeruginosa* (6m1s), *Staphylococcus aureus* (3vsl), *Bacillus subtilis* (3zih) par méthode de docking moléculaire.

**III.6.3.1. Etude des interactions de la pipérine avec les protéines Cyclo-oxygénase 2 (1cvu), E.Coli (5lj3), Pseudomonas Aeruginosa (6m1s), Staphylococcus Aureus (5a5x), Bacillus subtilis (3zih) :**

**Tableau 28 :** Les énergies d'interactions de la pipérine avec les différentes protéines

| Complexe                       | Pipérine-1CVU | Pipérine-5lj3 | Pipérine-6m1s | Pipérine-3vsl | Pipérine-3zih |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Score kcal/mol                 | -9.95         | -6.71         | -6.99         | -6.75         | -5.59         |
| Constante d'inhibition (Ki) µM | 36.28         | 12.03         | 88.9          | 11.34         | 80.11         |

**Tableau 29 :** Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition des protéines Cyclo-oxygénase 2 (1cvu), E.Coli (5lj3), Pseudomonas Aeruginosa (6m1s), Staphylococcus Aureus (3vsl), Bacillus subtilis (3zih) par la pipérine.

| Complexes     | Interaction de liaison hydrogène (HB) | Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB | interaction de Pi-alkyl Alkyl                            | l'interaction en forme de Pi-Sigma Pi-anion Pi-cation | Interaction de van der waals | Pi-Pi Staked | Carbon hydrogène bond |
|---------------|---------------------------------------|---|--|---|------------------------------|--------------|-----------------------|
| Pipérine-1CVU | VAL 228                               | 2.40  | ILE377<br>PHE381<br>PHE205<br>LEU534<br>VAL344<br>TRP387 | /   | /                            | PHE209       | GLY 227               |
| Pipérine-5lj3 | ARG 136                               | 1.85  | ARG76<br>ILE78<br>PRO79,<br>ALA47                        | GLU50   | /                            | /            | HIS55                 |
| Pipérine-6m1s | SER 49                                | 2.71  | PRO81<br>ILE80<br>VAL122<br>VAL169<br>VAL49<br>ARG78     | GLU52   | /                            | /            | VAL45                 |

| Complexes     | Interaction de liaison hydrogène (HB) | Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB | interaction de Pi-alkyl Alkyl | l'interaction en forme de Pi-Sigma Pi-anion Pi-cation | Interaction de van der waals | Pi-Pi Staked | Carbon hydrogène bond |
|---------------|---------------------------------------|---|-------------------------------|---|------------------------------|--------------|-----------------------|
| Pipérine-3vsl | SER429<br>GLY629                      | 3,34<br>2,22                                  | ILE522                        | /   | /                            | /            | /                     |
| Pipérine-3zih | ARG94                                 | 2.43  | ILE78<br>ARG 70               | GLU68<br>ARG 70                                       | /                            | /            | GLU 74<br>SER67       |

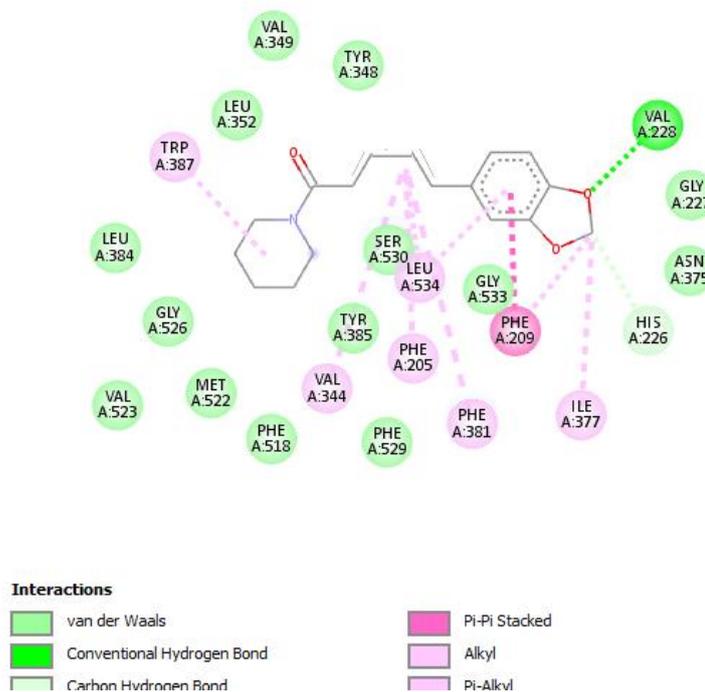


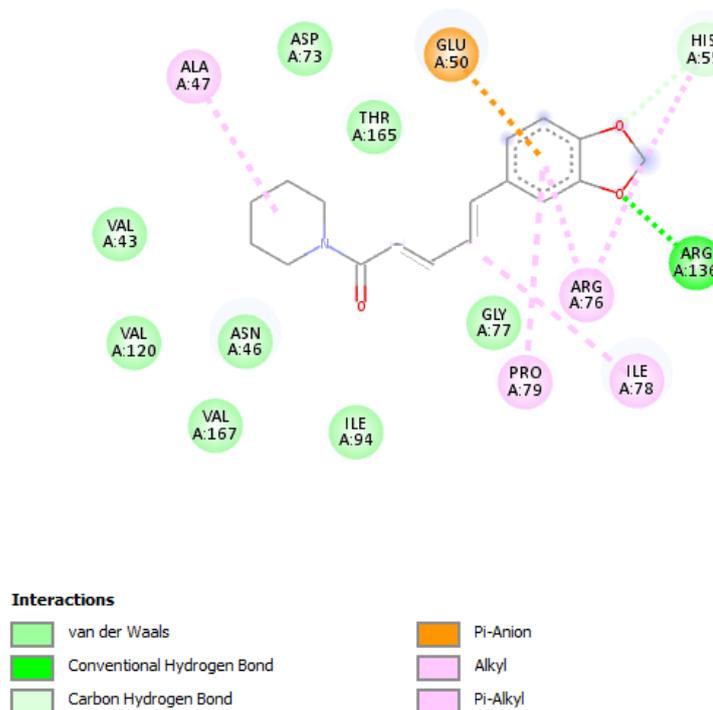
Figure 106 : Pose 2D de la pipérine sur le site actif de la protéine 1cvu.



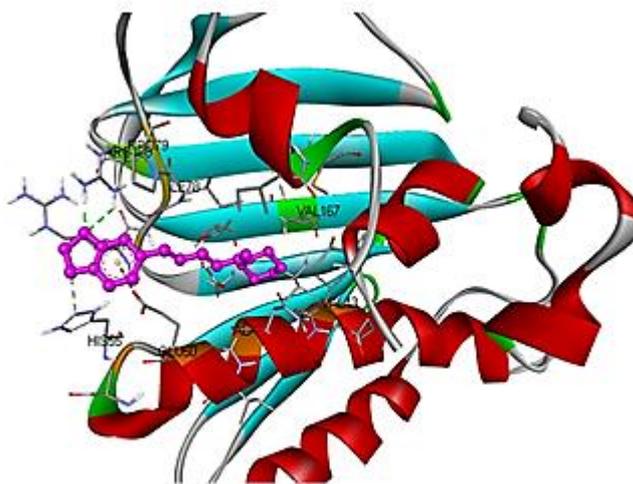
**Figure 107 :** Pose 3D de la pipérine sur le site actif de la protéine 1cvu.

L'analyse visuelle des figures 106 et 107 montre que la pipérine inhibe la COX2 (1cvu) en formant une liaison d'hydrogène avec le site actif au niveau du résidu (**VAL228**) et l'oxygène du cycle dioxolane, au niveau de la pipérine avec une distance (2.40 Å°).

Il faut également souligner l'intervention des résidus ILE377, PHE381, PHE205, LEU534, VAL344, TRP387, PHE209, GLY 227, dans la stabilité du complexe Pipérine-1CVU en permettant la formation de nombreuses interactions de type hydrophobe.

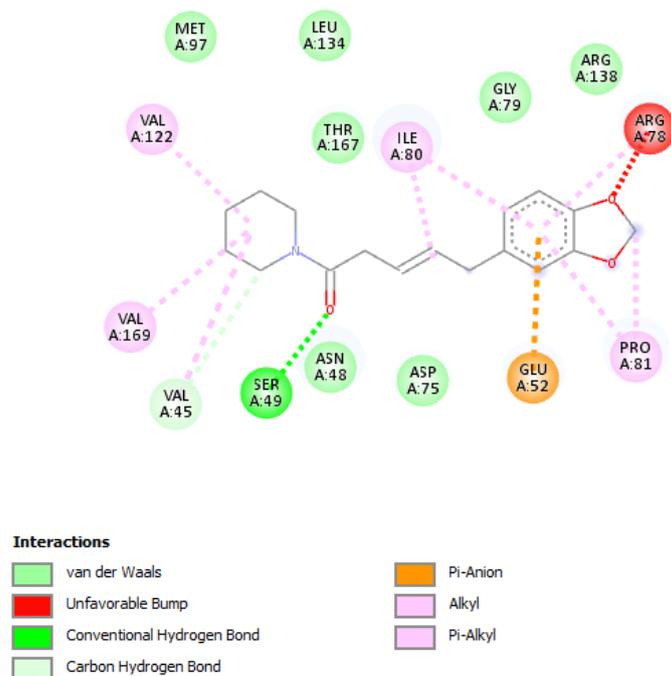


**Figure 108 :** Pose 2D de la pipérine sur le site actif de la protéine 5lj3.



**Figure 109** : Pose 3D de la pipérine sur le site actif de la protéine 5lj3.

Le complexe **Pipérine-5lj3** est inhibé par la formation d'une liaison hydrogène entre l'oxygène du cycle dioxolane, au niveau de la pipérine et le résidu ARG 136 avec une distance de 1.85 Å. Il est à noter que le complexe est stabilisé également par de nombreuses interactions hydrophobiques précisément avec les résidus ARG76, ILE78, HIS55, PRO79, ALA47, GLU50, du site actif de l'ADN gyrase d'E.Coli. (Figure 108 et 109)



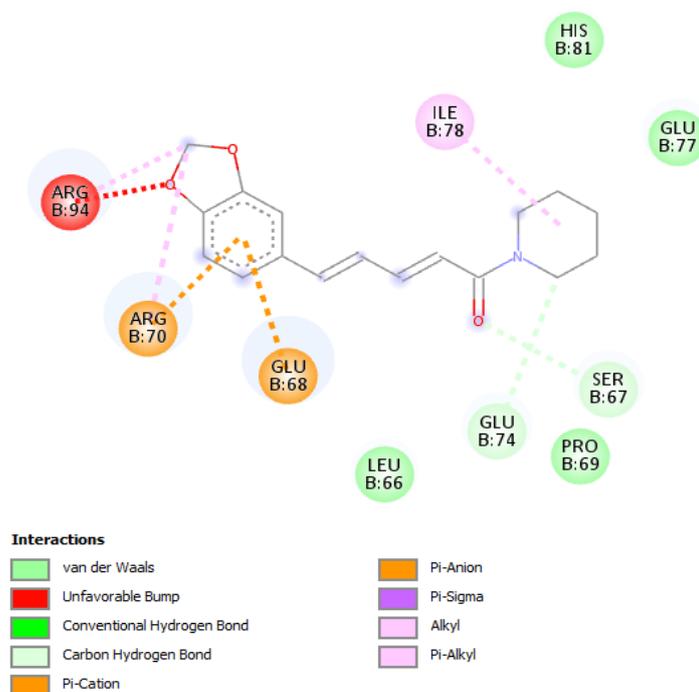
**Figure 110** : Pose 2D de la pipérine sur le site actif de la protéine 6m1s.



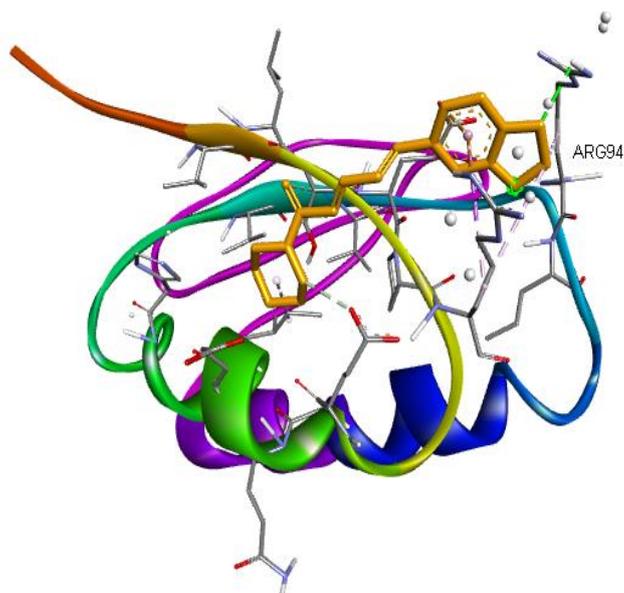
**Figure 111 :** Pose 3D de la pipérine sur le site actif de la protéine 6m1s.

Comme le montre les figures N° 110 et 111, la pipérine établit une liaison d'hydrogène entre l'oxygène du carbonyle de la chaîne latérale et le résidu SER49 (distance = 2,71 Å).

La stabilité de la pipérine au sein du site actif de la *Pseudomonas aeruginosa* est assurée également par de nombreuses interactions hydrophobiques faisant intervenir les résidus SER49, PRO81, ARG78, GLY79, ILE80, GLU52, VAL 45, 122 et 169.



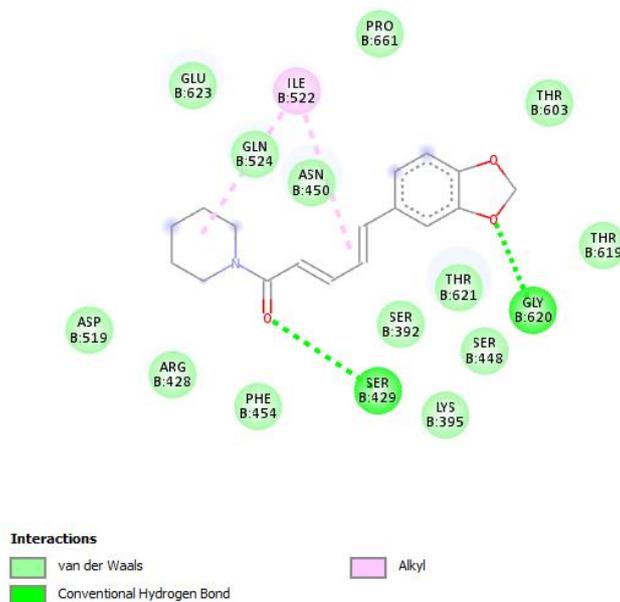
**Figure 112 :** Pose 2D de la pipérine sur le site actif de la protéine 3zih.



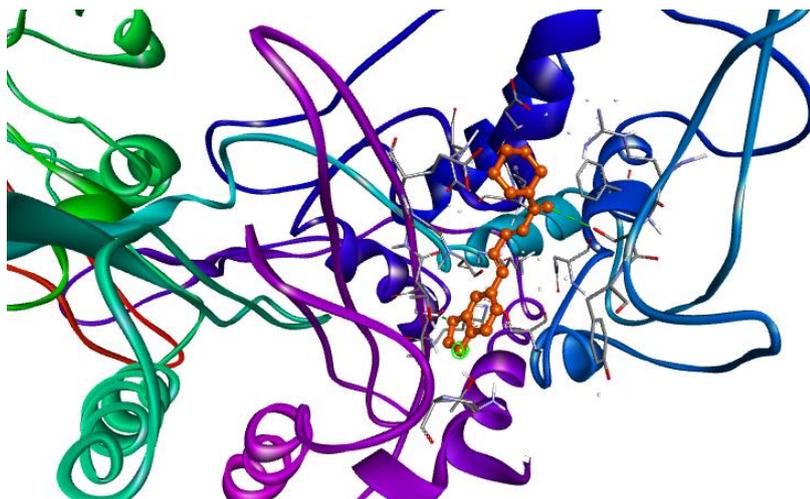
**Figure 113 :** Pose 3D de la pipérine sur le site actif de la protéine 3zih.

L'analyse visuelle des figures 112 et 113 révèle pour la pipérine mise en place une liaison d'hydrogène formée avec le résidu ARG94 et l'atome d'oxygène du noyau dioxolane avec une distance de 2.43 Å°.

Ce complexe est également stabilisé par des interactions hydrophobiques entre la pipérine et les résidus GLU 74, GLU 68, SER67, ILE78 et ARG 70.



**Figure 114 :** Pose 2D de la pipérine sur le site actif de la protéine 3vsl.



**Figure 115 :** Pose 3D de la pipérine sur le site actif de la protéine 3vsl.

Comme le montre les figures N°114 et 115, la pipérine établit deux liaisons d'hydrogène entre l'oxygène du carbonyle de la chaîne latérale, l'oxygène du noyau dioxolane et les résidus SER429, GLY629 respectivement (distance = 3,34 et 2,22 Å).

La stabilité de la pipérine au sein du site actif de la staphylococcus aureus est assurée également par deux interactions hydrophobiques faisant intervenir le résidu ILE522.

### ***III.6.3.2. Etude des interactions des 27 analogues de la pipérine avec les protéines Cyclo-oxygénase 2 (1cvu), E.Coli (5lj3), Pseudomonas Aeruginosa (6m1s), Staphylococcus Aureus (3vsl), Bacillus subtilis (3zih) :***

Le docking moléculaire des 27 analogues de la pipérine et l'acide pipérique avec les différentes protéines, a permis de calculer leur énergie d'interaction (Tableau 30). A l'issue de ce test il ressort que seuls les analogues 8, 9, 10, 13, 15, 17 présentent une énergie d'interaction inférieure à celle de la pipérine avec la plupart des protéines. (Figure 117)

**Tableau 30** : les énergies d'interactions des 27 analogues de la pipérine avec les différentes protéines.

| Composés          | Energie libre $\Delta G$ (Kcal/mol)<br>(1CVU) | Energie libre $\Delta G$ (Kcal/mol)<br>(5LJ3) | Energie libre $\Delta G$ (Kcal/mol)<br>(3VSL) | Energie libre $\Delta G$ (Kcal/mol)<br>(6M1S) | Energie libre $\Delta G$ (Kcal/mol)<br>(3ZIH) |
|-------------------|---|---|---|---|---|
| Pipérine          | <b>-9.95</b>                                  | <b>-6.98</b>                                  | <b>-6.75</b>                                  | <b>-6.96</b>                                  | <b>-5.59</b>                                  |
| (Acide pipérique) | -8.95   | -5.11   | -7.46   | -5.99   | -8.27   |
| 1                 | -7.86   | -5.90   | -5.96   | -6.26   | -5.46   |
| 2                 | -8.44   | -6.02   | -5.93   | -6.73   | -5.58   |
| 3                 | -8.31   | -6.18   | -6.26   | -6.76   | -5.52   |
| 4                 | -8.20   | -6.07   | -5.82   | -6.49   | -6.14   |
| 5                 | -8.37   | -5.42   | -5.88   | -6.55   | -5.91   |
| 6                 | -8.72   | -6.50   | -6.78   | -6.43   | -5.86   |
| 7                 | -8.39   | -5.50   | -5.38   | -6.65   | -6.91   |
| 8                 | <b>-10.48</b>                                 | <b>-7.40</b>                                  | <b>-7.16</b>                                  | <b>-7.56</b>                                  | <b>-7.09</b>                                  |
| 9                 | <b>-10.74</b>                                 | <b>-6.98</b>                                  | <b>-7.28</b>                                  | <b>-7.51</b>                                  | <b>-7.00</b>                                  |
| 10                | <b>-10.61</b>                                 | <b>-6.98</b>                                  | <b>-7.86</b>                                  | <b>-6.96</b>                                  | <b>-7.31</b>                                  |
| 11                | -9.21   | -6.92   | -7.04   | -7.15   | -6.62   |
| 12                | -9.66   | -6.77   | -6.71   | -9.70   | -6.77   |
| 13                | <b>-10.41</b>                                 | <b>-7.35</b>                                  | <b>-7.72</b>                                  | <b>-7.62</b>                                  | <b>-7.01</b>                                  |
| 14                | -9.11   | -7.11   | -6.76   | -7.37   | -6.99   |
| 15                | <b>-10.78</b>                                 | <b>-7.35</b>                                  | <b>-7.17</b>                                  | <b>-7.17</b>                                  | <b>-6.90</b>                                  |
| 16                | -9.81   | -6.48   | -7.19   | -7.11   | -5.46   |
| 17                | <b>-10.87</b>                                 | <b>-7.80</b>                                  | <b>-6.75</b>                                  | <b>-7.89</b>                                  | <b>-7.19</b>                                  |
| 18                | -9.73   | -6.36   | -7.37   | -7.02   | -5.42   |
| 19                | -9.07   | -6.54   | -6.88   | -7.38   | -5.46   |

| Composés | Energie libre $\Delta G$ (Kcal/mol) (1CVU) | Energie libre $\Delta G$ (Kcal/mol) (5LJ3) | Energie libre $\Delta G$ (Kcal/mol) (3VSL) | Energie libre $\Delta G$ (Kcal/mol) (6M1S) | Energie libre $\Delta G$ (Kcal/mol) (3ZIH) |
|----------|--|--|--|--|--|
| 20       | -8.33                                      | -7.27                                      | -6.27                                      | -7.72                                      | -5.57                                      |
| 21       | -9.04                                      | -5.54                                      | -6.88                                      | -6.38                                      | -6.46                                      |
| 22       | -9.10                                      | -6.80                                      | -6.19                                      | -5.11                                      | -5.36                                      |
| 23       | -9.48                                      | -5.64                                      | -5.88                                      | -5.38                                      | -5.11                                      |
| 24       | -9.53                                      | -6.01                                      | -5.38                                      | -6.38                                      | -5.16                                      |
| 25       | -9.10                                      | -6.50                                      | -6.68                                      | -5.80                                      | -5.56                                      |
| 26       | -9.36                                      | -5.54                                      | -5.78                                      | -6.18                                      | -5.41                                      |
| 27       | -9.25                                      | -6.44                                      | -5.28                                      | -6.08                                      | -5.04                                      |

Le pharmacophore (Figure N°116) maintenu ici se compose de trois accepteurs d'hydrogène (ACC), trois donneurs d'hydrogène (HYD) et deux systèmes de cycle aromatique (AR), la distance entre eux est rapportée en Å<sup>0</sup>.

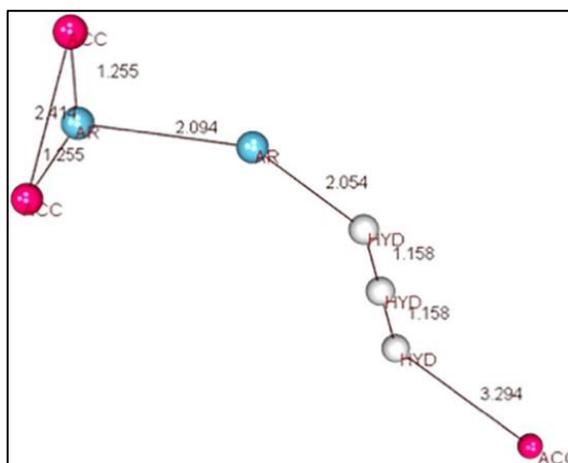
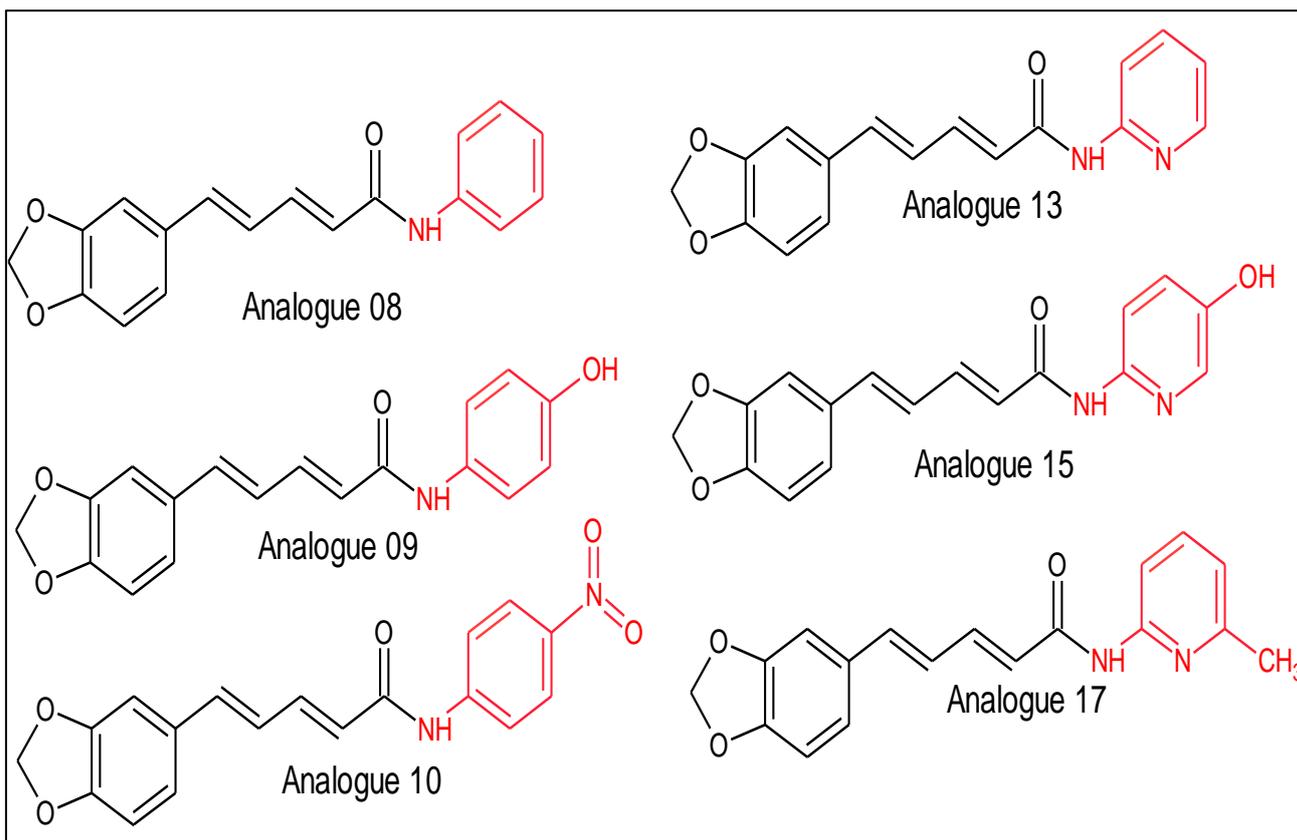


Figure 116 : Modèle pharmacophore.

Ce type de model est déjà observé dans des molécules telle que : **gingérol**, **curcumine** et **quercétine** qui ont prouvé leurs activités anti-inflammatoire et antibactérienne.(239,240)



**Figure 117 :** Structures des 6 meilleurs analogues actifs sur les 5 protéines.

❖ *Visualisation d'interaction des meilleurs dérivés avec les sites actifs des protéines 1cvu, 6m1s, 5a5x, 5LJ3, 3zih :*

**Tableau 31** : Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition de la protéine Cyclo-oxygénase 2 (1cvu), par les meilleurs analogues.

| <b>Analogues</b>     | <b>Interaction de liaison hydrogène (HB)</b> | <b>Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB</b> | <b>Interaction de Pi-alkyl Alkyl</b>  | <b>Interaction en forme de Pi-Sigma Pi-anion Pi-cation</b> | <b>Interaction de van der waals</b> | <b>Pi-Pi Staked Shaped</b> | <b>Carbon hydrogène bond</b> |
|----------------------|--|--|---|--|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| <b>Pipérine-1CVU</b> | <b>VAL228</b>                                | <b>2.40</b>  | <b>ILE377<br/>PHE381<br/>PHE205<br/>LEU534<br/>VAL344<br/>TRP387</b>        | <b>/</b>   | <b>/</b>                            | <b>PHE209</b>              | <b>GLY227</b>                |
| <b>Analogues 8</b>   | SER530                                       | 2.21   | VAL349<br>LEU352<br>VAL344<br>HIS90<br>ARG513<br>ALA516                     | VAL523   | /                                   | /                          | PHE518<br>ARG513<br>HIS90    |
| <b>Analogues 9</b>   | SER530                                       | 2.12   | VAL349<br>LEU352<br>VAL344<br>ALA516<br>VAL523                              | VAL523   | /                                   | TYR348                     | PHE518<br>HIS90              |
| <b>Analogues 10</b>  | SER530<br>MET535                             | 2.02<br>2.74   | VAL349<br>LEU352<br>LEU534<br>VAL344<br>HIS90<br>ARG513<br>ALA516<br>ILE345 | VAL523   | /                                   | /                          | PHE518<br>LEU531<br>HIS90    |
| <b>Analogues 13</b>  | SER530                                       | 2.23   | VAL349<br>TYR348<br>PHE518<br>VAL523<br>LEU352                              | LEU352   | /                                   | /                          | SER530                       |

| Analogues   | Interaction de liaison hydrogène (HB) | Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB | Interaction de Pi-alkyl Alkyl  | Interaction en forme de Pi-Sigma Pi-anion Pi-cation | Interaction de van der Waals | Pi-Pi Staked Shaped | Carbon hydrogen bond |
|-------------|---------------------------------------|---|--|---|------------------------------|---------------------|----------------------|
| Analogue 15 | GLY533                                | 2.02  | LEU534<br>TYR385<br>PHE381<br>PHE518<br>LEU352<br>VAL523                     | /   | /                            | PHE209<br>TRP387    | /                    |
| Analogue 17 | SER530                                | 1.96  | VAL349<br>LEU531<br>LEU534<br>LEU552<br>MET535<br>ILE345<br>ALA516<br>VAL523 | VAL523  | /                            | /                   | PHE518<br>HIS90      |

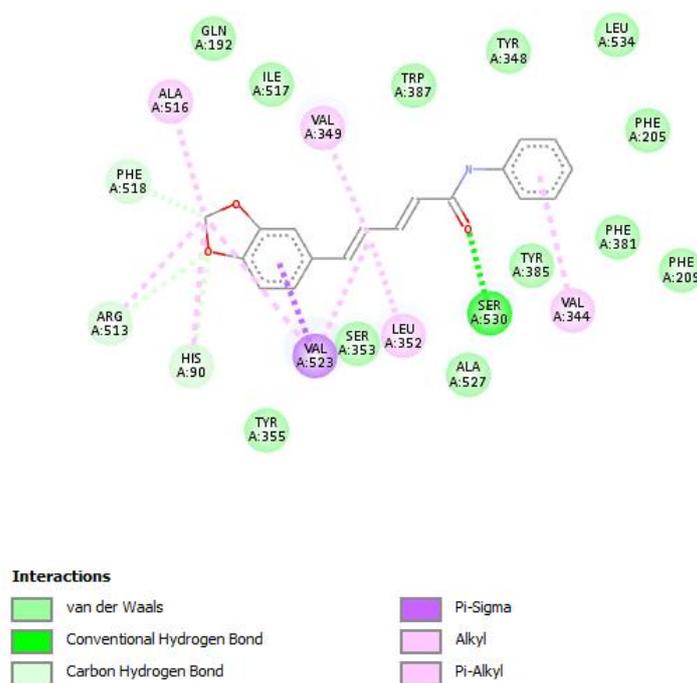
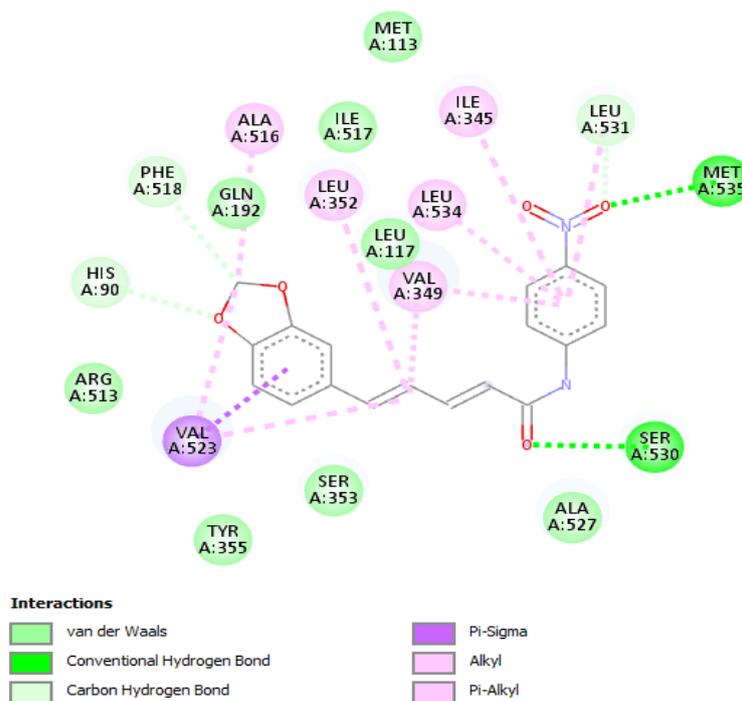
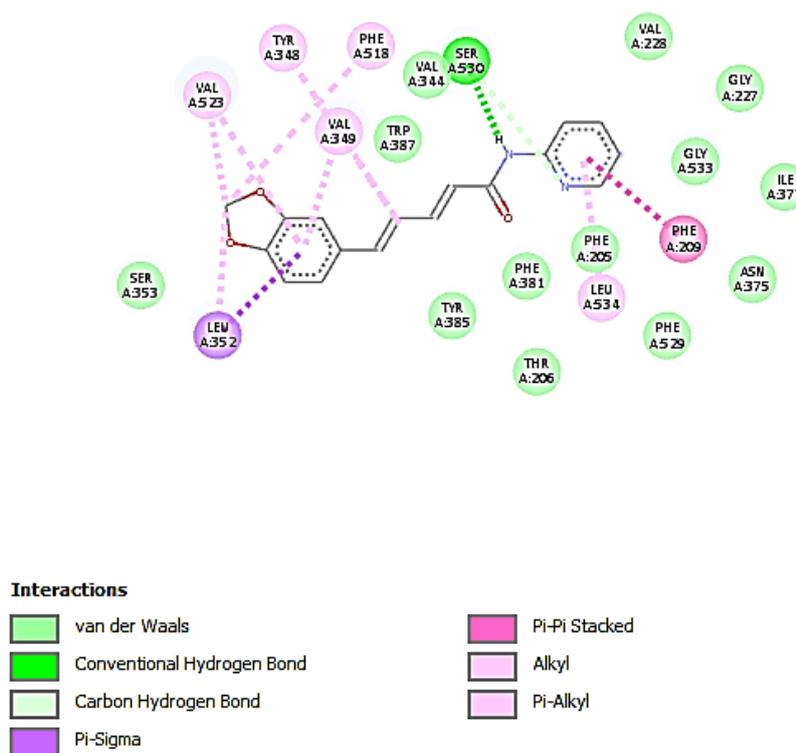


Figure 118 : Pose 2D de l’analogue 8 sur le site actif de la protéine 1cvu.



**Figure 119** : Pose 2D de l'analogue 10 sur le site actif de la protéine 1cvu.



**Figure 120** : Pose 2D de l'analogue 13 sur le site actif de la protéine 1cvu.

❖ **Discussion :**

L`analyse visuelle des figures 118,119 et 120 montre que tous les analogues établissent des liaisons hydrogènes avec les résidus MET535 et SR530 avec une distance inférieure à celle établit par la pipérine, de même les analogues sont stabilisés par des interactions hydrophobiques similaires à celle de la pipérine (ILE377, PHE381, PHE205, LEU534, VAL344, TRP387 et d`autres résidus), il faut mentionner que la protéine 1CVU établit d`autres types de liaisons telles que carbone hydrogène et Pi-Pi Staked.

**Tableau 32 :** Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition de la protéine d`*E.Coli* (5lj3), par les meilleurs analogues.

| <b>Analogues</b>     | <b>Interaction de liaison hydrogène (HB)</b> | <b>Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB</b> | <b>Interaction de Pi-alkyl Alkyl</b>                | <b>l'interaction en forme de Pi-Sigma<br/>Pi-anion<br/>Pi-cation</b> | <b>Interaction de van der waals</b> | <b>Pi-Pi Staked Shaped</b> | <b>Carbone hydrogène bond</b> |
|----------------------|--|--|---|--|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <b>Pipérine-5lj3</b> | ARG136                                       | 1.85   | ARG76<br>ILE78<br>PRO79,<br>ALA47                   | GLU50  | /                                   | /                          | HIS55                         |
| <b>Analogue 08</b>   | ARG136<br>ASP73                              | 2.15<br>2.93<br>2.20                                 | VAL71<br>VAL43<br>ARG76<br>ILE78<br>HIS55           | VAL167<br>GLU50  |                                     | ASN46                      | /                             |
| <b>Analogue 09</b>   | ARG136                                       | 2.71   | ARG76<br>ALA47<br>VAL120<br>VAL167<br>ARG76         | HIS55<br>GLU50   | /                                   | /                          | /                             |
| <b>Analogue 10</b>   | GLY77  | 1.83   | ALA47<br>VAL43<br>VAL167<br>ILE78<br>PRO79<br>ARG76 | ARG136<br>THR165   |                                     | ASN46                      | VAL71                         |

| Analogues   | Interaction de liaison hydrogène (HB) | Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB | Interaction de Pi-alkyl Alkyl                       | l'interaction en forme de Pi-Sigma Pi-anion Pi-cation | Interaction de van der Waals | Pi-Pi Staked Shaped      | Carbon hydrogène bond |
|-------------|---------------------------------------|---|---|---|------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Analogue 13 | ARG136<br>GLY77                       | 2.70<br>1.98                                  | ALA47<br>VAL43<br>VAL167<br>ILE78<br>PRO79<br>ARG76 | THR165  |                              | ASN46                    | VAL71                 |
| Analogue 15 | ARG136                                | 2.30  | VAL43<br>VAL71<br>PRO79<br>ALA47<br>VAL167          | ARG136<br>ASP73                                       | /                            | /                        | /                     |
| Analogue 17 | ARG136<br>ASP73                       | 1.88/2.87<br>1.99                             | ARG76<br>VAL43<br>VAL167<br>VAL71<br>PRO79          | GLU50   | /                            | VAL167<br>ASN46<br>HIS55 | HIS55                 |

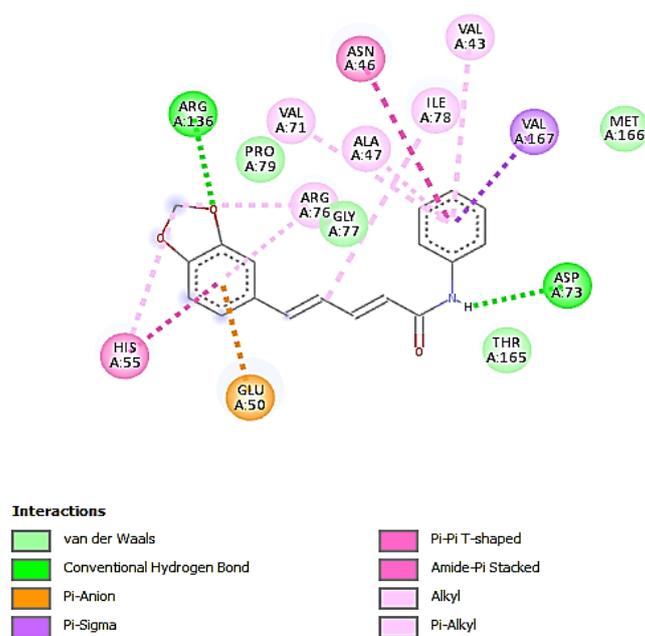
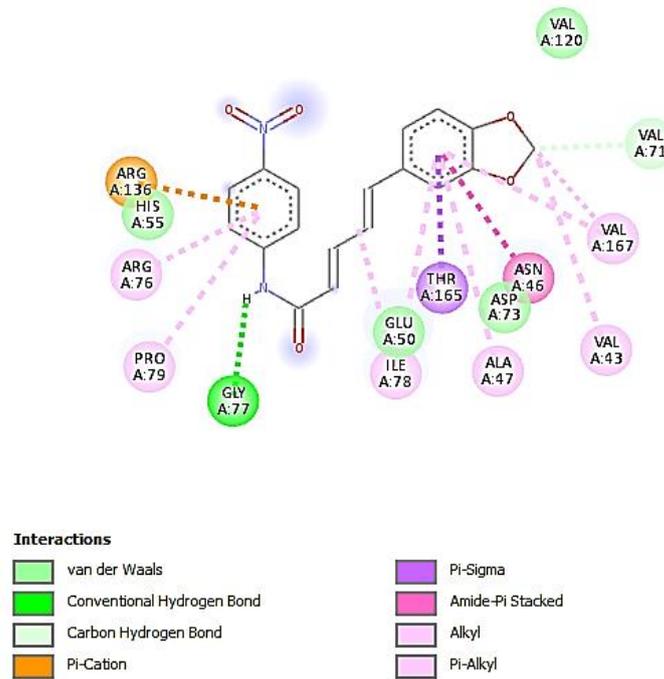
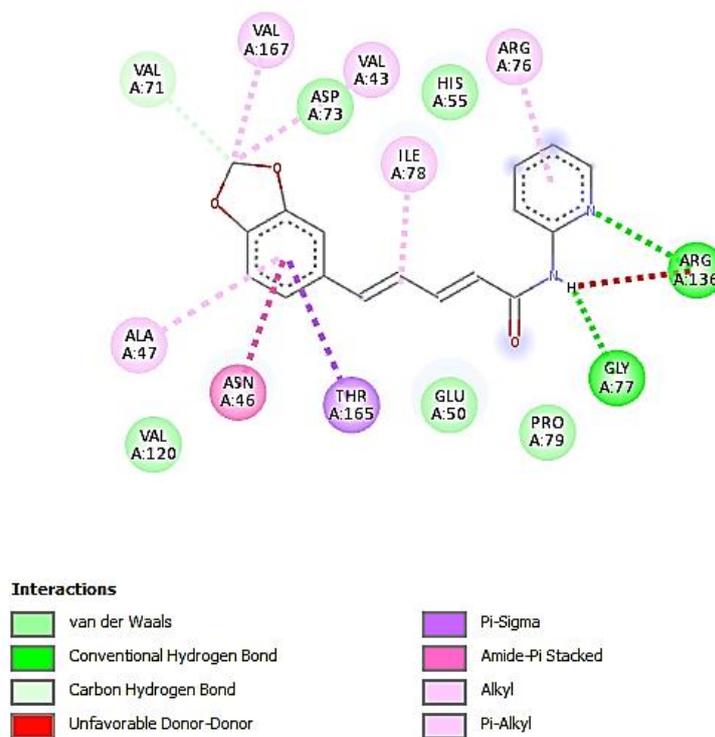


Figure 121 : Pose 2D de l'analogues 8 sur le site actif de la protéine 5lj3.



**Figure 122** : Pose 2D de l'analogues 10 sur le site actif de la protéine 5lj3.



**Figure 123** : Pose 2D de l'analogues 13 sur le site actif de la protéine 5lj3.

❖ **Discussion :**

Selon le tableau ci-dessus l'interaction des 6 analogues avec la protéine 5lj3 se fait par le biais d'une liaison hydrogène similaire à la pipérine avec le résidu ARG136. Aussi, les composés ont établi d'autres liaisons hydrogènes avec les résidus GLY77 et ASP73, de même les 6 complexes sont stabilisés par des liaisons hydrophobes et carbone hydrogènes similaires à celle de la pipérine (ARG76, ILE78, PRO79, ALA47, HIS55). (Figures 121,122 et 123)

**Tableau 33 :** Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition de la protéine *Pseudomonas aeruginosa* (6m1s), par les meilleurs analogues.

| <b>Analogues</b>     | <b>Interaction de liaison hydrogène (HB)</b> | <b>Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB</b> | <b>Interaction de Pi-alkyl Alkyl</b>                             | <b>l'interaction en forme de Pi-Sigma Pi-anion Pi-cation</b> | <b>Interaction de van der waals</b> | <b>Pi-Pi Staked Shaped</b> | <b>Carbon hydrogène bond</b> |
|----------------------|--|--|--|--|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| <b>Pipérine-6m1s</b> | <b>SER 49</b>                                | <b>2.71</b>  | <b>PRO81<br/>ILE80<br/>VAL122<br/>VAL169<br/>VAL49<br/>ARG78</b> | <b>GLU52</b>   | /                                   | /                          | <b>VAL45</b>                 |
| <b>Analogue 8</b>    | ARG138                                       | 1.80   | PRO81<br>ILE80<br>ARG78<br>VAL45                                 | THR167<br>ARG78  | /                                   | /                          | /                            |
| <b>Analogue 9</b>    | THR167                                       | 2.02   | VAL122<br>PRO81<br>ILE80   | ARG78  | /                                   | /                          | /                            |
| <b>Analogue 10</b>   | ARG78<br>ARG138<br>VAL122                    | 3.00<br>1.98<br>2.03                                 | PRO81<br>ILE80<br>ILE96<br>LEU100                                | ARG78  | /                                   | /                          | ARG78<br>GLY121              |
| <b>Analogue 13</b>   | ARG78<br>ARG138<br>GLY79                     | 2.66<br>1.86<br>2.02                                 | PRO81<br>ILE80<br>VAL45<br>VAL122<br>VAL169                      | ARG78<br>ARG138<br>ASN48<br>THR167                           | /                                   | /                          | /                            |

| Analogues   | Interaction de liaison hydrogène (HB) | Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB | Interaction de Pi-alkyl Alkyl               | l'interaction en forme de Pi-Sigma Pi-anion Pi-cation | Interaction de van der Waals | Pi-Pi Staked Shaped | Carbon hydrogène bond |
|-------------|---------------------------------------|---|---|---|------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Analogue 15 | GLY79<br>ARG78<br>ARG138              | 1.91<br>2.87<br>2.20                          | VAL45<br>VAL122<br>ILE80<br>VAL169<br>PRO81 | ARG78<br>ARG138<br>ASN48<br>THR167                    | /                            | /                   | /                     |
| Analogue 17 | ARG138                                | 1.73  | VAL73<br>ARG78<br>ILE80<br>PRO81<br>VAL169  | GLU52<br>ARG78<br>THR167                              | /                            | /                   | /                     |

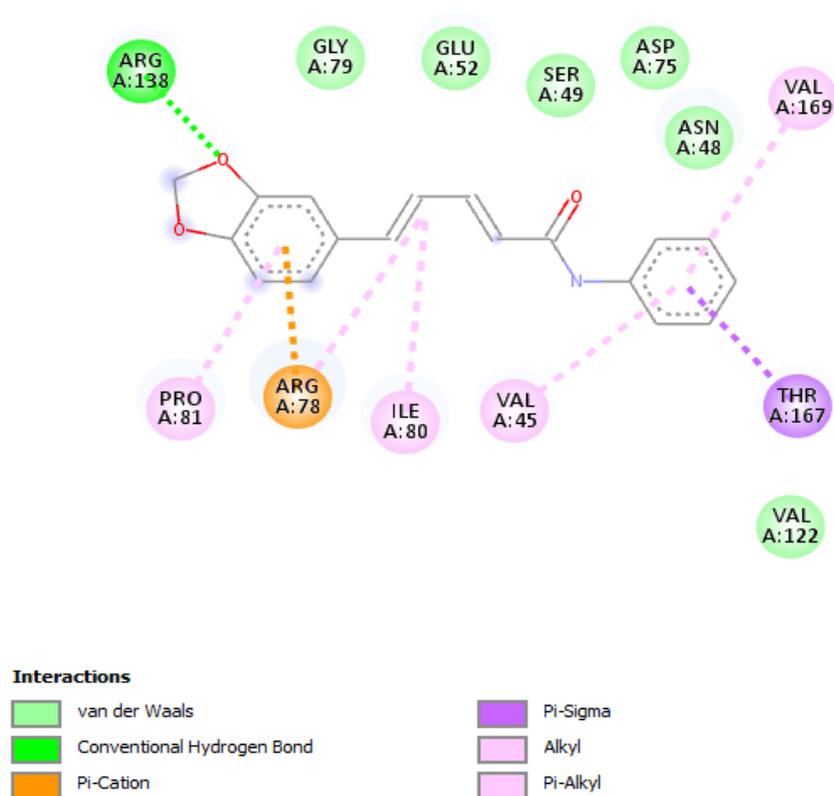
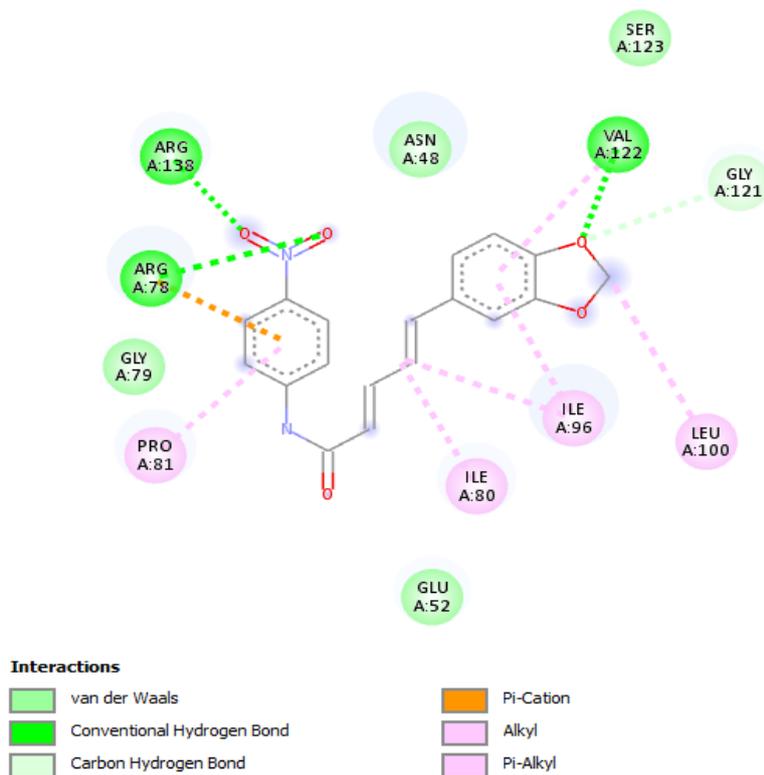
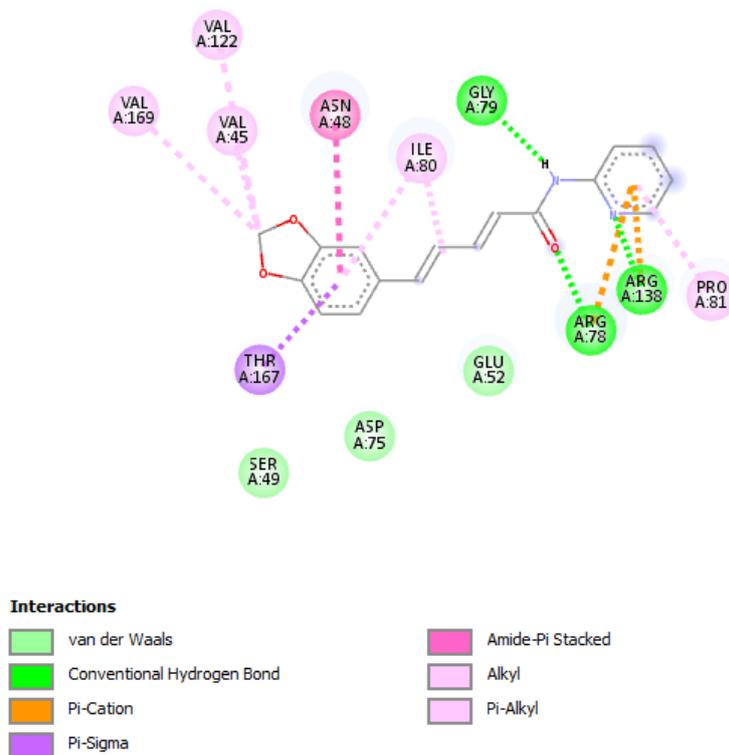


Figure 124 : Pose 2D de l'analogue 8 sur le site actif de la protéine 6m1s.



**Figure 125** : Pose 2D de l'analogue 10 sur le site actif de la protéine 6m1s.



**Figure 126** : Pose 2D de l'analogue 13 sur le site actif de la protéine 6m1s.

❖ Discussion :

Selon le tableau ci-dessus les complexes entre les 6 analogues et le 6mls se font par la formation de plusieurs liaisons hydrogènes au niveau des résidus ARG78, ARG138, GLY79 avec des distances inférieures à celle établit avec la pipérine, de même les complexes sont stabilisés par plusieurs interactions hydrophobiques PRO81, ILE80, VAL122, VAL169, VAL49, ARG78 similaires à celle de la pipérine. (Figure 124,125 et 126)

**Tableau 34** : Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition de la protéine *Staphylococcus Aureus* (3vsl), par les meilleurs analogues.

| Analogues     | Interaction de liaison hydrogène (HB)          | Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB | Interaction de Pi-alkyl Alkyl        | l'interaction en forme de Pi-Sigma<br>Pi-anion<br>Pi-cation | Interaction de van der waals | Pi-Pi Staked Shaped | Carbon hydrogène bond<br>Pi hydrogène bond |
|---------------|--|---|--------------------------------------|---|------------------------------|---------------------|--|
| Pipérine-3vsl | SER429<br>GLY629                               | 3,34<br>2,22                                  | ILE522                               | /   | /                            | /                   | /  |
| Analogue 8    | GLU623   | 2.11  | PRO659<br>VAL632<br>HIS447<br>TYR430 | TYR430<br>GLU623  | /                            | /                   | /  |
| Analogue 9    | HIS447<br>THR603<br>VAL624                     | 2.93<br>1.95<br>2.45                          | VAL632<br>PRO659<br>PRO630<br>PRO661 | GLU623  | /                            | /                   | /  |
| Analogue 10   | THR603<br>THR619<br>THR621<br>LYS618<br>VAL624 | 1.91<br>2.77<br>2.01<br>2.76<br>2.69          | PRO659<br>PRO630<br>VAL632           | GLU623  | /                            | /                   | GLU623                                     |
| Analogue 13   | THR621<br>PRO659                               | 2.32<br>2.03                                  | PRO630<br>PRO661<br>VAL632           | GLU623  | /                            | /                   | /  |

| Analogues   | Interaction de liaison hydrogène (HB) | Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB | Interaction de Pi-alkyl Alkyl        | Interaction en forme de Pi-Sigma Pi-anion Pi-cation | Interaction de van der Waals | Pi-Pi Staked Shaped | Carbon hydrogène bond      |
|-------------|---------------------------------------|---|--------------------------------------|---|------------------------------|---------------------|----------------------------|
| Analogue 15 | PRO659                                | 2.19  | PRO630<br>VAL632<br>PRO659<br>PRO661 | GLU623  | /                            | /                   | /                          |
| Analogue 17 | SER448<br>THR603                      | 2.58<br>1.66                                  | /                                    | /   | /                            | /                   | ARG428<br>SER429<br>THR621 |

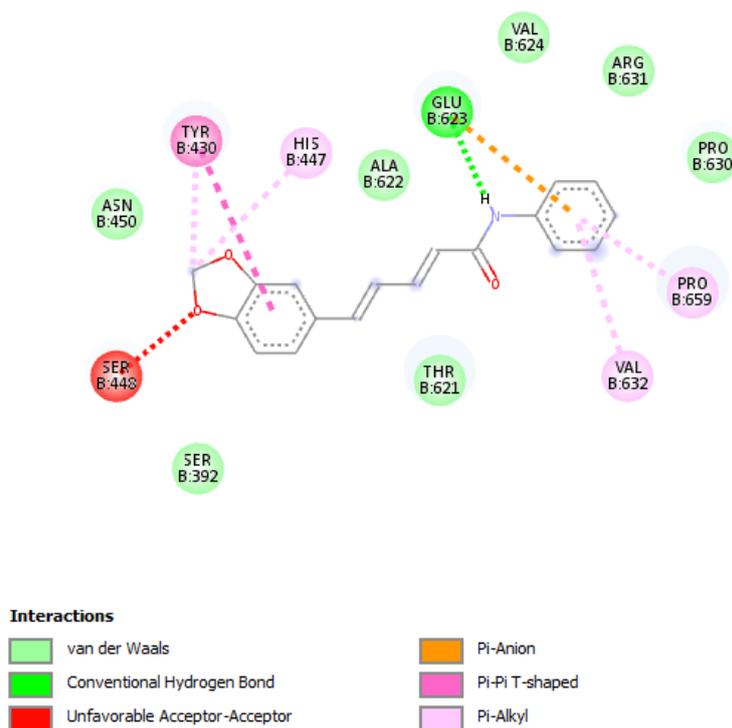
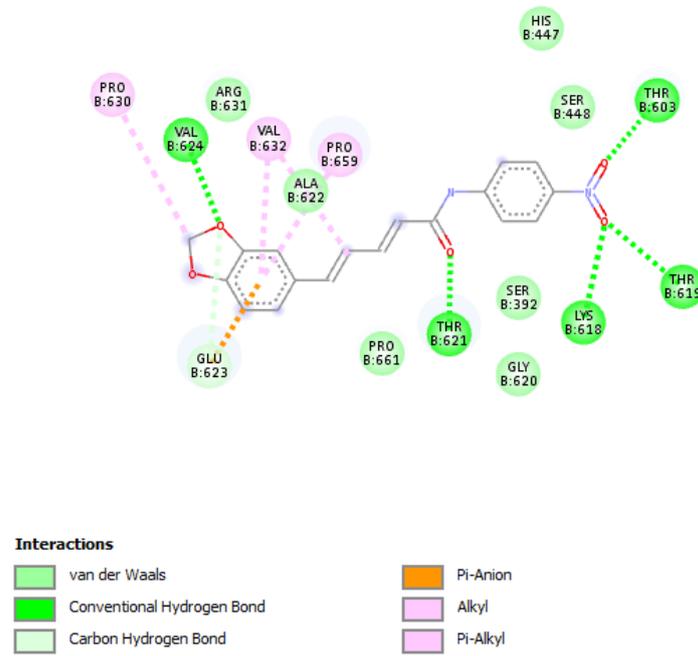
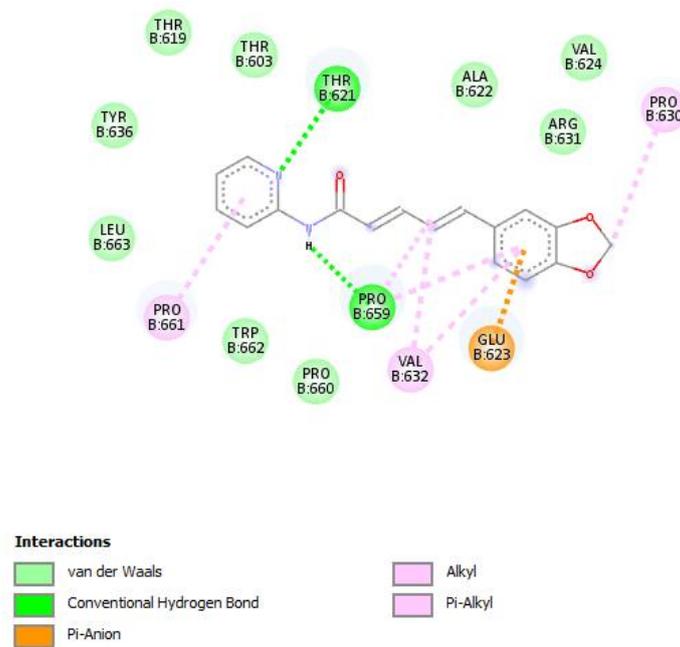


Figure 127 : Pose 2D de l'analogue 8 sur le site actif de la protéine 3vsl.



**Figure 128** : Pose 2D de l'analogue 10 sur le site actif de la protéine 3vsl.



**Figure 129** : Pose 2D de l'analogue 13 sur le site actif de la protéine 3vsl.

❖ **Discussion :**

Selon le tableau ci-dessus tous les analogues ont établi des liaisons hydrogènes similaires à celles de la pipérine avec les résidus SER429, GLY629. Il faut noter que les analogues ont établi aussi d'autres liaisons hydrogènes avec les résidus ALA622, THR603, SER448, PRO659, LYS427, GLU623, THR603, THR619, THR621, LYS618, VAL624. Les 6 complexes sont aussi stabilisés par de nombreuses interactions hydrophobiques (PRO630, VAL632, PRO659, PRO661) et carbone hydrogène (ARG428, SER429, THR621, GLU623) contrairement à la pipérine. (Figure 127,128 et 129)

**Tableau 35 :** Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition de la protéine *Bacillus subtilis* (3zih), par les meilleurs analogues.

| Analogues            | Interaction de liaison hydrogène (HB) | Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB | interaction de Pi-alkyl Alkyl             | l'interaction en forme de Pi-Sigma Pi-anion Pi-cation | Interaction de van der waals | Pi-Pi Staked Shaped | Carbon hydrogène bond   |
|----------------------|---------------------------------------|---|---|---|------------------------------|---------------------|-------------------------|
| <b>Pipérine-3zih</b> | <b>ARG94</b>                          | <b>2.43</b>                                   | <b>ILE78<br/>ARG 70</b>                   | <b>GLU68<br/>ARG 70</b>                               | /                            | /                   | <b>GLU 74<br/>SER67</b> |
| <b>Analogue 8</b>    | ARG94<br>GLU74                        | 1.93<br>2.10                                  | PRO69<br>ILE78                            | GLU77<br>ARG94<br>SER67                               | /                            | /                   | /                       |
| <b>Analogue 9</b>    | ARG94                                 | 1.97  | PRO69                                     | ARG94<br>GLU68<br>GLU77                               | /                            | /                   | SER67                   |
| <b>Analogue 10</b>   | ARG70<br>GLU68                        | 1.90<br>2.66<br>3.05                          | HIS81<br>ILE78<br>VAL65<br>PRO69<br>HIS81 | GLU68<br>GLU77  | /                            | /                   | /                       |
| <b>Analogue 13</b>   | GLU69<br>GLU74                        |   | PRO69<br>ILE78                            | ARG94<br>GLU77<br>SER69                               | /                            | /                   | /                       |

| Analogues   | Interaction de liaison hydrogène (HB) | Longueur de liaison (Å) pour l'interaction HB | Interaction de Pi-alkyl Alkyl    | Interaction en forme de Pi-Sigma Pi-anion Pi-cation | Interaction de van der Waals | Pi-Pi Staked Shaped | Carbon hydrogène bond |
|-------------|---------------------------------------|---|----------------------------------|---|------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Analogue 15 | GLU68<br>ARG70                        | 1.79<br>1.92/2.88                             | ARG94<br>ILE78<br>HIS81          | GLU77   | /                            | /                   | /                     |
| Analogue 17 | ARG94<br>ARG70<br>GLU68               | 2.73<br>1.79/3.00<br>2.16                     | HIS81<br>VAL65<br>ILE78<br>PRO69 | GLU77<br>SER67                                      | /                            | /                   | ARG70                 |

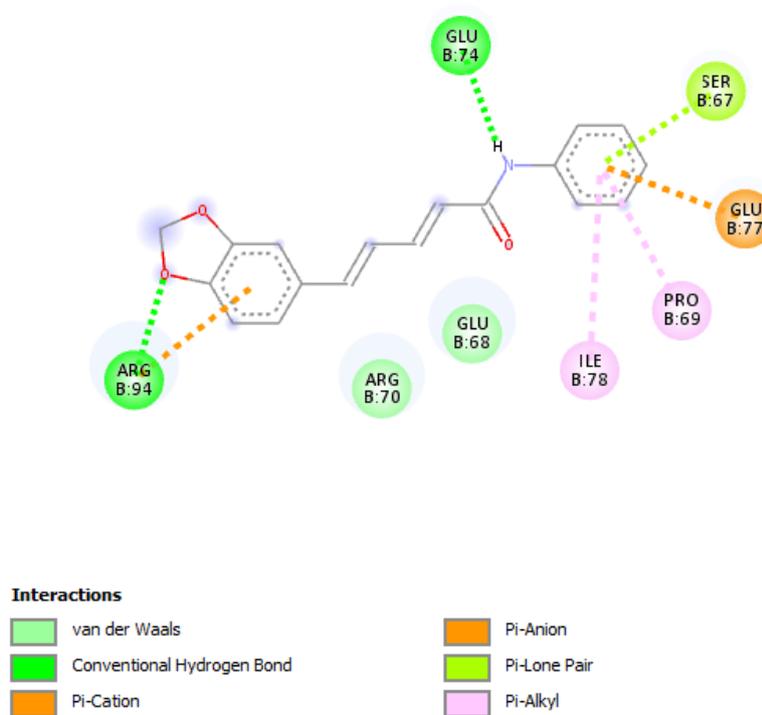
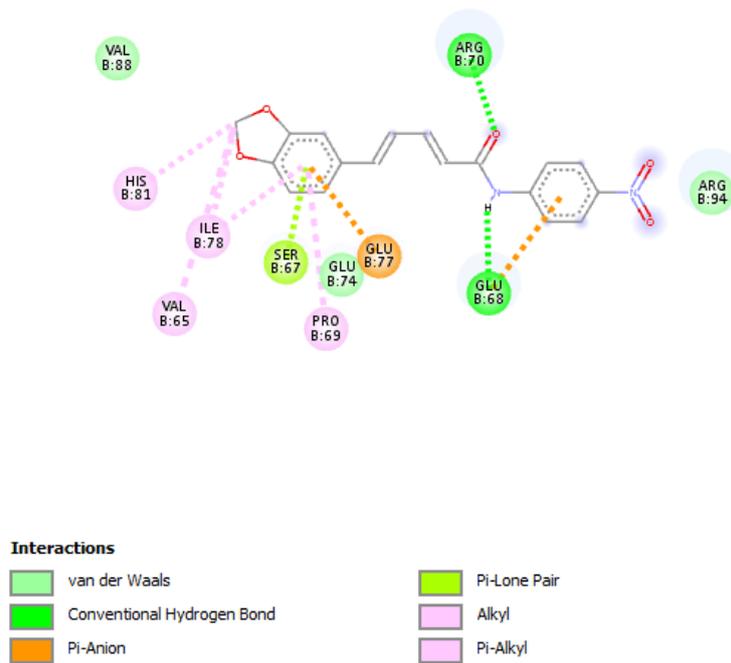
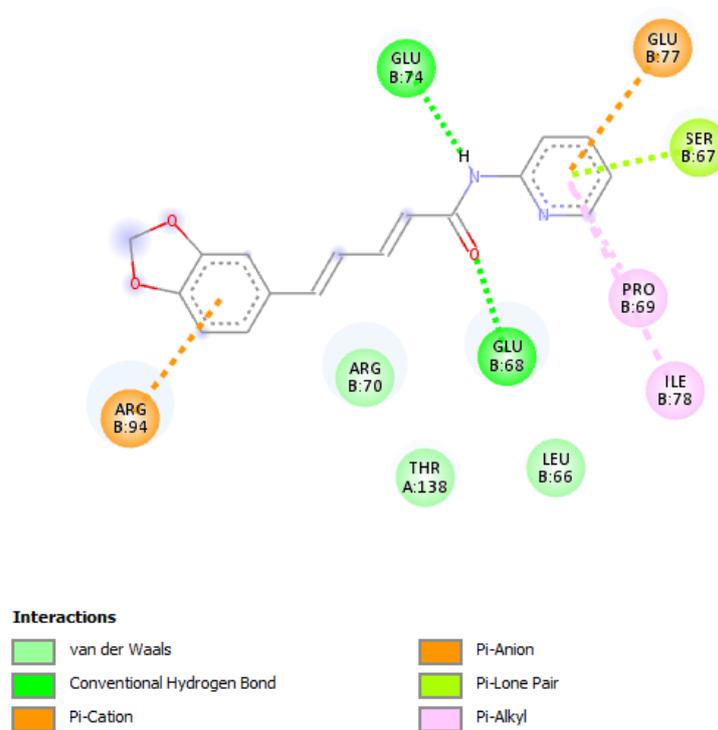


Figure 130 : Pose 2D de l'analogue 8 sur le site actif de la protéine 3zih.



**Figure 131** : Pose 2D de l’analogue 10 sur le site actif de la protéine 3zih.



**Figure 132** : Pose 2D de l’analogue 13 sur le site actif de la protéine 3zih.

❖ **Discussion :**

Selon le tableau ci-dessus la pipérine et la plupart de ses analogues établissent une liaison hydrogène avec le résidu ARG94. Il faut noter que les analogues établissent aussi d'autres liaisons hydrogènes avec les résidus GLU74, ARG70, GLU68. De même les 6 complexes sont stabilisés par des liaisons hydrophobiques similaires à celles de la pipérine avec les résidus ILE78, ARG 70. Aussi on a observé avec les 6 analogues d'autres interactions hydrophobiques avec les résidus SER67, ARG70, GLU68, GLU77, PRO68, HIS81. (Figure 130, 131 et 132)

**III.6.4. Etude de dynamique moléculaire des meilleurs analogues avec la cyclooxygénase 2 (COX2) :**

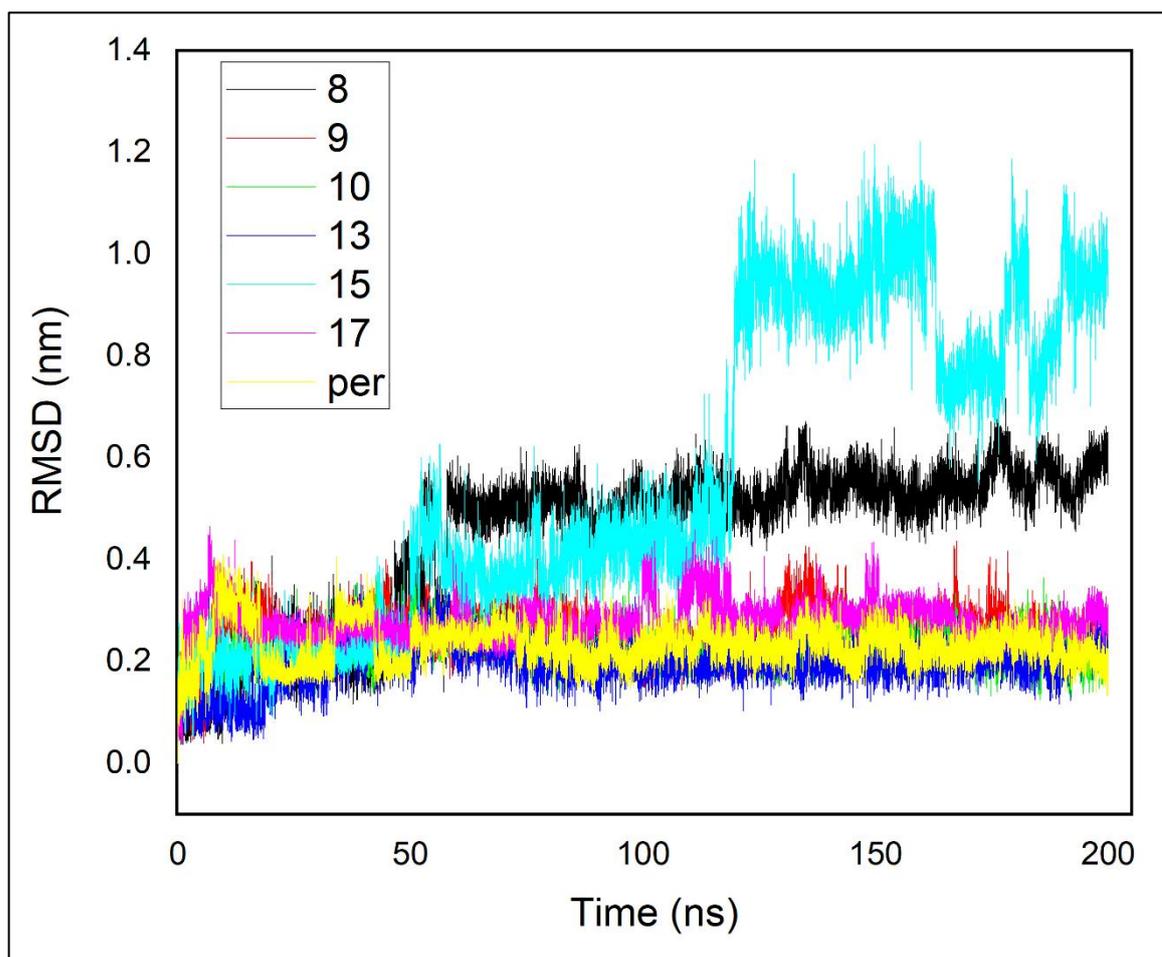
Le travail a été réalisé en collaboration avec le Centre de recherche en sciences pharmaceutiques et le Laboratoire de Physique Mathématique et Subatomique (LPMS), Département de Chimie, Université Constantine 1 Frères Mentouri.

La simulation MD est une technique largement utilisée dans diverses applications biologiques pour simuler des perturbations structurelles et physiologiques tout en considérant la mobilité en temps réel des complexes. De plus, les trajectoires obtenues à partir de la simulation offrent des informations précieuses et détaillées sur la stabilité des complexes ligand-récepteur et leurs interactions moléculaires. Pour évaluer la stabilité des composés, les paramètres RMSD, RMSF et Rg du squelette des ligands sélectionnés L8, L9, L10, L13, L15, et L17 à scores d'amarrage élevés, ainsi que du Pipérine ligand de référence avec les cibles de la COX 2 (PDB ID : 1CVU), ont été calculés sur la base de leurs coordonnées initiales.

Les résultats des simulations RMSD, RMSF et Rg, pour les ligands sélectionnés, par rapport à la protéine libre, sont représentés sur les figures 133, 134 et 135 respectivement. Il est à noter que les trajectoires résultant des RMSD, RMSF et Rg ont été analysées plus en détails à l'aide des utilitaires `g_rmsd`, `g_rmsf` et `g_gyrate` de GROMACS.

De plus, l'écart moyen de l'atome dans la simulation par rapport à une position de référence est reflété par les valeurs RMSF, qui représentent la stabilité thermodynamique et le taux de mobilité de tous les résidus et sont illustrées à la figure N°134.

### III.6.4.1. Analyse détaillée du RMSD (Root Mean Square Deviation) :



**Figure 133** : RMSD de la protéine avec des ligands à 100 ns de temps de simulation.

La figure 133 montre que le RMSD des ligands de notation N7, N9, 1q sélectionnés avec la kinase COX2 varient de 0,10 à 0,60 nm et atteignent une stabilité satisfaisante après les 50 premières ns de simulation. On peut noter que les techniques de simulation MD et d'amarrage sont souvent considérées comme satisfaisantes si la plage d'écart RMSD ne dépasse pas 2Å.(241) Une telle fluctuation modérément élevée des valeurs RMSD n'est pas inattendue. En effet, des seuils de 2Å peuvent être utilisés pour sélectionner des structures représentatives dans les simulations de dynamique moléculaire.

De plus, pour évaluer pleinement la stabilité des systèmes biomoléculaires, les valeurs moyennes du RMSD doivent être utilisées en conjonction avec d'autres analyses et données expérimentales, car elles dépendent du contexte (242). Un bon indicateur dans les simulations de protéines globulaires bien repliées est souvent un RMSD de 1 à 2 Å (0,1 à 0,2 nm). Des RMSD plus élevés peuvent être observés dans les simulations de protéines intrinsèquement désordonnées ou partiellement dépliées, généralement de 2 à 5 Å (0,2 à 0,5 nm) ou plus (243).

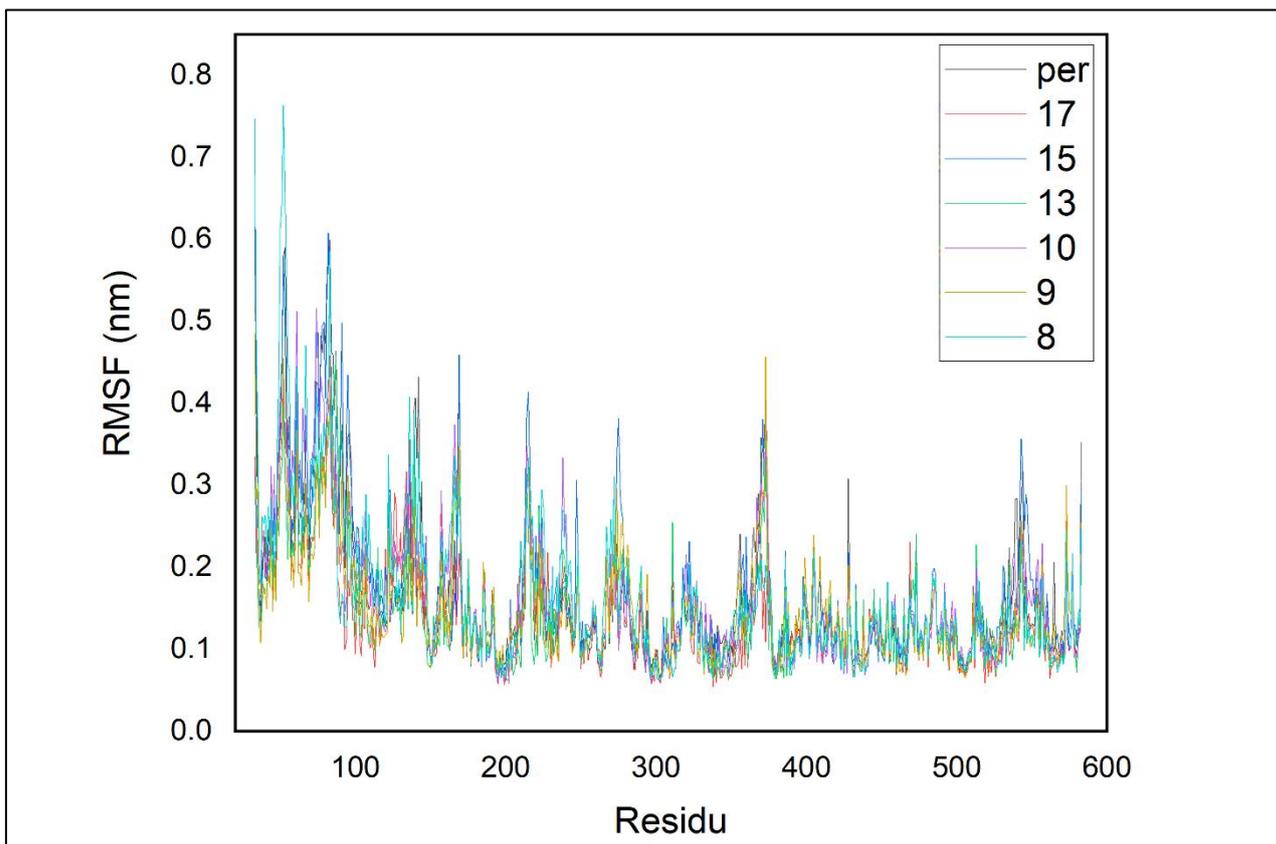
### Interprétation spécifique pour chaque analogue :

- **Pipérine ("per")** : Le RMSD de la pipérine reste stable aux alentours de 0,3 nm pendant la majeure partie de la simulation. Cela signifie que la pipérine conserve globalement sa structure, ce qui est cohérent avec la stabilité attendue de cette molécule.
- **Analogue 08** : Affiche un comportement intermédiaire. Il y a une légère augmentation du RMSD autour de 50 ns, suggérant des réarrangements, mais le RMSD se stabilise ensuite autour de 0,4 nm.
- **Analogue 09** : Montre des variations de RMSD plus importantes dans les premiers 100 ns, atteignant 0,45 nm, avant de se stabiliser. Cela peut indiquer une légère réorganisation structurale avant que l'analogue ne se stabilise.
- **Analogue 10** : Présente une stabilité similaire à celle de la pipérine, avec des valeurs proches de 0,35 nm. Cet analogue est également très stable, ce qui est un indicateur favorable pour son comportement dans des conditions similaires.
- **Analogue 13** : Présente un profil similaire à celui de la pipérine, avec un RMSD stable autour de 0,35-0,4 nm. Cela suggère que cet analogue est également très stable dans les mêmes conditions que la pipérine, ce qui pourrait indiquer une forte similarité.
- **Analogue 15** : Ce composé montre une grande instabilité, avec un RMSD atteignant 1,2 nm après 100 ns. Cela peut être dû à un réarrangement structurel significatif, ou à un changement dans sa conformation, ce qui suggère que cet analogue est moins stable que les autres.
- **Analogue 17** : Montre une augmentation progressive du RMSD, atteignant 0,6 nm, mais reste globalement plus stable que l'analogue 15. Il montre cependant une certaine flexibilité ou réorganisation structurale vers la fin.

Ces résultats issus des simulations RMSD indiquent que les ligands à score élevé (09, 10, 13 et 17, ainsi que, dans une moindre mesure, le 08), y compris le ligand pipérine (per), présentent une forte affinité pour les résidus du site actif de la cible COX2. En revanche, le ligand 15 se distingue par des complexes prédits comme étant moins stables dans un environnement physiologique.

**III.6.4.2. Analyse détaillée du RMSF (Root Mean Square Fluctuation) :**

L'analyse RMSF de la figure 134 représente l'écart moyen de l'atome dans la simulation par rapport à une position de référence. Malgré l'existence de diverses fluctuations élevées rapportées dans d'autres travaux (244), le RMSF des complexes est notamment similaire, avec des valeurs moyennes inférieures à 2.0 Å, ce qui suggère que les ligands ne subissent pas de changements majeurs de conformation le long de la simulation.



**Figure 134 :** Les Fluctuations quadratiques moyennes des ligands.

**Interprétation de la flexibilité locale :**

- Le RMSF montre la fluctuation locale de chaque résidu au cours du temps. Les valeurs plus élevées du RMSF indiquent des régions plus mobiles de la molécule.
- **Résidus entre 100 et 200 :** Pour tous les analogues, les résidus dans cette région présentent des fluctuations relativement élevées, atteignant jusqu'à 0,6 nm. Cela pourrait correspondre à une région flexible ou à une boucle dans la structure, ce qui est un comportement typique des régions non structurées.

- **Résidus entre 300 et 500** : Cette zone montre également des pics de fluctuation, bien que moins prononcés. Les fluctuations ici sont plus modérées et se situent entre 0,2 et 0,4 nm pour la plupart des analogues.
- **Pipérine ("per")** : La pipérine montre un profil de fluctuation très similaire à celui des analogues 08, 09 et 10 et 13 avec des fluctuations maximales autour de 0,4 nm dans les régions critiques, suggérant que ces analogues conservent des propriétés flexibles similaires.
- **Analogue 15** : Cet analogue montre également des fluctuations plus élevées dans certaines régions, ce qui peut expliquer son RMSD plus élevé et sa plus grande flexibilité globale.
- **Analogue 17** : Montre des fluctuations relativement faibles dans l'ensemble.

Cependant, pour s'adapter aux ligands et maintenir l'équilibre, les résidus flexibles dans les régions de liaison au ligand subissent une légère altération lors de la reconnaissance. Pour tous les complexes, les valeurs RMSF moyennes prévues, allant de 0,10 à 0,30 nm, montrent que les résidus du site actif ne sont pas affectés de manière significative par la liaison des ligands, avec une fluctuation légèrement plus élevée de la protéine native.

#### III.6.4.3. Analyse détaillée du rayon de giration ( $R_g$ ) :

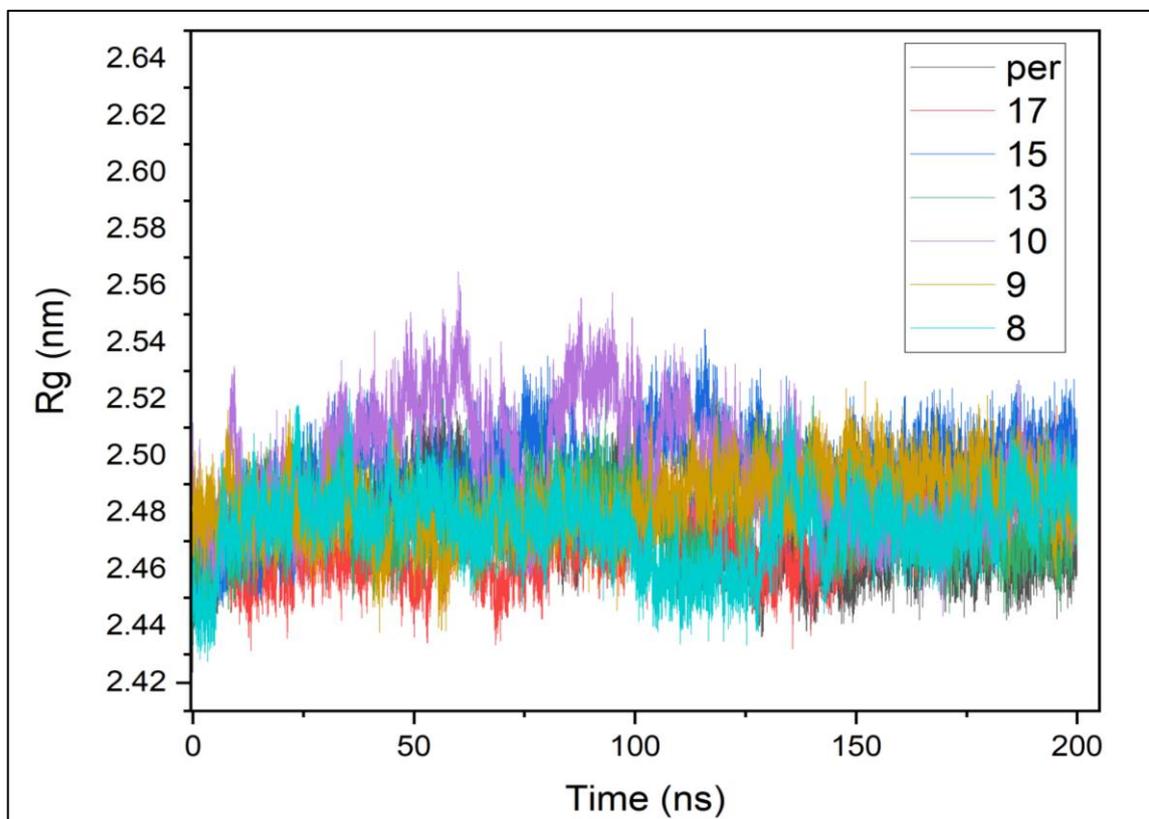


Figure 135 : Rayon de giration de la protéine COX – ligands.

### Interprétation de la compacité moléculaire :

Le rayon de giration ( $R_g$ ) mesure la compacité de la molécule tout au long de la simulation. Une augmentation du  $R_g$  peut indiquer un dépliement ou une expansion de la molécule, tandis qu'une diminution du  $R_g$  indique un compactage.

- **Pipérine ("per") et analogues 09, 10, 13** : Ces composés montrent une  $R_g$  assez constante, autour de 2,44-2,50 nm. Cela signifie qu'ils maintiennent une compacité similaire pendant la simulation, ce qui suggère qu'ils ne subissent pas de changements conformationnels majeurs.
- **Analogue 08** : Montre une légère compaction au début de la simulation avec une  $R_g$  inférieure à celle des autres analogues, mais elle revient à des valeurs similaires après 50 ns.
- **Analogue 15** : Cet analogue montre une grande fluctuation dans son  $R_g$ , atteignant jusqu'à 2,56 nm. Cela est cohérent avec son RMSD plus élevé, indiquant une expansion ou un réarrangement structurel.
- **Analogue 17** : A un  $R_g$  légèrement inférieur à celui des autres, mais avec moins de fluctuations, ce qui pourrait indiquer une structure plus compacte et rigide.

Les valeurs  $R_g$  demeurent cohérentes, avec une valeur moyenne de 2.45 nm pour tous les systèmes. Le léger décalage de la valeur  $R_g$  entre 2.44 et 2.54 nm, comme le montre la figure 135, indique que la compacité du complexe ligand-récepteur est largement cohérente. (244) De plus, ces résultats de valeur  $R_g$  montrent que les ligands à score élevé et leur dérivé de référence pipérine (per) assurent une liaison stable à la protéine COX2 sans provoquer de changements structurels significatifs.

En conclusion, la détermination des paramètres dynamiques tels que RMSD, RMSF et  $R_g$  au cours de la simulation constitue une étape critique dans notre analyse de la stabilité des complexes, fournissant des informations précieuses sur le comportement physiologique du système. Les résultats des simulations révèlent que les analogues 08, 09, 10, 13 et la pipérine sont les plus stables, présentant des fluctuations faibles et des conformations relativement compactes tout au long de la simulation. Ces ligands se présentent donc comme des candidats potentiels pour des études supplémentaires. En revanche, l'analogue 15 montre des signes d'instabilité significative, avec un RMSD élevé, un  $R_g$  fluctuant et des zones de flexibilité excessive, ce qui suggère qu'il pourrait ne pas être idéal pour une stabilité structurelle à long terme. L'analogue 17, quant à lui, présente des fluctuations modérées et une compacité accrue.

**III.6.5. Etude de la toxicité des meilleurs analogues :**

Dans le but de vérifier la toxicité des composés proposés, plusieurs paramètres ont été déterminés in silico.

**Tableau 36 :** Etude de la toxicité des meilleurs analogues.

| <b>Toxicité</b><br>-----<br>-----<br><b>Composé</b> | <b>Mutagénicité</b><br><b>(Ames_test)</b> | <b>algae_at</b> | <b>Carcino_</b><br><b>Mouse</b> | <b>Carcino_</b><br><b>Rat</b> | <b>Cardiotoxicité</b><br><b>(hERG_inhibition)</b> |
|---|---|-----------------|---------------------------------|-------------------------------|---|
| Diclofénac  | Mutagène                                  | 0,021           | -                               | -                             | Risque moyen                                      |
| Ciprofloxacine                                      | Mutagène                                  | 0.075           | -                               | -                             | Risque faible                                     |
| Pipérine  | Mutagène                                  | 0,045           | +                               | -                             | Risque moyen                                      |
| Analogue 8  | Mutagène                                  | 0.038           | +                               | -                             | Risque moyen                                      |
| Analogue 9  | Mutagène                                  | 0.030           | +                               | -                             | Risque moyen                                      |
| Analogue 10   | Mutagène                                  | 0.037           | +                               | -                             | Risque moyen                                      |
| Analogue 13   | Mutagène                                  | 0.053           | -                               | +                             | Risque moyen                                      |
| Analogue 15   | Mutagène                                  | 0.042           | +                               | +                             | Risque moyen                                      |
| Analogue 17   | Mutagène                                  | 0.045           | +                               | +                             | Risque moyen                                      |

D'après le tableau ci-dessus, les meilleurs analogues semblent être les suivants : **8, 09,10.**

**En raisons :**

- 1. Absence de pouvoir cancérigène :** Ces composés ont montré un résultat négatif total concernant le test sur les rongeurs.
- 2. Risque moyen vis-à-vis de l'arythmie cardiaque :** Comme pour la totalité des composés, ces trois présentent un risque moyen vis-à-vis de l'arythmie cardiaque, similaire aux autres composés.
- 3. Impact environnemental moindre :** Ces composés ont montré un taux inférieur dans les tests utilisant les espèces aquatiques comparé à la pipérine et aux deux médicaments de référence.

**III.7. Hémissynthèse des meilleurs analogues amides de l'acide pipérique (Analogues 08,09) :**

**III.7.1. Obtention de l'acide pipérique :**

**CALCUL DU RENDEMENT DE SYNTHÈSE**

Notre synthèse qui a été réalisée au sein du laboratoire de chimie thérapeutique de la faculté de médecine de Constantine, a donné les résultats suivants :

En faisant réagir 7 g de pipérine avec 40 ml d'hydroxyde de sodium, nous avons obtenu **4,66 g** d'acide pipérique.

Selon la formule pour le calcul du rendement ( $M_p/M_{Tx}100$ ) le rendement de synthèse est de **87,10%**.

**III.7.2. Obtention des amides de l'acide pipérique (Analogues 08,09) :**

**CALCUL DU RENDEMENT DE SYNTHÈSE**

Notre synthèse qui a été réalisée au sein du laboratoire de chimie thérapeutique de la faculté de médecine de Constantine et le CRSP, a donné les résultats suivants :

En faisant réagir 2,80 g d'acide pipérique avec 2,5 g d'amine voulue, nous avons obtenu les résultats présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 37** : rendement obtenu des 02 analogues synthétisés.

| <b>Produits</b>    | <b>Masse obtenue (g)</b> | <b>Masse théorique (g)</b> | <b>Rendement (%)</b> |
|--------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------|
| <b>Analogue 08</b> | <b>1.98</b>              | <b>3.06</b>                | <b>64.70</b>         |
| <b>Analogue 09</b> | <b>2.77</b>              | <b>3.95</b>                | <b>70.12</b>         |

**III.8. Identification de l'acide pipérique et de ses analogues amides hémissynthétiques :**

**III.8.1. Identification de l'acide pipérique hémissynthétique :**

**III.8.1.1. Propriétés organoleptiques :**

Solide jaune inodore, avec la présence ou l'absence de la forme cristalline. (Figure 136)



**Figure 136 :** L'aspect de l'acide pipérique hémisynthétique.

### III.8.1.2. Point de fusion :

Son point de fusion est de 217 °C. Il est conforme aux normes décrites dans les références FDS de Sigma-Aldrich (217-218°C °C.) (245) (Figure 137)



**Figure 137 :** Point de fusion de l'acide pipérique hémisynthétique.

### III.8.1.3. Analyse spectrale :

#### ❖ Analyse spectrophotométrie UV :

Pour l'acide pipérique, les pics d'absorption sont observés à 345, 309 et 204 nm, et ces pics sont dus aux transitions électroniques  $\pi-\pi^*$ . (Figure 138)

**NB :** En plus des transitions  $\pi-\pi^*$  dues à la conjugaison dans la molécule, une transition  $n-\pi^*$  (bande R), attribuable à la présence de la fonction carbonyle, est également observée. Cependant, cette dernière est masquée par la transition  $\pi-\pi^*$  (bande K), qui est plus intense.

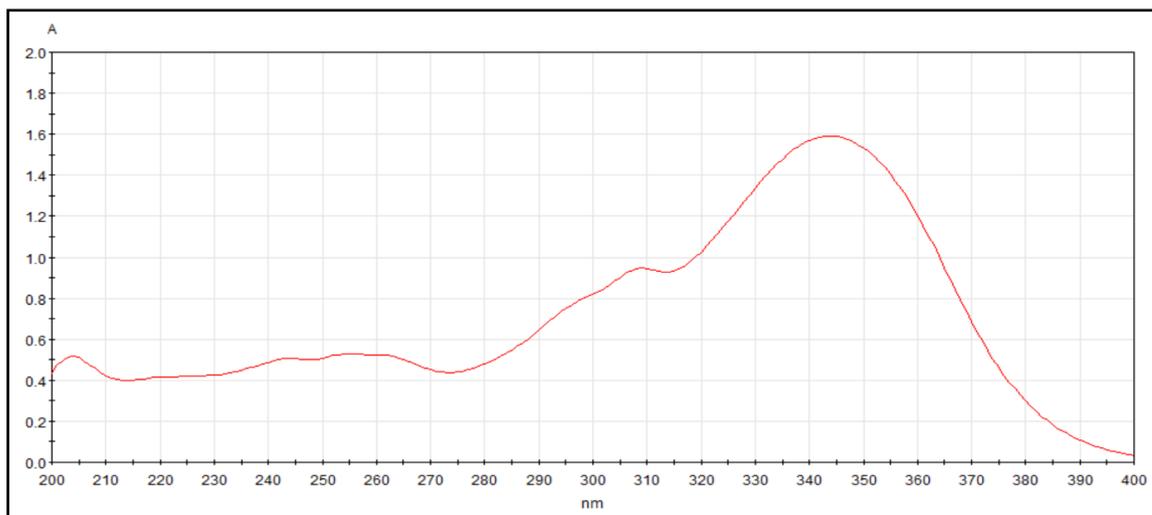


Figure 138 : le spectre UV de l'acide pipérique

❖ Discussion

Le spectre ultraviolet de l'acide pipérique montrent des bandes d'absorption a des longueurs d'onde maximales de 345 nm, 309 nm et 204 nm. Ce spectre n'est pas très différent de ce qui a été rapporté par les différents chercheurs.(246)

❖ Analyse spectrophotométrie IR :

Le spectre obtenu est comparable à celui de la référence : (Figure 139 et 140)

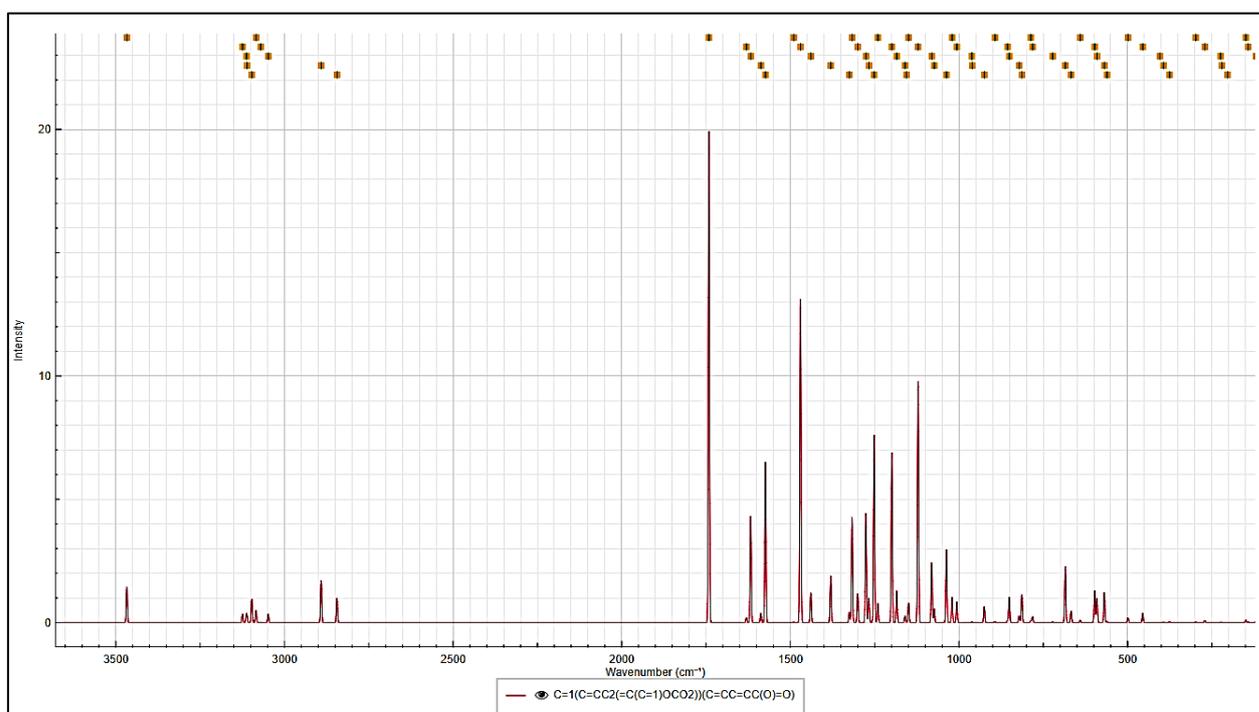


Figure 139 : Spectre IR théorique de l'acide pipérique prédit par le serveur cheminfo.(247)

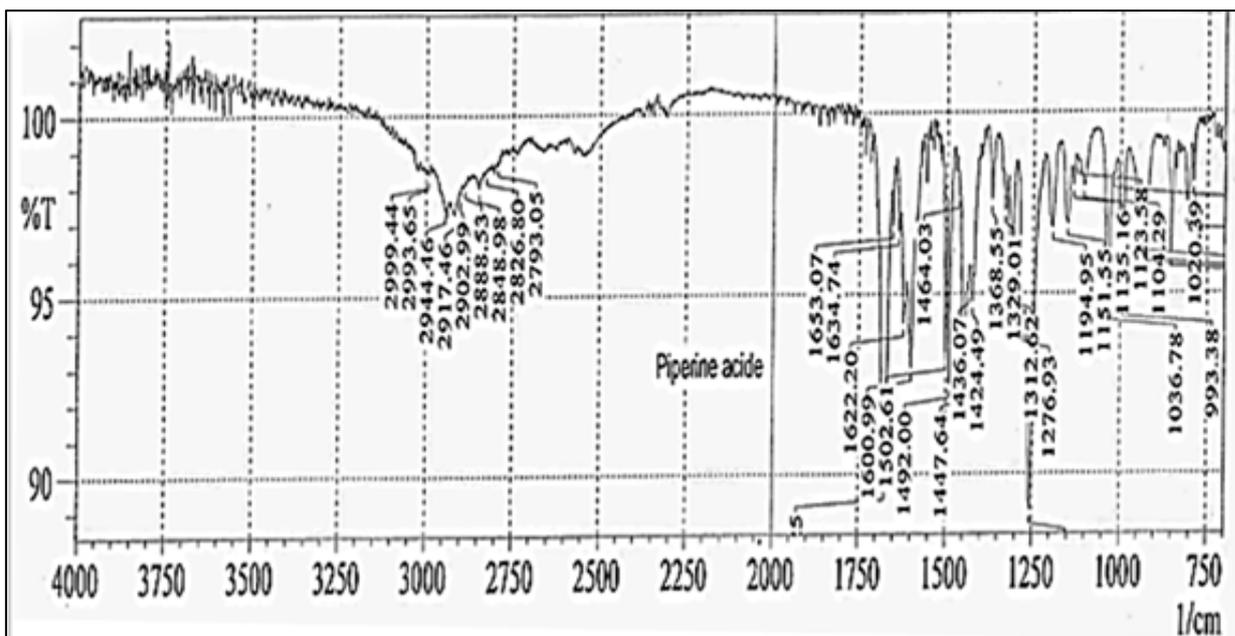


Figure 140 : Spectre IR de l'acide pipérique hémisynthétique.

Tableau 38 : Comparaison entre les pics du spectre IR expérimental et théorique pour l'acide pipérique.

| Région (cm <sup>-1</sup> ) | Spectre théorique(247)     | Spectre expérimental | Attribution possible  |
|----------------------------|----------------------------|----------------------|---|
| 3000-2900                  | Bande faible               | 2929-2914            | Étirement C-H des groupes CH <sub>2</sub> et CH <sub>3</sub> aliphatiques |
| 1700-1650                  | Bande intense (~1700)      | 1633-1622            | Étirement C=O du groupe carboxylique                                      |
| 1600-1500                  | Bande multiple             | 1464-1432            | Vibration C=C du cycle aromatique et déformation C-H                      |
| 1400-1300                  | Bande moyenne              | 1422-1370            | Déformation C-H et vibrations du cycle benzodioxole                       |
| 1300-1200                  | Bande multiple             | 1276-1200            | Vibration C-O et déformation C-H (cycle aromatique)                       |
| 1100-1000                  | Bande moyenne (~1050-1000) | 1036-993             | Étirement C-O (groupement pipéronyle)                                     |
| 1000-900                   | Bande faible (~950)        | 993-950              | Déformation hors du plan du cycle aromatique                              |

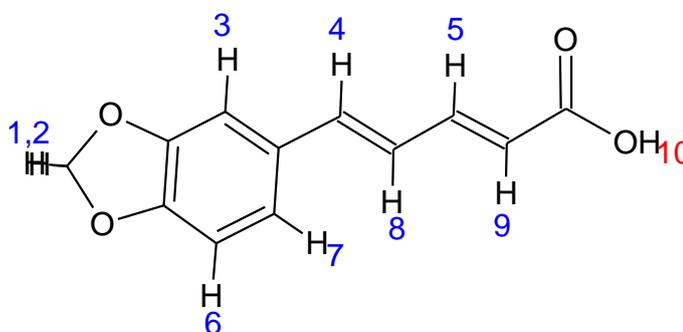
❖ *Discussion :*

Comme le montre le tableau ci-dessus, les pics de toutes les liaisons étaient présents dans les cristaux de l'acide pipérique synthétisé situés à proximité des valeurs IR standard de chaque groupe fonctionnel.

Le spectre expérimental semble bien correspondre à celui attendu pour l'acide pipérique, avec des bandes d'absorption caractéristiques qui corroborent la présence des groupes fonctionnels principaux de cette molécule (acide carboxylique, cycle aromatique pipéronyle).

❖ **Analyse spectre RMN : Acide (2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl) penta-2,4-dienoïque**

**RMN  $H^1$  :** Selon la structure de l'acide pipérique, voici les types de protons que nous attendons de trouver dans ce composé :



- **Aromatique :** Le noyau benzo[d][1,3]dioxole contient un cycle benzénique substitué par deux groupes méthylène dioxole. Les protons aromatiques devraient apparaître entre 6,5 et 8,5 ppm.
- **Protons vinyliques :** Les protons des doubles liaisons conjuguées dans le système (2E,4E) apparaîtront typiquement entre 5,5 et 7,5 ppm.
- **Protons acide carboxylique :** Le proton de l'acide carboxylique (-COOH) apparaîtra généralement entre 10 et 12 ppm, souvent sous forme d'un large singulet en raison de l'échange rapide avec le solvant. (202,231,232) (Figure 141)

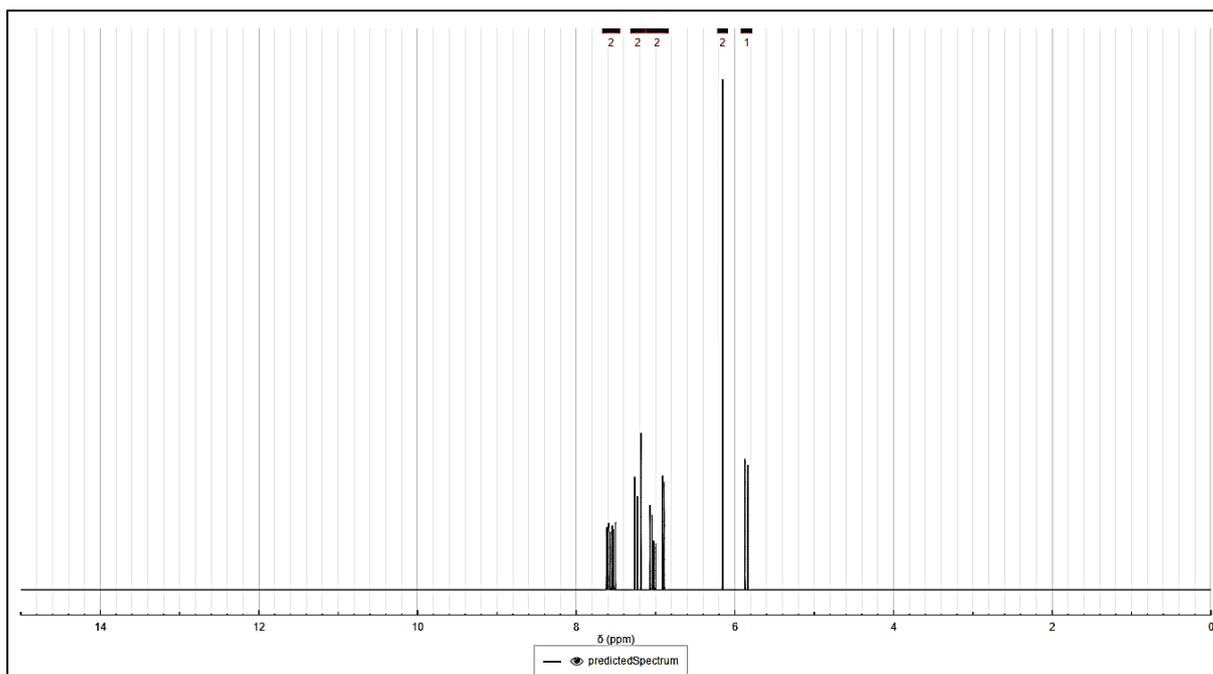


Figure 141 : Spectre RMN H<sup>1</sup> théorique de l'acide pipérique prédit par le serveur nmrdB.(232)

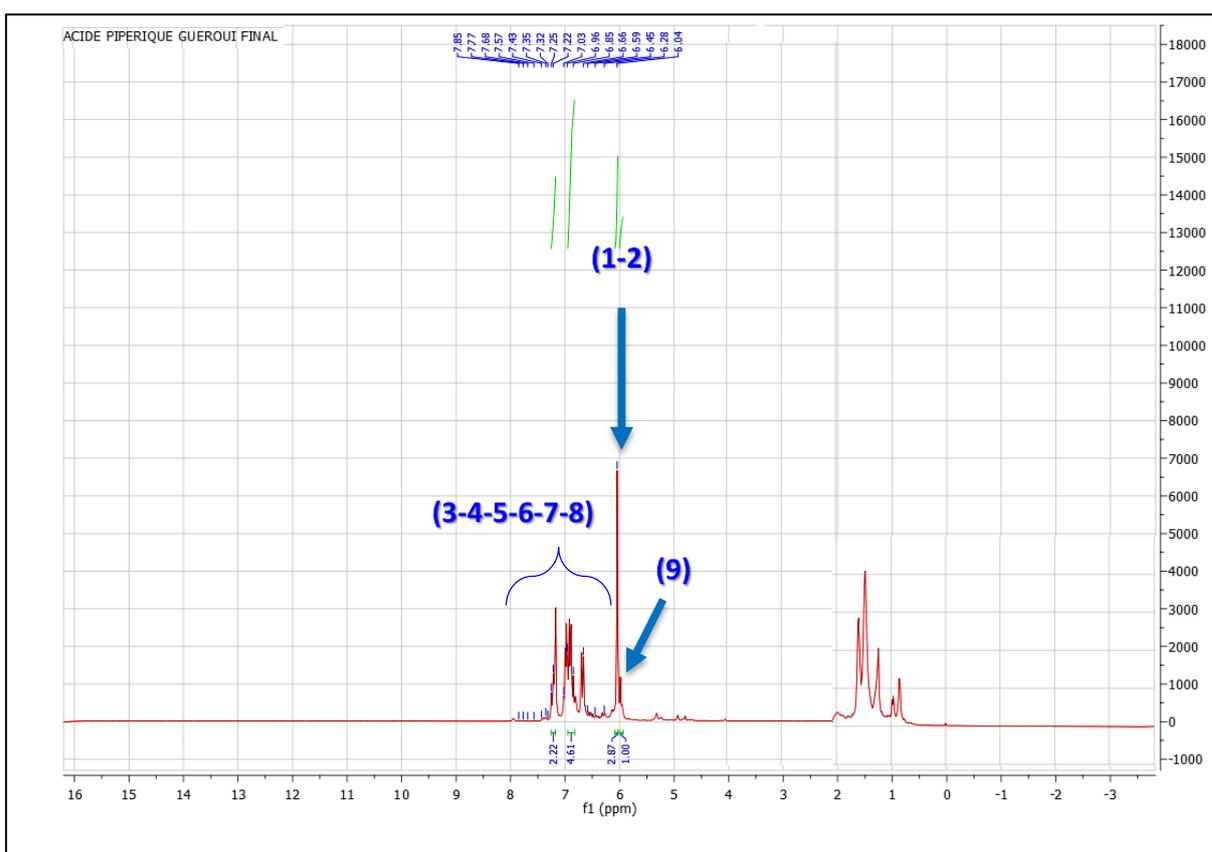


Figure 142 : Spectre RMN H<sup>1</sup> de l'acide pipérique hémisynthétique.

**Interprétation :**

Les pics dans la région **7.0 et 7.3 ppm** correspondent aux protons aromatiques du cycle benzodioxole, comme attendu dans la région aromatique typique (6.5-8 ppm).

Les pics entre **6.0 et 6.5 ppm** sont en accord avec les protons **vinyliques** des doubles liaisons (penta-2,4-diène), qui apparaissent dans cette région en raison de leur environnement conjugué.

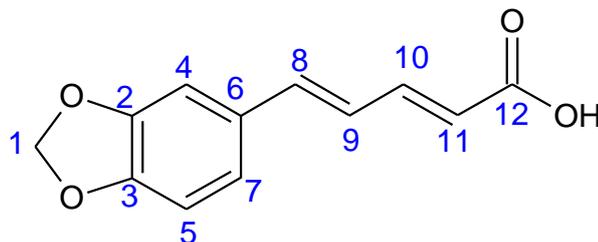
En comparant avec le spectre de la pipérine, on constate que les signaux correspondant aux protons aromatiques et vinyliques sont toujours présents, tandis que les pics associés aux protons aliphatiques du cycle pipéridine ont disparu. (Figure 142)

**Tableau 39 :** Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN H<sup>1</sup> pour l'acide pipérique.

| Région (ppm)               | Attribution possible                          | Observations  |
|----------------------------|---|---|
| <b>7.1 - 7.3</b>           | Protons aromatiques sur le cycle benzodioxole | La région entre 7.0 et 7.3 ppm montre des signaux correspondant aux protons du noyau aromatique. Typique pour les cycles benzéniques. |
| <b>6.0 - 6.5</b>           | Protons vinyliques (CH=CH)                    | Les protons vinyliques des doubles liaisons conjuguées apparaissent dans cette région.  |
| <b>Autour de 1 à 2 ppm</b> | Impuretés ou solvants résiduels               | Ces signaux faibles autour de 2 ppm sont probablement associés à des traces de solvants ou à des impuretés.                           |

Selon le tableau ci-dessus le spectre expérimental montre une bonne correspondance avec le spectre théorique, en particulier dans les régions des protons aromatiques et vinyliques. Le tableau ci-dessus met en évidence que chaque région du spectre correspond à des signaux attendus pour la molécule.

**RMN C<sup>13</sup>** : Concernant le spectre RMN C<sup>13</sup> voici les types de carbones que nous attendons de trouver dans ce composé :



▪ **Carbones aromatiques (120-160 ppm) :**

C1 et C2 (environ 120-140 ppm)

C3, C4, C5 (environ 120-140 ppm)

▪ **Carbones méthylène dioxole (100-110 ppm) :**

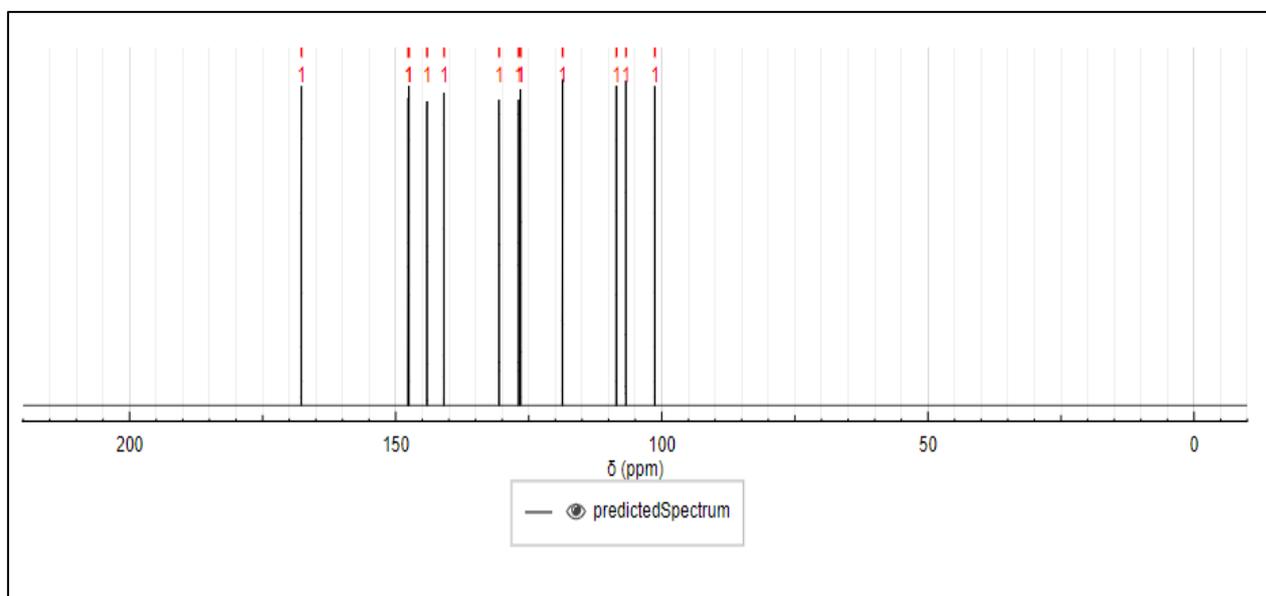
C6 et C7 (environ 100-110 ppm)

▪ **Carbones vinyliques (110-150 ppm) :**

C8 et C9 (environ 120-150 ppm)

▪ **Carbone carboxylique (160-180 ppm) :**

C10 (environ 160-180 ppm)(202,231,232) (Figure 143)



**Figure 143** : Spectre RMN C<sup>13</sup> théorique de l'acide pipérique prédit par le serveur nmrdB.(232)

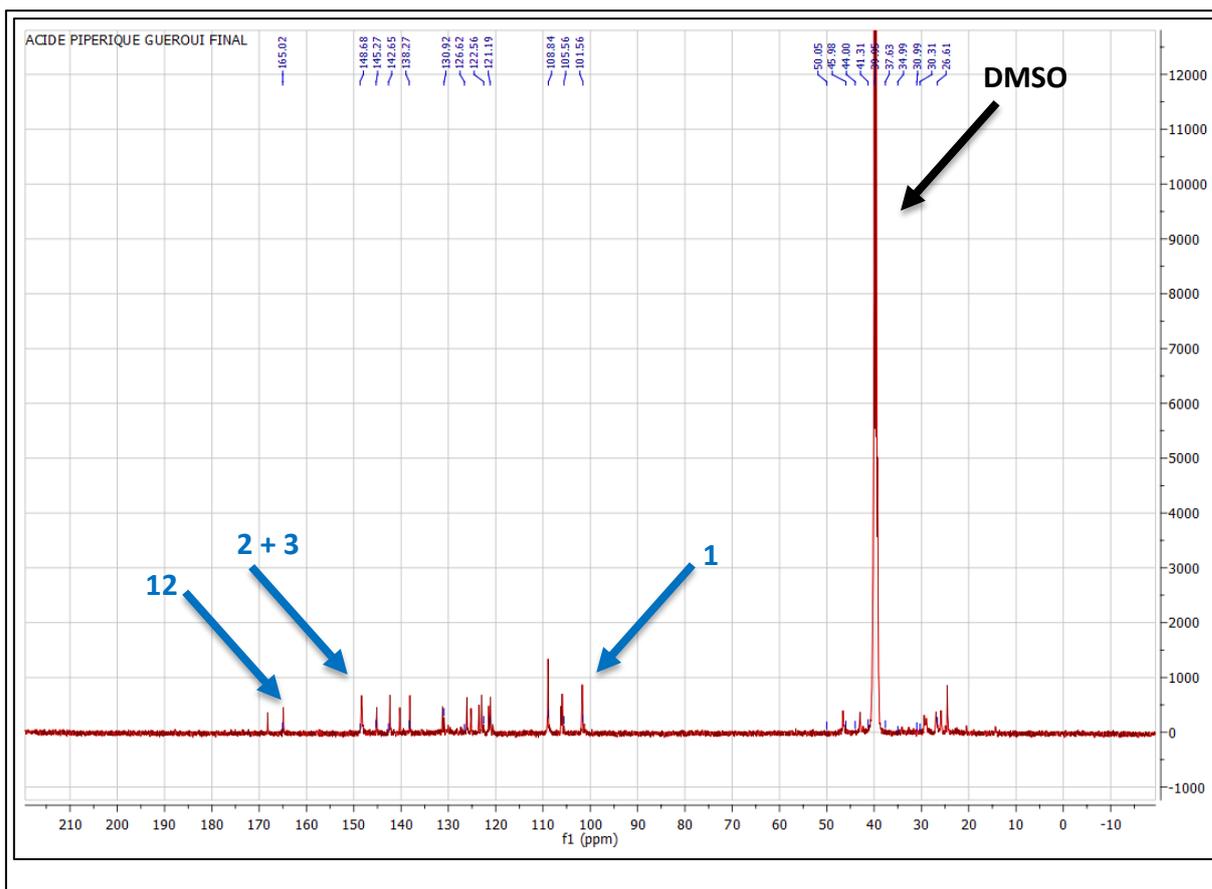


Figure 144 : Spectre RMN C<sup>13</sup> de l'acide pipérique hémisynthétique.

**Interprétation :**

Le spectre expérimental montre des pics similaires à celle du théorique :

**Entre 10 et 100 ppm :** Absence des pics correspondant aux carbones sp<sup>3</sup>, avec un signal fort autour de 4 ppm qui correspond au DMSO<sub>6</sub>.

**Entre 100 et 150 ppm :** De nombreux pics correspondant aux carbones sp<sup>2</sup>, du système conjugué et du cycle aromatique, tout comme dans le spectre théorique.

**Vers 165 ppm :** Ce signal correspond bien au carbone carbonylé, en accord avec le spectre théorique.

**Vers 100 ppm :** Ce signal correspond bien au carbone du méthylène du groupe O-CH<sub>2</sub>-O.

**Vers 150 ppm :** Ce signal correspond bien aux deux carbone (2,3) du cycle benzodioxole.

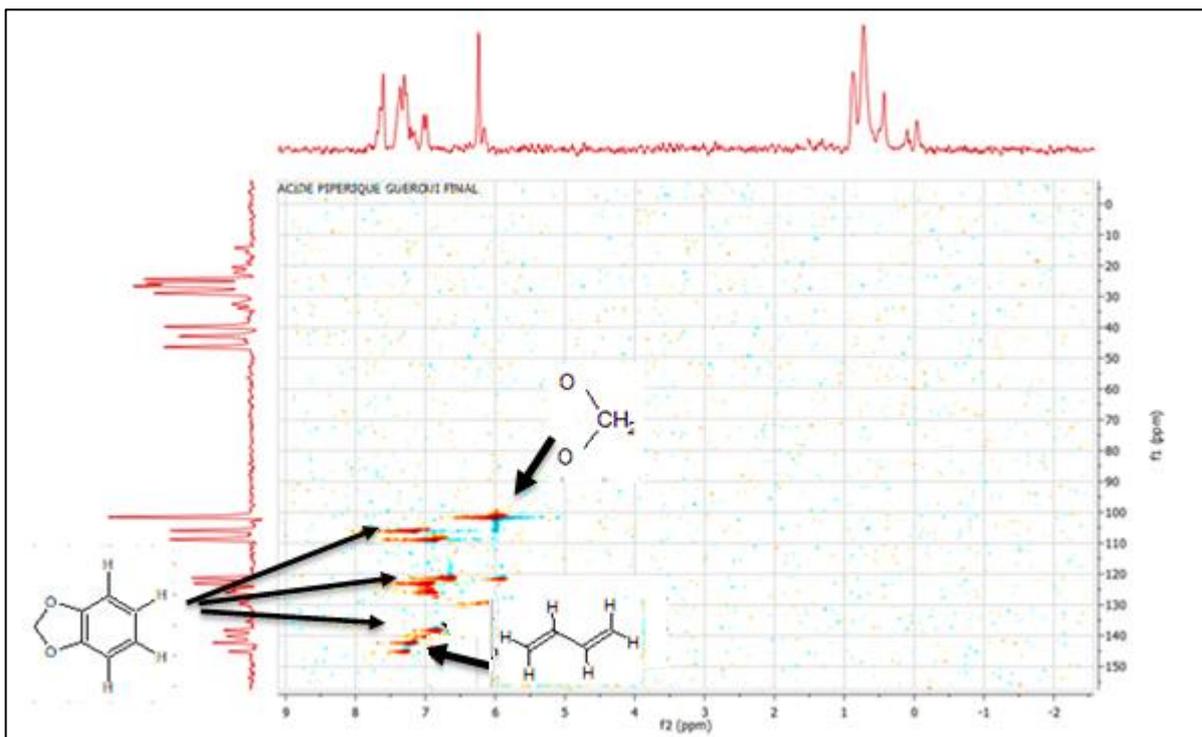
En conclusion, tout comme dans le spectre de la pipérine, des signaux spécifiques aux carbones 1, 2, 3 et 12 sont toujours visibles, tandis que les pics associés aux carbones sp<sup>3</sup> du cycle pipéridine ont disparu. (Figure 144)

**Tableau 40** : Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN C<sup>13</sup> pour l'acide pipérique.

| Déplacement chimique (ppm) | Type de carbone  | Attribution probable (Structure chimique)   |
|----------------------------|--|---|
| 165                        | C sp <sup>2</sup>  | (C=O) de la fonction carboxylique   |
| Régions 150-110            | C sp <sup>2</sup> (aromatique)<br>C sp <sup>2</sup> conjugué | Carbone du noyau aromatique (système benzoïque)<br><br>Carbone de la chaîne penta-diénoïque (C=C) |
| 101.56                     | C sp <sup>2</sup>  | Carbone du groupe O-CH <sub>2</sub> -O  |
| 40                         | C sp <sup>3</sup>  | DMSOd <sub>6</sub>  |

Selon le tableau ci-dessus les deux spectres montrent une excellente correspondance, non seulement qualitativement (position des pics) mais aussi quantitativement (déplacements chimiques précis). La molécule (2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)penta-2,4-diénoïque est bien représentée dans les deux cas, avec des signaux caractéristiques des cycles aromatiques et des doubles liaisons conjuguées. Le spectre RMN C<sup>13</sup> expérimental correspond donc bien au spectre théorique attendu pour cette molécule.

## Les Corrélations proton H et carbone C :



**Figure 145** : HSCQ de l'acide pipérique hémisynthétique.

*Région Aromatique (6-8 ppm pour  $H^1$ , 110-140 ppm pour  $C^{13}$ )* : Le spectre HSQC de l'acide pipérique présente des corrélations similaires à celle de la pipérine dans cette région, confirmant que le noyau aromatique est conservé après la transformation de la pipérine en acide pipérique. Les corrélations entre les hydrogènes et les carbones aromatiques restent dans les mêmes plages de décalage chimique.

*Région Vinylique (4-6 ppm pour  $^1H$ , 100-130 ppm pour  $^{13}C$ )* : Dans le spectre de l'acide pipérique, des corrélations similaires à celle de la pipérine sont observées dans la région des doubles liaisons, bien que certaines modifications subtiles puissent être présentes.

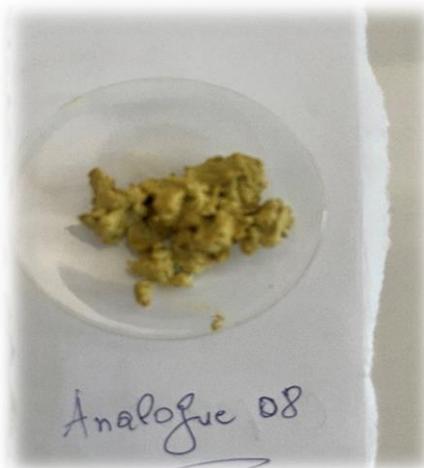
*Groupes Méthylène* : Les signaux liés aux groupes méthylène restent constants entre les deux spectres (pipérine et acide pipérique), reflétant la stabilité de la partie benzodioxole dans les deux composés.

*Noyau Pipéridine (1-4 ppm pour  $H^1$ , 10-40 ppm pour  $C^{13}$ )* : Dans le spectre de l'acide pipérique, ces corrélations sont absentes, indiquant que le cycle pipéridine a été rompu. Cette disparition est un indicateur clair de la transformation chimique. (Figure 145)

**III.8.2. Identification des dérivés N-arylamides de l'acide pipérique hémissynthétiques :**

**III.8.2.1. Identification de l'analogue 08 :**

**III.8.2.1.1. Aspect :** Solide jaune. (Figure 146)



**Figure 146 :** Aspect de l'analogue 08.

**III.8.2.1.2. Détermination du point de fusion de l'analogue 08 :**

Son point de fusion est de 219 °C. (Figure 147)



**Figure 147 :** Détermination du point de fusion de l'analogue 08 sur Banc Kofler.

Ce composé est relativement stable en raison de la présence de cycle aromatique et d'une chaîne conjuguée ce qui peut renforcer les interactions intermoléculaires dans le cristal du produit, en général, la formation d'une liaison amide n'entraîne pas nécessairement une grande variation du point de fusion par rapport à l'acide de départ ce qui explique la température proche à celle de l'acide pipérique.

III.8.2.1.3. Analyse spectrale de l'analogue 08 : (2E,4E) -5-(2H-1,3-benzodioxol-5-yl) -N-phenylpenta-2,4-dienamide.

❖ Analyse spectre IR :

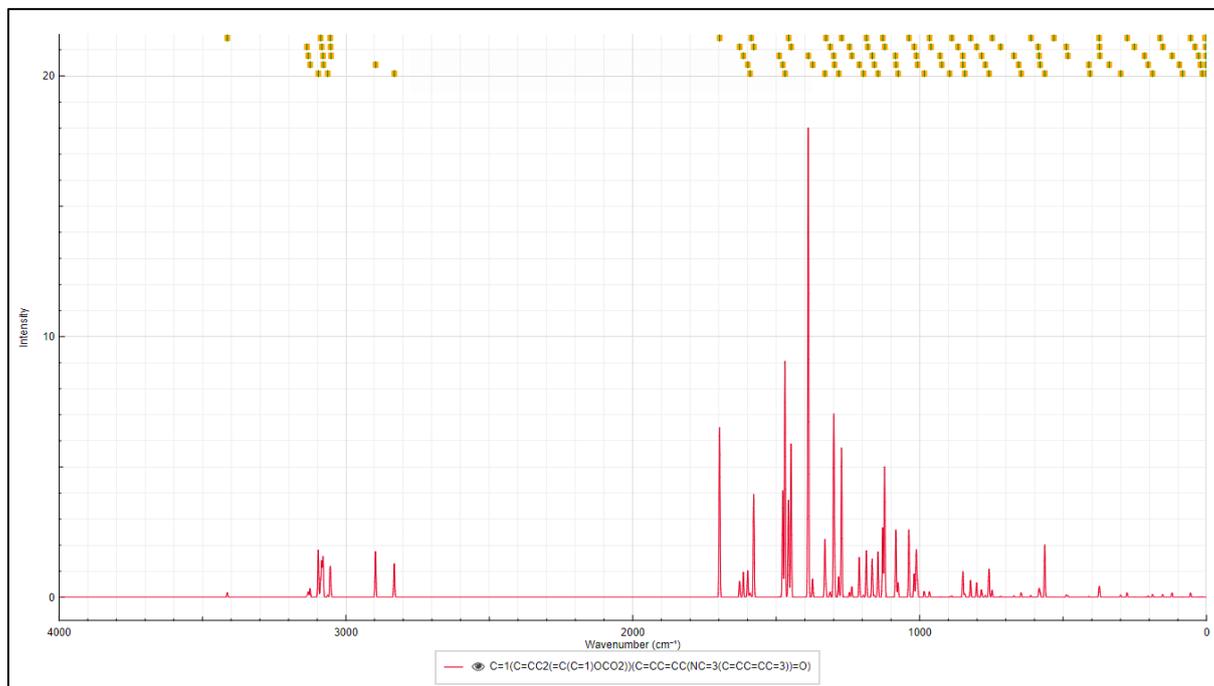


Figure 148 : Spectre théorique de l'analogue 08 prédit par le serveur cheminfo.(247)

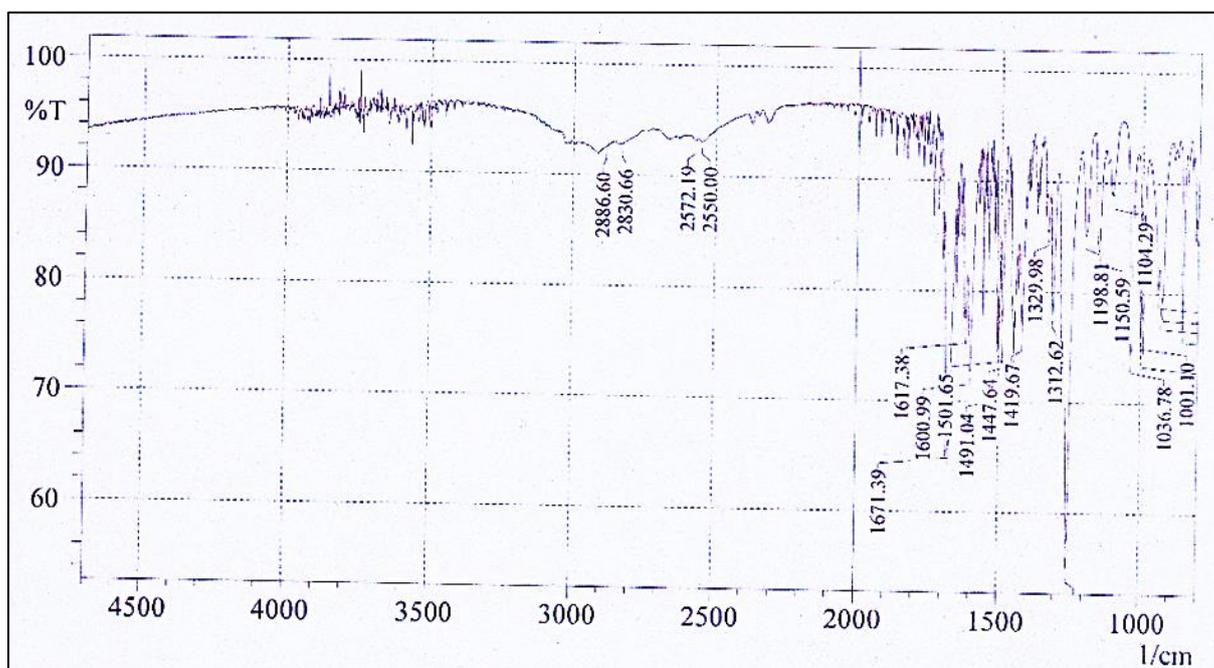


Figure 149 : Spectre expérimental de l'analogue 08 hémisynthétique.

**Tableau 41 :** Comparaison entre les pics du spectre IR expérimental et théorique pour l'analogue 08.

| Région (cm <sup>-1</sup> ) | Spectre théorique(247)         | Spectre expérimental            | Attribution possible                            |
|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---|
| 3000-3500                  | Bande large (faible intensité) | Bande large (faible intensité)  | Vibrations C-H des alcènes et aromatiques       |
| 1650-1700                  | Bande intense (pic principal)  | Bande intense vers 1671         | Vibration de valence C=O (amide)                |
| 1500-1600                  | Bandes multiples (modérées)    | Pics multiples vers 1600, 1500  | Vibration C=C (noyau aromatique, système diène) |
| 1000-1300                  | Bandes multiples               | Bandes multiples vers 1000-1250 | Vibrations C-O-C (benzodioxol)                  |
| ~850-900                   | Faible intensité               | Pics vers 853, 922              | Déformations hors du plan C-H (aromatique)      |

❖ *Discussion :*

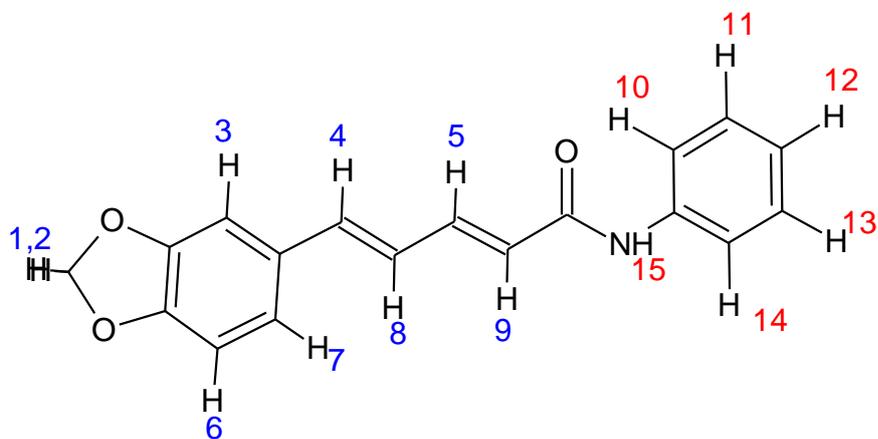
Selon le tableau ci-dessus les deux spectre expérimental et théorique :

- Région 3000-3500 cm<sup>-1</sup> : Le spectre expérimental montre une faible intensité dans cette région, ce qui peut être attendu en fonction de la sensibilité de l'échantillon aux vibrations C-H.
- Bande à 1600-1700 cm<sup>-1</sup> : Les deux spectres montrent une bande très marquée dans cette région, ce qui confirme la présence d'un groupe carbonyle (C=O) amide dans la molécule.
- Région 1000-1300 cm<sup>-1</sup> : Les deux spectres montrent également plusieurs bandes dans cette région, ce qui peut correspondre aux vibrations du groupe benzodioxole, ce qui est conforme avec la structure théorique.

Le spectre expérimental semble en assez bon accord avec le spectre théorique, en particulier pour les pics principaux associés aux groupes fonctionnels clés (amide, aromatique, benzodioxole). Cela suggère que le spectre expérimental correspond bien à la molécule (2E,4E)-5-(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)-N-phénylpenta-2,4-dienamide. (Figure 148 et 149)

❖ **Analyse RMN de l'analogue 08 : (2E,4E)-5-(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)-N-phenylpenta-2,4-dienamide.**

**RMN  $H^1$**  : Selon la structure de l'analogue 08, voici les types de protons que nous attendons de trouver dans ce composé :



- *Protons aromatiques du benzodioxole :*

Le cycle benzodioxole aura trois protons aromatiques (les positions 4, 6 et 7 de l'anneau). Ils résonneront typiquement entre 6.5 et 8 ppm.

- *Protons de la chaîne penta-2,4-diène :*

Protons des doubles liaisons ( $H_{2,3}$  et  $H_{4,5}$ ) : Ces protons sont généralement désignés comme protons vinyliques. Leurs déplacements chimiques seront entre 5.5 et 7.5 ppm.

- *Protons aromatiques du groupe phényl :*

Le groupe phényl lié à l'azote aura cinq protons aromatiques résonnant typiquement entre 7 et 8 ppm. (202,231,232) (Figure 150)

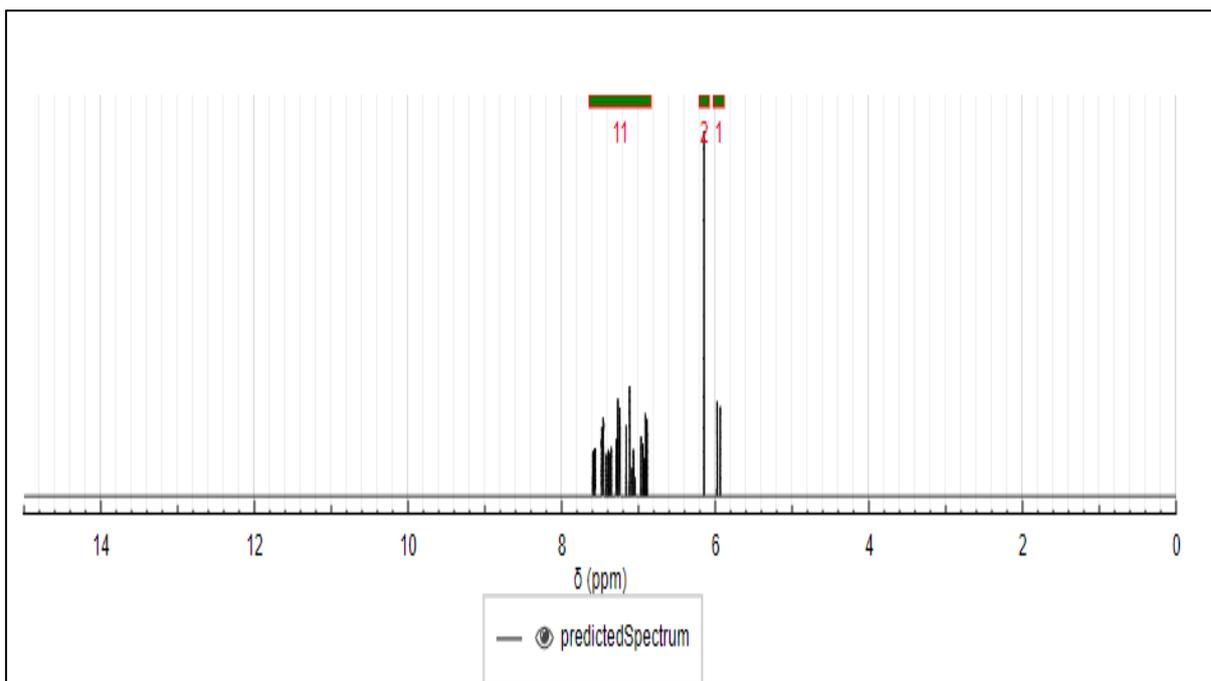


Figure 150 : Spectre RMN  $H^1$  théorique de l'analogue 08 prédit par le serveur nmrdB.(232)

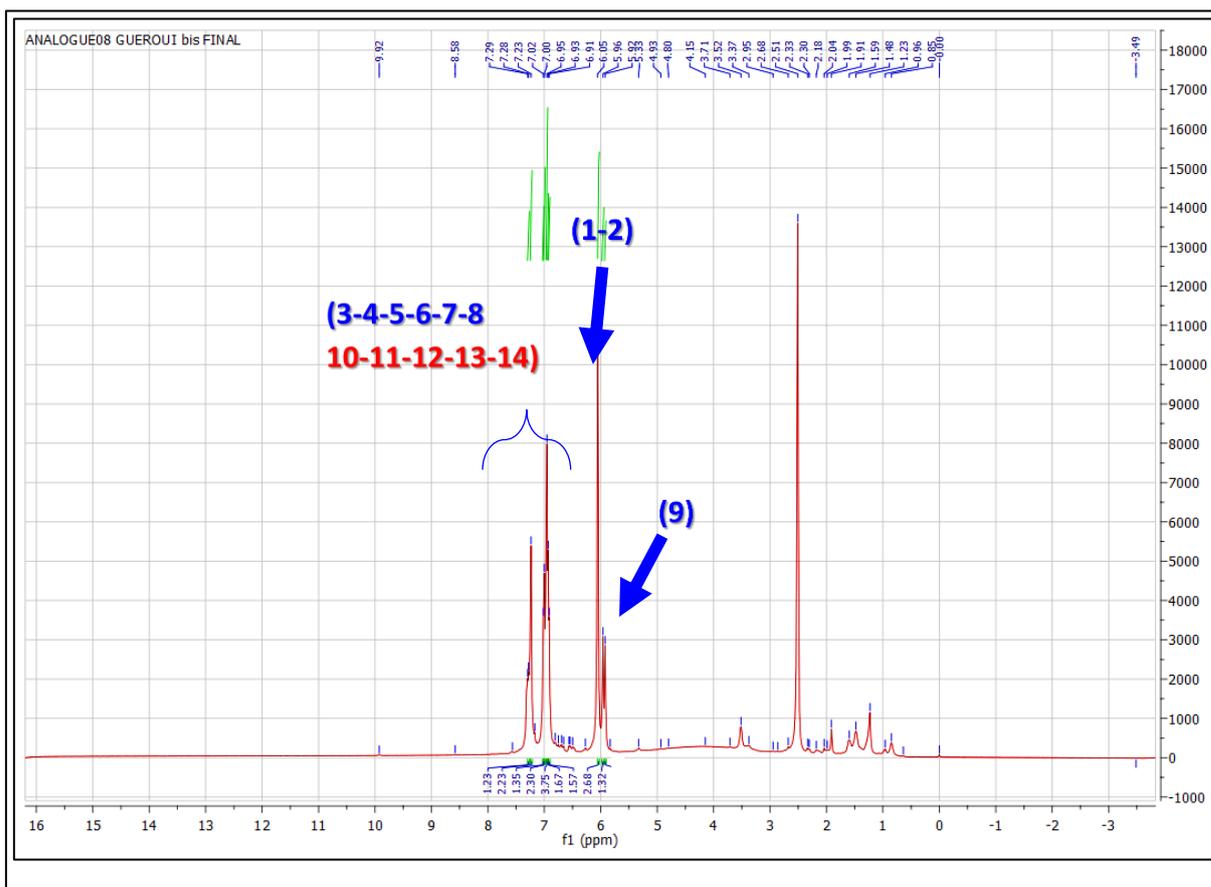


Figure 151 : Spectre RMN  $H^1$  de l'analogue 08 hémisynthétique.

**Interprétation :**

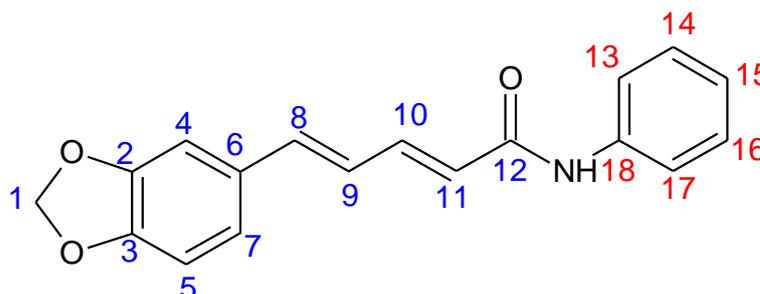
En plus des pics correspondant aux protons déjà présents dans l'acide pipérique, tels que les protons 1 et 2 du méthylène du groupe O-CH<sub>2</sub>-O, ainsi que les protons du cycle aromatique et ceux conjugués aux doubles liaisons de la chaîne penta-2,4-diènamide, on observe l'apparition de nouveaux signaux dans la région 7-8 ppm, correspondant aux protons 10, 11, 12, 13 et 14 du cycle aromatique. (Figure 151)

**Tableau 42 :** Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN H<sup>1</sup> pour l'analogue 08.

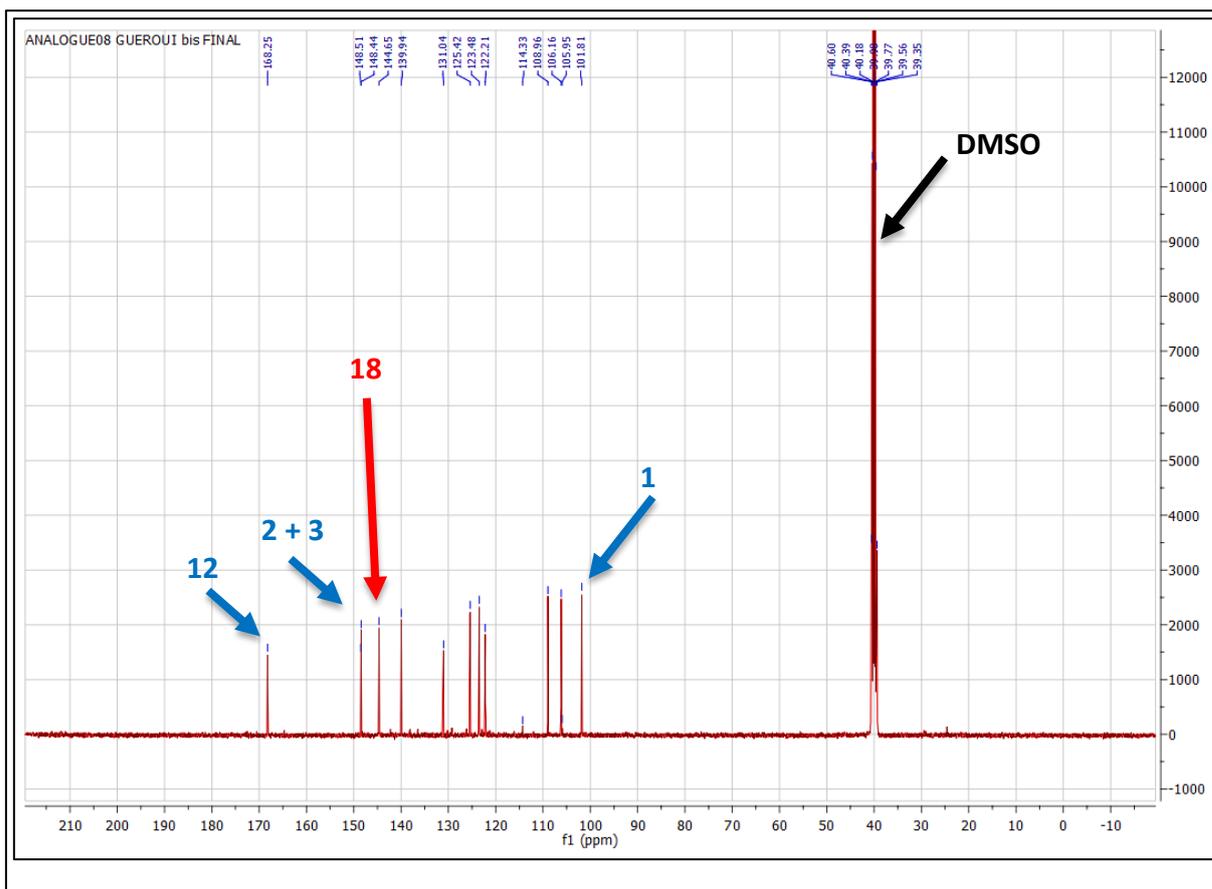
| Région (ppm) | Théorique                            | Expérimental                 | Attribution probable   |
|--------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| ~7.2 - 7.6   | Pic majeur à 7.2 - 7.6 ppm           | Pic majeur à 7.2 - 7.6 ppm   | Protons aromatiques ( de type phényl ou benzodioxole)                    |
| ~6.5 - 7.0   | Pic majeur autour de 6.6 ppm         | Pic majeur autour de 6.6 ppm | Protons conjugués avec les doubles liaisons (chaîne penta-2,4-dienamide) |
| ~6.0         | Petit pic isolé à ~6.0 ppm           | Petit pic isolé à ~6.0 ppm   | Proton conjugué avec la double liaison (système dienique)                |
| ~1.0 - 1.5   | Pas de pic théorique dans cette zone | pic à ~1.0 ppm               | Possible impureté ou résidu de solvant                                   |

Selon le tableau ci-dessus les pics principaux du spectre expérimental sont bien alignés avec ceux prédits pour les protons aromatiques (~7.2-7.6 ppm) et les protons de la chaîne conjuguée (~6.0-6.6 ppm). Les deux pics autour de 7.2-7.6 ppm et 6.6 ppm dans le spectre expérimental correspondent clairement aux protons sur les cycles aromatiques et sur la chaîne conjuguée, respectivement.

**RMN C<sup>13</sup> :** Concernant le spectre RMN C<sup>13</sup> voici les types de carbones que nous attendons de trouver dans ce composé :







**Figure 153 :** Spectre RMN  $C^{13}$  de l'analogue 08 hémisynthétique.

**Interprétation :**

- Région 100–160 ppm : Comme dans le spectre théorique, plusieurs pics apparaissent ici, indiquant la présence de carbones  $sp^2$ . On observe une bonne correspondance entre les pics de cette région dans les deux spectres. Les signaux entre 110 et 140 ppm correspondent aux mêmes carbones aromatiques ainsi qu'aux doubles liaisons  $C=C$  de la chaîne conjuguée. (Figure 153)
- Le pic à 168,25 ppm correspond au carbone numéro 12 du carbonyle, déjà visible dans les spectres de l'acide pipérique et de la pipérine.
- Le pic à 148,51 ppm est toujours attribué aux carbones 2 et 3 du cycle benzénique, également présents dans la structure de base de l'acide pipérique.
- Aux environs de 144,65 ppm, un nouveau pic apparaît, correspondant au carbone 18, lié à l'azote de la liaison amide.
- Le pic à 101,81 ppm correspond, comme attendu, au carbone du groupe  $O-CH_2-O$ .
- Région <100 ppm : Le spectre expérimental montre un pic très intense autour de 40 ppm, qui ne semble pas correspondre à un carbone de la molécule cible. Ce pic pourrait être lié

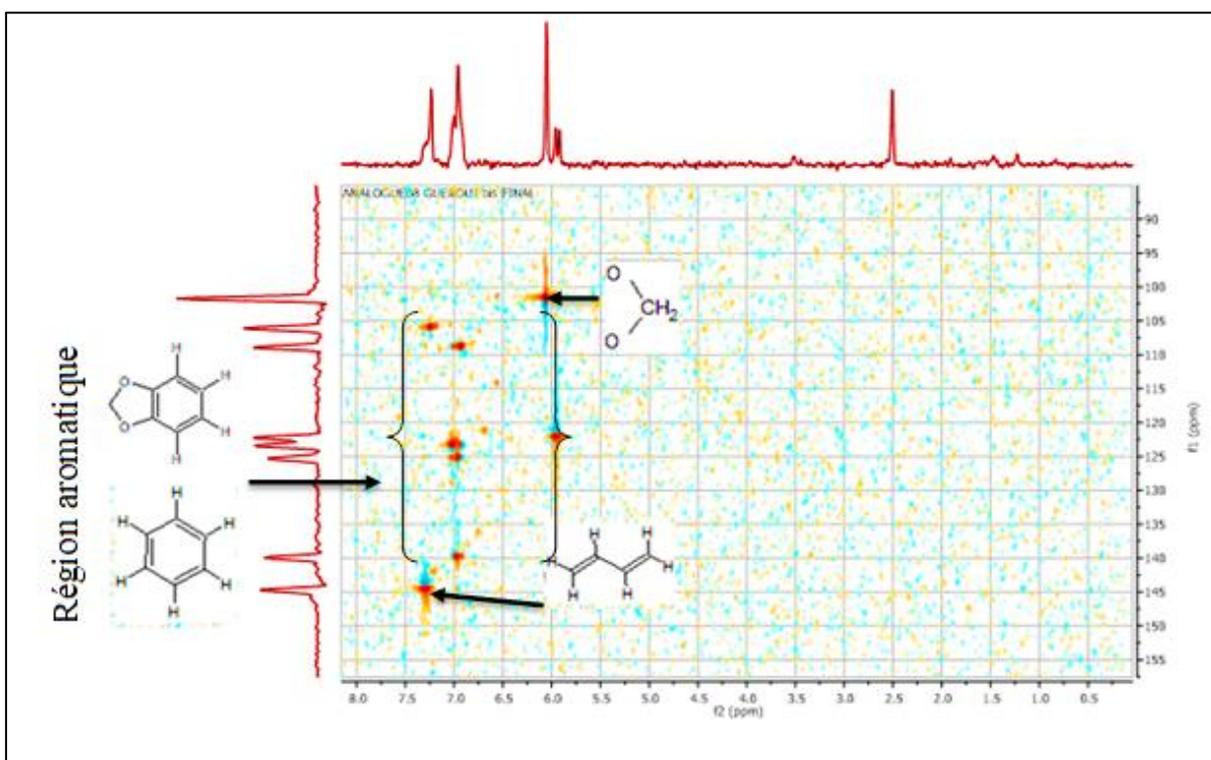
à un artefact expérimental, à un solvant résiduel ou à une impureté. En effet, aucun carbone dans la structure prévue ne devrait apparaître dans cette région.

**Tableau 43 :** Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN  $C^{13}$  pour l'analogue 08.

| Région (ppm) | Spectre théorique (caractéristique)  | Spectre expérimental (caractéristique)       |
|--------------|--|--|
| 170–180 ppm  | Pic pour le carbone C=O de l'amide   | Pic observé près de 168.25 ppm               |
| 100–160 ppm  | Plusieurs pics pour les carbones $sp^2$ des cycles aromatiques et des doubles liaisons | Plusieurs pics observés entre 100 et 160 ppm |
| 40 ppm       | Aucun pic  | Pic intense à environ 40 ppm                 |
| -10 à 0 ppm  | Aucun pic  | Aucun pic                                    |

Selon le tableau ci-dessus les déplacements chimiques du spectre RMN  $C^{13}$  confirment la structure chimique proposée pour cette molécule. Tous les signaux correspondent bien aux différentes portions de la structure moléculaire attendue.

**Les Corrélations proton H et carbone C :**



**Figure 154 :** HSQC de l'analogue 08.

- Benzodioxole : Les protons de l'anneau benzodioxole montrent des corrélations typiques dans la région de 7-8 ppm pour H<sup>1</sup> avec des carbones dans la région de 110-130 ppm. Cela confirme la présence du noyau benzodioxole.
- Noyau phényl : Les protons du noyau phényl sont corrélés avec des carbones situés entre 120 et 140 ppm, ce qui est typique des noyaux aromatiques non substitués.
- Chaîne conjuguée (penta-diène) : Les protons des doubles liaisons montrent des corrélations claires dans la région de 5-6 ppm avec des carbones situés entre 110 et 150 ppm, ce qui est caractéristique des systèmes conjugués.

En conclusion, Le spectre HSQC du composé (2E,4E)-5-(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)-N-phénylpenta-2,4-dienamide montre une corrélation nette entre les protons et les carbones, confirmant la structure générale avec des doubles liaisons conjuguées et des groupes aromatiques. Il permet d'assigner les positions des protons sur les différents cycles aromatiques (phényl et benzodioxole) ainsi que sur les doubles liaisons de la chaîne conjuguée. (Figure 154)

**III.8.2.2. Identification de l'analogue 09** : (2E,4E) -5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-(4-hydroxyphenyl)penta-2,4-dienamide.

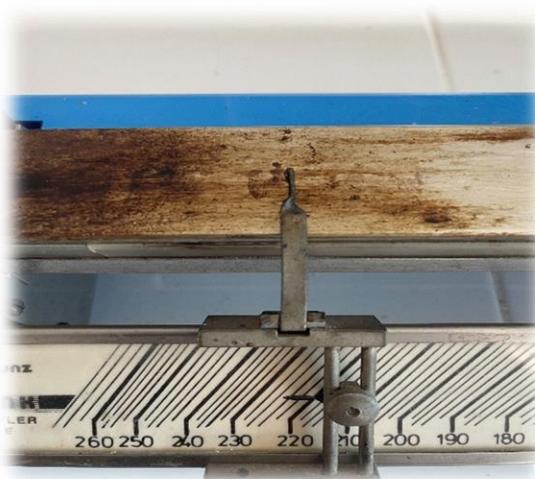
**III.8.2.2.1. Aspect** : Solide jaune. (Figure 155)



**Figure 155** : Aspect de l'analogue 09.

**III.8.2.2.2. Détermination du point de fusion** :

Son point de fusion est de 225 °C. (Figure 156)



**Figure 156** : Détermination du point de fusion de l'analogue 09.

Ce composé contient un groupe hydroxyphényle, qui permet la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires plus fortes. Cela augmentera la stabilité du réseau cristallin, entraînant probablement un point de fusion plus élevé que celui de l'acide pipérique et de l'analogue 08.

III.8.2.2.3. Analyse spectrale de l'analogue 09 : (2E,4E) -5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-(4-hydroxyphenyl)penta-2,4-dienamide.

❖ Analyse spectre IR :

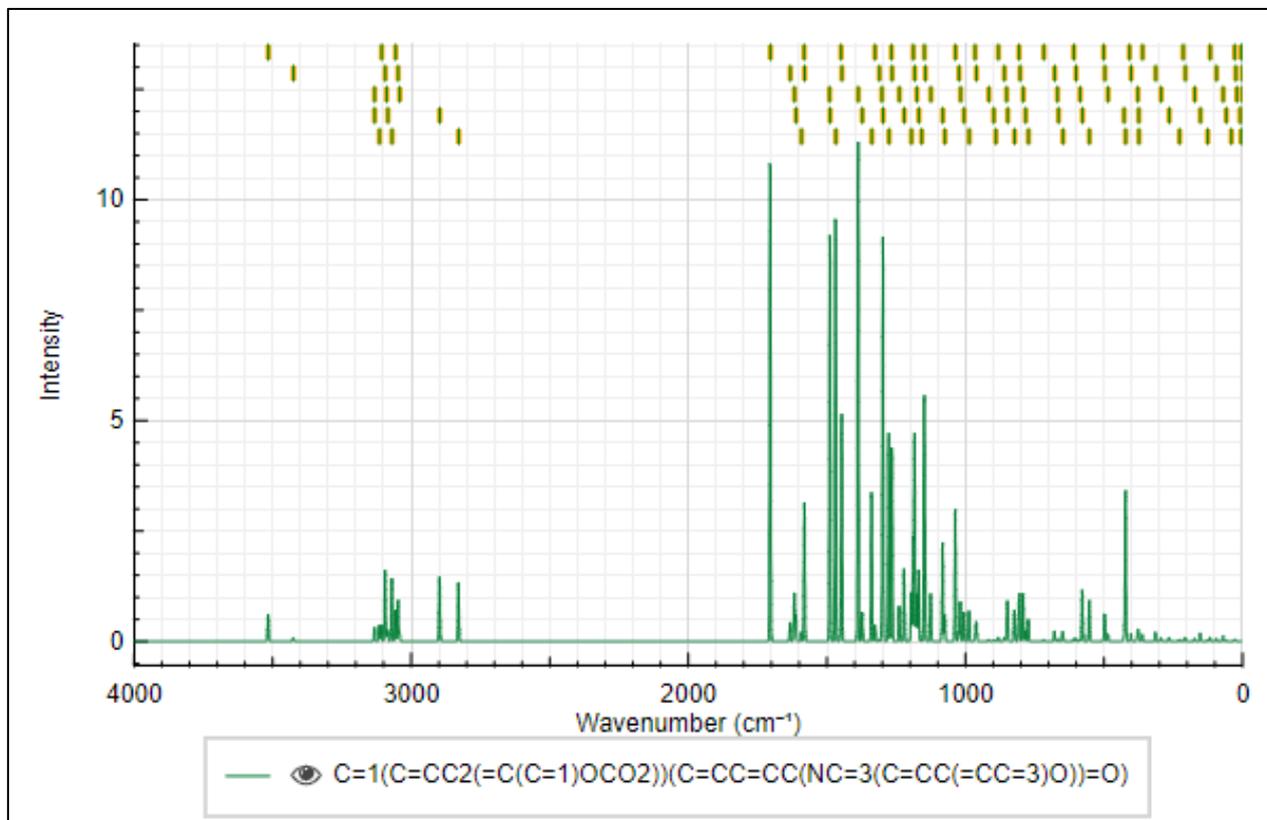


Figure 157 : Spectre théorique de l'analogue 09 prédit par le serveur cheminfo.(247)

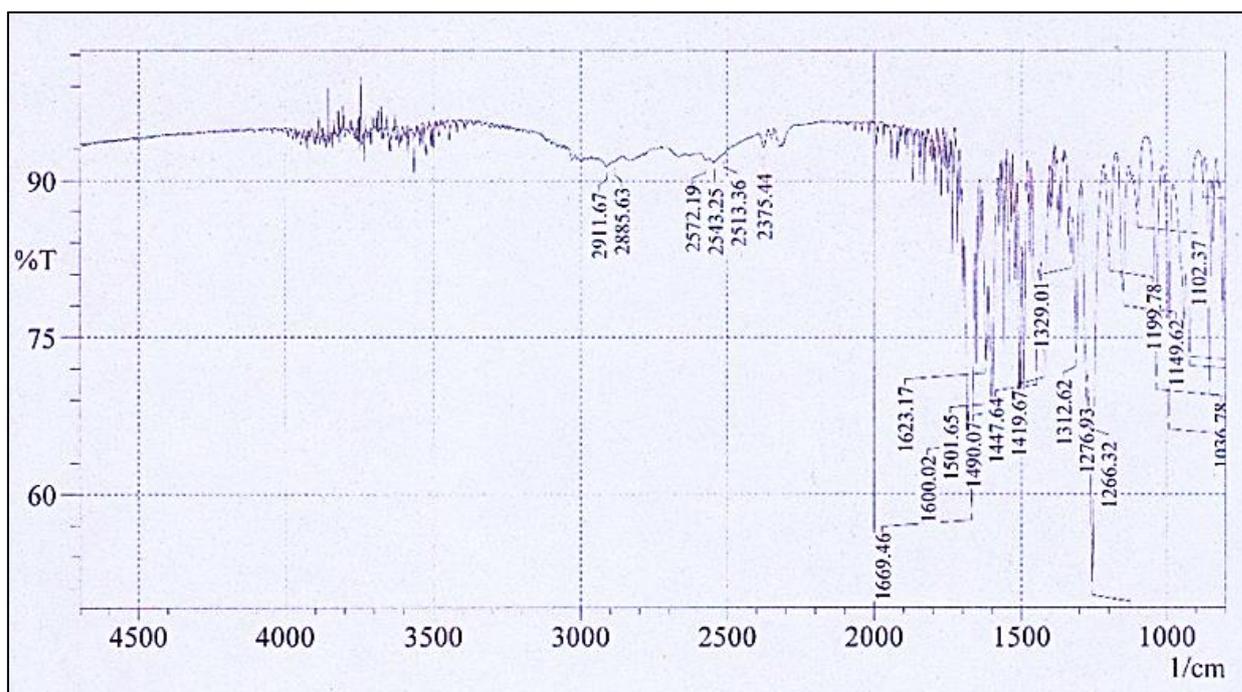


Figure 158 : Spectre expérimental de l'analogue 09.

**Tableau 44 :** Comparaison entre les pics du spectre IR expérimental et théorique pour l'analogue 09.

| Région (cm <sup>-1</sup> ) | Spectre théorique(247)             | Spectre expérimental                 | Attribution possible                                |
|----------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 2900-3000                  | Pics bien définis                  | Pics larges mais présents            | Vibration d'élongation C-H (aliphatique)            |
| 1600-1700                  | Pic intense et étroit              | Pic intense mais plus large          | Vibration d'élongation C=O (groupement carbonyle)   |
| 1500-1600                  | Plusieurs pics étroits             | Pics plus larges et moins définis    | Vibration d'élongation C=C (aromatique)             |
| 1200-1400                  | Pics nets et multiples             | Pics présents mais élargis           | Vibration C-N                                       |
| 1000-1200                  | Pics multiples, bien séparés       | Pics élargis et moins résolus        | Vibration C-O (groupements éther)                   |
| 600-900                    | Pics multiples de faible intensité | Pics moins résolus et moins intenses | Déformation hors plan des liaisons C-H (aromatique) |

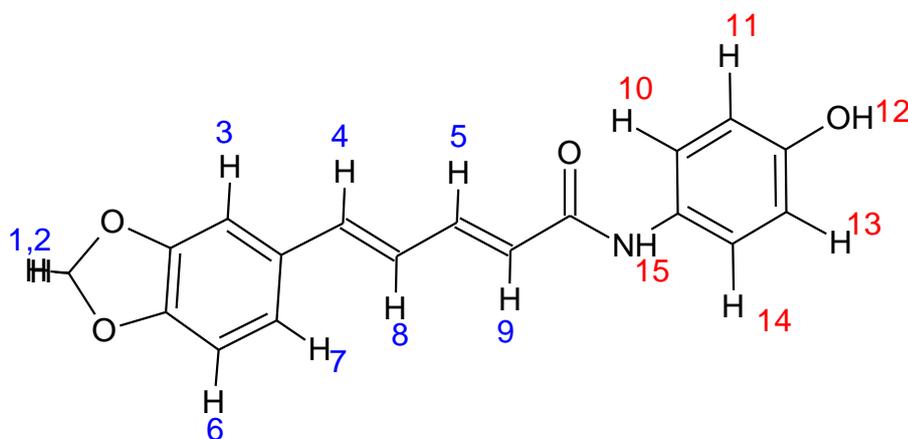
❖ *Discussion :*

Selon le tableau ci-dessus plusieurs pics caractéristiques sont observés dans des régions clés, ce qui confirme la nature des groupes fonctionnels présents dans la molécule étudiée. En particulier, dans la région de 1600-1700 cm<sup>-1</sup>, une forte bande est visible aussi bien dans le spectre théorique que dans le spectre expérimental, ce qui suggère la présence d'une vibration d'élongation C=O (carbonyle). De même, dans la région de 1000-1500 cm<sup>-1</sup>, plusieurs pics sont observés, correspondant aux vibrations caractéristiques des liaisons C=C et C-N, présentes dans les cycles aromatiques ou les liaisons amides. Cependant, certaines différences sont notées. Par exemple, dans le spectre expérimental, les bandes observées autour de 1260 cm<sup>-1</sup>, 1320 cm<sup>-1</sup>, et 1490 cm<sup>-1</sup> apparaissent élargies et moins résolues, ce qui est un phénomène typique des spectres expérimentaux. Cet élargissement peut être dû à des facteurs tels que l'interaction intermoléculaire. (Figure 157 et 158)

En somme, la comparaison entre les spectres théorique et expérimental montre une bonne concordance dans les positions des pics principaux, confirmant ainsi la validité des prédictions théoriques pour les vibrations caractéristiques des groupes fonctionnels présents dans la molécule. Toutefois, les différences d'intensité et de forme des pics sont prévisibles, étant donné les simplifications des modèles théoriques et les conditions expérimentales.

❖ **Analyse spectre RMN de l'analogue 09 :**

**RMN  $H^1$  :** Selon la structure de l'analogue 09, voici les types de protons que nous attendons de trouver dans ce composé :



• *Chaîne penta-2,4-diénamide (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N) :*

**2 protons vinyliques** sur le carbone 2 et le carbone 4 (protons des doubles liaisons conjuguées). Ils apparaîtront dans la région des protons vinyliques en RMN  $H^1$ , soit vers **5,5-7,5 ppm**, avec des couplages (J) caractéristiques des protons vinyliques conjugués.(202,231)

▪ *Groupe phényle (hydroxyphényle) :*

4 protons sur l'anneau phényle substitué en para (positions 2, 3, 5, 6) qui apparaîtront sous la forme de deux doublets en RMN  $H^1$ , autour de **6,5-8 ppm**, avec des couplages ortho.

Un proton hydroxyle (-OH) lié à l'anneau aromatique en position 4. Ce proton peut apparaître sous forme d'un signal large vers **4-7 ppm**, selon les conditions d'acquisition.(231)

▪ *Noyau 1,3-benzodioxole :*

Les protons aromatiques du noyau benzodioxole apparaîtront entre **6,5 et 7,5 ppm** en RMN  $H^1$ , souvent comme un multiplet en raison de la conjugaison avec les autres atomes de l'anneau.(202)

▪ *Amide (-CONH-):* Le proton amide (-NH) apparaît souvent comme un signal large, parfois échangeable avec le D<sub>2</sub>O, vers 7-9 ppm en RMN  $H^1$ .(231) (Figure 159)

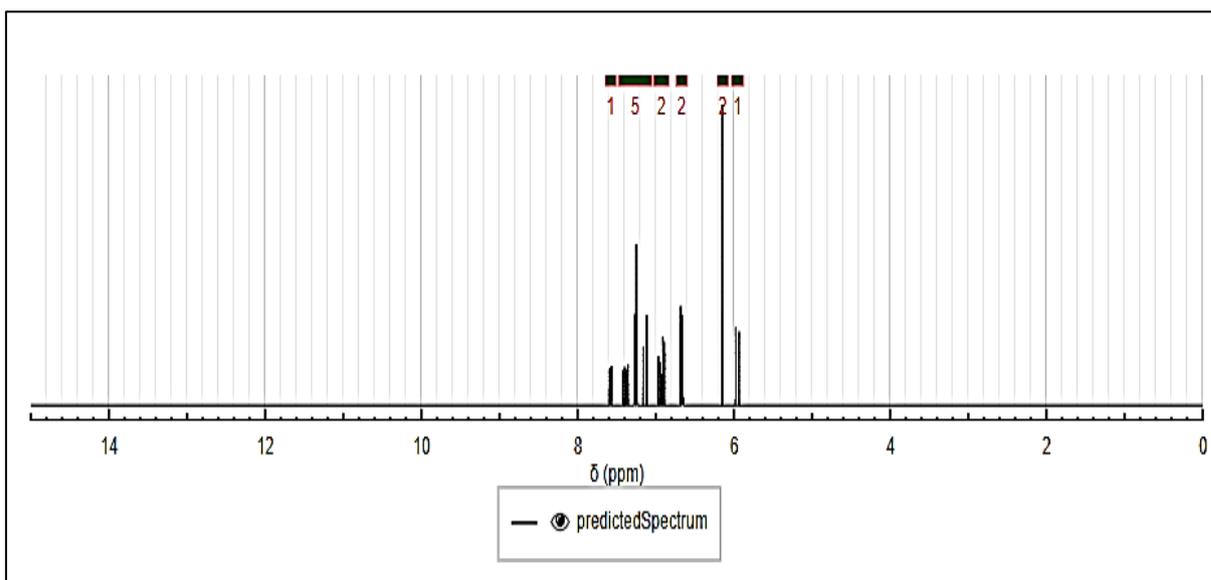


Figure 159 : Spectre RMN H<sup>1</sup> théorique de l'analogue 09 prédit par le serveur nmrdB.(232)

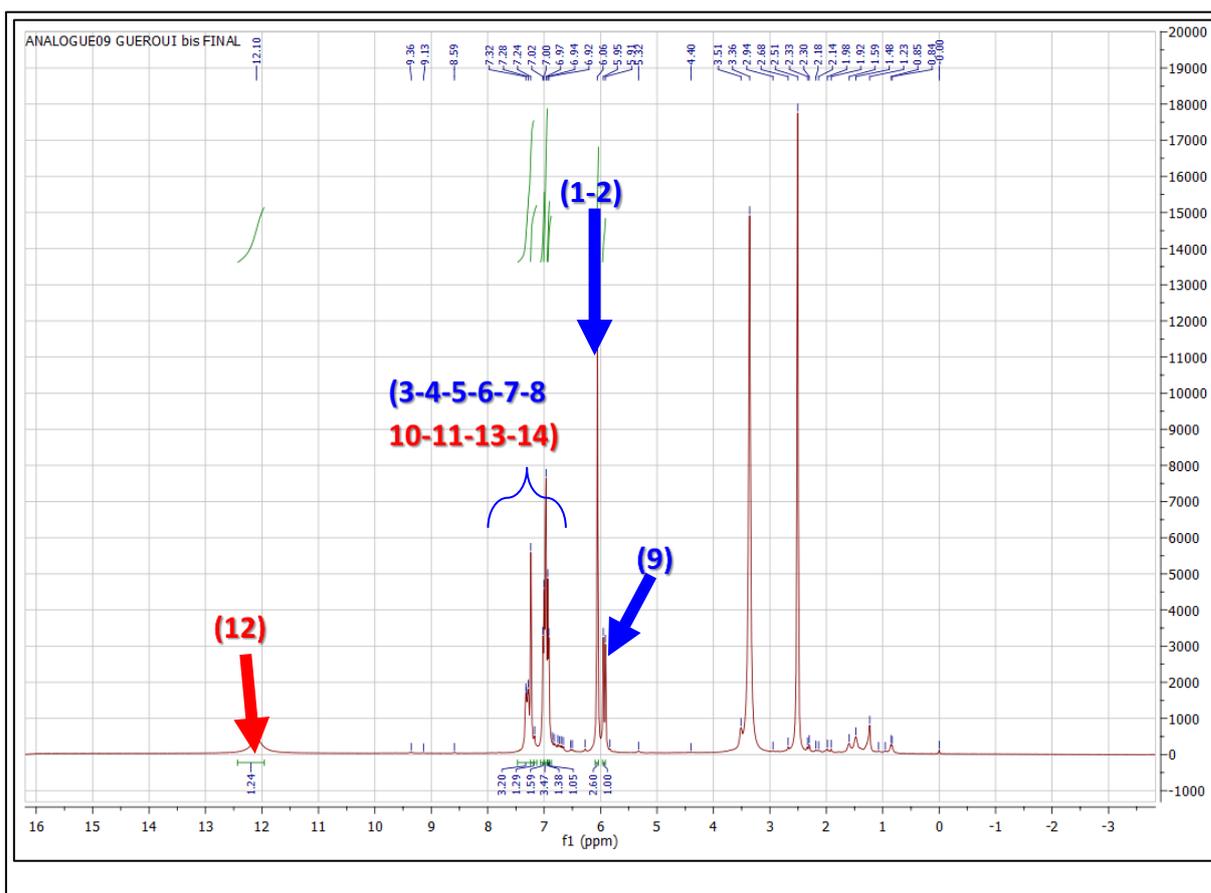


Figure 160 : Spectre RMN H<sup>1</sup> de l'analogue 09 hémisynthétique.

**Interprétation :**

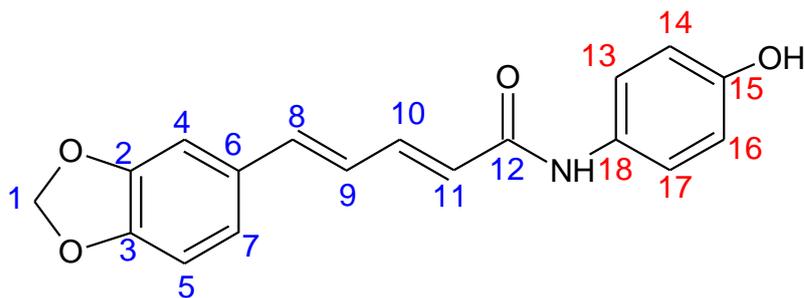
- **Protons vinyliques (7 à 8 ppm) :** On observe dans le spectre expérimental plusieurs multiplets autour de **6.9 à 7.5 ppm**, qui correspondent aux protons des doubles liaisons conjuguées (comme H-2, H-3 et H-5).
- **Protons aromatiques (6 à 7 ppm) :** Dans le spectre théorique, il y a des signaux prédits dans cette même région, ce qui est en bon accord avec les protons du cycle phényle et du benzodioxole. Le spectre expérimental montre plusieurs signaux dans cette région, correspondant aux deux cycles aromatiques.
- Dans le spectre expérimental, il y a un pic visible vers **12.1 ppm**. Cela correspond au proton du groupe hydroxyle (OH) attaché au cycle phényle.
- **1 à 4 ppm :** Le spectre expérimental montre quelques signaux dans cette région, mais ils sont probablement dus à des impuretés ou à des solvants résiduels. (Tableau 45)

En conclusion, en plus des pics caractéristiques des protons (1, 2 et 9) et des protons aromatiques (3, 4, 5, 6, 7, 8) déjà observés dans le spectre de l'acide pipérique, on note l'apparition de nouveaux pics dans la région 7-8 ppm, correspondant aux protons (10, 11, 13, 14) du cycle aromatique, ainsi qu'un pic autour de 12,10 ppm, attribué au proton du groupe phénolique. (Figure 160)

**Tableau 45 :** Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN H1 pour l'analogue 09.

| Région Chimique                | Protons concernés  | Spectre expérimental  | Spectre théorique                                   |
|--------------------------------|--|---|---|
| <b>7 à 8 ppm</b>               | Protons vinyliques sur les doubles liaisons conjuguées   | Pics observés entre 6.9 et 7.5 ppm  | Correspondance avec les protons vinyliques prédite  |
| <b>6 à 7 ppm</b>               | Protons aromatiques (cycles phényle et benzodioxole)     | Plusieurs signaux observés dans cette région, correspondant aux deux cycles aromatiques | Correspondance avec les protons aromatiques prédite |
| <b>12.1 ppm</b>                | Proton du groupe hydroxyle (OH) attaché au cycle phényle | Un pic visible à 12.1 ppm   | Correspondance avec la prédiction pour le proton OH |
| <b>Régions supplémentaires</b> | Impuretés ou solvants résiduels                          | Quelques signaux supplémentaires observés dans le spectre                               | Non discutés  |

**RMN C<sup>13</sup>** : Concernant le spectre RMN C<sup>13</sup> voici les types de carbones que nous attendons de trouver dans ce composé :



- *Chaîne penta-2,4-diénamide (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N)* :

C=C conjuguées (C2 et C4) : ces carbones apparaissent en RMN C<sup>13</sup> dans la région des carbones vinyliques (vers 120-150 ppm).

Carbone carbonyle (C5) : un signal intense dans la région des carbonyles (vers 160-180 ppm).

- *Groupe phényle (hydroxyphényle)* :

Carbones aromatiques : Les carbones dans l'anneau phényle apparaîtront dans la région des carbones aromatiques, autour de **115-150 ppm**.

- *Noyau 1,3-benzodioxole* :

Carbones de l'anneau benzodioxole : Ces carbones sont typiques des systèmes aromatiques, et apparaîtront en RMN C<sup>13</sup> vers **105-130 ppm**.(202,231)

Carbones de la dioxole (-O-CH<sub>2</sub>-O) : Les carbones du méthylène (CH<sub>2</sub>) dans la partie dioxole du noyau apparaîtront en RMN C<sup>13</sup> dans la région des carbones saturés (vers **100-80 ppm**). (Figure 161)

- *Amide (-CONH-)* :

Le carbone de l'amide lié à l'oxygène (C=O) se trouve vers **160-180 ppm** en RMN C<sup>13</sup>.(202,231)

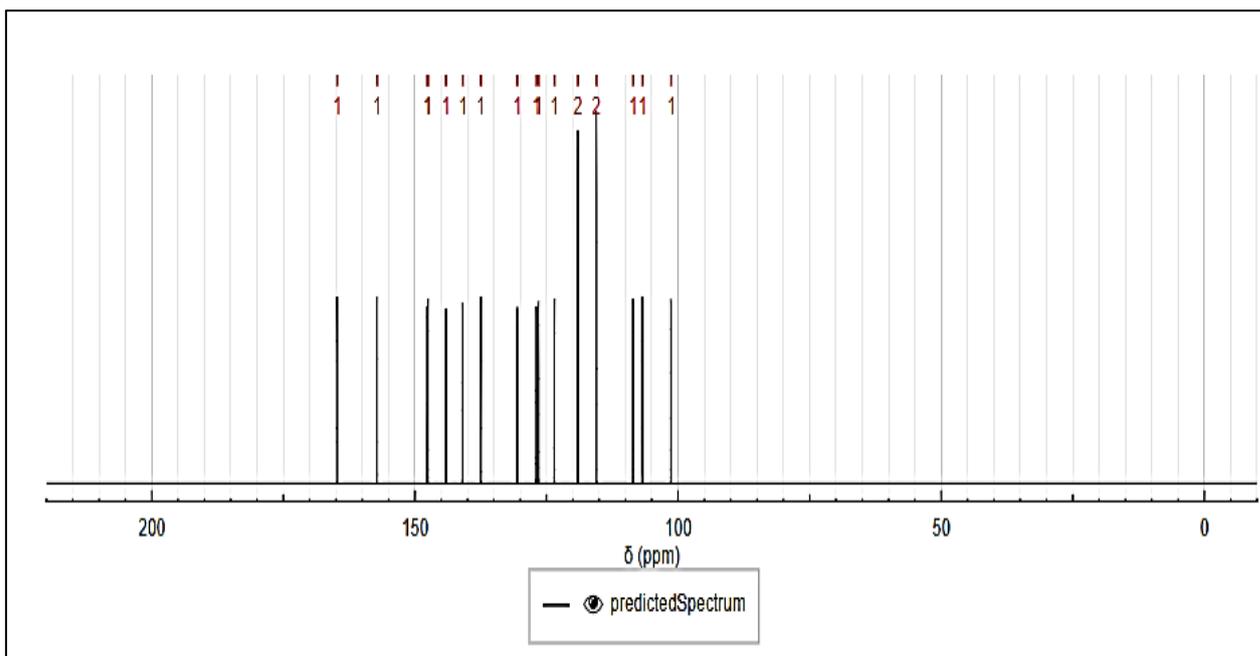


Figure 161 : Spectre RMN  $\text{C}^{13}$  théorique de l'analogue 09 prédit par le serveur nmrdB.(232)

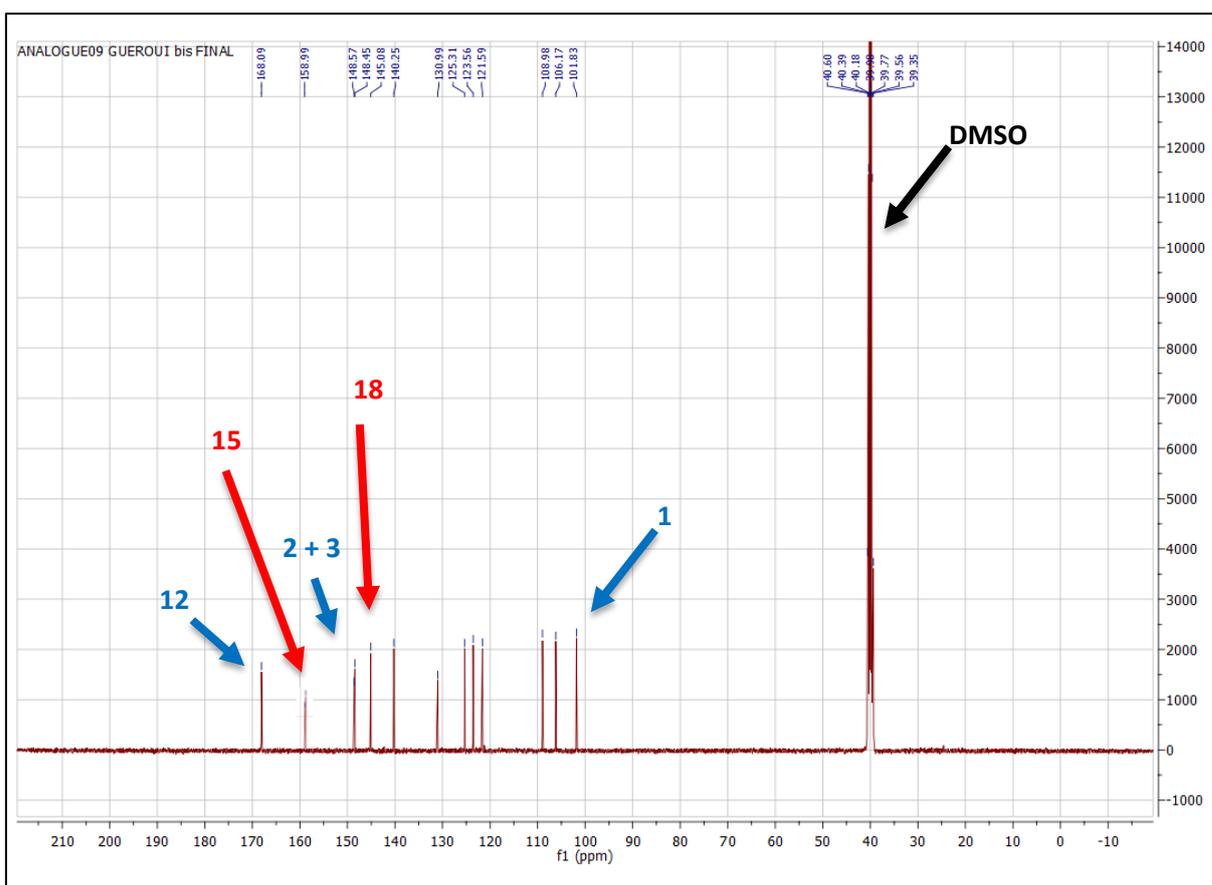


Figure 162 : Spectre RMN  $\text{C}^{13}$  de l'analogue 09 hémisynthétique.

**Interprétation :** Selon le tableau ci-dessous montre une bonne correspondance entre le pic théorique et expérimentale.

- *Pic à 168.09 ppm (expérimental) :* Il correspond très bien au pic à environ 170 ppm observé dans le spectre théorique, et peut être attribué au **carbone carbonyle (C=O)** de la fonction amide.
- *Pics entre 140 et 160 ppm (expérimental) :* Plusieurs pics distincts sont observés dans cette région dans les deux spectres. Ceux-ci sont associés aux **carbones aromatiques substitués** du noyau benzodioxole et du phénol. Ces pics sont bien corrélés entre les deux spectres.
- Aux environs de 145,08 ppm, un nouveau pic apparaît, correspondant au **carbone 18**, lié à l'azote de la liaison amide.
- Le pic à 158,99 ppm est caractéristique du **carbone 15**, lié au groupe hydroxyle sur le cycle aromatique. (Figure 162)

**Tableau 46 :** Résumé de déplacement chimique obtenu par RMN C<sup>13</sup> pour l'analogue 09.

| <b>Carbone</b>   | <b>Déplacement chimique théorique (ppm)</b> | <b>Déplacement chimique expérimental (ppm)</b> | <b>Attribution</b>   |
|--|---|--|--|
| <b>C=O (Amide)</b>   | ~170  | 168.09   | Carbone carbonyle (fonction amide)   |
| <b>C- liée à l'hydroxyle</b>   | ~150  | 158.99   | Le carbone aromatique lié à la fonction phénol.  |
| <b>Aromatique C-Phénol (substitué)</b><br><b>Aromatique C-Benzodioxole (substitué)</b> | 105-150                                     | 106.17-148.57                                  | Carbone du cycle phénol (C-H ou substitué OH)<br>Carbone du cycle benzodioxole (C-H ou O-CH <sub>2</sub> ) |
| <b>O-CH<sub>2</sub> (du méthylènedioxy)</b>  | ~100  | 101.83   | Carbone lié à l'oxygène dans le benzodioxole   |

Les deux spectres, théorique et expérimental, montrent une bonne correspondance, en particulier dans les zones critiques pour les carbones carbonyles, aromatiques, et conjugués. Les pics sont bien alignés en termes de position chimique, ce qui suggère que le spectre expérimental est bien en accord avec la structure proposée pour la molécule.

### Les Corrélations proton H et carbone C :

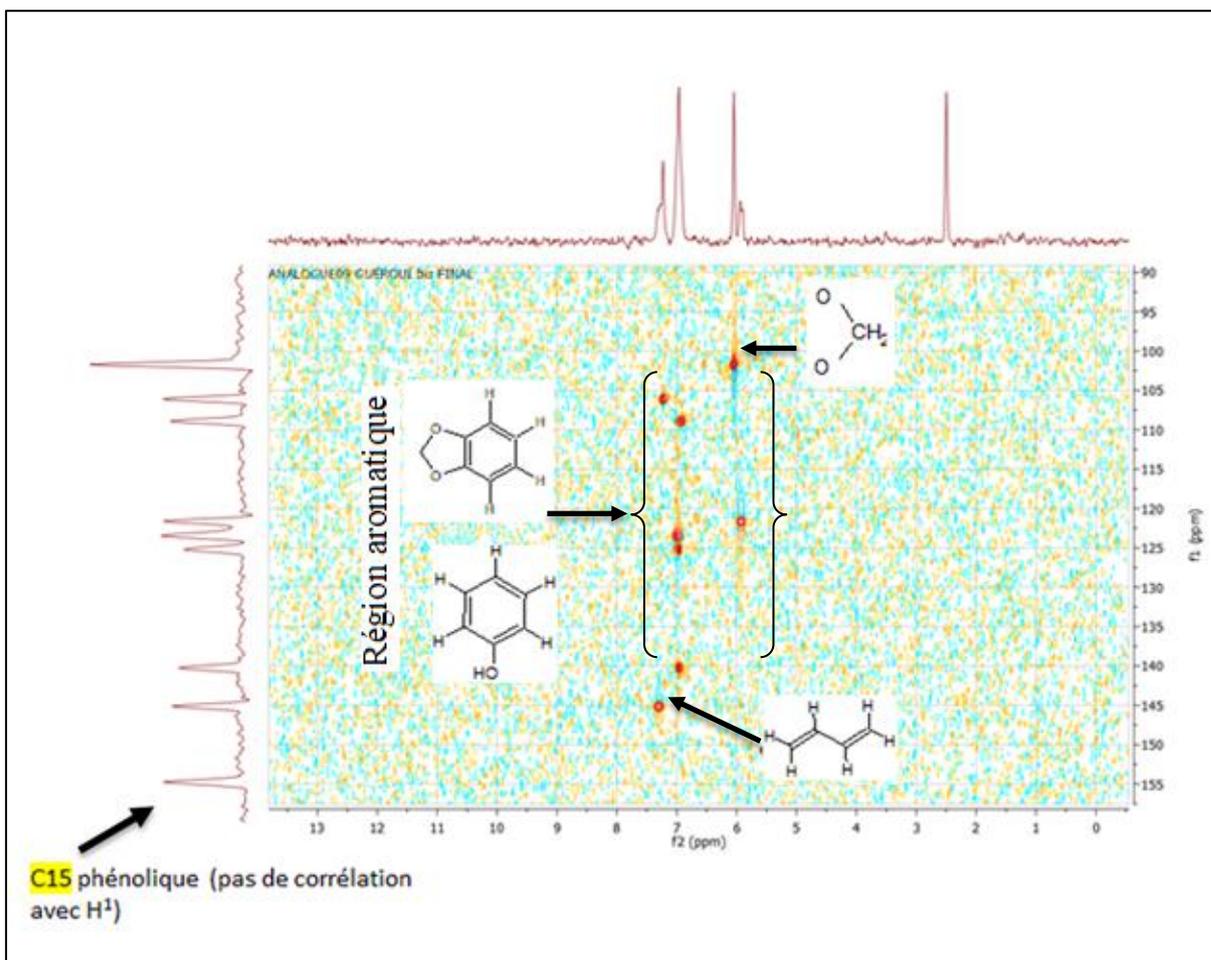


Figure 163 : HSQC de l'analogue 09.

Le spectre HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) que nous avons analysé révèle des informations précises sur les couplages entre les protons ( $H^1$ ) et les carbones ( $C^{13}$ ) du composé **(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-(4-hydroxyphenyl)penta-2,4-dienamide**. Ce spectre permet de confirmer la structure de la molécule en identifiant les interactions directes entre les noyaux hydrogènes et leurs carbones adjacents.

- *Identification des systèmes aromatiques :*

Dans le spectre HSQC, les corrélations entre les protons et les carbones dans les régions suivantes :

-Protons aromatiques dans la région 6.5-8 ppm : Ces signaux sont corrélés avec des carbones aromatiques situés entre 110 et 130 ppm, ce qui correspond à des carbones sp<sup>2</sup> du système benzodioxole et du cycle phénolique.

-Le cycle benzodioxole, avec ses deux atomes d'oxygène, est susceptible de montrer des décalages chimiques légèrement plus bas pour ses carbones aromatiques (environ 100-110 ppm), ce qui est en accord avec les corrélations observées.

- *Système conjugué des doubles liaisons :*

Les protons vinyliques situés autour de 6.5-7.5 ppm sont couplés à des carbones sp<sup>2</sup> apparaissant dans la région 120-135 ppm. Ces corrélations suggèrent la présence des doubles liaisons conjuguées dans la structure du penta-2,4-dienamide, confirmant la configuration E,E des liaisons.

- *Proton hydroxyle (-OH) du groupe phénolique :*

Le signal du proton hydroxyle apparaît dans la région **12-13 ppm**, ce qui est typique des groupes hydroxyles associés à des cycles aromatiques (phénols). Ce proton n'apparaît pas directement dans le spectre HSQC, car il n'est pas lié à un carbone. De plus, les protons hydroxyles peuvent souvent être échangés, rendant leur signal plus diffus ou absents dans les techniques de corrélation comme HSQC.

L'analyse du spectre HSQC permet de confirmer la structure du **(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-(4-hydroxyphenyl)penta-2,4-dienamide**. Les corrélations entre les protons et les carbones dans les régions aromatiques et vinyliques sont cohérentes avec la structure attendue. La présence du proton hydroxyle est également bien observée. L'ensemble des résultats valide la structure proposée. (Figure 163)

**III.9. Evaluation *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des analogues 08,09 et de l'acide pipérique hémisynthétiques :**

**III.9.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire par induction de l'œdème de la patte chez la souris :**

L'œdème a été déterminé par une augmentation progressive du volume de la patte (Tableau 47) et caractérisé par un pourcentage d'augmentation qui est plus important chez le lot de contrôle négatif et l'acide pipérique, et significativement diminué en présence des analogues 08,09 et d'aspirine (Figure 164 et 165).

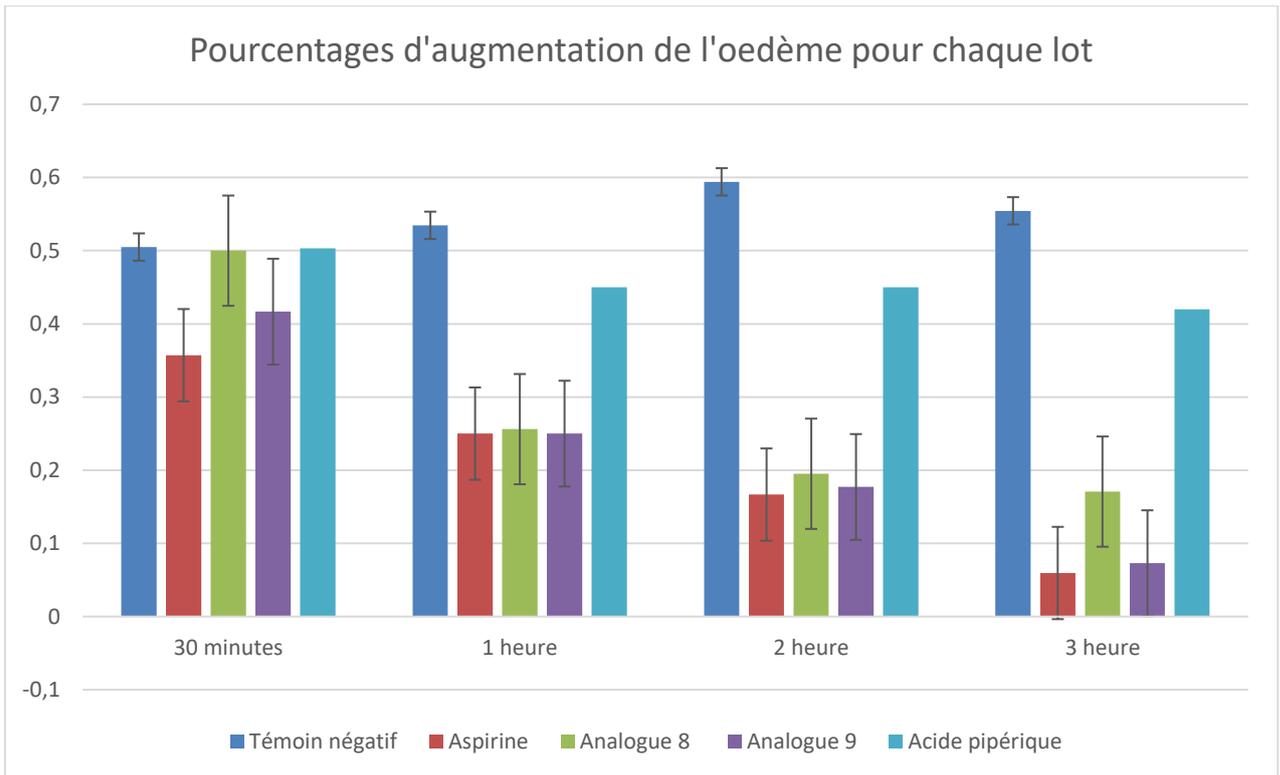
L'activité anti-inflammatoire des solutions testées a été évaluée par la détermination du pourcentage d'inhibition de l'œdème caractéristique de chaque substance testée.

**Tableau 47 :** Volume moyen de la patte postérieure gauche avant et à différents temps après l'injection de carragénine dans les cinq lots.

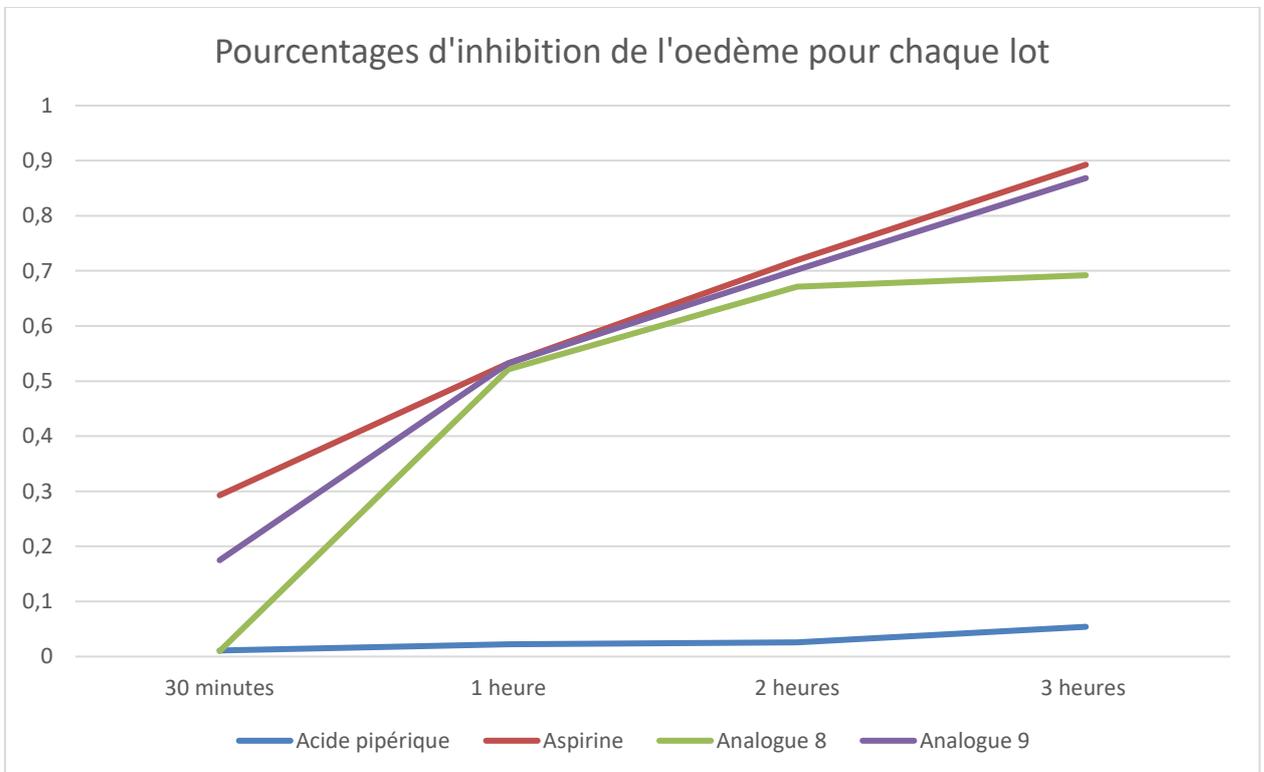
| Volume moyen de la patte postérieure gauche en ml |                 |                                 |                |                |                |
|---|-----------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Lot   | Avant injection | Après l'injection des solutions |                |                |                |
|   |                 | 30 min                          | 60 min         | 120 min        | 180 min        |
| <b>Témoin (-)</b>                                 | 0,168           | 0,253±0.00287                   | 0,258±0.01472  | 0,268±0.02317  | 0,261±0.02229  |
| <b>Aspirine</b>                                   | 0,145           | 0,19±0.03033*                   | 0,175±0.02811* | 0,163±0.01862* | 0,148±0.02639* |
| <b>Acide pipérique</b>                            | 0,15            | 0,242±0.0321                    | 0,252±0.0121   | 0,258±0.0024   | 0,257±0.0054   |
| <b>Analogue 8</b>                                 | 0,14            | 0,205±0.00837*                  | 0,171±0.01329* | 0,163±0.01633* | 0,16±0.02098*  |
| <b>Analogue 9</b>                                 | 0,165           | 0,226±0.02944*                  | 0,2±0.01095*   | 0,188±0.00753* | 0,171±0.01472* |

Les résultats sont exprimés en Moyenne ± écart type, n=6 dans chaque lot.

\* Représente des différences significatives par rapport au témoin (p< 0,05)



**Figure 164 :** Pourcentages d'augmentation de l'œdème induit par la carragénine en fonction du temps dans les cinq lots.



**Figure 165 :** Pourcentages d'inhibition de l'œdème par l'aspirine, l'acide pipérique, l'analogue 8 et l'analogue 9.

### ❖ Analyse des résultats

L'acide pipérique présente une faible inhibition de l'œdème tout au long de l'expérience, avec des valeurs quasi constantes et inférieures à 10%. Cela suggère qu'il a un effet anti-inflammatoire très faible, voire négligeable, par rapport aux autres composés testés.

L'aspirine montre une inhibition rapide de l'œdème, atteignant environ 40% au bout de 30 minutes et continuant à augmenter de manière significative. À la fin de l'expérience, elle atteint presque 90%, indiquant une forte efficacité anti-inflammatoire. Ces résultats confirment son efficacité comme anti-inflammatoire bien connu.

L'analogue 08 montre une inhibition modérée par rapport à l'aspirine et l'analogue 9. Il présente une augmentation rapide au début, atteignant 40% au bout d'une heure, puis une stabilisation autour de 60% pour les deux dernières heures. Cet analogue montre un certain potentiel anti-inflammatoire, mais il semble moins efficace que l'aspirine et l'analogue 9.

L'analogue 09 présente un profil d'inhibition similaire à celui de l'aspirine, bien qu'un peu moins rapide initialement. Au bout de trois heures, son pourcentage d'inhibition est proche de celui de l'aspirine (environ 90%).

### ❖ Discussion :

*Comparaison des composés :* Les analogues 8 et 9 montrent des effets anti-inflammatoires supérieurs à ceux de l'acide pipérique. L'analogue 9 est particulièrement remarquable car il atteint des niveaux d'inhibition similaires à ceux de l'aspirine, ce qui en fait un candidat potentiel pour des tests plus approfondis.

*Cinétique d'inhibition :* L'aspirine et l'analogue 9 ont une cinétique d'inhibition rapide, atteignant des niveaux élevés dès la première heure. L'analogue 8 semble moins efficace et pourrait nécessiter une concentration ou une formulation différente pour améliorer son activité.

*Comparaison des analogues avec la pipérine :* La comparaison entre la pipérine et les Analogues 8,9 et l'acide pipérique révèle des différences importantes en termes d'efficacité et de durabilité de l'effet anti-inflammatoire.

Pour l'Analogue 8, on observe une montée rapide de l'inhibition de l'œdème, qui se stabilise entre 0,5 et 1 heure pour se maintenir jusqu'à 3 heures. La pipérine, quant à lui, affiche une efficacité initiale plus élevée (73,98 % à 60 minutes) mais décline progressivement pour atteindre 24,38 % après 3 heures. Ainsi, bien que la pipérine offre une puissance initiale supérieure, l'Analogue 8 propose un effet plus stable sur le moyen terme.

En ce qui concerne l'Analogue 9, il montre une efficacité progressive atteignant 85 % d'inhibition à 3 heures, surpassant ainsi la pipérine qui débute à 73,98 % avant de chuter à 24,38 % au bout de 3 heures. Cette tendance suggère que l'Analogue 9 serait mieux adapté pour un effet anti-inflammatoire prolongé, alors que la pipérine convient davantage pour une action rapide mais éphémère.

Comparativement à l'Acide pipérique, qui présente une inhibition anti-inflammatoire faible et inférieure à 10 % pendant 3 heures, la pipérine démontre une bien meilleure efficacité, atteignant 73,98 % dès 60 minutes.

En somme, la pipérine montre une efficacité initiale supérieure mais décroît avec le temps, tandis que les Analogues 8 et 9 apportent des effets plus stables ou prolongés, avec l'Analogue 9 se démarquant pour une action durable.

**III.9.2. Evaluation de l'activité analgésique par le test de la pression de la queue :**

**Le tableau 48** représente les effets des différentes molécules testées sur la valeur du seuil de nociception.

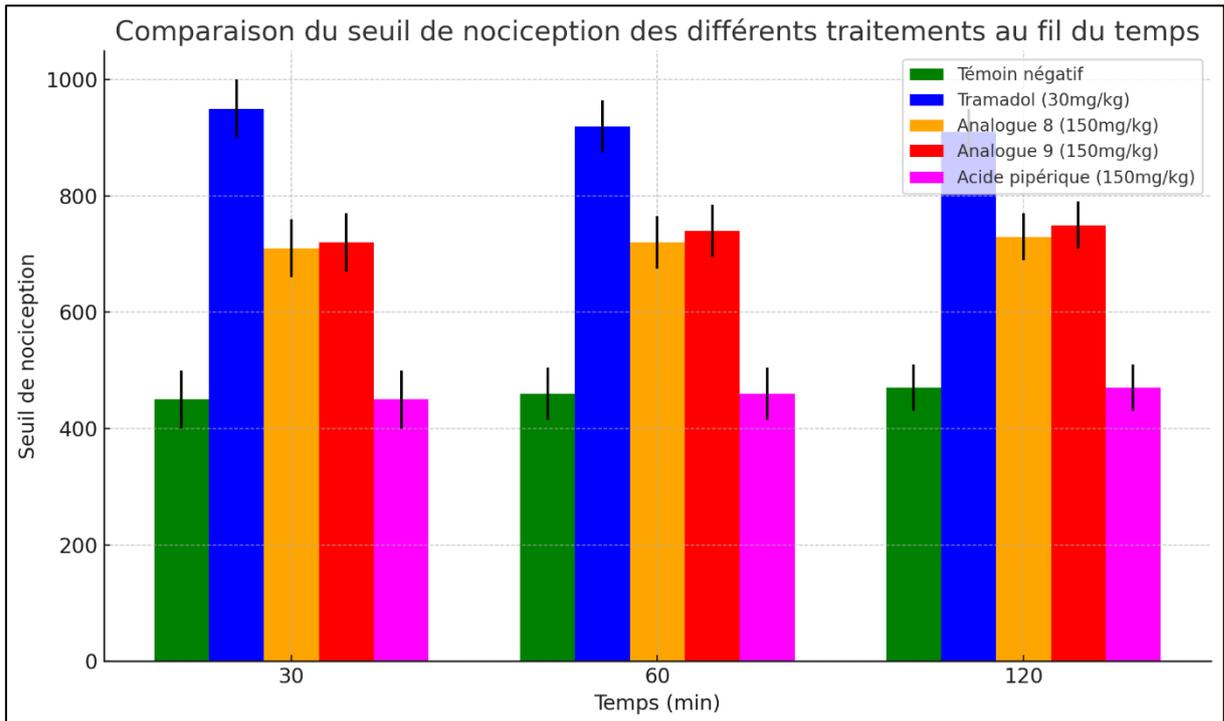
Il a été révélé que les effets analgésiques des analogues 8 et 9 ainsi que ceux du tramadol étaient significatifs à 30 min, 60 min et 120 min par rapport au témoin négatif.

Par contre l'acide pipérique n'a montré aucune différence significative dans la valeur du seuil de nociception par rapport au témoin négatif, et ce aux différents temps d'étude.

**Tableau 48 :** Seuils de nociception des souris des différents lots par la méthode de la pression de la queue.

| <b>La moyenne de la valeur du seuil de nociception</b> |                   |                   |                   |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Traitement</b>                                      | <b>30min</b>      | <b>60min</b>      | <b>120min</b>     |
| <b>Témoin négatif</b>                                  | 451,6667±48,6894  | 451,6667±32,2407  | 458,8333±26,1412  |
| <b>Tramadol (30mg/kg)</b>                              | 940,1667±35,2840* | 924,8333±35,8073* | 918,5±65,7075*    |
| <b>Analogue 8 (150mg/kg)</b>                           | 721,6667±28,6542* | 761,8333±41,9066* | 777,8333±21,7202* |
| <b>Analogue 9 (150mg/kg)</b>                           | 764,3333±35,1036* | 769,3333±31,9228* | 764,6667±35,2003* |
| <b>Acide pipérique (150mg/kg)</b>                      | 446,6667±35,5902  | 447,6667±34,3025  | 453,3333±33,0736  |

❖ **Analyse des résultats :**



**Figure 166 :** Evolution du seuil de nociception en fonction du temps pour les cinq lots.

L'Analogue 8 présente des valeurs de seuil significativement plus élevées que le témoin, avec des valeurs de  $721,67 \pm 28,65$  (30 min),  $761,83 \pm 41,91$  (60 min) et  $777,83 \pm 21,72$  (120 min). L'effet analgésique de l'Analogue 8 augmente avec le temps, atteignant un pic à 120 minutes. Les valeurs obtenues pour l'Analogue 9 montrent un effet analgésique significatif avec des valeurs de  $764,33 \pm 35,10$  (30 min),  $769,33 \pm 31,92$  (60 min) et  $764,67 \pm 35,20$  (120 min). Contrairement à l'Analogue 8, l'effet de l'Analogue 9 semble stable sur toute la durée, sans augmentation marquée ou déclin notable, suggérant une efficacité constante sur 120 minutes. L'acide pipérique ne montre pas de différences significatives par rapport au témoin, avec des valeurs de  $446,67 \pm 35,59$  (30 min),  $447,67 \pm 34,30$  (60 min) et  $453,33 \pm 33,07$  (120 min). Ces résultats suggèrent que l'acide pipérique n'a pas d'effet analgésique notable dans ce modèle à la dose administrée. (Figure 166)

❖ **Discussion :**

Les Analogues 8 et 9, présentent un effet analgésique significatif et notable par rapport au témoin. L'Analogue 8 se distingue par une augmentation progressive de son effet analgésique, atteignant son maximum à 120 minutes. À l'inverse, l'Analogue 9 montre une stabilité de l'effet analgésique sur toute la durée de l'étude, ce qui pourrait indiquer un mécanisme d'action rapide et soutenu. Contrairement aux analogues, l'acide pipérique ne montre pas de

différence significative par rapport au témoin négatif, suggérant une absence d'activité analgésique notable à la dose testée.

*Comparaison des analogues avec la pipérine :* Les résultats montrent des différences significatives entre les effets analgésiques de la pipérine et ceux des Analogues 08 et 09, obtenus par hémisynthèse au niveau de la liaison amide.

Les Analogues 08 et 09, montrent des effets analgésiques significativement supérieurs à ceux de la pipérine et du témoin. L'Analogue 08 présente une augmentation progressive de l'effet analgésique, atteignant un pic à 120 minutes, rendant cet analogue intéressant pour une gestion durable de la douleur. L'Analogue 09, quant à lui, présente un effet relativement stable tout au long des 120 minutes. La modification chimique au niveau de la liaison amide semble jouer un rôle crucial dans l'activité des Analogues 08 et 09.

**III.10. Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des analogues amides de l'acide pipérique hémisynthétiques (méthode de diffusion sur puits) :**

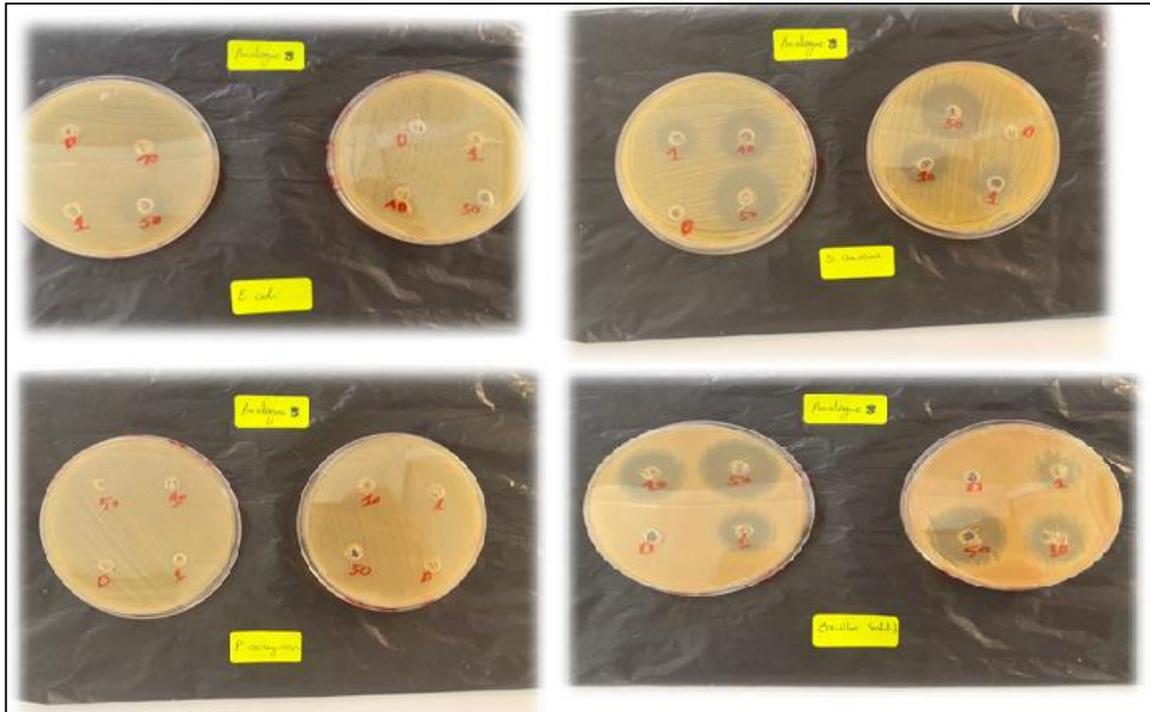
L'activité antibactérienne des analogues 08 et 09 a été évaluée au Centre de Recherche des Sciences Pharmaceutiques (CRSP) de Constantine. La méthode de diffusion en puits a été employée sur quatre types de bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. L'efficacité antibactérienne a été déterminée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition après une incubation de 24 heures à 37 °C.

L'activité antibactérienne des analogues 08 et 09 a été observée contre les souches bactériennes *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. Contrairement à cela, une activité notable a été détectée contre *Pseudomonas aeruginosa* uniquement pour l'analogue 09, tandis que l'analogue 08 s'est révélé inefficace contre cette souche (Tableau N° 49). (Figure 167 et 168)

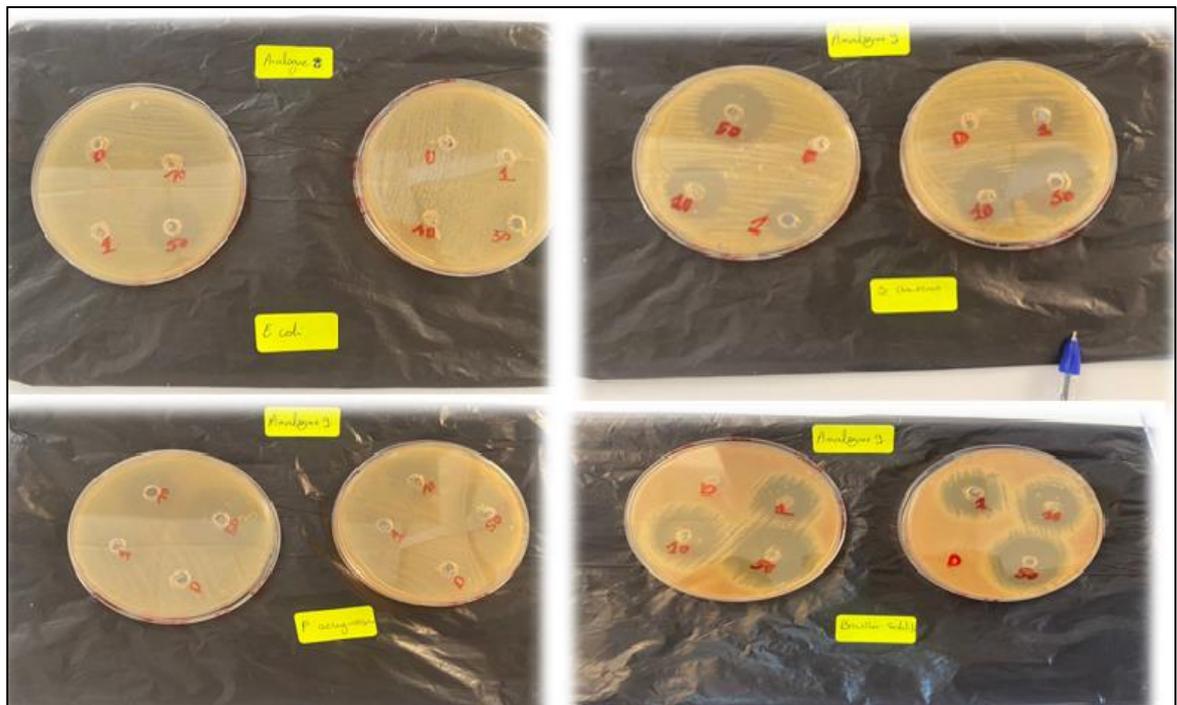
**Tableau 49 :** Valeurs des diamètres moyens des zones d'inhibition induites par les analogues 08 et 09.

|                               | Diamètre d'inhibition (mm) |             |    |    |             |    |    |
|-------------------------------|----------------------------|-------------|----|----|-------------|----|----|
|                               | Témoin négatif (DMSO)      | Analogue 08 |    |    | Analogue 09 |    |    |
|                               |                            | 1           | 10 | 50 | 1           | 10 | 50 |
| <i>Bacillus subtilis</i>      | -                          | 21          | 28 | 38 | 26          | 30 | 34 |
| <i>Escherichia coli</i>       | -                          | -           | -  | 17 | 36          | 38 | 40 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -                          | -           | -  | -  | 15          | 19 | 34 |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | -                          | 17          | 27 | 29 | 20          | 25 | 38 |

(-) : absence de l'activité antibactérienne

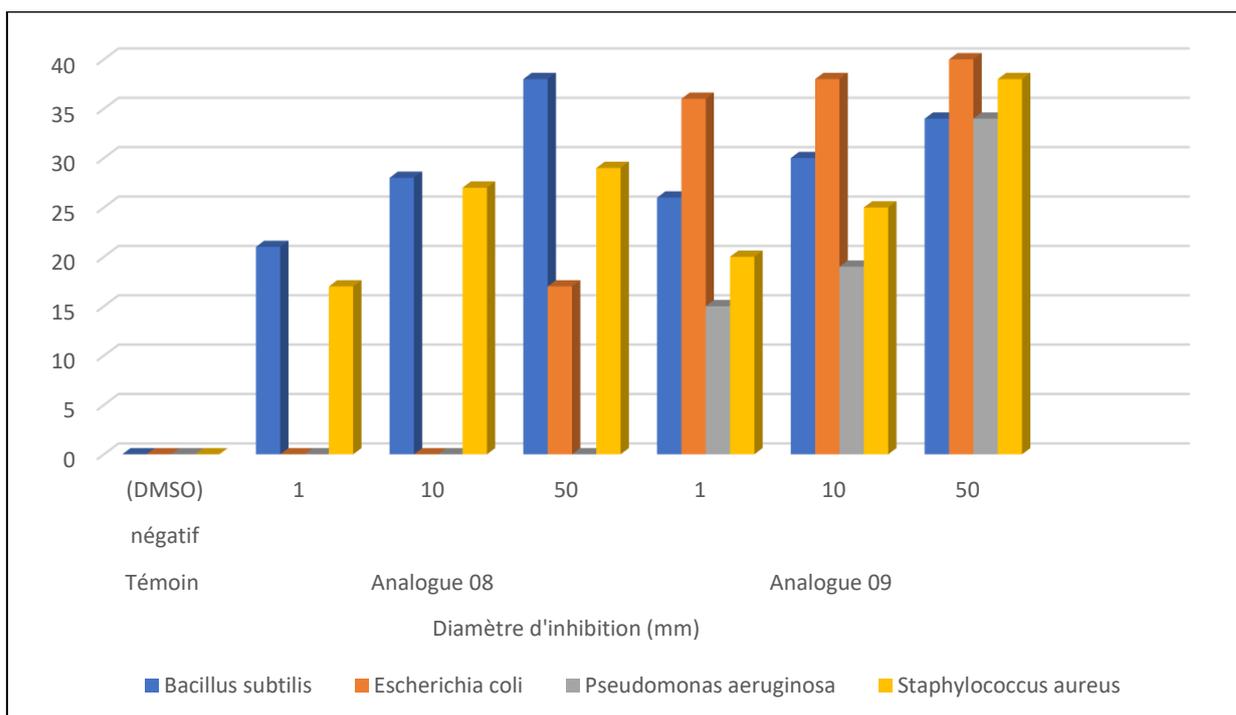


**Figure 167 :** Illustration de l'effet de l'analogue 08 sur les souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*.



**Figure 168 :** Illustration de l'effet de l'analogue 09 sur les souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*.

❖ Analyse et discussion des résultats :



**Figure 169 :** Diamètre d’inhibition par les deux analogues 08 et 09.

Les deux analogues étudiés démontrent une activité antibactérienne dépendante de la concentration, ce qui est une caractéristique classique des agents antimicrobiens.

Les souches Gram-positives (telles que *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) se révèlent globalement plus sensibles aux deux analogues comparés aux souches Gram-négatives (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Cette différence est attribuée à la structure des parois cellulaires : les bactéries Gram-négatives possèdent une membrane externe supplémentaire qui constitue une barrière limitant la pénétration des composés.

*Analogue 09* : Il est plus efficace que l’analogue 08 contre les souches Gram-négatives, notamment *E. coli* et *P. aeruginosa*. Cette meilleure performance peut s’expliquer par une interaction renforcée avec les cibles bactériennes ou une pénétration accrue dans les cellules.

Contre les souches Gram-positives, il montre une légère supériorité à haute concentration, bien que l’écart avec l’analogue 08 reste faible.

Son activité contre des souches résistantes, notamment *P. aeruginosa* et *E. coli*, est particulièrement remarquable.

*Analogue 08* : Bien qu’un peu moins performant que l’analogue 09, il conserve une bonne efficacité, en particulier contre les souches Gram-positives. (Figure 169)

Ces résultats s'alignent avec les observations rapportées dans d'autres travaux sur les analogues amides de la pipérine :

- *Étude de Arthi Sivashanmugam (janvier 2022)*

Cette recherche a exploré la synthèse et l'évaluation biologique de 15 analogues amides de la pipérine ciblant des protéines antibactériennes. Les deux analogues les plus actifs ont surpassé la pipérine dans leur efficacité contre cinq souches bactériennes, dont *Staphylococcus epidermidis*.

- *Étude de Karteek Rao Amperayani (février 2018)*

Ce travail portait sur la conception et la synthèse de nouveaux analogues conjugués à des aminopyridines substituées pour améliorer leur activité antimicrobienne. Les analogues obtenus ont montré une activité supérieure contre plusieurs souches, notamment *Bacillus subtilis*, *Streptobacillus*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *Salmonella*, par rapport aux molécules parentales.

### CONCLUSION GENERALE

Cette étude s'inscrit dans une démarche visant à concevoir de nouveaux agents anti-inflammatoires, analgésiques et antibactériens dérivés de la pipérine en combinant des approches expérimentales et *in silico*.

La première partie de notre manuscrit a été consacrée à une revue bibliographique sur la physiologie de l'inflammation, de la douleur et des infections bactériennes. Elle a inclus également une analyse approfondie de la pipérine et de ses analogues, ainsi qu'une étude détaillée des méthodes *in silico* et des stratégies de synthèse des amides.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons d'abord isolé la pipérine à partir du poivre noir, puis conçu, grâce à des approches *in silico*, de nouveaux analogues amides de la pipérine. Parmi les candidats générés, nous avons synthétisé les plus prometteurs et évalué leur activité thérapeutique, à la fois *in vivo* et *in vitro*. Les résultats ont mis en évidence que les analogues 08 et 09 présentaient des propriétés améliorées grâce à des modifications structurales spécifiques. Ces composés ont fait l'objet d'une analyse approfondie englobant leur synthèse, leur caractérisation chimique, une étude de leurs propriétés pharmacocinétiques et toxicologiques *in silico*, ainsi que des tests biologiques *in vivo* et *in vitro*.

Les fruits du poivre noir ont été caractérisés par des analyses macroscopiques et microscopiques, validant leur pureté. La pipérine a été isolée à partir du poivre noir en utilisant différentes techniques, parmi lesquelles l'extraction par chauffage à reflux qui a donné le meilleur rendement (3,1 %), mais l'acide acétique glacial a permis d'obtenir une pipérine de plus grande pureté, avec des cristaux bien définis.

La pipérine isolée a été identifiée à l'aide de tests UV, IR et RMN, qui étaient en concordance avec les données de la littérature. Les analyses ont confirmé la présence des fonctions caractéristiques, y compris les doubles liaisons conjuguées et le groupe amide.

Deux analogues amides (08 et 09) de l'acide pipérique ont été synthétisés avec des rendements respectifs de 64,7 % et 70,12 %.

Les spectres UV, IR et RMN ont confirmé la structure des analogues. Leurs points de fusion (219 °C pour l'analogue 08 et 225 °C pour l'analogue 09) étaient proches de celui de l'acide pipérique, témoignant de leur stabilité thermique.

L'administration de la pipérine (50 mg/kg) a montré un effet anti-inflammatoire significatif, avec des pourcentages d'inhibition de l'œdème similaires à ceux de l'aspirine (150 mg/kg). Ces résultats confirment l'efficacité de la pipérine dans des modèles d'inflammation aiguë.

La pipérine a démontré une augmentation significative du seuil de nociception, comparable au tramadol. Ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle la pipérine agit sur des récepteurs liés à la douleur, offrant une alternative potentielle aux analgésiques classiques.

Les études menées n'ont pas révélé d'activité antibactérienne significative pour la pipérine et l'acide pipérique sur les bactéries testées (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*), quelles que soient les méthodes utilisées (diffusion sur disque ou diffusion en puits).

Bien que certaines études antérieures rapportent une activité antibactérienne pour la pipérine, nos résultats divergent, possiblement en raison des variations méthodologiques, des solvants employés ou des spécificités des souches bactériennes utilisées.

L'analyse *in silico* a révélé que les analogues 08 et 09 présentent une absorption gastro-intestinale élevée et ne sont pas transportés par la glycoprotéine P, améliorant ainsi leur biodisponibilité. Les études de docking révèlent une interaction forte avec la COX-2 et différentes protéines bactériennes, avec des énergies de liaison inférieures à celles de la pipérine, confirmant leur potentiel anti-inflammatoire et antibactérien.

Les simulations de dynamique moléculaire ont confirmé la stabilité structurelle des analogues 08 et 09 dans leur interaction avec la COX-2, avec des paramètres RMSD et Rg indiquant une interaction stable et robuste.

Les analogues 08 et 09 montrent une toxicité modérée, comparable à celle de la pipérine et des anti-inflammatoires commerciaux. L'absence de pouvoir cancérigène et leur faible impact environnemental renforcent leur potentiel en tant que candidats thérapeutiques sûrs.

Les tests d'œdème de la patte induit par la carragénine chez la souris ont démontré des résultats significatifs :

**Analogue 08** : Inhibition modérée, atteignant un plateau à 60 % après 2 heures.

**Analogue 09** : Efficacité comparable à celle de l'aspirine, atteignant une inhibition de 85-90 % à 3 heures.

En comparaison : L'acide pipérique présente une faible inhibition (<10 %). L'aspirine reste la référence, mais l'analogue 09 montre une cinétique d'inhibition similaire avec un effet prolongé.

Les tests de pression de la queue confirment une efficacité analgésique notable pour les deux analogues :

**Analogue 08** : Augmentation progressive de l'effet analgésique, atteignant un maximum à 120 minutes ( $777,83 \pm 21,72$ ).

**Analogue 09** : Efficacité stable et significative sur toute la durée de l'étude ( $764,67 \pm 35,20$  à 120 minutes).

En revanche, l'acide pipérique n'a pas montré d'effet analgésique significatif. Ces résultats soulignent l'importance des modifications chimiques apportées.

Les résultats montrent que les analogues 08 et 09 surpassent la pipérine et l'acide pipérique en termes d'efficacité et de stabilité :

**Pipérine** : Effet initial marqué mais déclin rapide (73,98 % d'inhibition à 60 minutes, chutant à 24,38 % à 3 heures).

**Acide pipérique** : Faible efficacité (<10 % pour l'activité anti-inflammatoire).

**Analogue 08** : Effet stable sur la durée, avec une montée progressive des effets.

**Analogue 09** : Effet prolongé et comparable à celui de l'aspirine, en faisant un candidat idéal pour une utilisation thérapeutique.

Les deux analogues présentent une activité antibactérienne concentration-dépendante, avec une meilleure sensibilité des bactéries à Gram-positives (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) par rapport aux Gram-négatives (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). L'analogue 09 est particulièrement efficace, y compris contre des bactéries à Gram-négatives souvent résistantes comme *P. aeruginosa* et *E. coli*.

Ces résultats confirment le potentiel des analogues amides de l'acide pipérique, en particulier l'analogue 09, pour le développement futur d'agents antibactériens. Ces observations s'alignent avec d'autres études explorant des analogues amides de la pipérine, renforçant l'intérêt pour leur optimisation comme agents thérapeutiques potentiels.

### PERSPECTIVES

Les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel des analogues 08 et 09 comme candidats thérapeutiques prometteurs, surpassant la pipérine et l'acide pipérique en termes d'efficacité et de stabilité. Des études futures devraient :

1. Explorer des modèles animaux avancés pour valider leur efficacité et leur sécurité.
2. Élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans leurs activités pharmacologiques.
3. Poursuivre l'optimisation structurelle pour améliorer leurs propriétés pharmacodynamiques et leur spécificité.

En conclusion, cette étude constitue une étape importante dans le développement de nouvelles alternatives aux anti-inflammatoires, analgésiques et antibactériens, en s'inspirant des propriétés naturelles de la pipérine et en optimisant ses dérivés par hémisynthèse.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*. 19 mars 2010;140(6):771-6.
2. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 23 janv 2018;9(6):7204.
3. Ferber D. Microbiology. Pods invade infected bladders. *Science*. 4 juill 2003;301(5629):31.
4. Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S, Mahmood ZA. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 1 sept 2014;7:S461-8.
5. Dhargawe N, Mahakalkar S, Mohod B, Raj J. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic activity of piperine: An experimental study. *Pharmacognosy Research*. 1 janv 2020;12:176.
6. Bukhari IA, Pivac N, Alhumayyd MS, Mahesar AL, Gilani AH. The analgesic and anticonvulsant effects of piperine in mice. *J Physiol Pharmacol*. déc 2013;64(6):789-94.
7. Rahmani S, Belboukhari N, Sekkoum K, Abdelkrim C. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE D'EXTRAITS AQUEUX DE FEUILLES *Limoniastrum feei* (PLUMBAGINACEA). *Algerian journal of arid environment*. 1 juin 2016;6:80-6.
8. Kaur S, Sharma R, Sarangal V, Kaur N, Prashar P. Evaluation of anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin, lycopene and piperine as an adjunct to scaling and root planing: A clinical study. *Ayu*. déc 2017;38(3-4):117-21.
9. Bang JS, Oh DH, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, et al. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 $\beta$ -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(2):R49.
10. Umadevi P, Deepti K, Venugopal DVR. Synthesis, anticancer and antibacterial activities of piperine analogs. *Med Chem Res*. 1 nov 2013;22(11):5466-71.
11. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J Comput Chem*. déc 2009;30(16):2785-91.
12. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clin Exp Immunol*. févr 2007;147(2):227-35.
13. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*. 19 mars 2010;140(6):871-82.

14. Jabbour HN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction*. déc 2009;138(6):903-19.
15. Gravel SP. Rôles des kinases IKK et IKK-related dans les maladies inflammatoires chroniques : implications dans l'athérosclérose et la réponse hypoxique [Internet] [pharmacologie]. [Montréal]: université de Montréal; 2010 [cité 20 oct 2020]. Disponible sur: <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/5299>
16. Ciaccia L. Fundamentals of Inflammation. *Yale J Biol Med*. mars 2011;84(1):64-5.
17. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, éditeurs. *Robbins Basic Pathology, Eighth Edition*. 8th Edition. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2007. 960 p.
18. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 19 déc 2002;420(6917):846-52.
19. McEver RP. GMP-140: A receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1991;45(2):156-61.
20. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, et al. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *The Journal of Immunology*. 1 juin 1986;136(11):4220-5.
21. Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest*. déc 1987;80(6):1550-60.
22. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. sept 2004;18(3):385-405.
23. de Revel T, Doghmi K. *Physiologie de l'hémostase*. EMC - Dentisterie. 1 févr 2004;1(1):71-81.
24. SALIMA SADALLAH.JÜR.G. A. SCHIFFERLI. Maladies et complément. *Rev Med Suisse*. 2018;14:752-6.
25. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 19 oct 2001;429(1):161-76.
26. Galoppin L, Ponvert C. L'Histamine. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 1 janv 1997;37(7):865-80.
27. Serteyn D., Grulke S., Franck T., Mouithys-Mickalad A., Deby-Dupont G. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann Méd Vét*. 2003;147(2):79-93.
28. Delarue J. Acides gras polyinsaturés et inflammation. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 1 janv 2001;15(3):172-6.

29. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mai 2011;31(5):986-1000.
30. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
31. Dinarello CA. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Current Opinion in Immunology.* 1 déc 1991;3(6):941-8.
32. Calvino B. Les mécanismes de la douleur. *Psycho Oncologie.* 1 juin 2007;1(2):81-7.
33. Physiologie de la douleur. *EMC - Anesthésie-Réanimation.* 1 oct 2004;1(4):227-66.
34. Casey KL. Concepts of pain mechanisms: the contribution of functional imaging of the human brain. *Prog Brain Res.* 2000;129:277-87.
35. Le Bars D, Plaghki L. Douleurs : bases anatomiques, physiologiques et psychologiques. Douleurs aiguës, douleurs chroniques, soins palliatifs. In: *Med-Line.* Paris; 2001. p. 43-82.
36. Kumazawa T. Primitivism and plasticity of pain--implication of polymodal receptors. *Neurosci Res.* sept 1998;32(1):9-31.
37. À chaque douleur, son antalgie | Le Généraliste [Internet]. [cité 5 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.legeneraliste.fr/actu-medicale/chaque-douleur-son-antalgie>
38. Cottinet D. Diversité phénotypique et adaptation chez *Escherichia Coli* étudiées en millifluidique digitale [These de doctorat]. l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE; 2013.
39. Hart CA, Shears P. Atlas de poche de microbiologie. Flammarion Médecine-Sciences; 1999. paris; 1999. 314 p.
40. Hart CA, Shears P. Atlas de poche de microbiologie. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 1999.
41. Török E, Moran E, Cooke F. Handbook of Infectious Diseases and Microbiology. 2nd éd. England: Oxford University Press; 2017. 912 p.
42. Goering RV, Dockrell HM, Zuckerman M, Chiodini PL, Roitt IM. MIMS' MEDICAL MICROBIOLOGY. 5th éd. Saunders: an imprint of Elsevier Ltd; 2013. 580 p.
43. Bennet JE, Dolin R, Martin J. B. Infectious Disease ESSENTIALS. 1st éd. USA: Elsevier Inc; 2017. 560 p.
44. Kenneth JR. Sherris medical microbiology. 7th éd. Canada: McGraw-Hill Education; 2018. 1003 p.

45. journaldesfemmes.fr [Internet]. 2023. infections urinaires. Disponible sur: <https://img-3.journaldesfemmes.fr/L11qazseRT14xtxrQ61ndNYdh0=/1080x/smart/5fb93dc38807455492129519aa62da5c/ccmcms-jdf/33216532.jpg>
46. Tortora GJ, Funke BB, Case CL. Microbiology : an introduction. 13th éd. United Kingdom: Pearson; 2018. 960 p.
47. Opatowski M. Résistance bactérienne aux antibiotiques, apport du système national des données de santé [Internet] [phdthesis]. Université Paris-Saclay; 2020 [cité 8 déc 2024]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-03149679>
48. Sumathykuty MA, Rao JM, Padmakumari KP, Narayanan CS. Essential oil constituents of some Piper species. Flavour Fragr J. sept 1999;14(5):279-82.
49. Statistics [Internet]. [cité 9 janv 2025]. Statistiques | FAO | Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Disponible sur: <http://www.fao.org/statistics/fr>
50. Mathieu Weil. Étude des procédés de transformation de poivres sauvages d'îles de l'océan indien : impact sur la qualité (piquant, arôme et couleur) [Internet] [thèse doctorat]. [Montpellier]: GAIA (Montpellier ; École Doctorale ); 2018 [cité 5 août 2024]. Disponible sur: <https://theses.fr/2018NSAM0003>
51. Teuscher Eberhard, Anton Robert, Lobstein-Guth Annelise. Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris : Tec&Doc ; Cachan : Ed. Médicales internationales. 2005. 522 pages.
52. Myrtea - Formations : aromathérapie, réflexologie, naturopathie, massages bien-être. Formations en présentiel ou en ligne [Internet]. [cité 26 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.myrtea-formations.com/>
53. Damanhoury ZA, Ahmad A. A Review on Therapeutic Potential of Piper nigrum L. (Black Pepper): The King of Spices. Medicinal & Aromatic Plants. 2014;3(3):1-6.
54. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1 oct 1997;46(4):597-673.
55. Parmar VS, Jain SC, Gupta S, Talwar S, Rajwanshi VK, Kumar R, et al. Polyphenols and alkaloids from piper species. Phytochemistry. 27 oct 1998;49(4):1069-78.
56. Perpillon A. Les plantes à épices, de Jacques Maistre. Annales de géographie. 1965;74(405):596-9.
57. Ravindran PN. Black pepper: piper nigrum. Amsterdam: Harwood Academic; 2000.
58. Expliquez-moi les épices, aromates ou médicaments - broché - Pierre Delaveau - Achat Livre | fnac [Internet]. [cité 26 juin 2020]. Disponible sur: <https://livre.fnac.com/a1801541/Pierre-Delaveau-Expliquez-moi-les-epices-aromates-ou-medicaments>

59. Ahmad N, Fazal H, Abbasi BH, Farooq S, Ali M, Khan MA. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1 janv 2012;2(3, Supplement):S1945-53.
60. Richard H. *Epices et aromates*. Paris : RIA. 1985. 339 p.
61. LACAU SIONNEAU D. Sechage du poivre (*piper nigrum*) et de la cardamome (*elettaria cardamomum maton*) : influences sur la qualite aromatique et la couleur [Internet] [These de doctorat]. École nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires (Massy, Essonne); 1993 [cité 26 juin 2020]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/1993EIAA0025>
62. De Cleyn R, Verzele M. Constituents of peppers. *Chromatographia*. 1 juill 1975;8(7):342-4.
63. Epstein WW, Netz DF, Seidel JL. Isolation of piperine from black pepper. *J Chem Educ*. 1 juill 1993;70(7):598.
64. Pruthi, JS. *Spices and condiments : chemistry, microbiology, technology*. New York : Academic Press. 1993.
65. Khan M, Siddiqui M. Antimicrobial activity of *Piper* fruits. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 1 janv 2007;6.
66. Paulkumar K, Gnanajobitha D, Vanaja M, Shanmugam R, Chelladurai M, Kannaiyan P, et al. *Piper nigrum* Leaf and Stem Assisted Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Its Antibacterial Activity Against Agricultural Plant Pathogens. *TheScientificWorldJournal*. 15 janv 2014;2014:829894.
67. Vijayakumar RS, Surya D, Nalini N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep*. 2004;9(2):105-10.
68. Selvendiran K, Sakthisekaran D. Chemopreventive effect of piperine on modulating lipid peroxidation and membrane bound enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis. *Biomed Pharmacother*. mai 2004;58(4):264-7.
69. Agbor GA, Akinfiresoye L, Sortino J, Johnson R, Vinson JA. *Piper* species protect cardiac, hepatic and renal antioxidant status of atherogenic diet fed hamsters. *Food Chem*. 1 oct 2012;134(3):1354-9.
70. Ahmad N, Fazal H, Abbasi BH, Rashid M, Mahmood T, Fatima N. Efficient regeneration and antioxidant potential in regenerated tissues of *Piper nigrum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 1 juill 2010;102(1):129-34.
71. Shamkuwar PB, Shahi SR, Jadhav ST. Evaluation of antidiarrhoeal effect of Black pepper (*Piper nigrum* L.). In 2012.

72. Lin Z, Liao Y, Venkatasamy R, Hider RC, Soumyanath A. Amides from *Piper nigrum* L. with dissimilar effects on melanocyte proliferation in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007;59(4):529-36.
73. Chopra B, Dhingra AK, Kapoor RP, Prasad DN. Piperine and Its Various Physicochemical and Biological Aspects: A Review. *The Open Chemistry Journal* [Internet]. 30 déc 2016 [cité 2 juill 2020];3(1). Disponible sur: <https://openchemistryjournal.com/VOLUME/3/PAGE/75/>
74. Geissman, T. A, Crout, D. H. *Organic chemistry of secondary plant metabolism*. Freeman, Cooper&Company: San Francisco. 1969. 170 p.
75. Bird CR, Smith TA. Agmatine coumaroyltransferase from barley seedlings. *Phytochemistry*. 1 janv 1983;22(11):2401-3.
76. Negrel J, Martin C. The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*. 1 janv 1984;23(12):2797-801.
77. Negrel J, Jeandet P. Metabolism of tyramine and feruloyltyramine in TMV inoculated leaves of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*. 1 janv 1987;26(8):2185-90.
78. Bird CR, Smith TA. The biosynthesis of coumarylagmatine in barley seedlings. *Phytochemistry*. 1 janv 1981;20(10):2345-6.
79. Okwute S, Egharevba H. Piperine-Type Amides: Review of the Chemical and Biological Characteristics. *ChemInform*. 24 juin 2014;45.
80. Paula VF de, Barbosa LC de A, Demuner AJ, Piló-Veloso D, Picanço MC. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pest Management Science*. 2000;56(2):168-74.
81. Sunkara G, Mada SR, Vobalaboina V. Pharmacokinetics and tissue distribution of piperine in animals after i.v. bolus administration. *Pharmazie*. août 2001;56(8):640-2.
82. Shanmugasundaram P, Maheswari R, Vijayaanandhi M. Quantitative estimation of piperine in herbal cough syrup by HPTLC method. *Rasayan Journal of Chemistry*. 1 janv 2008;1:212-7.
83. Kannur D, Shingate PN, Dongre P. New method development for extraction and isolation of piperine from black pepper. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 1 janv 2013;4:3165-70.
84. Kulkarni D, Apte SP, Mary F, Sane RT. High performance thin layer chromatographic method for the determination of piperine from *piper nigrum* linn. *Indian Drugs*. 1 janv 2001;38:323-6.
85. Scott IM, Puniani E, Jensen H, Livesey JF, Poveda L, Sánchez-Vindas P, et al. Analysis of Piperaceae Germplasm by HPLC and LCMS: A Method for Isolating and

- Identifying Unsaturated Amides from Piper spp Extracts. *J Agric Food Chem*. 1 mars 2005;53(6):1907-13.
86. Raman G, Gaikar VG. Microwave-Assisted Extraction of Piperine from Piper nigrum. *Ind Eng Chem Res*. 1 mai 2002;41(10):2521-8.
87. Schobert R, Siegfried S, Gordon GJ. Three-component synthesis of (E)- $\alpha,\beta$ -unsaturated amides of the piperine family. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*. 11 oct 2001;(19):2393-7.
88. El-Faham A, Albericio F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem Rev*. 9 nov 2011;111(11):6557-602.
89. Banerji A, Ghosh PC. Sylvatine, a new alkaloid from Piper sylvaticum roxb. (Piperaceae). *Tetrahedron*. 1 janv 1973;29(7):977-9.
90. Karri V rama. Piperine: A valuable alkaloid from piper species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 1 mars 2014;6(4):34-8.
91. Tiwari A, Mahadik KR, Gabhe SY. Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties. *Medicine in Drug Discovery*. 1 sept 2020;7:100027.
92. Koul S, Koul JL, Taneja SC, Dhar KL, Jamwal DS, Singh K, et al. Structure–activity relationship of piperine and its synthetic analogues for their inhibitory potentials of rat hepatic microsomal constitutive and inducible cytochrome P450 activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1 janv 2000;8(1):251-68.
93. Correa EA, Högestätt ED, Sterner O, Echeverri F, Zygmunt PM. In vitro TRPV1 activity of piperine derived amides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1 mai 2010;18(9):3299-306.
94. Nargotra A, Sharma S, Koul JL, Sangwan PL, Khan IA, Kumar A, et al. Quantitative structure activity relationship (QSAR) of piperine analogs for bacterial NorA efflux pump inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1 oct 2009;44(10):4128-35.
95. Taqvi SIH, Shah AJ, Gilani AH. Blood Pressure Lowering and Vasomodulator Effects of Piperine. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. nov 2008;52(5):452-8.
96. Makhov P, Golovine K, Canter D, Kutikov A, Simhan J, Corlew MM, et al. Co-Administration of Piperine and Docetaxel Results in Improved Anti-Tumor Efficacy via Inhibition of CYP3A4 Activity. *Prostate*. 1 mai 2012;72(6):661-7.
97. Srinivasan K. Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 25 oct 2007;47(8):735-48.
98. Sudjarwo SA. THE POTENCY OF PIPERINE AS ANTIINFLAMMATORY AND ANALGESIC IN RATS AND MICE. 2005;41(3):5.

99. Matsuda H, Ninomiya K, Morikawa T, Yasuda D, Yamaguchi I, Yoshikawa M. Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on d-galactosamine/TNF- $\alpha$ -induced cell death in mouse hepatocytes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15 mars 2008;18(6):2038-42.
100. Platel K, Srinivasan K. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. *Int J Food Sci Nutr*. janv 1996;47(1):55-9.
101. Mao QQ, Huang Z, Zhong XM, Xian YF, Ip SP. Piperine reverses the effects of corticosterone on behavior and hippocampal BDNF expression in mice. *Neurochemistry International*. 1 juill 2014;74:36-41.
102. Sharma S, Kalia NP, Suden P, Chauhan PS, Kumar M, Ram AB, et al. Protective efficacy of piperine against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. juill 2014;94(4):389-96.
103. Chen CY, Li W, Qu KP, Chen CR. Piperine exerts anti-seizure effects via the TRPV1 receptor in mice. *Eur J Pharmacol*. 15 août 2013;714(1-3):288-94.
104. Johnson JJ, Nihal M, Siddiqui IA, Scarlett CO, Bailey HH, Mukhtar H, et al. Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. *Mol Nutr Food Res*. août 2011;55(8):1169-76.
105. Bae GS, Kim MS, Jeong J, Lee HY, Park KC, Koo BS, et al. Piperine ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the activation of mitogen activated protein kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 8 juill 2011;410(3):382-8.
106. Akhilender Naidu K, Thippeswamy NB. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices. *Mol Cell Biochem*. 1 janv 2002;229(1):19-23.
107. Pistolesim, E. Nutritional and therapeutical preparation having antioxidant activity. *PCT Int Appl*. 2002;WO 2002052955 A1:22.
108. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2000;14(6):329-34.
109. Li S, Wang C, Li W, Koike K, Nikaido T, Wang MW. Antidepressant-like effects of piperine and its derivative, antiepilepsirine. *Journal of Asian Natural Products Research*. 1 juill 2007;9(5):421-30.
110. Wattanathorn J, Chonpathompikunlert P, Muchimapura S, Priprem A, Tankamnerdthai O. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. *Food and Chemical Toxicology*. 1 sept 2008;46(9):3106-10.

111. Khajuria A, Zutshi U, Bedi KL. Permeability characteristics of piperine on oral absorption--an active alkaloid from peppers and a bioavailability enhancer. *Indian J Exp Biol.* janv 1998;36(1):46-50.
112. Khajuria A, Thusu N, Zutshi U. Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: Influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics. *Phytomedicine.* 1 janv 2002;9(3):224-31.
113. Miyako T, Ji-Guang J, Yun-Fei L, Sosogu N. Effects of piperine on the motility of the isolated guinea-pig ileum: comparison with capsaicin. *European Journal of Pharmacology.* 4 sept 1990;186(1):71-7.
114. Johri RK, Thusu N, Khajuria A, Zutshi U. Piperine-mediated changes in the permeability of rat intestinal epithelial cells: The status of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity, uptake of amino acids and lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology.* 1 avr 1992;43(7):1401-7.
115. Khajuria A, Johri RK, Zutshi U. Piperine mediated alterations in lipid peroxidation and cellular thiol status of rat intestinal mucosa and epithelial cells. *Phytomedicine.* 1 nov 1999;6(5):351-5.
116. Bajad S, Bedi KL, Singla AK, Johri RK. Antidiarrhoeal Activity of Piperine in Mice. *Planta Med.* 2001;67(03):284-7.
117. Bajad S, Bedi KL, Singla AK, Johri RK. Piperine Inhibits Gastric Emptying and Gastrointestinal Transit in Rats and Mice. *Planta Med.* 2001;67(2):176-9.
118. Khan IA, Mirza ZM, Kumar A, Verma V, Qazi GN. Piperine, a Phytochemical Potentiator of Ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1 févr 2006;50(2):810-2.
119. Begum N, Bakshi V, Vijayalaxmi A, Gaud P, Sunand K, Kumar K, et al. Protective role of Piperine and Metformin on Gentamicin induced hepatorenal toxicity. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 1 nov 2015;35(2):83-9.
120. Nirwane AM, Bapat AR. Effect of methanolic extract of *Piper nigrum* fruits in Ethanol-CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Der Pharmacia Lettre.* 24 juill 2012;4(3):795-802.
121. Park BS, Son DJ, Park YH, Kim TW, Lee SE. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. *Phytomedicine.* 4 déc 2007;14(12):853-5.
122. Peela J, Elshaari F, Elfrady M, Srikumar S, Singh R, Belkheir A, et al. Effect of Piperine on Lipid Profile of Non-Transgenic Mice. *Int Rev Biophys Chem.* 1 août 2012;3(4).
123. Vijayakumar RS, Nalini N. Piperine, an active principle from *Piper nigrum*, modulates hormonal and apo lipoprotein profiles in hyperlipidemic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2006;17(2):71-86.

124. Shah SS, Shah GB, Singh SD, Gohil PV, Chauhan K, Shah KA, et al. Effect of piperine in the regulation of obesity-induced dyslipidemia in high-fat diet rats. *Indian J Pharmacol.* mai 2011;43(3):296-9.
125. Malini T, Arunakaran J, Aruldas MM, Govindarajulu P. Effects of piperine on the lipid composition and enzymes of the pyruvate-malate cycle in the testis of the rat in vivo. *Biochem Mol Biol Int.* mars 1999;47(3):537-45.
126. Doucette CD, Hilchie AL, Liwski R, Hoskin DW. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. *J Nutr Biochem.* janv 2013;24(1):231-9.
127. Samykutty A, Shetty AV, Dakshinamoorthy G, Bartik MM, Johnson GL, Webb B, et al. Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE.* 2013;8(6):e65889.
128. DB M, S S, KR M. Role of Piperine as an Effective Bioenhancer in Drug Absorption. *Pharmaceutica Analytica Acta.* 1 janv 2018;09(7):591.
129. Jhanwar B, Gupta S. Biopotential using herbs: Novel technique for poor bioavailable drugs. *International Journal of PharmTech Research.* 1 janv 2014;6(2):443-54.
130. Micevych PE, Yaksh TL, Szolcsanyi J. Effect of intrathecal capsaicin analogues on the immunofluorescence of peptides and serotonin in the dorsal horn in rats. *Neuroscience.* 1 janv 1983;8(1):123-31.
131. Miyauchi T, Ishikawa T, Sugishita Y, Saito A, Goto K. Involvement of calcitonin gene-related peptide in the positive chronotropic and inotropic effects of piperine and development of cross-tachyphylaxis between piperine and capsaicin in the isolated rat atria. *J Pharmacol Exp Ther.* févr 1989;248(2):816-24.
132. Szallasi A, Blumberg PM. Characterization of vanilloid receptors in the dorsal horn of pig spinal cord. *Brain Research.* 3 mai 1991;547(2):335-8.
133. Kawada T, Sakabe SI, Watanabe T, Yamamoto M, Iwai K. Some Pungent Principles of Spices Cause the Adrenal Medulla to Secrete Catecholamine in Anesthetized Rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1 juin 1988;188(2):229-33.
134. Atal CK, Dubey RK, Singh J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther.* janv 1985;232(1):258-62.
135. Eun JS. A Study on the Mechanism of Analgesic Action of Piperine. *YAKHAK HOEJI.* 30 août 1986;30(4):169-73.
136. Liu GQ, Algeri S, Ceci A, Garattini S, Gobbi M, Murai S. Stimulation of serotonin synthesis in rat brain after antiepilepsirine, an antiepileptic piperine derivative. *Biochemical Pharmacology.* 1 déc 1984;33(23):3883-6.

137. Ganesh Bhat B, Chandrasekhara N. Studies on the metabolism of piperine: Absorption, tissue distribution and excretion of urinary conjugates in rats. *Toxicology*. 1 juill 1986;40(1):83-92.
138. Suresh D, Srinivasan K. Studies on the in vitro absorption of spice principles – Curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food and Chemical Toxicology*. 1 août 2007;45(8):1437-42.
139. Bhat BG, Chandrasekhara N. Metabolic disposition of piperine in the rat. *Toxicology*. 1 avr 1987;44(1):99-106.
140. Bajad S, Coumar M, Khajuria R, Suri OP, Bedi KL. Characterization of a new rat urinary metabolite of piperine by LC/NMR/MS studies. *Eur J Pharm Sci*. août 2003;19(5):413-21.
141. Khajuria A, Thusu N, Zutshi U, Bedi KL. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. *Mol Cell Biochem*. déc 1998;189(1-2):113-8.
142. Suresh DV, Mahesha HG, Rao AGA, Srinivasan K. Binding of bioactive phytochemical piperine with human serum albumin: a spectrofluorometric study. *Biopolymers*. juill 2007;86(4):265-75.
143. Veerareddy PR, Vobalaboina V. Pharmacokinetics and tissue distribution of piperine lipid nanospheres. *Pharmazie*. mai 2008;63(5):352-5.
144. Atal CK, Zutshi U, Rao PG. Scientific evidence on the role of Ayurvedic herbals on bioavailability of drugs. *Journal of Ethnopharmacology*. 1 sept 1981;4(2):229-32.
145. Pattanaik S, Hota D, Prabhakar S, Kharbanda P, Pandhi P. Effect of piperine on the steady-state pharmacokinetics of phenytoin in patients with epilepsy. *Phyther Res*. août 2006;20(8):683-6.
146. Bano G, Raina RK, Zutshi U, Bedi KL, Johri RK, Sharma SC. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 1 déc 1991;41(6):615-7.
147. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*. mai 1998;64(4):353-6.
148. Di Pierro F, Settembre R. Safety and efficacy of an add-on therapy with curcumin phytosome and piperine and/or lipoic acid in subjects with a diagnosis of peripheral neuropathy treated with dexibuprofen. *J Pain Res*. 2013;6:497-503.
149. Badmaev V, Majeed M, Norkus EP. Piperine, an alkaloid derived from black pepper increases serum response of beta-carotene during 14-days of oral beta-carotene supplementation. *Nutrition Research*. 1 mars 1999;19(3):381-8.

150. Badmaev V, Majeed M, Prakash L. Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme q10 following oral supplementation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1 févr 2000;11(2):109-13.
151. Vora A, Patel S, Patel K. Role of Risorine in the Treatment of Drug - Susceptible Pulmonary Tuberculosis: A Pilot Study. *J Assoc Physicians India*. nov 2016;64(11):20-4.
152. Patel N, Jagannath K, Vora A, Patel M, Patel A. A Randomized, Controlled, Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Tolerability of Risorine with Conventional Rifampicin in the Treatment of Newly Diagnosed Pulmonary Tuberculosis Patients. *J Assoc Physicians India*. sept 2017;65(9):48-54.
153. Bedada SK, Boga PK. Effect of piperine on CYP2E1 enzyme activity of chlorzoxazone in healthy volunteers. *Xenobiotica*. déc 2017;47(12):1035-41.
154. Bedada SK, Boga PK. The influence of piperine on the pharmacokinetics of fexofenadine, a P-glycoprotein substrate, in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. mars 2017;73(3):343-9.
155. Cherniakov I, Izgelov D, Barasch D, Davidson E, Domb AJ, Hoffman A. Piperine-pro-nanolipospheres as a novel oral delivery system of cannabinoids: Pharmacokinetic evaluation in healthy volunteers in comparison to buccal spray administration. *J Control Release*. 28 nov 2017;266:1-7.
156. Rofes L, Arreola V, Martin A, Clavé P. Effect of oral piperine on the swallow response of patients with oropharyngeal dysphagia. *J Gastroenterol*. 1 déc 2014;49(12):1517-23.
157. Shafiee A, Hoormand M, Shahidi-Dadras M, Abadi A. The effect of topical piperine combined with narrowband UVB on vitiligo treatment: A clinical trial study. *Phytother Res*. sept 2018;32(9):1812-7.
158. Mihăilă B, Dinică RM, Tatu AL, Buzia OD. New insights in vitiligo treatments using bioactive compounds from *Piper nigrum*. *Exp Ther Med*. févr 2019;17(2):1039-44.
159. Donata, Kesavan M, Austin, Mohan KS, Rajagopalan K, Kuttan R. CLINICAL TRIAL OF CERTAIN AYURVEDIC MEDICINES INDICATED IN VITILIGO. *Anc Sci Life*. 1990;9(4):202-6.
160. Panahi Y, Ghanei M, Hajhashemi A, Sahebkar A. Effects of Curcuminoids-Piperine Combination on Systemic Oxidative Stress, Clinical Symptoms and Quality of Life in Subjects with Chronic Pulmonary Complications Due to Sulfur Mustard: A Randomized Controlled Trial. *J Diet Suppl*. 2016;13(1):93-105.
161. Panahi Y, Hosseini MS, Khalili N, Naimi E, Majeed M, Sahebkar A. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoid-piperine combination in subjects with metabolic syndrome: A randomized controlled trial and an updated meta-analysis. *Clin Nutr*. déc 2015;34(6):1101-8.

162. Rondanelli M, Opizzi A, Perna S, Faliva M, Solerte SB, Fioravanti M, et al. Acute Effect on Satiety, Resting Energy Expenditure, Respiratory Quotient, Glucagon-Like Peptide-1, Free Fatty Acids, and Glycerol Following Consumption of a Combination of Bioactive Food Ingredients in Overweight Subjects. *Journal of the American College of Nutrition*. 1 févr 2013;32(1):41-9.
163. Amperayani KR, Kumar KN, Parimi UD. Synthesis and in vitro and in silico antimicrobial studies of novel piperine–pyridine analogs. *Res Chem Intermed*. 1 mai 2018;44(5):3549-64.
164. Wansri R, Lin ACK, Pengon J, Kamchonwongpaisan S, Srimongkolpithak N, Rattanajak R, et al. Semi-Synthesis of N-Aryl Amide Analogs of Piperine from *Piper nigrum* and Evaluation of Their Antitrypanosomal, Antimalarial, and Anti-SARS-CoV-2 Main Protease Activities. *Molecules*. 29 avr 2022;27(9):2841.
165. Fischer E. Synthese von Polypeptiden. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1 juill 1903;36(3):2982-92.
166. Baumann E. Ueber eine einfache Methode der Darstellung von Benzoësäureäthern. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1 juill 1886;19(2):3218-22.
167. Jaradat DMM. Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. *Amino Acids*. 1 janv 2018;50(1):39-68.
168. Vaughan JR. ACYLALKYLCARBONATES AS ACYLATING AGENTS FOR THE SYNTHESIS OF PEPTIDES. *J Am Chem Soc*. 1 juill 1951;73(7):3547-3547.
169. Bodanszky M, Yang Lin C, Yiotakis AE, Mutt V, Said SI. Vasoactive intestinal peptide (VIP) from chicken: Synthesis and properties of the C-terminal hendecapeptide. *Bioorganic Chemistry*. 1 sept 1976;5(3):339-50.
170. Reddy PR, Chandrashekar R, Shaik H, Satyanarayana B. A Modified Method for the Synthesis of Tetradentate Ligand Involving Peptide Bond. *International Journal of Organic Chemistry*. 22 mai 2014;4(2):122-34.
171. Izdebski J, Kunce D. Evaluation of carbodiimides using a competition method. *J Pept Sci*. avr 1997;3(2):141-4.
172. Atherton E, Cameron LR, Sheppard RC. Peptide synthesis: Part 10. Use of pentafluorophenyl esters of fluorenylmethoxycarbonylamino acids in solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron*. 1 janv 1988;44(3):843-57.
173. Albericio F, Barany G. Improved approach for anchoring N alpha-9-fluorenylmethoxycarbonylamino acids as p-alkoxybenzyl esters in solid-phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res*. juill 1985;26(1):92-7.

174. Peters S, Bielfeldt T, Meldal M, Bock K, Paulsen H. Multiple column solid phase glycopeptide synthesis. *Tetrahedron Letters*. 16 sept 1991;32(38):5067-70.
175. Lloyd-Williams P, Gairí M, Albericio F, Giralt E. Convergent solid-phase peptide synthesis. X. Synthesis and purification of protected peptide fragments using the photolabile Nbb-resin. *Tetrahedron*. 2 déc 1991;47(47):9867-80.
176. Karskela T. *Solid-Phase Organic Synthesis: Bicyclic Peptides and Purine-Derived Small Molecules*. 2013.
177. Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol*. sept 2007;152(1):9-20.
178. Shoichet BK. Virtual screening of chemical libraries. *Nature*. 16 déc 2004;432(7019):862-5.
179. Lionta E, Spyrou G, Vassilatis DK, Cournia Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(16):1923-38.
180. Maia EHB, Assis LC, de Oliveira TA, da Silva AM, Taranto AG. Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence. *Front Chem*. 2020;8:343.
181. Lagarde N. Méthodes de criblage virtuel in silico : importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine 6. [Internet] [phdthesis]. Conservatoire national des arts et métiers - CNAM; 2014 [cité 15 août 2024]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-01132490>
182. Computer Aided Drug Design - Profacgen [Internet]. [cité 15 août 2024]. Disponible sur: <https://www.profacgen.com/computer-aided-drug-design-cadd.htm>
183. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov*. nov 2004;3(11):935-49.
184. Rimac H, Grishina M, Potemkin V. Use of the Complementarity Principle in Docking Procedures: A New Approach for Evaluating the Correctness of Binding Poses. *J Chem Inf Model*. 26 avr 2021;61(4):1801-13.
185. Mohanty M, Mohanty PS. Molecular docking in organic, inorganic, and hybrid systems: a tutorial review. *Monatsh Chem*. 1 juill 2023;154(7):683-707.
186. Mohanty M, Mohanty PS. Molecular docking in organic, inorganic, and hybrid systems: a tutorial review. *Monatsh Chem*. 1 juill 2023;154(7):683-707.
187. Salmaso V, Moro S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Front Pharmacol*. 2018;9:923.

188. Hoffer L. Développement et validation du logiciel S4MPLE : application au docking moléculaire et à l'optimisation de fragments assistée par ordinateur dans le cadre du fragment-based drug design [Internet] [phdthesis]. Université de Strasbourg; 2013 [cité 15 août 2024]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-00874644>
189. Karplus M, McCammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol.* sept 2002;9(9):646-52.
190. Adcock SA, McCammon JA. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chem Rev.* 1 mai 2006;106(5):1589-615.
191. Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J Am Chem Soc.* 1 mai 1995;117(19):5179-97.
192. MacKerell ADJr, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RLJr, Evanseck JD, Field MJ, et al. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J Phys Chem B.* 1 avr 1998;102(18):3586-616.
193. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J Am Chem Soc.* 13 nov 1996;118(45):11225-36.
194. Kožić M, Bertoša B. Trajectory maps: molecular dynamics visualization and analysis. *NAR Genomics and Bioinformatics.* 1 mars 2024;6(1):lqad114.
195. Lindahl E, Hess B, van der Spoel D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Model.* 1 août 2001;7(8):306-17.
196. Brooks BR, Brooks CL, MacKerell AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, et al. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J Comput Chem.* 30 juill 2009;30(10):1545-614.
197. Leelananda SP, Lindert S. Computational methods in drug discovery. *Beilstein J Org Chem.* 12 déc 2016;12(1):2694-718.
198. Cherkasov A, Muratov EN, Fourches D, Varnek A, Baskin II, Cronin M, et al. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? *J Med Chem.* 26 juin 2014;57(12):4977-5010.
199. Muratov EN, Bajorath J, Sheridan RP, Tetko I, Filimonov D, Poroikov V, et al. QSAR without borders. *Chem Soc Rev.* 7 juin 2020;49(11):3525-64.
200. Feller D. The role of databases in support of computational chemistry calculations. *Journal of Computational Chemistry.* 1996;17(13):1571-86.
201. Kohn W, Sham LJ. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys Rev.* 15 nov 1965;140(4A):A1133-8.

202. Dominique Gennet. Fil d'Ariane CultureSciences-Chimie. 2002 [cité 14 août 2024]. Introduction à la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Disponible sur: <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/introduction-a-la-resonance-magnetique-nucleaire-rmn>
203. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. déc 1962;111:544-7.
204. R. Koster, M. Anderson et E.J. Beer. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc*. 1959;18:412-7.
205. Fiorenzani P, Lamponi S, Magnani A, Ceccarelli I, Aloisi AM. In Vitro and In Vivo Characterization of the New Analgesic Combination Beta-Caryophyllene and Docosahexaenoic Acid. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:596312.
206. Shravani S. Pawar\*, Sachin H. Rohane. Review on Discovery Studio: An important Tool for Molecular Docking. *Asian J Research Chem*. 2021;14(1):86.
207. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*. 7 oct 2011;3(1):33.
208. Chemical Structure Drawing Software | ACD/ChemSketch [Internet]. [cité 23 sept 2021]. Disponible sur: [https://www.acdlabs.com/products/draw\\_nom/draw/chemsketch/?gclid=CjwKCAjwy7CKBhBMEiwA0Eb7ahKF5n\\_6ecqXQ\\_1ellpjsyXFF2Rr8r3jEgtHJuIsMaEFIGZV51vUkxoC4OAQAvD\\_BwE](https://www.acdlabs.com/products/draw_nom/draw/chemsketch/?gclid=CjwKCAjwy7CKBhBMEiwA0Eb7ahKF5n_6ecqXQ_1ellpjsyXFF2Rr8r3jEgtHJuIsMaEFIGZV51vUkxoC4OAQAvD_BwE)
209. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform*. 13 août 2012;4:17.
210. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 1 sept 2015;1-2:19-25.
211. Yuan S, Chan HCS, Hu Z. Using PyMOL as a platform for computational drug design. *WIREs Computational Molecular Science*. 2017;7(2):e1298.
212. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1 févr 1996;14(1):33-8.
213. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 3 mars 2017;7(1):42717.
214. Viana Nunes AM, das Chagas Pereira de Andrade F, Filgueiras LA, de Carvalho Maia OA, Cunha RLOR, Rodezno SVA, et al. preADMET analysis and clinical aspects of dogs

treated with the Organotellurium compound RF07: A possible control for canine visceral leishmaniasis? *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 1 nov 2020;80:103470.

215. Binkowski TA, Naghibzadeh S, Liang J. CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of proteins. *Nucleic Acids Res*. 1 juill 2003;31(13):3352-5.

216. Koes DR, Camacho CJ. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Res*. juill 2012;40(Web Server issue):W409-14.

217. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings IPII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1 mars 2001;46(1):3-26.

218. Castro-Alvarez A, Costa AM, Vilarrasa J. The Performance of Several Docking Programs at Reproducing Protein–Macrolide-Like Crystal Structures. *Molecules*. janv 2017;22(1):136.

219. Carbone J, Ghidini A, Romano A, Gentilucci L, Musiani F. PacDOCK: A Web Server for Positional Distance-Based and Interaction-Based Analysis of Docking Results. *Molecules*. janv 2022;27(20):6884.

220. Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for Ligand-Receptor Docking. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2008;24(1):8.14.1-8.14.40.

221. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev*. 1 avr 2017;9(2):91-102.

222. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. 1998;19(14):1639-62.

223. Vanommeslaeghe K, MacKerell AD. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: bond perception and atom typing. *J Chem Inf Model*. 21 déc 2012;52(12):3144-54.

224. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comput Chem*. août 2011;32(11):2359-68.

225. Price DJ, Brooks CL III. A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation. *The Journal of Chemical Physics*. 22 nov 2004;121(20):10096-103.

226. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*. 1 déc 1981;52(12):7182-90.

227. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys*. 7 janv 2007;126(1):014101.

228. Pélissier AL, uffaut F, De Méo MP, Botta A. Le test d'Ames: Application aux urines de fumeurs. *La Revue de Médecine Interne*. 1 août 1996;17(8):635-9.
229. Stergiopoulos C, Tsopelas F, Valko K. Prediction of hERG inhibition of drug discovery compounds using biomimetic HPLC measurements. *ADMET DMPK*. 6 juin 2021;9(3):191-207.
230. PubChem. Piperine [Internet]. [cité 10 sept 2024]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/638024>
231. David Klein. Chapitre 18. La spectroscopie de RMN. In: *Chimie organique Simple et intuitive*. De Boeck Supérieur; 2018. p. 370-401. (Hors collection Sciences).
232. Julien Wist. [www.nmrdb.org](http://www.nmrdb.org) Tools for NMR spectroscopists. [cité 15 août 2024]. NMR Predict. Disponible sur: <https://www.nmrdb.org>
233. Hikal DM. Antibacterial Activity of Piperine and Black Pepper Oil – *Biosciences Biotechnology Research Asia*. [cité 30 août 2024]; Disponible sur: <https://www.biotech-asia.org/vol15no4/antibacterial-activity-of-piperine-and-black-pepper-oil/>
234. Yohannes A, Eyalarasan K, Imam, Eyob L, Ghebregus E, Weldemariam L, et al. Antibacterial and Antifungal Activities of easily grown Eritrean Black Pepper. *International Journal of Engineering Research & Technology* [Internet]. 6 févr 2018 [cité 30 août 2024];7(2). Disponible sur: <https://www.ijert.org/research/antibacterial-and-antifungal-activities-of-easily-grown-eritrean-black-pepper-IJERTV7IS020028.pdf>, <https://www.ijert.org/antibacterial-and-antifungal-activities-of-easily-grown-eritrean-black-pepper>
235. Roy AC, Haque ME, Rahman S, Al-Mansur MA. Piperine and isoflavan-4-one from the stems of *Piper chaba* Hunter and their In vitro antimicrobial activities. *J Pharmacogn Phytochem*. 2018;7(1):2653-62.
236. Sivashanmugam A, Velmathi S. Synthesis, in vitro and in silico anti-bacterial analysis of piperine and piperic ester analogues. *Chem Biol Drug Des*. juill 2021;98(1):19-29.
237. Moraru AC. INSIGHTS OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PIPERINE EXTRACTED FROM PIPER NIGRUM L. 20 déc 2019;67(6):1099-105.
238. Zarai Z, Boujelbene E, Ben Salem N, Gargouri Y, Sayari A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT - Food Science and Technology*. 1 mars 2013;50(2):634-41.
239. Zhou X, Afzal S, Wohlmuth H, Münch G, Leach D, Low M, et al. Synergistic Anti-Inflammatory Activity of Ginger and Turmeric Extracts in Inhibiting Lipopolysaccharide and Interferon- $\gamma$ -Induced Proinflammatory Mediators. *Molecules*. 16 juin 2022;27(12):3877.

240. Güran M, Şanlıtürk G, Kerküklü NR, Altundağ EM, Süha Yalçın A. Combined effects of quercetin and curcumin on anti-inflammatory and antimicrobial parameters in vitro. *Eur J Pharmacol*. 15 sept 2019;859:172486.
241. Westermaier Y, Barril X, Scapozza L. Virtual screening: An *in silico* tool for interlacing the chemical universe with the proteome. *Methods*. 1 janv 2015;71:44-57.
242. Chtita S, Belaidi S, Qais FA, Ouassaf M, AlMogren MM, Al-Zahrani AA, et al. Unsymmetrical aromatic disulfides as SARS-CoV-2 Mpro inhibitors: Molecular docking, molecular dynamics, and ADME scoring investigations. *Journal of King Saud University Science*. 20 juill 2022;34(7):102226.
243. Abchir O, Daoui O, Nour H, Yamari I, Elkhatabi S, Errougui A, et al. Exploration of Cannabis constituents as potential candidates against diabetes mellitus disease using molecular docking, dynamics simulations and ADMET investigations. *Scientific African*. 1 sept 2023;21:e01745.
244. Maadwar S, Galla R. Cytotoxic oxindole derivatives: in vitro EGFR inhibition, pharmacophore modeling, 3D-QSAR and molecular dynamics studies. *J Recept Signal Transduct Res*. 2019;39(5-6):460-9.
245. PubChem. Piperic acid [Internet]. [cité 15 oct 2022]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5370536>
246. Bahri S, Ambarwati Y, Iqbal M, Baihaqy AA. Synthesis 4-Piperoilmorpholine from Piperine. *J Phys: Conf Ser*. oct 2019;1338(1):012010.
247. Infrared spectra prediction [Internet]. [cité 16 sept 2024]. Disponible sur: [https://www.cheminfo.org/flavor/biooriented/IR/IR\\_spectra\\_prediction/index.html](https://www.cheminfo.org/flavor/biooriented/IR/IR_spectra_prediction/index.html)

## ANNEXES

## 2.2.24. Absorption spectrophotometry, infrared

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

Operate an atomic absorption spectrometer in accordance with the manufacturer's instructions at the prescribed wavelength. Introduce a blank solution into the atomic generator and adjust the instrument reading so that it indicates maximum transmission. The blank value may be determined by using solvent to zero the apparatus. Introduce the most concentrated reference solution and adjust the sensitivity to obtain a maximum absorbance reading. Rinse in order to avoid contamination and memory effects. After completing the analysis, rinse with *water R* or acidified water.

If a solid sampling technique is applied, full details of the procedure are provided in the monograph.

Ensure that the concentrations to be determined fall preferably within the linear part of the calibration curve. If this is not possible, the calibration plots may also be curved and are then to be applied with appropriate calibration software.

Determinations are made by comparison with reference solutions with known concentrations of the element to be determined either by the method of direct calibration (Method I) or the method of standard additions (Method II).

**METHOD I - DIRECT CALIBRATION**

For routine measurements 3 reference solutions and a blank solution are prepared and examined.

Prepare the solution of the substance to be examined (test solution) as prescribed in the monograph. Prepare not fewer than 3 reference solutions of the element to be determined, the concentrations of which span the expected value in the test solution. For assay purposes, optimal calibration levels are between 0.7 and 1.3 times the expected content of the element to be determined or the limit prescribed in the monograph. For purity determination, calibration levels are the limit of detection and 1.2 times the limit specified for the element to be determined. Any reagents used in the preparation of the test solution are added to the reference and blank solutions at the same concentration.

Introduce each of the solutions into the instrument using the same number of replicates for each of the solutions to obtain a steady reading.

**Calculation.** Prepare a calibration curve from the mean of the readings obtained with the reference solutions by plotting the means as a function of concentration. Determine the concentration of the element in the test solution from the curve obtained.

**METHOD II - STANDARD ADDITIONS**

Add to at least 3 similar volumetric flasks equal volumes of the solution of the substance to be examined (test solution) prepared as prescribed. Add to all but 1 of the flasks progressively larger volumes of a reference solution containing a known concentration of the element to be determined to produce a series of solutions containing steadily increasing concentrations of that element known to give responses in the linear part of the curve, if possible. Dilute the contents of each flask to volume with solvent.

Introduce each of the solutions into the instrument, using the same number of replicates for each of the solutions, to obtain a steady reading.

**Calculation.** Calculate the linear equation of the graph using a least-squares fit and derive from it the concentration of the element to be determined in the test solution.

**VALIDATION OF THE METHOD**

Satisfactory performance of methods prescribed in monographs is verified at suitable time intervals.

**LINEARITY**

Prepare and analyse not fewer than 4 reference solutions over the calibration range and a blank solution. Perform not fewer than 5 replicates.

The calibration curve is calculated by least-square regression from all measured data. The regression curve, the means, the measured data and the confidence interval of the calibration curve are plotted. The operating method is valid when:

- the correlation coefficient is at least 0.99,
- the residuals of each calibration level are randomly distributed around the calibration curve.

Calculate the mean and relative standard deviation for the lowest and highest calibration level.

When the ratio of the estimated standard deviation of the lowest and the highest calibration level is less than 0.5 or greater than 2.0, a more precise estimation of the calibration curve may be obtained using weighted linear regression. Both linear and quadratic weighting functions are applied to the data to find the most appropriate weighting function to be employed. If the means compared to the calibration curve show a deviation from linearity, two-dimensional linear regression is used.

**ACCURACY**

Verify the accuracy preferably by using a certified reference material (CRM). Where this is not possible, perform a test for recovery.

**Recovery.** For assay determinations a recovery of 90 per cent to 110 per cent is to be obtained. For other determinations, for example, for trace element determination the test is not valid if recovery is outside of the range 80 per cent to 120 per cent at the theoretical value. Recovery may be determined on a suitable reference solution (matrix solution) which is spiked with a known quantity of analyte (middle concentration of the calibration range).

**REPEATABILITY**

The repeatability is not greater than 3 per cent for an assay and not greater than 5 per cent for an impurity test.

**LIMIT OF QUANTIFICATION**

Verify that the limit of quantification (for example, determined using the 10  $\sigma$  approach) is below the value to be measured.

01/2008:20224

**2.2.24. ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY, INFRARED**

Infrared spectrophotometers are used for recording spectra in the region of 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  (2.5-15.4  $\mu\text{m}$ ) or in some cases down to 200  $\text{cm}^{-1}$  (50  $\mu\text{m}$ ).

**APPARATUS**

Spectrophotometers for recording spectra consist of a suitable light source, monochromator or interferometer and detector. Fourier transform spectrophotometers use polychromatic radiation and calculate the spectrum in the frequency domain from the original data by Fourier transformation. Spectrophotometers fitted with an optical system capable of producing monochromatic radiation in the measurement region may also be used. Normally the spectrum is given as a function of transmittance, the quotient of the intensity of the transmitted radiation and the incident radiation. It may also be given in absorbance.

The absorbance ( $A$ ) is defined as the logarithm to base 10 of the reciprocal of the transmittance ( $T$ ):

$$A = \log_{10} \left( \frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right)$$

$$T = \frac{I}{I_0}$$

$I_0$  = intensity of incident radiation,

$I$  = intensity of transmitted radiation.

## PREPARATION OF THE SAMPLE

**FOR RECORDING BY TRANSMISSION OR ABSORPTION**  
Prepare the substance by one of the following methods.

**Liquids.** Examine a liquid either in the form of a film between 2 plates transparent to infrared radiation, or in a cell of suitable path length, also transparent to infrared radiation.

**Liquids or solids in solution.** Prepare a solution in a suitable solvent. Choose a concentration and a path length of the cell which give a satisfactory spectrum. Generally, good results are obtained with concentrations of 10-100 g/L for a path length of 0.5-0.1 mm. Absorption due to the solvent is compensated by placing in the reference beam a similar cell containing the solvent used. If an FT-IR instrument is used, the absorption is compensated by recording the spectra for the solvent and the sample successively. The solvent absorbance, corrected by a compensation factor, is subtracted using calculation software.

**Solids.** Examine solids dispersed in a suitable liquid (mull) or in a solid (halide disc), as appropriate. If prescribed in the monograph, make a film of a molten mass between 2 plates transparent to infrared radiation.

## A. Mull

Triturate a small quantity of the substance to be examined with the minimum quantity of *liquid paraffin R* or other suitable liquid; 5-10 mg of the substance to be examined is usually sufficient to make an adequate mull using one drop of *liquid paraffin R*. Compress the mull between 2 plates transparent to infrared radiation.

## B. Disc

Triturate 1-2 mg of the substance to be examined with 300-400 mg, unless otherwise specified, of finely powdered and dried *potassium bromide R* or *potassium chloride R*. These quantities are usually sufficient to give a disc of 10-15 mm diameter and a spectrum of suitable intensity. If the substance is a hydrochloride, it is recommended to use *potassium chloride R*. Carefully grind the mixture, spread it uniformly in a suitable die, and submit it to a pressure of about 800 MPa ( $8 \text{ t-cm}^{-2}$ ). For substances that are unstable under normal atmospheric conditions or are hygroscopic, the disc is pressed *in vacuo*. Several factors may cause the formation of faulty discs, such as insufficient or excessive grinding, humidity or other impurities in the dispersion medium or an insufficient reduction of particle size. A disc is rejected if visual examination shows lack of uniform transparency or when transmittance at about  $2000 \text{ cm}^{-1}$  ( $5 \mu\text{m}$ ) in the absence of a specific absorption band is less than 60 per cent without compensation, unless otherwise prescribed.

**Gases.** Examine gases in a cell transparent to infrared radiation and having an optical path length of about 100 mm. Evacuate the cell and fill to the desired pressure through a stopcock or needle valve using a suitable gas transfer line between the cell and the container of the gas to be examined. If necessary adjust the pressure in the cell to atmospheric pressure using a gas transparent to infrared radiation (for example *nitrogen R* and *argon R*). To avoid absorption interferences due to water, carbon dioxide or other atmospheric gases, place in the reference beam, if possible, an identical cell that is either evacuated or filled with the gas transparent to infrared radiation.

## FOR RECORDING BY DIFFUSE REFLECTANCE

**Solids.** Triturate a mixture of the substance to be examined with finely powdered and dried *potassium bromide R* or *potassium chloride R*. Use a mixture containing approximately 5 per cent of the substance, unless otherwise specified. Grind the mixture, place it in a sample cup and examine the reflectance spectrum.

The spectrum of the sample in absorbance mode may be obtained after mathematical treatment of the spectra by the Kubelka-Munk function.

## FOR RECORDING BY ATTENUATED TOTAL REFLECTION

Attenuated total reflection (including multiple reflection) involves light being reflected internally by a transmitting medium, typically for a number of reflections. However, several accessories exist where only one reflection occurs. Prepare the substance as follows. Place the substance to be examined in close contact with an internal reflection element (IRE) such as diamond, germanium, zinc selenide, thallium bromide-thallium iodide (KRS-5) or another suitable material of high refractive index. Ensure close and uniform contact between the substance and the whole crystal surface of the internal reflection element, either by applying pressure or by dissolving the substance in an appropriate solvent, then covering the IRE with the obtained solution and evaporating to dryness. Examine the attenuated total reflectance (ATR) spectrum.

## IDENTIFICATION USING REFERENCE SUBSTANCES

Prepare the substance to be examined and the reference substance by the same procedure and record the spectra between  $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$  ( $2.5\text{-}15.4 \mu\text{m}$ ) under the same operational conditions. The transmission minima (absorption maxima) in the spectrum obtained with the substance to be examined correspond in position and relative size to those in the spectrum obtained with the reference substance (CRS).

When the spectra recorded in the solid state show differences in the positions of the transmission minima (absorption maxima), treat the substance to be examined and the reference substance in the same manner so that they crystallise or are produced in the same form, or proceed as prescribed in the monograph, then record the spectra.

## IDENTIFICATION USING REFERENCE SPECTRA

**Control of resolution performance.** For instruments having a monochromator, record the spectrum of a polystyrene film approximately  $35 \mu\text{m}$  in thickness. The difference  $x$  (see Figure 2.2.24.-1) between the percentage transmittance at the transmission maximum  $A$  at  $2870 \text{ cm}^{-1}$  ( $3.48 \mu\text{m}$ ) and that at the transmission minimum  $B$  at  $2849.5 \text{ cm}^{-1}$  ( $3.51 \mu\text{m}$ ) must be greater than 18. The difference  $y$  between the percentage transmittance at the transmission maximum  $C$  at  $1589 \text{ cm}^{-1}$  ( $6.29 \mu\text{m}$ ) and that at the transmission minimum  $D$  at  $1583 \text{ cm}^{-1}$  ( $6.32 \mu\text{m}$ ) must be greater than 10.

For Fourier-transform instruments, use suitable instrument resolution with the appropriate apodisation prescribed by the manufacturer. The resolution is checked by suitable means, for example by recording the spectrum of a polystyrene film approximately  $35 \mu\text{m}$  in thickness. The difference between the absorbances at the absorption minimum at  $2870 \text{ cm}^{-1}$  and the absorption maximum at  $2849.5 \text{ cm}^{-1}$  is greater than 0.33. The difference between the absorbances at the absorption

## 2.2.25. Absorption spectrophotometry, ultraviolet and visible

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

minimum at 1589  $\text{cm}^{-1}$  and the absorption maximum at 1583  $\text{cm}^{-1}$  is greater than 0.08.

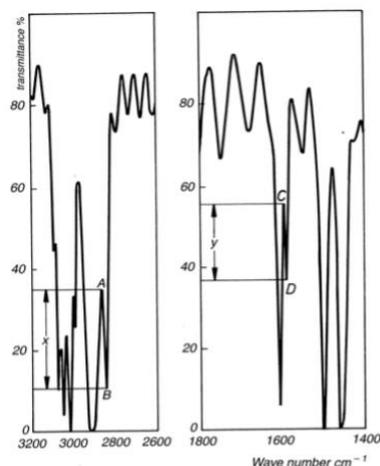


Figure 2.2.24.-1. – Typical spectrum of polystyrene used to verify the resolution performance

**Verification of the wave-number scale.** The wave-number scale may be verified using a polystyrene film, which has transmission minima (absorption maxima) at the wave numbers (in  $\text{cm}^{-1}$ ) shown in Table 2.2.24.-1.

Table 2.2.24.-1. – Transmission minima and acceptable tolerances of a polystyrene film

| Transmission minima ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Acceptable tolerance ( $\text{cm}^{-1}$ ) |                               |
|--|---|-------------------------------|
|  | Monochromator instruments                 | Fourier-transform instruments |
| 3060.0                                   | $\pm 1.5$                                 | $\pm 1.0$                     |
| 2849.5                                   | $\pm 2.0$                                 | $\pm 1.0$                     |
| 1942.9                                   | $\pm 1.5$                                 | $\pm 1.0$                     |
| 1601.2                                   | $\pm 1.0$                                 | $\pm 1.0$                     |
| 1583.0                                   | $\pm 1.0$                                 | $\pm 1.0$                     |
| 1154.5                                   | $\pm 1.0$                                 | $\pm 1.0$                     |
| 1028.3                                   | $\pm 1.0$                                 | $\pm 1.0$                     |

**Method.** Prepare the substance to be examined according to the instructions accompanying the reference spectrum/reference substance. Using the operating conditions that were used to obtain the reference spectrum, which will usually be the same as those for verifying the resolution performance, record the spectrum of the substance to be examined.

The positions and the relative sizes of the bands in the spectrum of the substance to be examined and the reference spectrum are concordant in the 2 spectra.

**Compensation for water vapour and atmospheric carbon dioxide.** For Fourier-transform instruments, spectral interference from water vapour and carbon dioxide is compensated using suitable algorithms according to the manufacturer's instructions. Alternatively, spectra can be

acquired using suitable purged instruments or ensuring that sample and background single beam spectra are acquired under exactly the same conditions.

## IMPURITIES IN GASES

For the analysis of impurities, use a cell transparent to infrared radiation and of suitable optical path length (for example, 1-20 m). Fill the cell as prescribed under Gases. For detection and quantification of the impurities, proceed as prescribed in the monograph.

01/2008:20225

## 2.2.25. ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY, ULTRAVIOLET AND VISIBLE

**Determination of absorbance.** The absorbance ( $A$ ) of a solution is defined as the logarithm to base 10 of the reciprocal of the transmittance ( $T$ ) for monochromatic radiation:

$$A = \log_{10} \left( \frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right)$$

$$T = I/I_0;$$

$$I_0 = \text{intensity of incident monochromatic radiation};$$

$$I = \text{intensity of transmitted monochromatic radiation.}$$

In the absence of other physico-chemical factors, the absorbance ( $A$ ) is proportional to the path length ( $b$ ) through which the radiation passes and to the concentration ( $c$ ) of the substance in solution in accordance with the equation:

$$A = \epsilon cb$$

$$\epsilon = \text{molar absorptivity, if } b \text{ is expressed in centimetres and } c \text{ in moles per litre.}$$

The expression  $A_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ per cent}}$  representing the specific absorbance of a dissolved substance refers to the absorbance of a 10 g/L solution in a 1 cm cell and measured at a defined wavelength so that:

$$A_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ per cent}} = \frac{10\epsilon}{M_r}$$

Unless otherwise prescribed, measure the absorbance at the prescribed wavelength using a path length of 1 cm. Unless otherwise prescribed, the measurements are carried out with reference to the same solvent or the same mixture of solvents. The absorbance of the solvent measured against air and at the prescribed wavelength shall not exceed 0.4 and is preferably less than 0.2. Plot the absorption spectrum with absorbance or function of absorbance as ordinate against wavelength or function of wavelength as abscissa.

Where a monograph gives a single value for the position of an absorption maximum, it is understood that the value obtained may differ by not more than  $\pm 2$  nm.

**Apparatus.** Spectrophotometers suitable for measuring in the ultraviolet and visible range of the spectrum consist of an optical system capable of producing monochromatic radiation in the range of 200-800 nm and a device suitable for measuring the absorbance.

**Control of wavelengths.** Verify the wavelength scale using the absorption maxima of *holmium perchlorate solution R*, the line of a hydrogen or deuterium discharge lamp or the lines of a mercury vapour arc shown in Table 2.2.25.-1. The permitted

tolerance is  $\pm 1$  nm for the ultraviolet range and  $\pm 3$  nm for the visible range. Suitable certified reference materials may also be used.

Table 2.2.25.-1. – Absorption maxima for control of wavelength scale

|                |                       |
|----------------|-----------------------|
| 241.15 nm (Ho) | 404.66 nm (Hg)        |
| 253.7 nm (Hg)  | 435.83 nm (Hg)        |
| 287.15 nm (Ho) | 486.0 nm (D $\beta$ ) |
| 302.25 nm (Hg) | 486.1 nm (H $\beta$ ) |
| 313.16 nm (Hg) | 536.3 nm (Ho)         |
| 334.15 nm (Hg) | 546.07 nm (Hg)        |
| 361.5 nm (Ho)  | 576.96 nm (Hg)        |
| 365.48 nm (Hg) | 579.07 nm (Hg)        |

**Control of absorbance.** Check the absorbance using suitable filters or a solution of *potassium dichromate R* at the wavelengths indicated in Table 2.2.25.-2, which gives for each wavelength the exact value and the permitted limits of the specific absorbance. The table is based on a tolerance for the absorbance of  $\pm 0.01$ .

For the control of absorbance, use solutions of *potassium dichromate R* that has been previously dried to constant mass at 130 °C. For the control of absorbance at 235 nm, 257 nm, 313 nm and 350 nm, dissolve 57.0-63.0 mg of *potassium dichromate R* in 0.005 M *sulfuric acid* and dilute to 1000.0 mL with the same acid. For the control of absorbance at 430 nm, dissolve 57.0-63.0 mg of *potassium dichromate R* in 0.005 M *sulfuric acid* and dilute to 100.0 mL with the same acid. Suitable certified reference materials may also be used.

Table 2.2.25.-2

| Wavelength (nm) | Specific absorbance $A_{1\text{ cm}}^{1\text{ per cent}}$ | Maximum tolerance |
|-----------------|---|-------------------|
| 235             | 124.5   | 122.9 to 126.2    |
| 257             | 144.5   | 142.8 to 146.2    |
| 313             | 48.6  | 47.0 to 50.3      |
| 350             | 107.3   | 105.6 to 109.0    |
| 430             | 15.9  | 15.7 to 16.1      |

**Limit of stray light.** Stray light may be detected at a given wavelength with suitable filters or solutions: for example, the absorbance of a 12 g/L solution of *potassium chloride R* in a 1 cm cell increases steeply between 220 nm and 200 nm and is greater than 2.0 at 198 nm when compared with water as compensation liquid. Suitable certified reference materials may also be used.

**Resolution** (for qualitative analysis). When prescribed in a monograph, measure the resolution of the apparatus as follows: record the spectrum of a 0.02 per cent V/V solution of *toluene R* in *hexane R*. The minimum ratio of the absorbance at the maximum at 269 nm to that at the minimum at 266 nm is stated in the monograph. Suitable certified reference materials may also be used.

**Spectral slit-width** (for quantitative analysis). To avoid errors due to spectral slit-width, when using an instrument on which the slit-width is variable at the selected wavelength, the slit-width must be small compared with the half-width of the absorption band but it must be as large as possible to obtain a high value of  $I_0$ . Therefore, a slit-width is chosen such that further reduction does not result in a change in absorbance reading.

**Cells.** The tolerance on the path length of the cells used is  $\pm 0.005$  cm. When filled with the same solvent, the cells intended to contain the solution to be examined and the compensation liquid must have the same transmittance. If this is not the case, an appropriate correction must be applied.

The cells must be cleaned and handled with care.

#### DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRY

Derivative spectrophotometry involves the transformation of absorption spectra (zero-order) into first-, second- or higher-order-derivative spectra.

A *first-order-derivative spectrum* is a plot of the gradient of the absorption curve (rate of change of the absorbance with wavelength,  $dA/d\lambda$ ) against wavelength.

A *second-order-derivative spectrum* is a plot of the curvature of the absorption spectrum against wavelength ( $d^2A/d\lambda^2$ ). The second-order-derivative spectrum at any wavelength  $\lambda$  is related to concentration by the following equation:

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2A_{1\text{ cm}}^{1\text{ per cent}}}{d\lambda^2} \times \frac{c'b}{10} = \frac{d^2A\varepsilon}{d\lambda^2} \times \frac{cb}{10}$$

$c'$  = concentration of the absorbing solute, in grams per litre.

**Apparatus.** Use a spectrophotometer complying with the requirements prescribed above and equipped with an analogue resistance-capacitance differentiation module or a digital differentiator or other means of producing derivative spectra. Some methods of producing second-order-derivative spectra produce a wavelength shift relative to the zero-order spectrum and this is to be taken into account where applicable.

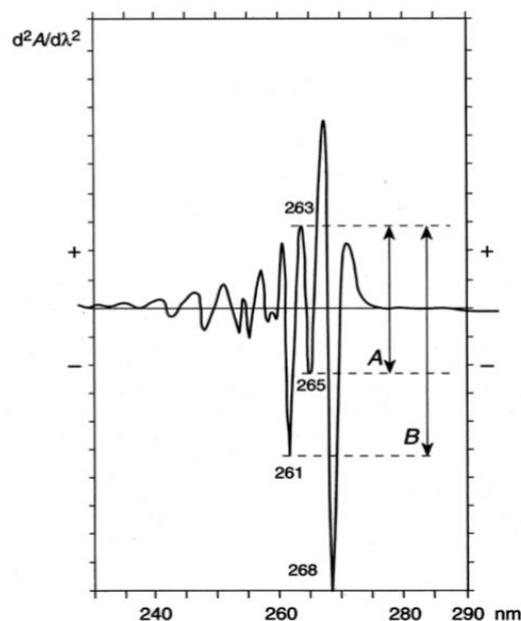


Figure 2.2.25.-1

**Resolution power.** When prescribed in a monograph, record the second-order-derivative spectrum of a 0.02 per cent V/V solution of *toluene R* in *methanol R*, using *methanol R* as the compensation liquid. The spectrum shows a small negative extremum located between 2 large negative extrema at 261 nm

**BLACK PEPPER***Piper nigrum*

L.

Piperaceae

**Pepper**

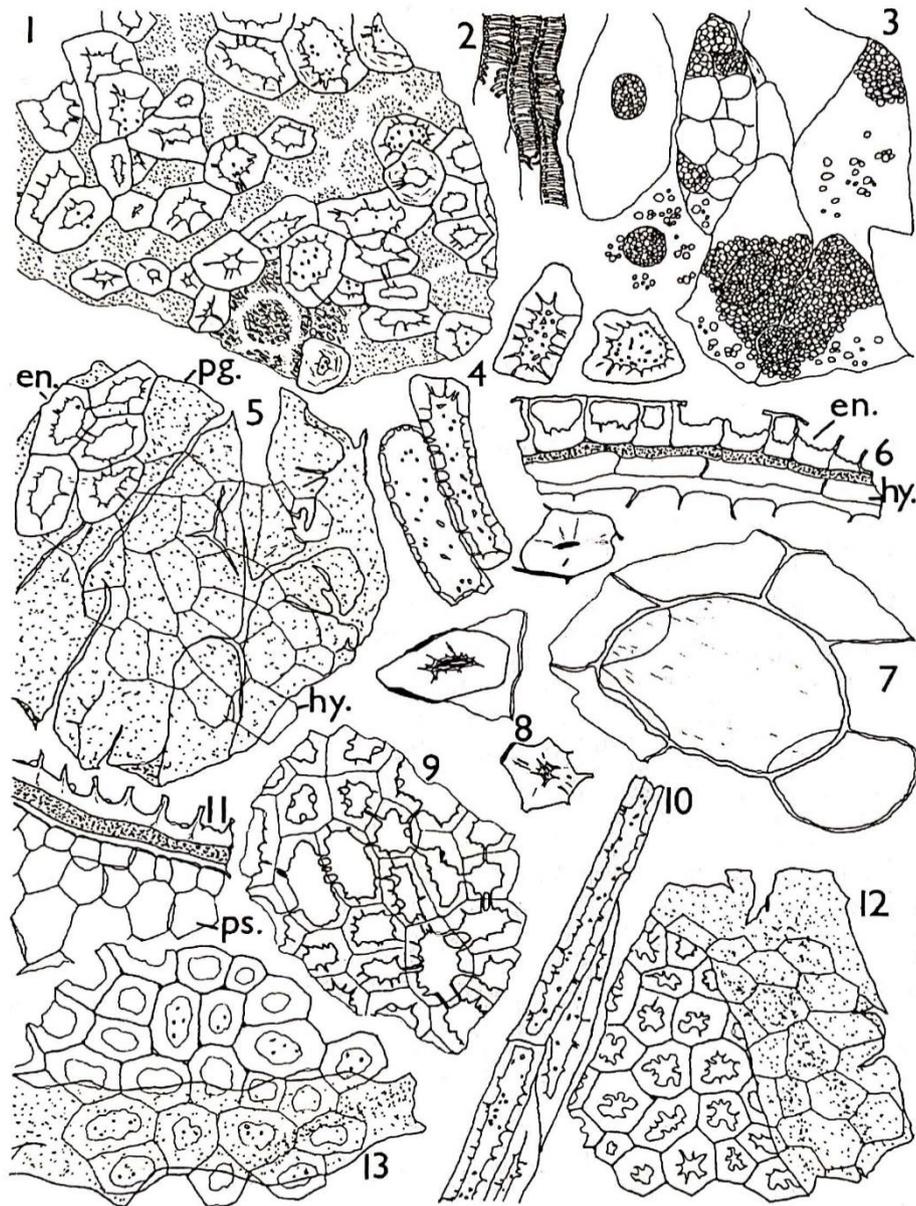
A dark greyish-brown powder with black specks; it has a strong, characteristic, spicy odour and a burning taste; it is strongly sternutatory.

The diagnostic characters are:

- (a) The *epicarp*, which is always adherent to the outermost sclerenchymatous layers of the mesocarp. In surface view the cells cannot readily be distinguished, but the layer is recognised by the areas of dark brown pigment in which are embedded small prism *crystals of calcium oxalate*.
- (b) The *sclereids of the outer mesocarp* which do not form continuous layers but occur in groups separated by ill-defined parenchyma and may be two or three cells in depth. The sclereids vary considerably in size and shape but are usually polygonal to rectangular with moderately thickened walls and fairly numerous pits, although sometimes the walls are much more heavily thickened; all have dark brown contents. These cells frequently are found isolated or in small groups with adhering fragments of thin-walled tissue; they are fairly abundant.
- (c) The *parenchyma of the mesocarp* composed of large, polygonal, thin-walled cells with associated larger, thin-walled *oil cells*.
- (d) The very occasional groups of small, lignified, spirally or annularly thickened *vessels* from the vascular strands. Groups of large, *fibrous sclereids* from the stem also occur infrequently.
- (e) The *endocarp* composed of a single layer of lignified cells which are more uniform in size and shape than the sclereids of the outer mesocarp. In *sectional view* the cells are seen to be strongly thickened on the inner tangential walls and the radial walls are also thickened at the base but taper towards the outer tangential walls, which are relatively thin. In *surface view* the cells are polygonal and, when seen from above, show distinct pits in the side walls; in median focus the side walls appear markedly convoluted and, when seen from below, pits are absent and the lumens are small and irregular. This layer is nearly always found adherent to the layers of the testa.
- (f) The *testa* composed of a narrow outer area with one or more layers of collapsed cells containing *reddish-brown pigment* and an inner *hyaline layer* composed of rather indistinct, colourless, thin-walled cells, polygonal in surface view. The layers of the testa are usually found adherent to the endocarp and may also be associated with the outer layers of the perisperm.
- (g) The numerous fragments of the *parenchyma of the perisperm* composed of thin-walled, polygonal or ovoid cells; the majority are packed with minute *starch granules* which are clumped together to form very dense masses completely filling the cells. Scattered among the starch-filled cells are smaller, rounded to ovoid *oil cells*.
- A few small, single, rounded to angular starch granules (from the parenchyma of the mesocarp) also occur scattered.

**WHITE PEPPER**

A pale brown to cream powder with the odour of Black Pepper and a similar but slightly less pungent taste. Microscopically, it differs from Black Pepper in that the epicarp and outer sclerenchymatous layers of the mesocarp are not present; it consists mainly of perisperm with associated fragments of the testa and endocarp, and strands of vascular tissue.

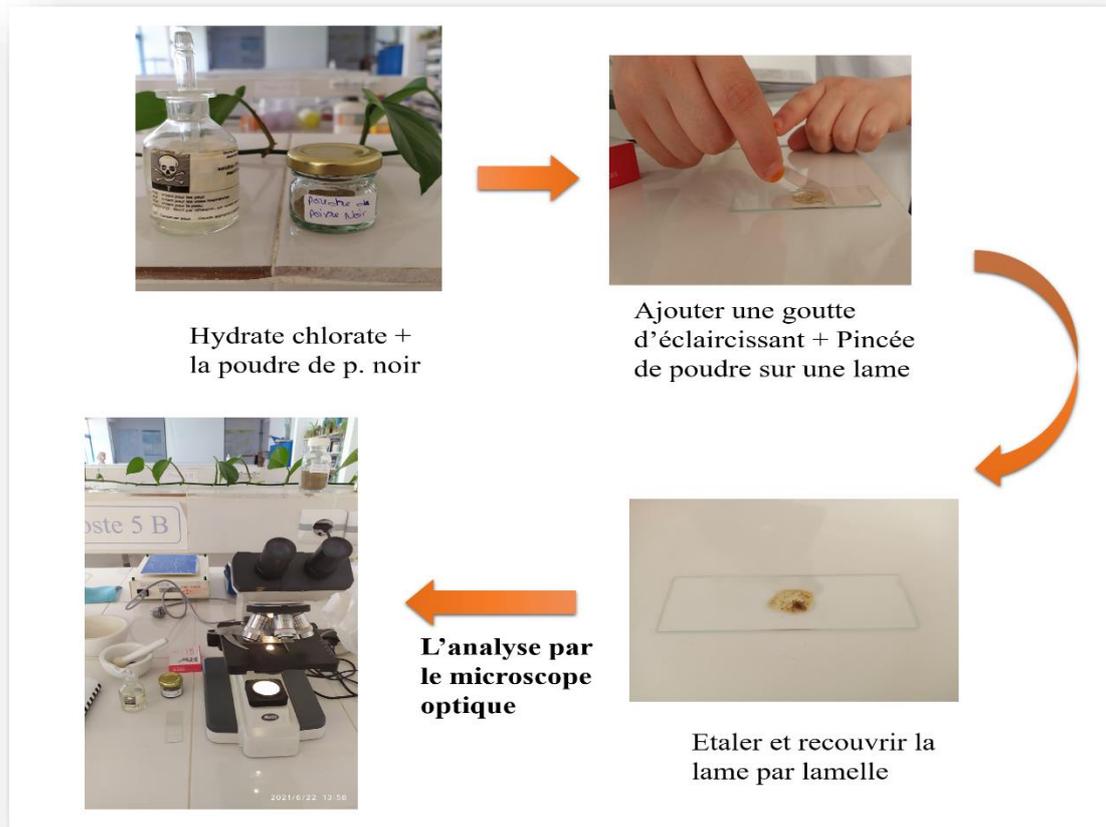


Black Pepper

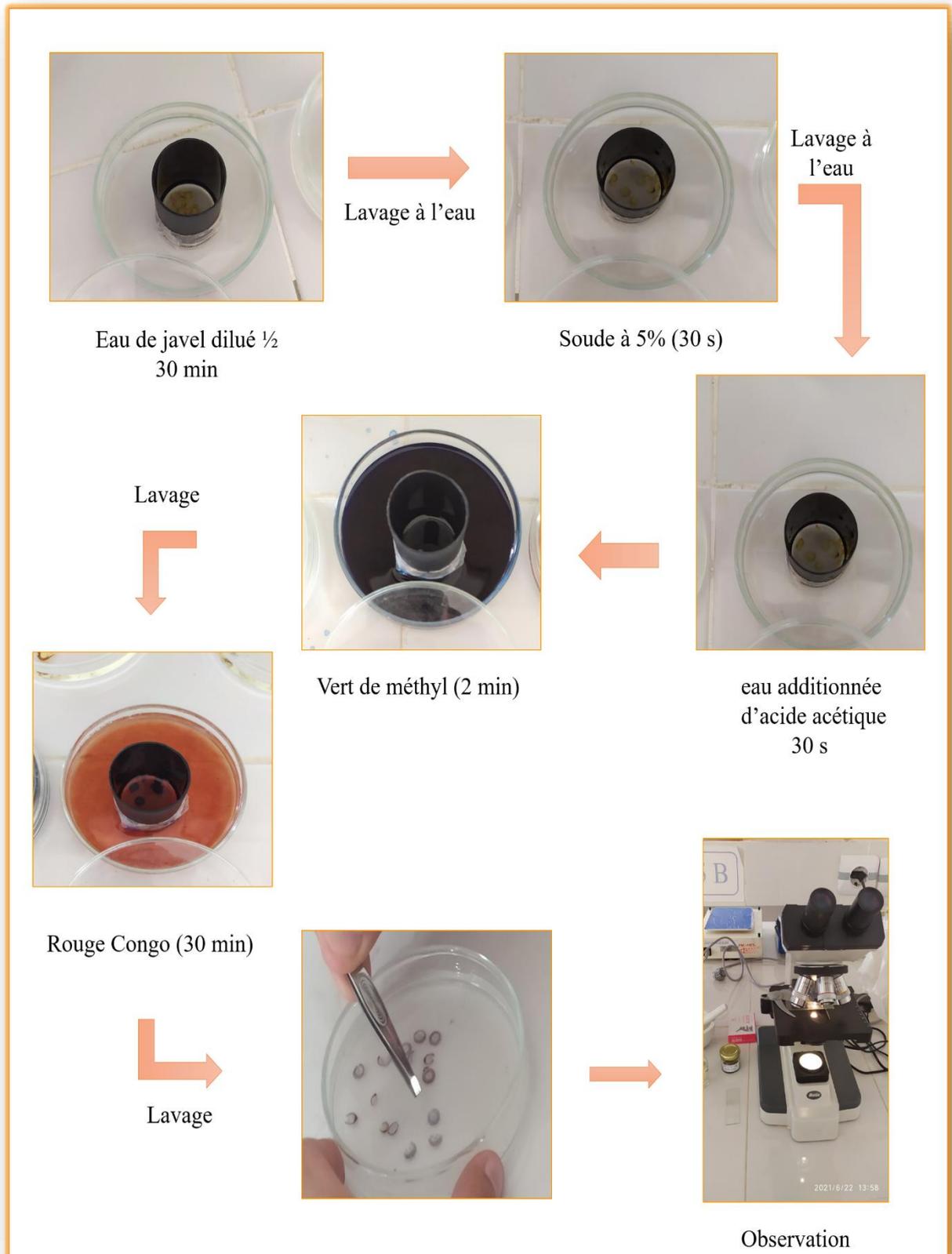
X330

- 1 Two layers of sclereids of the outer mesocarp with adhering epicarp containing pigment and calcium oxalate crystals, in surface view.
- 2 Part of a group of vessels from a vascular strand.
- 3 Perisperm cells containing densely compacted masses of starch granules and some loose starch granules.
- 4 Isolated sclereids from the outer mesocarp.
- 5 Cells of the endocarp (en.) in surface view with underlying pigment layer (pg.) and hyaline layer (hy.) of the testa.
- 6 Endocarp (en.), pigment layer and hyaline layer (hy.) of the testa in sectional view.
- 7 Parenchyma of the mesocarp with an oil cell.
- 8 Sclereids with strongly thickened walls.
- 9 Endocarp in surface view, seen from above.
- 10 Fibrous sclereids from the stalk.
- 11 Endocarp, layers of the testa and outer parenchyma of the perisperm (ps.) in sectional view.
- 12 Endocarp cells in median focus with associated pigment layer of the testa in surface view.
- 13 Endocarp cells seen from below, with associated pigment layer of the testa, in surface view.

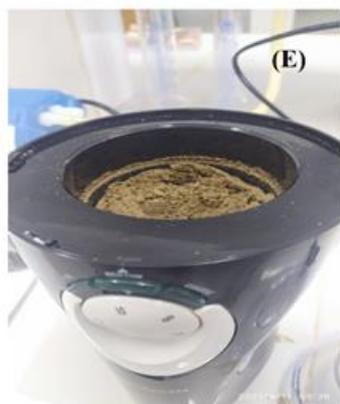
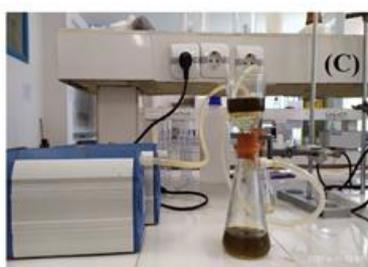
**Annexe 3 : Monographie de Poivre Noir de « Atlas Of Microscopy Of Medicinal Plants Culinary Herbs And Spices » pages 24-25.**



**Annexe 04** : Montage de la poudre.

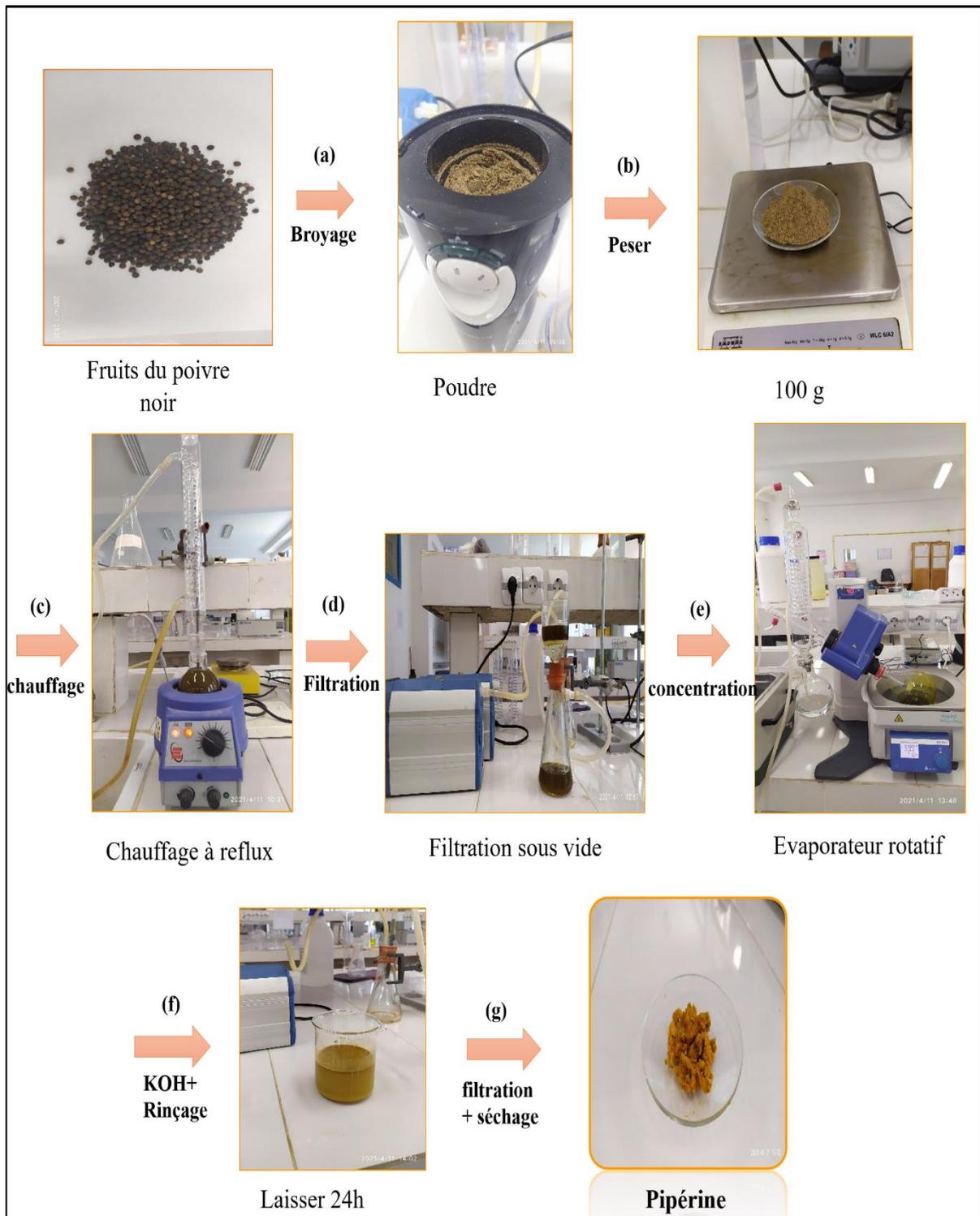


**Annexe 05 :** Les étapes de traitement des coupes transversales par le vert de méthyl et le rouge Congo (Technique de double coloration).

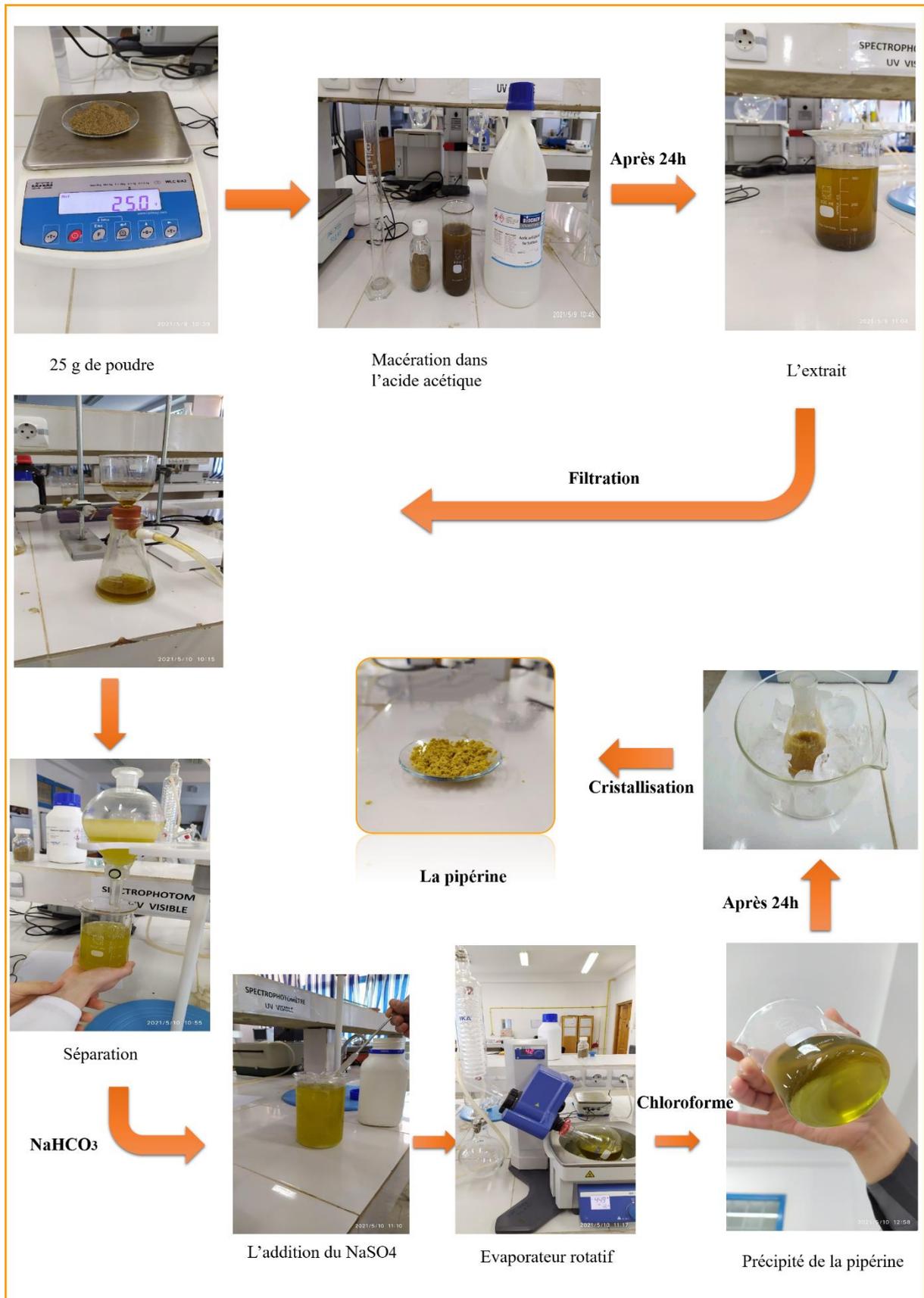


**Annexe 06** : L'appareillage utilisé dans l'isolement de la pipérine.

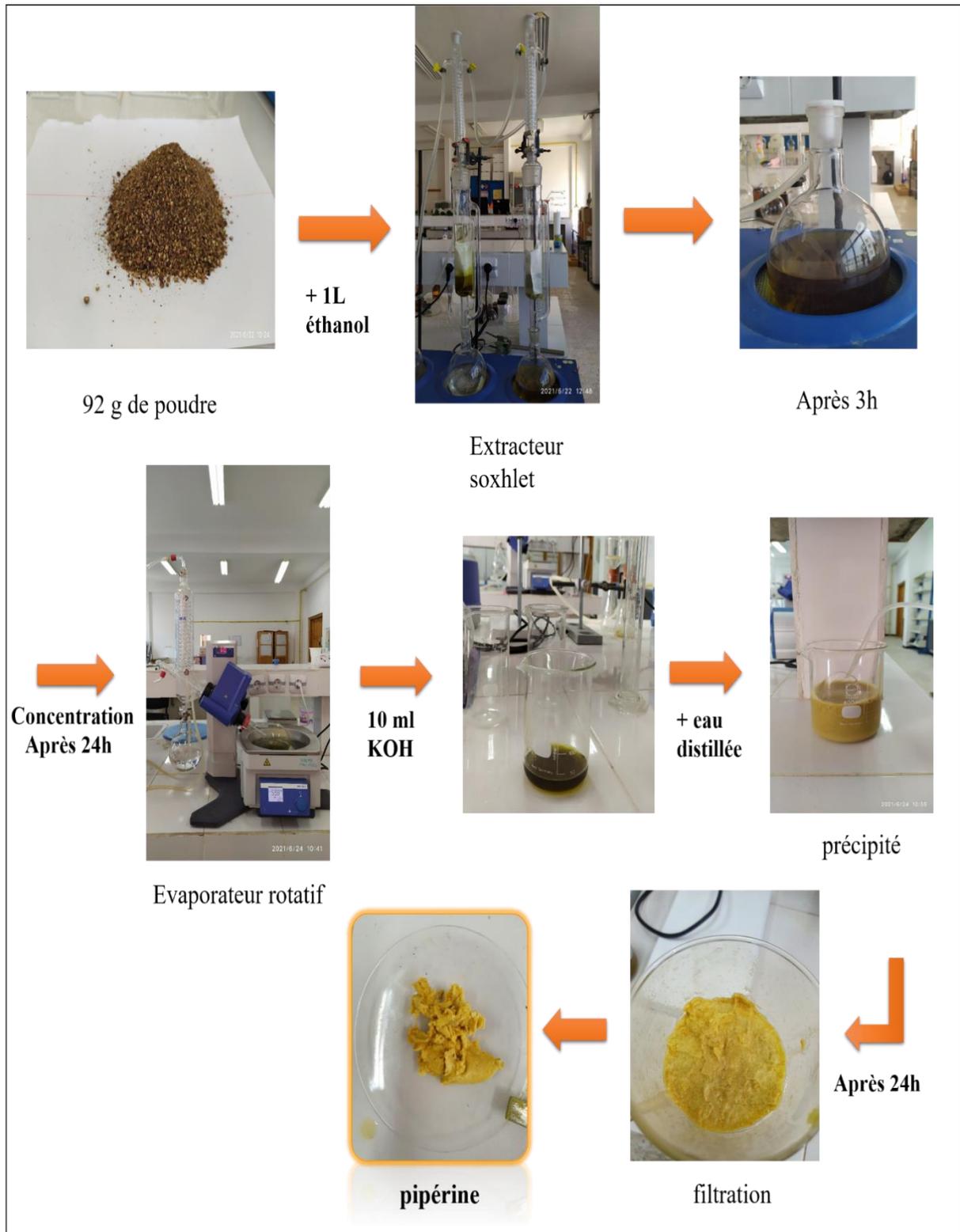
(A) : chauffage à reflux ; (B) : Evaporateur rotatif ; (C) : Filtre sous vide ;  
(D) : Balance électrique ; (E) : Broyeur (Moulin à épice Kitchenaid); (F) : Extracteur Soxhlet , (G)  
Micro-onde (Whirlpool).



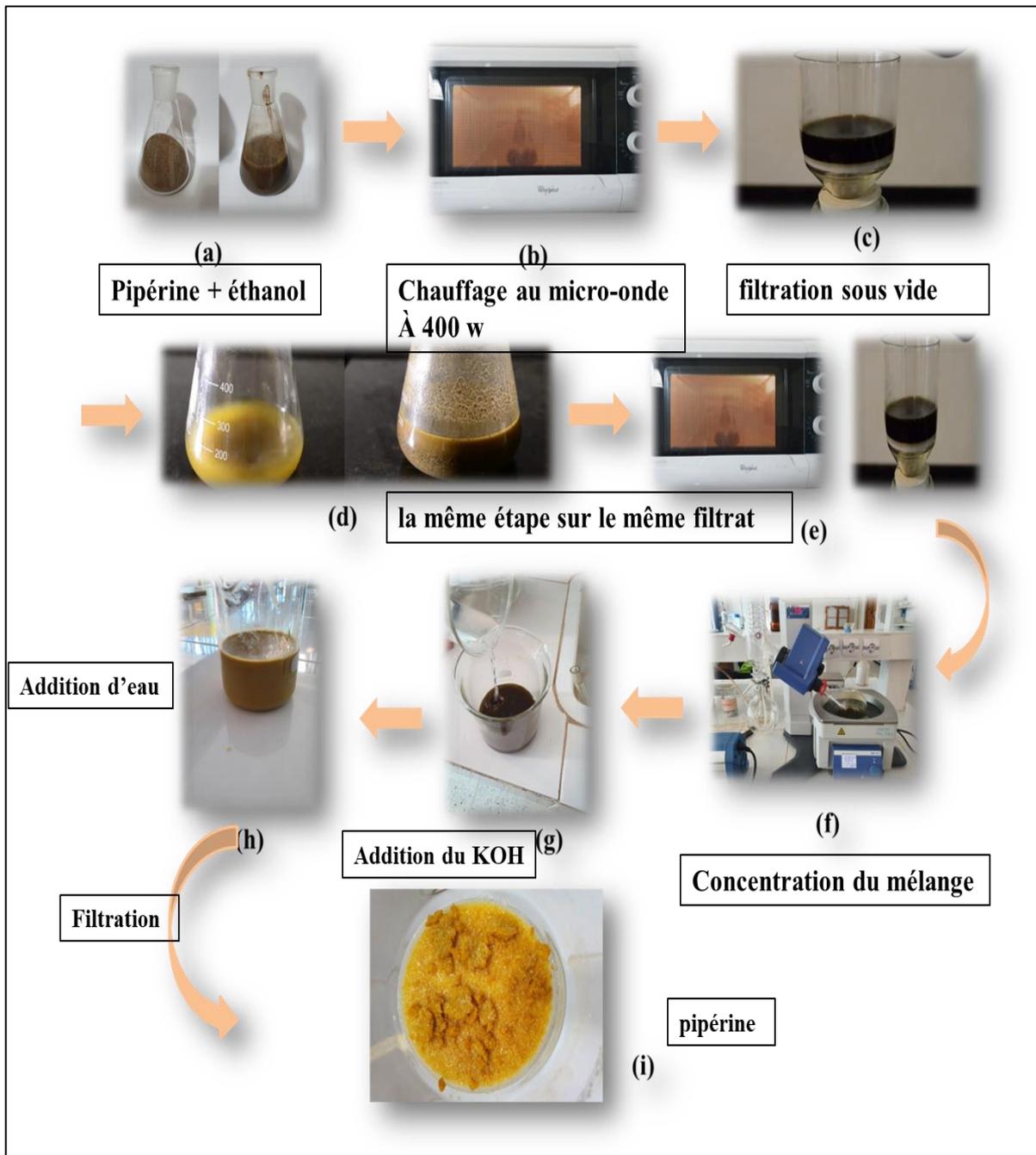
**Annexe 07 :** Les étapes d'extraction par chauffage à reflux.



Annexe 08 : Les étapes d'extraction par acide acétique.



**Annexe 09** : Extraction de la pipérine par Soxhlet.



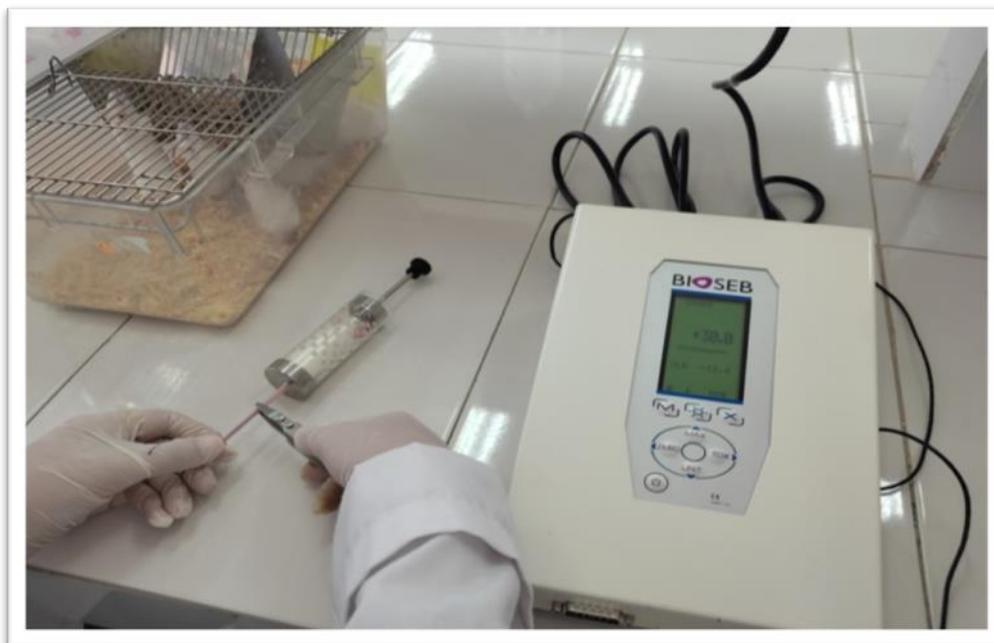
Annexe 10 : Extraction de la pipérine par micro-onde.



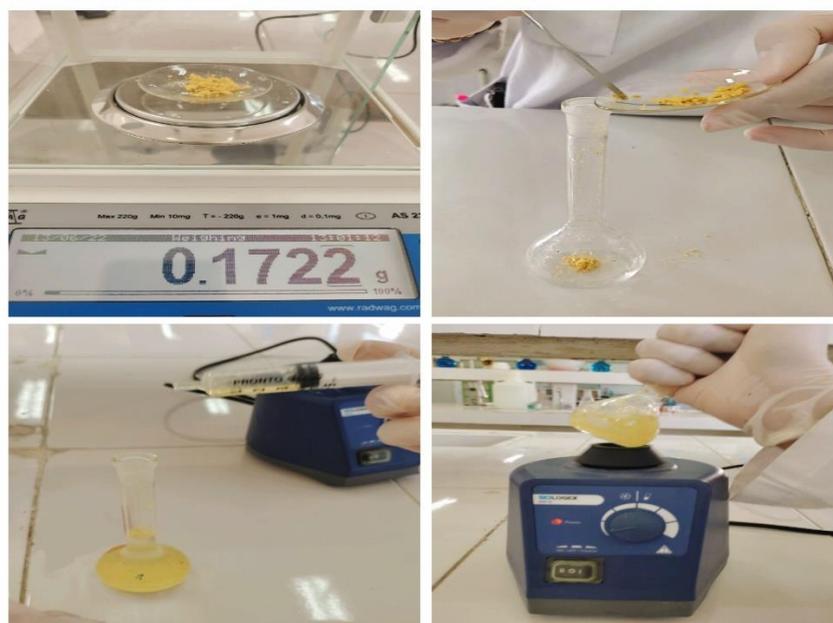
**Annexe 11** : Administration intra-péritonéale de produits et sub-plantaire de carragénine.



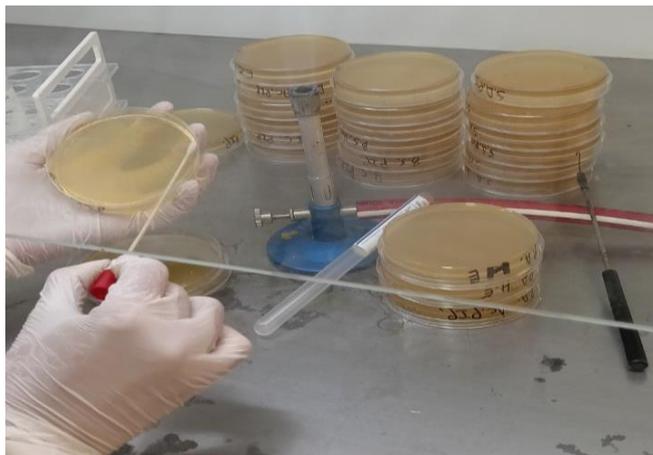
**Annexe 12** : Photo de l'œdème au niveau de la patte postérieure gauche (B) et la mesure du volume de l'œdème via le pléthysmomètre (A).



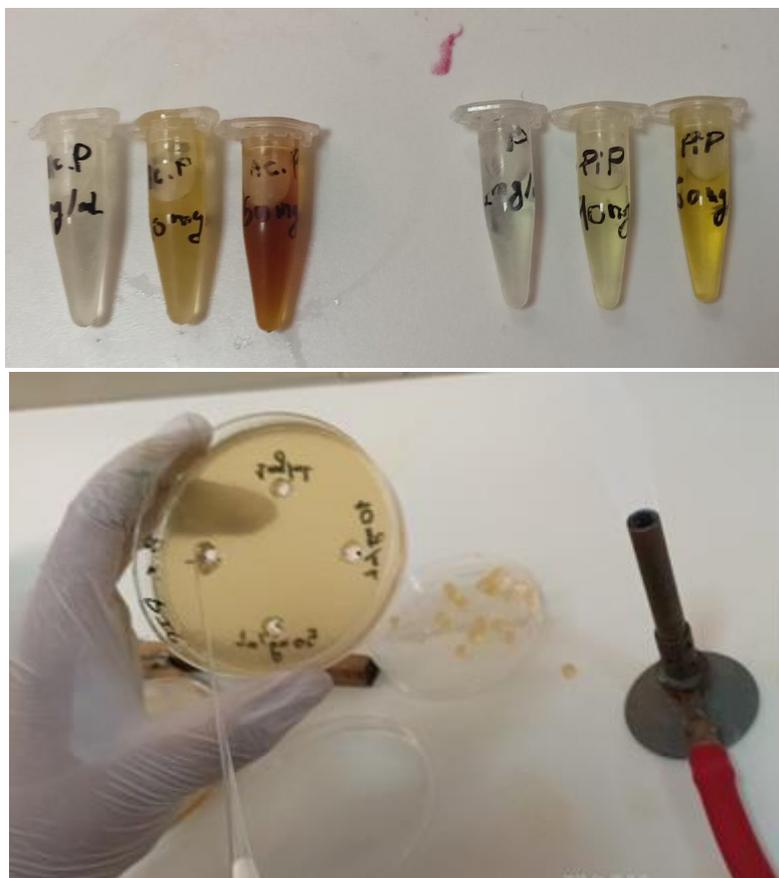
**Annexe 13 :** Mesure du seuil de tolérance de la douleur chez la souris par le biais de l'analgésimètre.



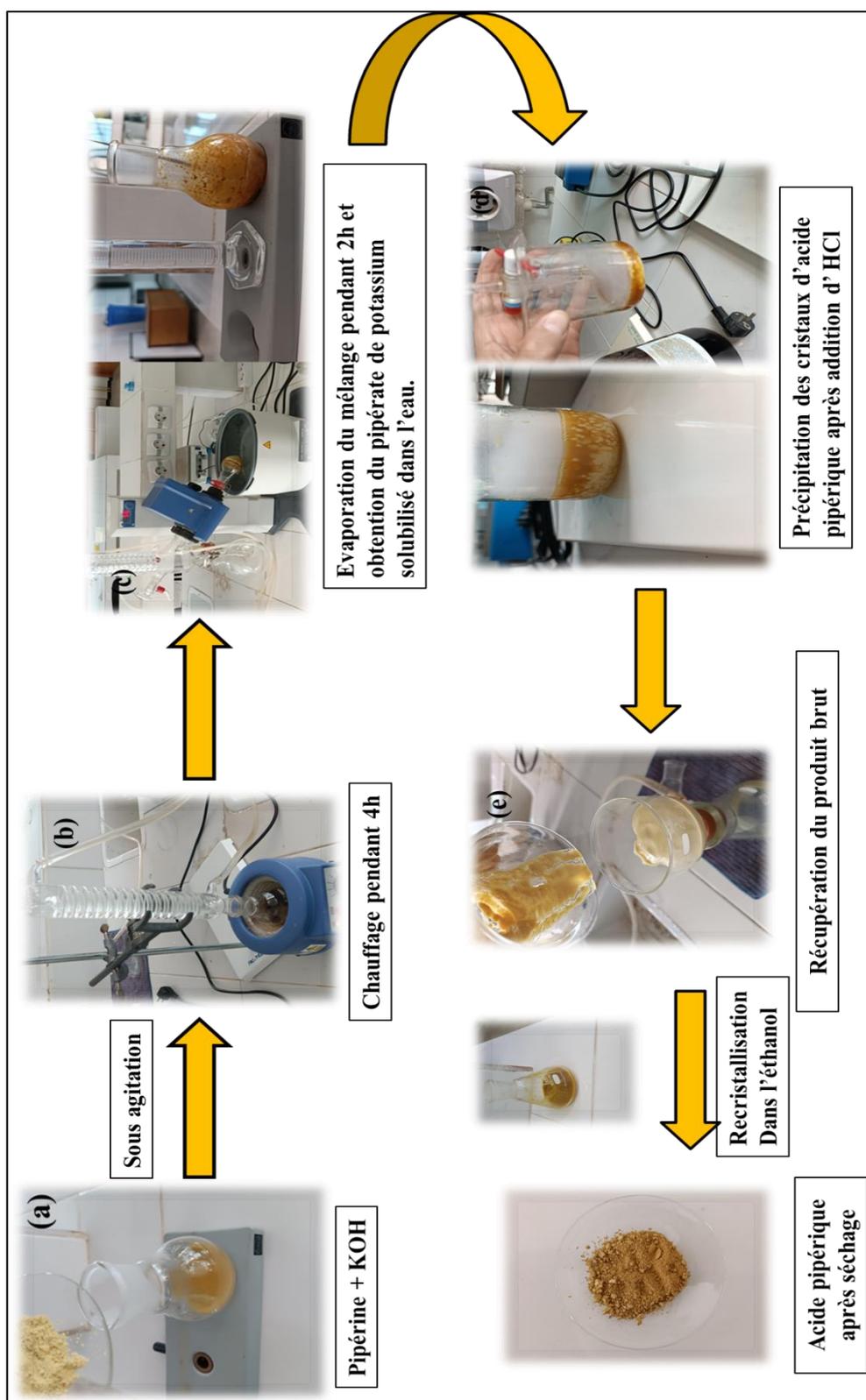
**Annexe 14 :** Préparation de la suspension de pipérine.



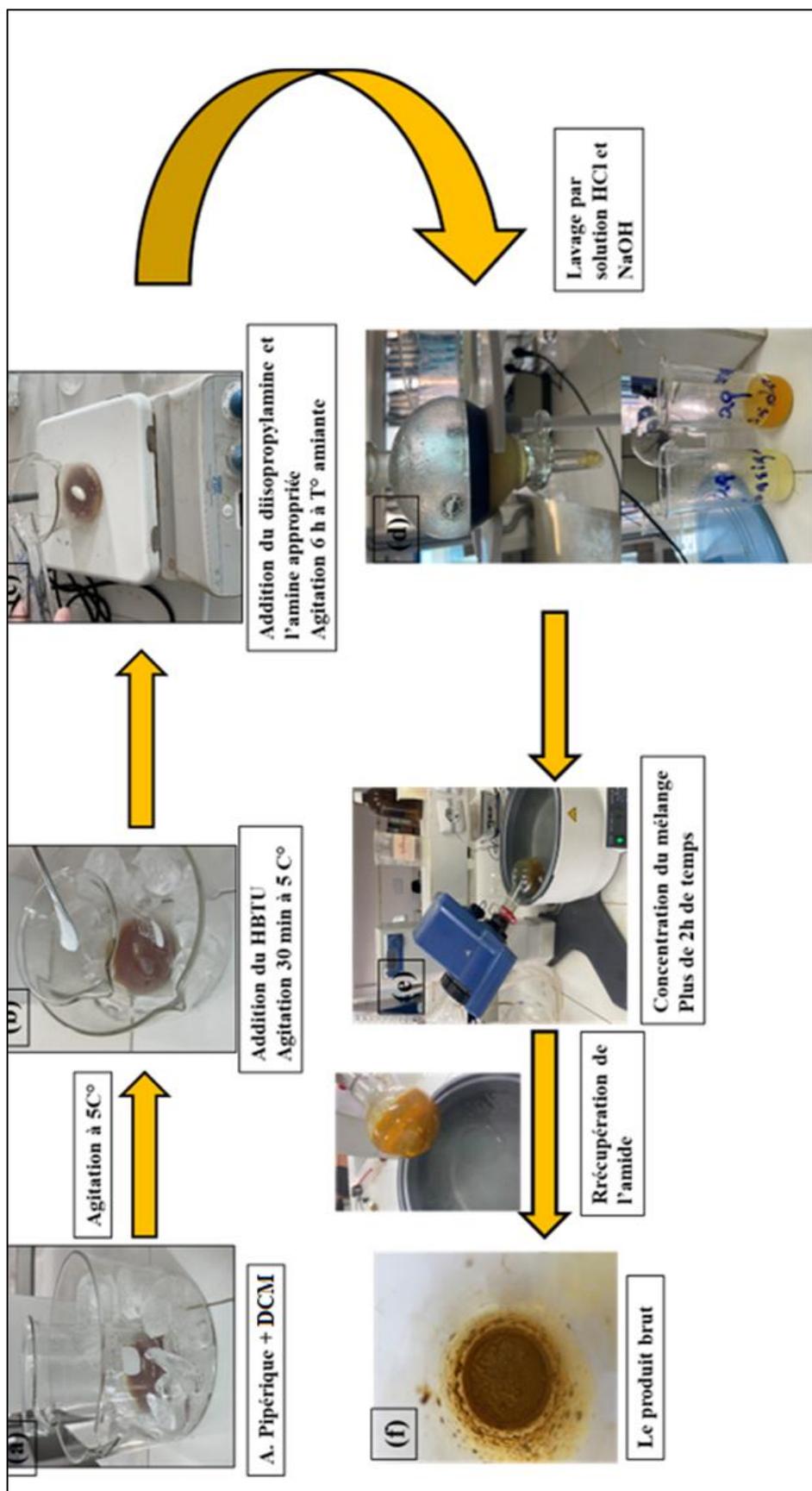
**Annexe 15 :** Ensemencement des suspensions bactériennes.



**Annexe 16 :** les concentrations des solutions et préparation des puits



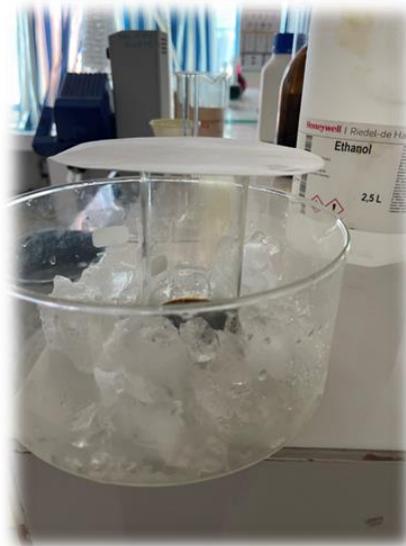
Annexe 17 : L'hémisynthèse de l'acide pipérique à partir de la pipérine.



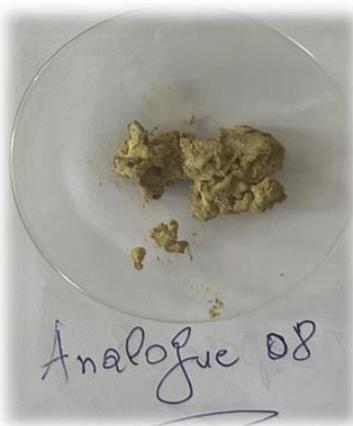
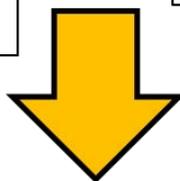
**Annexe 18 :** L'hémisynthèse des analogues amides (analogue 08 et 09) à partir de l'acide pipérique.



**Solubilisation du produit amide dans un mélange eau-éthanol à chaud.**



**Recristallisation du produit amide à froid.**



**Analogue 08 après purification et séchage.**

**Annexe 19 : La purification d'analogue 08.**



Annexe 20 : Echantillon des 4 produits obtenus.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFICCertificate of Analysis

Product No.: B23597

Product: O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate, 98%

Lot No.: 10225744

Appearance: White crystalline powder

Melting Point: 202°C (dec)

Assay (HPLC): 99.9%

Loss on Drying: 0.10%

Identification (FTIR): Conforms

Retest Date: 14.01.2030

Order our products online [alfa.com](http://alfa.com)

This document has been electronically generated and does not require a signature.

This is to certify that units of the lot number above were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Thermo Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Products are for research use or further manufacturing. Not for direct administration to humans or animals. It is the responsibility of the purchaser, formulator or those performing further manufacturing to determine suitability based upon the intended use of the end product. Products are tested to meet the analytical requirements of the noted grade. The above information is the actual analytical results obtained.

**Annexe 21 : Certificat d'analyse du réactif HBTU.**



## Certificate of Analysis

1.06050.6025 Dichloromethane for analysis EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur  
 Batch K53147550

|   | Spec. Values  |       | Batch Values |       |
|---|---------------|-------|--------------|-------|
|   |               |       |              |       |
| Purity (GC)   | ≥ 99.8        | %     | 99.8         | %     |
| Identity (IR)                                       | conforms      |       | conforms     |       |
| Appearance  | clear         |       | clear        |       |
| Color   | ≤ 10          | Hazen | < 5          | Hazen |
| Titrate acid  | ≤ 0.0002      | meq/g | < 0.0001     | meq/g |
| Alkalinity  | ≤ 0.0002      | meq/g | < 0.0002     | meq/g |
| Density (d 20 °C/4 °C)                              | 1.324 - 1.326 |       | 1.326        |       |
| Boiling point                                       | 39 - 42       | °C    | 40           | °C    |
| Free chlorine (as Cl)                               | ≤ 0.00002     | %     | ≤ 0.00002    | %     |
| Chloride (Cl)                                       | ≤ 0.0001      | %     | ≤ 0.0001     | %     |
| Matter discolored by H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | ≤ 100         | Hazen | ≤ 100        | Hazen |
| Chloroform (GC)                                     | ≤ 0.005       | %     | < 0.005      | %     |
| Ethanol (GC)  | ≤ 0.02        | %     | < 0.01       | %     |
| Methanol (GC)                                       | ≤ 0.1         | %     | < 0.1        | %     |
| Carbon tetrachloride (GC)                           | ≤ 0.005       | %     | < 0.001      | %     |
| Fluorescence (as quinine at 365 nm)                 | ≤ 0.002       | ppm   | ≤ 0.002      | ppm   |
| Al (Aluminium)                                      | ≤ 0.00005     | %     | ≤ 0.00005    | %     |
| B (Boron)   | ≤ 0.000002    | %     | ≤ 0.000002   | %     |
| Ba (Barium)   | ≤ 0.00001     | %     | ≤ 0.00001    | %     |
| Ca (Calcium)  | ≤ 0.00005     | %     | ≤ 0.00005    | %     |
| Cd (Cadmium)  | ≤ 0.000005    | %     | ≤ 0.000005   | %     |
| Co (Cobalt)   | ≤ 0.000002    | %     | ≤ 0.000002   | %     |
| Cr (Chromium)                                       | ≤ 0.000002    | %     | ≤ 0.000002   | %     |
| Cu (Copper)   | ≤ 0.000002    | %     | ≤ 0.000002   | %     |
| Fe (Iron)   | ≤ 0.00001     | %     | ≤ 0.00001    | %     |
| Mg (Magnesium)                                      | ≤ 0.00001     | %     | ≤ 0.00001    | %     |
| Mn (Manganese)                                      | ≤ 0.000002    | %     | ≤ 0.000002   | %     |
| Mo (Molybdenum)                                     | ≤ 0.000002    | %     | ≤ 0.000002   | %     |
| Ni (Nickel)   | ≤ 0.000002    | %     | ≤ 0.000002   | %     |
| Pb (Lead)   | ≤ 0.00001     | %     | ≤ 0.00001    | %     |
| Sn (Tin)  | ≤ 0.00001     | %     | ≤ 0.00001    | %     |
| Zn (Zinc)   | ≤ 0.00001     | %     | ≤ 0.00001    | %     |
| Evaporation residue                                 | ≤ 0.001       | %     | < 0.001      | %     |
| Water   | ≤ 0.01        | %     | < 0.01       | %     |

Stabilized with about 50 ppm 2-Methyl-2-butene.

Annexe 22 : Certificat d'analyse du réactif Dichlorométhane.

|   |   | <h2>Certificate of Analysis</h2> |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
|--|---|----------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------|------------------------|------------------------|------------|-------------|--------|---------------------------|---------------|-------|-------|------------|------|---------------|-------------|-------------|
|    |   |                                  |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| <b>Material Number:</b><br><b>Material description:</b><br><b>Grade:</b><br><b>Lot Number:</b><br><b>Date of Quality Control:</b><br><b>Date of Manufacture:</b><br><b>CAS Number:</b><br><b>Molecular weight:</b><br><b>Molecular formula:</b>  | 87031.320<br>Diisopropylamine >99%<br>GPR RECTAPUR®<br>2109200919<br>2019-Sep-24<br>2019-Sep-20<br>108-18-9<br>101.19 g/mol<br>C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N |                                  |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr style="background-color: #0056b3; color: white;"> <th>Characteristics</th> <th>Specifications</th> <th>Measured values</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Appearance</td> <td>Clear yellowish liquid</td> <td>Clear colorless liquid</td> </tr> <tr> <td>Assay (GC)</td> <td>min. 99,0 %</td> <td>99,9 %</td> </tr> <tr> <td>Relative density (20/4°C)</td> <td>0,715 – 0,716</td> <td>0,716</td> </tr> <tr> <td>Water</td> <td>max. 0,3 %</td> <td>0,01</td> </tr> <tr> <td>Identity (IR)</td> <td>Passes test</td> <td>Passes test</td> </tr> </tbody> </table> |   |                                  | Characteristics | Specifications | Measured values | Appearance | Clear yellowish liquid | Clear colorless liquid | Assay (GC) | min. 99,0 % | 99,9 % | Relative density (20/4°C) | 0,715 – 0,716 | 0,716 | Water | max. 0,3 % | 0,01 | Identity (IR) | Passes test | Passes test |
| Characteristics  | Specifications  | Measured values                  |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| Appearance   | Clear yellowish liquid  | Clear colorless liquid           |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| Assay (GC)   | min. 99,0 %   | 99,9 %                           |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| Relative density (20/4°C)  | 0,715 – 0,716   | 0,716                            |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| Water  | max. 0,3 %  | 0,01                             |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| Identity (IR)  | Passes test   | Passes test                      |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| <p>*The use by date is the date to which VWR guarantees the above specification will be met for the product in an unopened container stored under our recommended conditions.</p>  |   |                                  |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| <b>Signature</b>   |   |                                  |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| <p>We certify that this batch conforms to the specifications listed above. This document has been produced electronically and is valid without a signature.</p>  |   |                                  |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| <p>Signed on behalf of VWR:<br/>           Jaroslav Svadlenka<br/>           Quality Control Manager</p>   |   |                                  |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| <b>Product Information</b>   |   |                                  |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |
| VWR International LLC, Radnor Corporate Center, Building One, Suite 200, 100 Malvern Road Radnor, PA 19087, USA<br>VWR International bvba/srnl, Hasseltse Research Park Zone 2020, Geldenakkerbaan 464, 3001 Leuven, Belgium<br><a href="http://www.vwr.com">http://www.vwr.com</a>  |   | <b>87031.320</b><br>---          |                 |                |                 |            |                        |                        |            |             |        |                           |               |       |       |            |      |               |             |             |

**Annexe 23** : Certificat d'analyse du réactif diisopropylamine.



## Certificat d'analyse

---

**Produit** 21423.231

**Description du produit** Aniline

**Grade / qualité** AnalaR NORMAPUR

**Lot** 22K024001

**Expire fin** 2024-Jul-22

**Numéro CAS** 62-53-3

**Formule moléculaire** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>

**Masse moléculaire** 93.13

| Analyses                                 | Spécifications | Valeurs mesurées |
|--|----------------|------------------|
| Titre (sur substance anhydre)            | ≥ 99.5 %       | 100.0 %          |
| Hydrocarbures                            | Conforme       | Conforme         |
| Acidité ou alcalinité                    | ≤ 0.03 meq/g   | ≤ 0.03 meq/g     |
| Densité (20/4)                           | 1.021 - 1.023  | 1.022            |
| Point de solidification                  | -6.5 - -6.1 °C | -6.3 °C          |
| Résidu de calcination (SO <sub>4</sub> ) | ≤ 50 ppm       | ≤ 50 ppm         |
| Nitrobenzène                             | ≤ 100 ppm      | ≤ 100 ppm        |
| Solubilité dans HCl 2 N                  | ≥ 13 %         | ≥ 13 %           |
| Eau                                      | ≤ 0.1 %        | ≤ 0.1 %          |

**Signature**

Nous certifions que ce lot est conforme aux spécifications listées ci-dessus.

Ce document a été produit électroniquement et est validé sans signature.

Isabelle Habay, Head of Laboratory - Briare  
VWR International S.A.S.; Z.I. de Vaugereau; FR-45250  
Briare; France

The information on this Laboratory or Manufacturing Certificate is an Active Pharmaceutical Ingredient or Feed or Active Feed. Suitability and intended use of the product remains the responsibility of the user. 15020443\_212080\_49637780

VWR International LLC, Radnor Corporate Center, Building One, Suite 200, 100 Matsonford Road, Radnor, PA 19087, USA 21423.231 - 22K024001 - V. 1 - Page 1 / 1

VWR International bv, Haaxrode Research Park Zone 2020, Geldensakkebaan 454, 3001 Leuven, Belgium

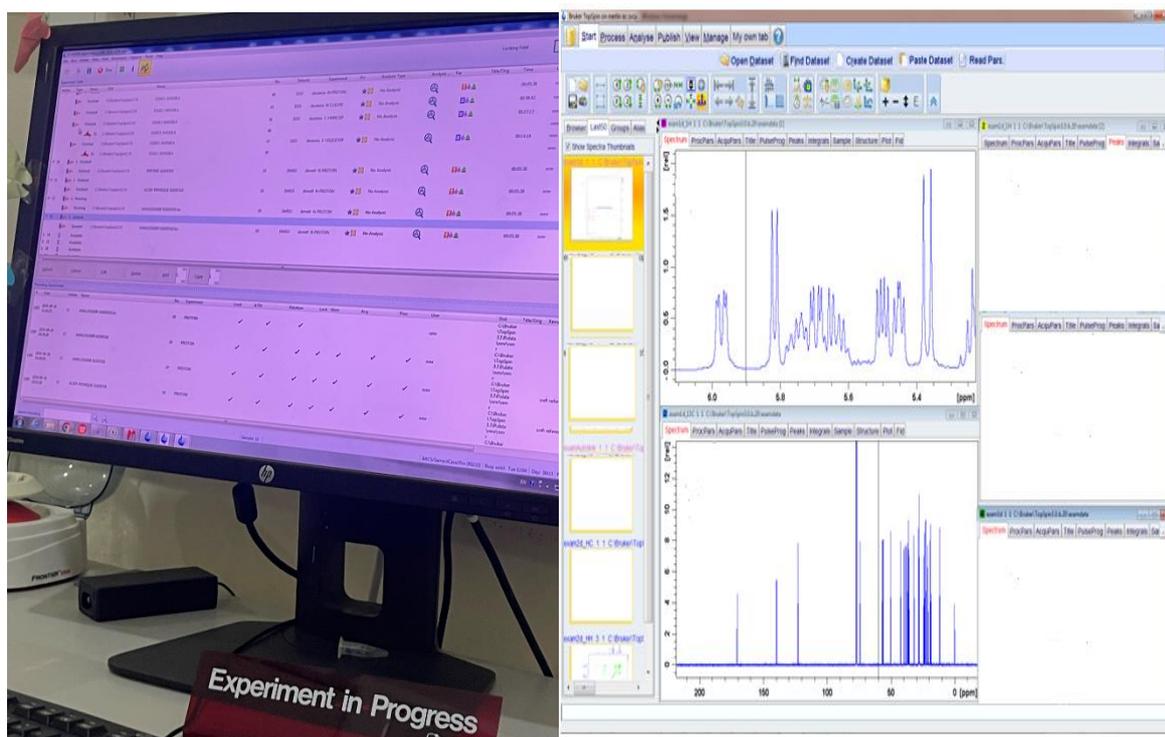
Annexe 24 : Certificat d'analyse du réactif aniline.

|    |   |                   |                                  |
|---|---|-------------------|----------------------------------|
| <b>TECHNICAL DATA SHEET</b>   |   |                   |                                  |
| <b>4-AMINOPHENOL LR</b>   |   |                   |                                  |
| <b>4-Hydroxyaniline</b>   |   |                   |                                  |
| Article No.   | 301310250   | Molecular Formula | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO |
| H.S. Code   | 2922.2900   | Molecular Weight  | 109.13                           |
| CAS No.   | 123-30-8  |                   |                                  |
| <b>Physical Properties</b>  |   |                   |                                  |
| Physical state at 20 °C   | Solid   |                   |                                  |
| Colour  | White to off white                                |                   |                                  |
| Melting point/ Freezing point [°C]  | 186 - 189 °C                                      |                   |                                  |
| Decomposition point [°C]  | 284 °C  |                   |                                  |
| Flash point [°C]  | 188°C   |                   |                                  |
| Vapour pressure [20°C]  | 0.075 mm Hg at 20 °C                              |                   |                                  |
| Vapour pressure mm/Hg   | 0.075 mm Hg at 20 °C                              |                   |                                  |
| Solubility in water [% weight]  | 1.5 g/100 ml in water                             |                   |                                  |
| Partition coefficient Log Pow octanol / water at 20°C                               | 0.04  |                   |                                  |
| <b>Specifications</b>   |   |                   |                                  |
| Assay (by GC) Min 98 %  |   |                   |                                  |
| Appearance White to cream to beige to light brown crystals or granules or powder    |   |                   |                                  |
| <b>Safety Information and Hazard Symbols</b>  |   |                   |                                  |
|  |   |                   |                                  |
| Symbol  | GHS07, GHS08, GHS09                               |                   |                                  |
| Signal Word   | Warning   |                   |                                  |
| UN No   | 3077  |                   |                                  |
| IMCO Class No.  | 9   |                   |                                  |
| Hazardous Statement   | H302+H332-H410-H341                               |                   |                                  |
| Precaution Statement  | P201-P261-P264-P271-P273-P304+P340-P308+P313-P501 |                   |                                  |

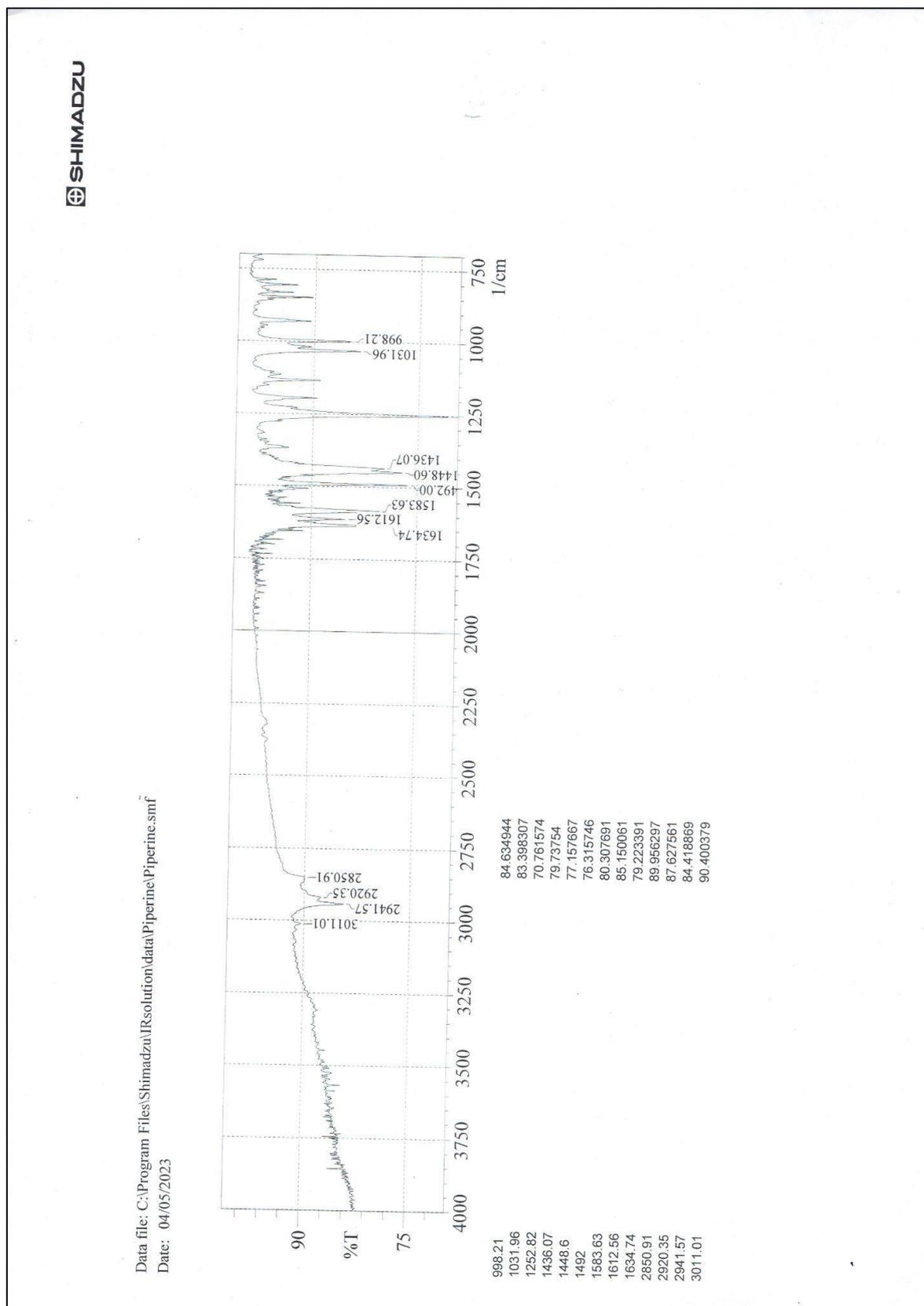
Annexe 25 : Fiche technique du réactif 4-aminophénol.



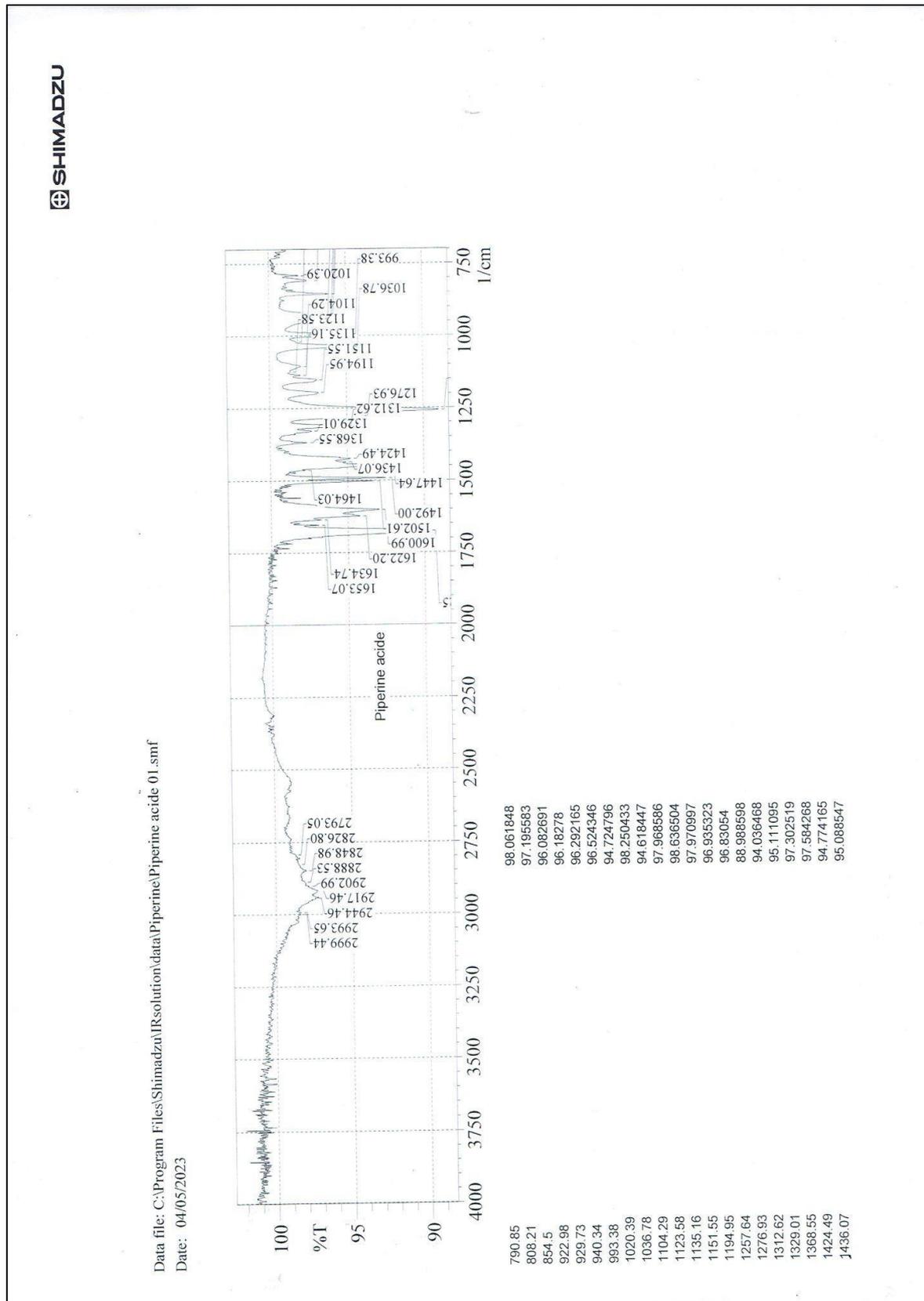
**Annexe 26 : l'appareil RMN Bruker® 400**



Annexe 27 : Interface du logiciel Top spin 3.5.



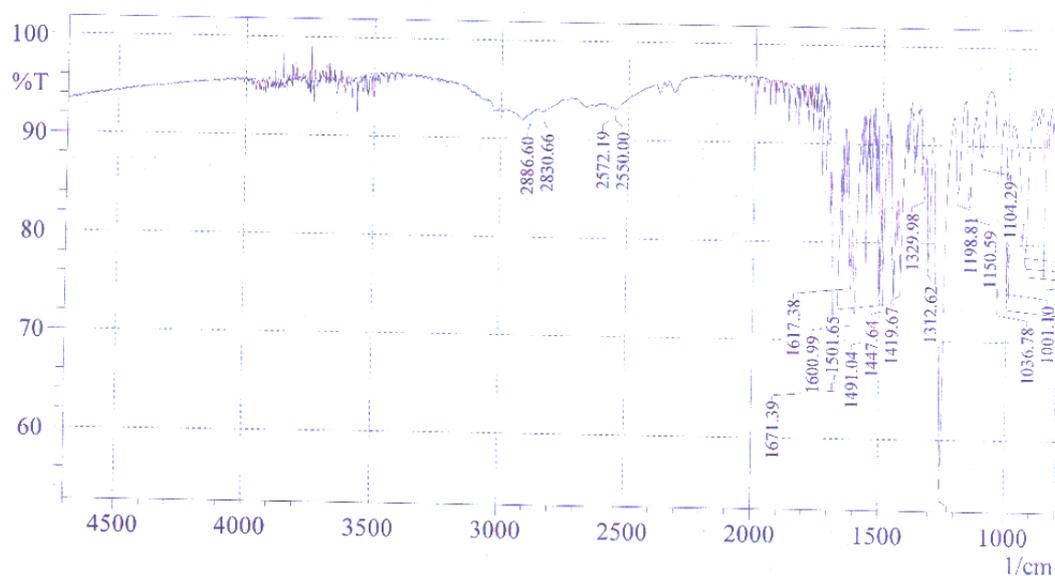
Annexe 28 : Spectre IR de la pipérine isolées.



Annexe 29 : Spectre IR de l'acide pipérique hémisynthétique.



Data filename: C:\Program Files\Shimadzu\IRsolution\data\Nouveau dossier (2)\ANALOGUE 08.smf  
Date: 15/09/2024



| No. | Peak    | Intensity | Corr. Intensity | Base (H) | Base (L) | Area  | Corr. Area |
|-----|---------|-----------|-----------------|----------|----------|-------|------------|
| 1   | 853.54  | 76.73     | 16.379          | 870.9    | 844.86   | 1.457 | 0.673      |
| 2   | 922.98  | 78.763    | 1.888           | 924.91   | 895.97   | 1.373 | 0.024      |
| 3   | 929.73  | 77.896    | 2.946           | 934.55   | 925.87   | 0.871 | 0.069      |
| 4   | 940.34  | 79.856    | 3.495           | 977.95   | 935.52   | 2.525 | 0.114      |
| 5   | 993.38  | 74.435    | 8.416           | 997.24   | 978.92   | 1.27  | 0.199      |
| 6   | 1001.1  | 76.159    | 6.465           | 1014.6   | 998.21   | 1.119 | 0.132      |
| 7   | 1036.78 | 73.986    | 19.871          | 1069.57  | 1015.57  | 2.825 | 1.41       |
| 8   | 1104.29 | 88.822    | 4.357           | 1116.83  | 1074.4   | 1.485 | 0.341      |
| 9   | 1150.59 | 83.74     | 10.085          | 1170.84  | 1131.3   | 1.907 | 0.811      |
| 10  | 1198.81 | 85.152    | 8.385           | 1215.21  | 1176.63  | 1.825 | 0.728      |
| 11  | 1256.68 | 54.974    | 24.845          | 1273.07  | 1216.17  | 6.467 | 2.113      |
| 12  | 1312.62 | 78.021    | 11.77           | 1322.26  | 1298.15  | 1.773 | 0.67       |
| 13  | 1329.98 | 85.409    | 3.387           | 1334.8   | 1323.22  | 0.705 | 0.108      |
| 14  | 1419.67 | 75.8      | 4.839           | 1421.6   | 1407.13  | 1.103 | 0.095      |
| 15  | 1447.64 | 74.452    | 4.647           | 1450.53  | 1439.92  | 1.076 | 0.09       |
| 16  | 1491.04 | 71.272    | 15.616          | 1496.83  | 1483.32  | 1.272 | 0.495      |
| 17  | 1501.65 | 74.788    | 7.036           | 1504.54  | 1497.79  | 0.699 | 0.135      |
| 18  | 1600.99 | 72.748    | 12.464          | 1612.56  | 1579.77  | 2.984 | 0.946      |
| 19  | 1617.38 | 76.415    | 3.588           | 1621.24  | 1613.52  | 0.804 | 0.064      |
| 20  | 1671.39 | 66.034    | 2.985           | 1673.32  | 1656.92  | 1.875 | 0.094      |
| 21  | 2550    | 93.111    | 0.435           | 2559.65  | 2495.99  | 1.813 | 0.073      |
| 22  | 2572.19 | 93.188    | 0.34            | 2588.58  | 2560.61  | 0.832 | 0.022      |
| 23  | 2830.66 | 92.81     | 0.043           | 2832.59  | 2800.76  | 0.994 | 0.005      |
| 24  | 2886.6  | 92.513    | 0.019           | 2887.56  | 2865.38  | 0.727 | 0.001      |

Comment;

Date/Time; 15/09/2024 16:31:55

No. of Scans; 45

Resolution; 2 [1/cm]

Apodization; Happ-Genzel

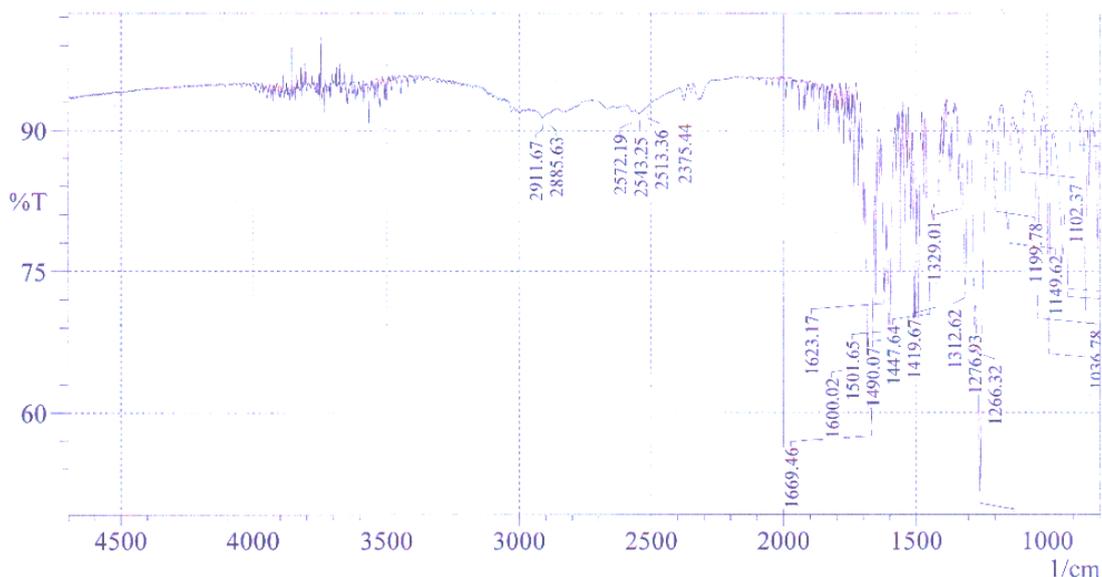
User; Administrateur

Annexe 30 : Spectre IR de l'analogue 08 hémisynthétique.



Data filename: C:\Program Files\Shimadzu\IRsolution\data\Nouveau dossier (2)\ANALOGUE 09.smf

Date: 15/09/2024



| No. | Peak    | Intensity | Corr. Intensity | Base (H) | Base (L) | Area  | Corr. Area |
|-----|---------|-----------|-----------------|----------|----------|-------|------------|
| 1   | 808.21  | 76.995    | 12.275          | 819.78   | 799.53   | 1.494 | 0.501      |
| 2   | 854.5   | 70.724    | 20.017          | 869.93   | 845.82   | 1.792 | 0.808      |
| 3   | 876.68  | 89.674    | 2.8             | 892.12   | 870.9    | 0.779 | 0.072      |
| 4   | 922.98  | 73.554    | 10.458          | 932.62   | 893.08   | 2.529 | 0.368      |
| 5   | 940.34  | 74.481    | 7.892           | 977.95   | 933.59   | 3.529 | 0.457      |
| 6   | 993.38  | 67.412    | 22.993          | 1016.53  | 978.92   | 2.768 | 1.154      |
| 7   | 1036.78 | 71.239    | 21.389          | 1063.79  | 1017.49  | 2.972 | 1.471      |
| 8   | 1102.37 | 86.781    | 5.069           | 1115.87  | 1078.25  | 1.667 | 0.376      |
| 9   | 1149.62 | 79.195    | 12.831          | 1171.81  | 1131.3   | 2.548 | 1.095      |
| 10  | 1199.78 | 82.62     | 9.438           | 1215.21  | 1176.63  | 2.146 | 0.783      |
| 11  | 1256.68 | 51.589    | 19.74           | 1264.39  | 1216.17  | 5.814 | 1.335      |
| 12  | 1266.32 | 67.489    | 0.768           | 1273.07  | 1265.36  | 1.262 | 0.036      |
| 13  | 1276.93 | 70.756    | 3.294           | 1294.29  | 1274.04  | 2.117 | 0.17       |
| 14  | 1312.62 | 73.473    | 14.273          | 1322.26  | 1298.15  | 2.166 | 0.836      |
| 15  | 1329.01 | 82.828    | 4.101           | 1334.8   | 1323.22  | 0.643 | 0.136      |
| 16  | 1419.67 | 72.438    | 5.752           | 1421.6   | 1408.1   | 1.205 | 0.121      |
| 17  | 1447.64 | 71.729    | 9.439           | 1453.43  | 1439.92  | 1.508 | 0.29       |
| 18  | 1490.07 | 69.405    | 16.764          | 1494.9   | 1483.32  | 1.161 | 0.456      |
| 19  | 1501.65 | 70.113    | 8.931           | 1504.54  | 1497.79  | 0.826 | 0.175      |
| 20  | 1600.02 | 66.113    | 17.737          | 1611.59  | 1579.77  | 3.484 | 1.276      |
| 21  | 1623.17 | 72.801    | 6.396           | 1631.85  | 1619.31  | 1.246 | 0.114      |
| 22  | 1669.46 | 58.741    | 8.848           | 1673.32  | 1656.92  | 2.525 | 0.296      |
| 23  | 2375.44 | 93.231    | 1.515           | 2390.87  | 2360.97  | 0.805 | 0.104      |
| 24  | 2513.36 | 92.576    | 0.032           | 2514.32  | 2433.31  | 2.392 | 0          |
| 25  | 2543.25 | 91.785    | 0.084           | 2545.18  | 2520.11  | 0.892 | 0.005      |
| 26  | 2572.19 | 92.035    | 0.362           | 2588.58  | 2561.58  | 0.947 | 0.025      |
| 27  | 2885.63 | 91.83     | 0.054           | 2887.56  | 2858.63  | 1.03  | 0.004      |
| 28  | 2911.67 | 91.376    | 0.469           | 2927.1   | 2897.21  | 1.142 | 0.037      |

Comment;

Date/Time; 15/09/2024 16:48:07

No. of Scans; 45

Resolution; 2 [1/cm]

Apodization; Happ-Genzel

User; Administrateur

Annexe 31 : Spectre IR de l'analogue 09 hémisynthétique.

**Reference solution (b).** Dissolve 1.0 mg of 4'-hydroxyacetophenone R in 6.0 mL of reference solution (a). Dilute 3.0 mL of this solution to 10.0 mL with a 6.8 g/L solution of potassium dihydrogen phosphate R.

**Reference solution (c).** Dilute 2.5 mL of reference solution (a) to 10.0 mL with a 6.8 g/L solution of potassium dihydrogen phosphate R.

**Column:**

- size:  $l = 0.15$  m,  $\varnothing = 4.6$  mm;
- stationary phase: end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5  $\mu$ m).

**Mobile phase:** methanol R, 6.8 g/L solution of potassium dihydrogen phosphate R (30:70 V/V).

**Flow rate:** 1.0 mL/min.

**Detection:** spectrophotometer at 230 nm.

**Injection:** 10  $\mu$ L of the test solution and reference solutions (b) and (c).

**Run time:** 18 min.

**Retention time:** paeoniflorin = about 8 min; 4'-hydroxyacetophenone = about 9 min.

**System suitability:** reference solution (b):

- resolution: minimum 1.5 between the peaks due to paeoniflorin and 4'-hydroxyacetophenone.

Calculate the percentage content of paeoniflorin using the following expression:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1 \times 10}$$

- $A_1$  = area of the peak due to paeoniflorin in the chromatogram obtained with the test solution;
- $A_2$  = area of the peak due to paeoniflorin in the chromatogram obtained with reference solution (c);
- $m_1$  = mass of the herbal drug to be examined used to prepare the test solution, in grams;
- $m_2$  = mass of paeoniflorin CRS used to prepare reference solution (a), in grams;
- $p$  = percentage content of paeoniflorin in paeoniflorin CRS.

01/2013:2477  
corrected 10.0



## PEPPER

### *Piper fructus*

#### DEFINITION

Dried, ripe or nearly ripe fruit of *Piper nigrum* L. with an unbroken pericarp (black pepper) or with the outer layers of the pericarp removed (white pepper).

**Content:**

- essential oil: minimum 25 mL/kg (anhydrous drug);
- piperine ( $C_{17}H_{19}NO_3$ ;  $M_r$  285.3): minimum 3.0 per cent (anhydrous drug).

#### IDENTIFICATION

- A. **White pepper.** Spheroid berries, 3-5 mm in diameter, slightly flattened at one pole and with a small protuberance at the other, with smooth, externally matt, brownish-grey, greyish-white or pale yellowish-white surface, with numerous pale, linear striations between apex and base.

**Black pepper.** Spheroid berries, 3-6 mm in diameter, externally blackish-brown, with raised reticular wrinkles, bearing fine remains of the style at the apex and a scar of the peduncle at the base. The texture is hard, the epicarp can be stripped, the endocarp is greyish-white or pale yellow. The fracture is greyish-white, starchy, possessing a small space at the centre.

B. Microscopic examination (2.8.23).

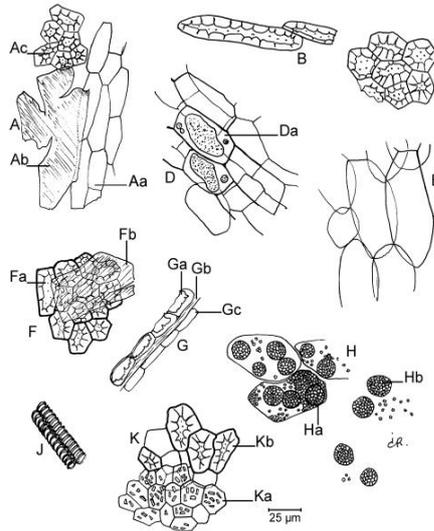


Figure 2477.-1. – Illustration for identification test B of powdered herbal drug of pepper

**White pepper.** The powder is light grey. Examine under a microscope using chloral hydrate solution R. The powder shows the following diagnostic characters (Figure 2477.-1): fragments of the endocarp in surface view, consisting of more or less polygonal sclereids about 20-30  $\mu$ m in diameter, which have irregularly thickened walls [Ac, C, Fa] and which may or may not be associated with the testa [A, F], consisting of a layer of indistinct, reddish-brown pigmented cells constituting the 'pigmented layer' [Ab, Fb] and a layer of very thin-walled polygonal cells constituting the 'hyaline layer' [Aa]; fragments of the endocarp, in transverse section [G], showing sclereids with thickened inner walls on the 3 lower sides [Ga], usually associated with the testa (pigmented layer [Gb] and hyaline layer [Gc]); fragments of the parenchyma of the mesocarp [D] containing large oil cells 50-75  $\mu$ m in diameter [Da]; numerous thin-walled, ovoid or polygonal cells of the parenchyma of the seed [E]; rare, elongated sclereids, with thickened walls, from the fruit peduncle [B]; a few fragments of vascular tissue with narrow spiral vessels [J]. Examine under a microscope using a 50 per cent V/V solution of glycerol R. Rounded, compound starch granules [H], about 30  $\mu$ m in diameter, made up of tiny individual granules, ovoid or polyhedral by compression, free [Hb] or included in the parenchymatous cells of the seed [Ha].

**Black pepper.** The powder is grey. Examine under a microscope using chloral hydrate solution R. In addition to the diagnostic characters described for white pepper, the powdered black pepper shows the following diagnostic characters (Figure 2477.-1): fragments of the epicarp [K] with extremely thin-walled, brownish-red pigmented, polygonal or ovoid cells, which contain small prisms

of calcium oxalate [Ka], and which are associated with the outer layers of the mesocarp consisting of groups of sclereids with strongly thickened walls [Kb].

C. Thin-layer chromatography (2.2.27).

**Test solution.** To 0.5 g of the powdered herbal drug (355) (2.9.12) add 5 mL of *methanol R*. Sonicate for 10 min, centrifuge and use the supernatant.

**Reference solution.** Dissolve 10 mg of *borneol R* and 15 mg of *piperine R* in 10 mL of *methanol R*.

**Plate:** TLC silica gel  $F_{254}$  plate R (5-40  $\mu\text{m}$ ) [or TLC silica gel  $F_{254}$  plate R (2-10  $\mu\text{m}$ )].

**Mobile phase:** ethyl acetate R, cyclohexane R (30:50 V/V).

**Application:** 10  $\mu\text{L}$  [or 5  $\mu\text{L}$ ] as bands of 10 mm [or 8 mm].

**Development:** over a path of 15 cm [or 6 cm].

**Drying:** in air.

**Detection A:** examine in ultraviolet light at 254 nm.

**Results A:** see below the sequence of zones present in the chromatograms obtained with the reference solution and the test solution. Furthermore, other faint quenching zones may be present in the chromatogram obtained with the test solution.

| Top of the plate           |                                    |
|----------------------------|------------------------------------|
|                            | 3 quenching zones                  |
|                            | A quenching zone                   |
| Piperine: a quenching zone | A strong quenching zone (piperine) |
| Reference solution         | Test solution                      |

**Detection B:** treat with *anisaldehyde solution R* and heat at 100 °C for 5 min; examine in daylight.

**Results B:** see below the sequence of zones present in the chromatograms obtained with the reference solution and the test solution. Furthermore, other zones may be present in the chromatogram obtained with the test solution.

| Top of the plate                   |                                     |
|------------------------------------|-------------------------------------|
|                                    | A strong purple zone                |
|                                    | A purple zone                       |
| Borneol: a yellowish-brown zone    |                                     |
|                                    | A purple-grey zone                  |
|                                    | A violet-grey zone                  |
|                                    | A grey zone                         |
| Piperine: a green or brownish zone | A green or brownish zone (piperine) |
|                                    | A grey zone                         |
| Reference solution                 | Test solution                       |

TESTS

**Foreign matter** (2.8.2): maximum 3 per cent.

**Water** (2.2.13): maximum 120 mL/kg, determined on 20.0 g of the freshly powdered herbal drug (1400) (2.9.12) reduced using a knife mill.

**Total ash** (2.4.16): maximum 6.0 per cent.

ASSAY

**Essential oil** (2.8.12). Use 10.0 g of the freshly powdered herbal drug (1400) (2.9.12), a 1000 mL round-bottomed flask, 400 mL of *water R* as the distillation liquid and 0.5 mL of *xylene R* in the graduated tube. Distil at a rate of 2-3 mL/min for 3 h.

**Piperine.** Liquid chromatography (2.2.29). Carry out the assay protected from light.

**Test solution.** Disperse 0.250 g of the powdered herbal drug (355) (2.9.12) in 40 mL of *ethanol (96 per cent) R*. Sonicate for 20 min and filter. Rinse the flask and the filter with 5 mL of *ethanol (96 per cent) R*, combine the filtrate and washings and dilute to 50.0 mL with the same solvent. Filter through a membrane filter (nominal pore size 0.45  $\mu\text{m}$ ).

**Reference solution (a).** Dissolve 15.0 mg of *piperine CRS* in *ethanol (96 per cent) R* and dilute to 100.0 mL with the same solvent.

**Reference solution (b).** Disperse 0.250 g of *long pepper for system suitability HRS* (355) (2.9.12) in 40 mL of *ethanol (96 per cent) R*. Sonicate for 20 min and filter. Rinse the flask and the filter with 5 mL of *ethanol (96 per cent) R*, combine the filtrate and washings and dilute to 50.0 mL with the same solvent. Filter through a membrane filter (nominal pore size 0.45  $\mu\text{m}$ ).

**Column:**

- size:  $l = 0.15 \text{ m}$ ,  $\text{Ø} = 4.6 \text{ mm}$ ;
- stationary phase: end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5  $\mu\text{m}$ ).

**Mobile phase:**

- mobile phase A: *water R*;
- mobile phase B: *acetonitrile R*;

| Time (min) | Mobile phase A (per cent V/V) | Mobile phase B (per cent V/V) |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 - 5      | 50                            | 50                            |
| 5 - 20     | 50 $\rightarrow$ 5            | 50 $\rightarrow$ 95           |
| 20 - 22    | 5 $\rightarrow$ 0             | 95 $\rightarrow$ 100          |

**Flow rate:** 1.0 mL/min.

**Detection:** spectrophotometer at 343 nm.

**Injection:** 10  $\mu\text{L}$ .

**Retention time:** piperine = about 10 min.

**Identification of peaks:** use the chromatogram supplied with *long pepper for system suitability HRS* and the chromatogram obtained with reference solution (b) to identify the peak due to piperine and peak 2.

**System suitability:** reference solution (b):

- peak-to-valley ratio: minimum 4, where  $H_p$  = height above the baseline of peak 2 and  $H_v$  = height above the baseline of the lowest point of the curve separating the peak due to piperine from peak 2.

Calculate the percentage content of piperine using the following expression:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1 \times 2}$$

$A_1$  = area of the peak due to piperine in the chromatogram obtained with the test solution;

$A_2$  = area of the peak due to piperine in the chromatogram obtained with reference solution (a);

$m_1$  = mass of the herbal drug to be examined used to prepare the test solution, in grams;

$m_2$  = mass of *piperine CRS* used to prepare reference solution (a), in grams;

$p$  = percentage content of piperine in *piperine CRS*.

## BIOGRAPHIE D'AUTEUR

- Dr GUEROUI Mehdi a obtenu son diplôme de pharmacien en juillet 2008 au Département de Pharmacie de la Faculté de Médecine d'Annaba, en Algérie. Il a ensuite poursuivi ses études au laboratoire de chimie thérapeutique de la même faculté, où il a décroché un DEMS (Diplôme d'Études Médicales Spécialisées) en chimie thérapeutique en janvier 2013.
- Il a suivi plusieurs formations, parmi lesquelles :
  - Formation Nationale des Enseignants Universitaires Algériens intitulé : Pédagogie 2.0 au sein de l'université Salah Boubnider-Constantine<sup>3</sup>
  - Formation en ligne par Elsevier, intitulé : The Article Publishing Process : An Elsevier Author Workshop.
  - Formation dans la 1<sup>ère</sup> école in silico au sein du Centre Nationale de Recherche en Science Pharmaceutique (CRSP).
  - Formation Nationale des Enseignants Universitaires Algériens intitulé : Analyse statistiques en science médicale (Logiciel SPSS) au sein de l'université Salah Boubnider-Constantine<sup>3</sup>
  - Formation en ligne par Elsevier, intitulé : Évitez le haut degré de similarité et écrire des citations de manière appropriée en utilisant Mendeley.
  - Formation en ligne par Elsevier, intitulé : Conseils et astuces pour la préparation de votre manuscript.
  - Formation en ligne par Elsevier, intitulé: Shorten your path to publication ``Reserarch insights from submission to rejection.
  - Formation en ligne par Elsevier, intitulé: Data Repositories to store your data.
  - Formation en ligne par Elsevier, intitulé : Tips for writing grant applications : a funder perspective.
- Il a occupé le poste de pharmacien assistant, chef d'unité, et chef de service physico-chimie par intérim au Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP), Annexe de Constantine, de mai 2013 à mai 2015.

En mai 2015, il est devenu maître-assistant hospitalo-universitaire en chimie thérapeutique, poste qu'il occupe actuellement. Il enseigne et mène des recherches au Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Département de Pharmacie, Faculté de Médecine de Constantine (Algérie). Il est également responsable du module de chimie thérapeutique

et pharmacien maître-assistant à la pharmacie centrale du CHU de Constantine depuis septembre 2015

- Membre de l'équipe de recherche du Laboratoire IDAP (Laboratoire d'innovation et de développement d'actif pharmaceutique) au département de pharmacie de l'Université de Constantine 3. Ce laboratoire, dirigé par le Pr. Abdelmalik BELKHIRI.
- Membre de l'équipe de recherche du Laboratoire ReMeDD (Recherche Médicaments et Développement Durable) à la Faculté de Génie des Procédés de l'Université de Constantine 3. Ce laboratoire, dirigé par le Pr. Rihab BOUSHABA, se concentre sur l'unité de Génie Pharmaceutique et Industriel. Lien du site du laboratoire ReMeDD : <https://remedd.univ-constantine3.dz/>

- **Production Scientifique :**

Dr. GUEROUI Mehdi a publié au cours de son cursus en tant qu'auteur principal l'article ci-dessous :

Evaluation of the anti-inflammatory activity of esters and amides piperine analogs an in silico study. Au journal RHAZES: Green and Applied Chemistry (ISSN: 2605-6895) Vol. 20, 2024, pp. 30~44 <https://doi.org/10.48419/IMIST.PRSM/rhazes-v20.52388>

L'Auteur a participé avec des communications orales et affichées aux journées scientifiques, congrès et conférences nationales et internationales cités ci-dessous.

- **Communication orale :** *L'intelligence artificielle dans la recherche pharmaceutique, Exemple de recherche de nouveaux inhibiteurs de l'ARN polymérase du virus de l'hépatite C*, aux premières journées nationales du Département de Pharmacie de Constantine, les 27-28 novembre 2024, à Constantine (Algérie).
- **Communication affichée :**
  - *Identification de nouveaux inhibiteurs de la NS5B pour le traitement de l'hépatite C : une étude in silico*, présentée lors des premières journées nationales du Département de Pharmacie de Constantine, les 27-28 novembre 2024, à Constantine (Algérie).
- **Communication affichée :**
  - *Étude In Silico de l'activité Antibactérienne des Flavonoïdes sur E. Coli*
  - *Évaluation de l'activité cytotoxique in silico de la pipérine isolée des fruits du Piper nigrum*, présentée lors de la 1ère Journée Nationale de Pharmacie Hospitalière du CHU de Sétif, le 03 avril 2021.
- **Communication affichée :** *Complexe de platine*, présentée aux VIe Journées Internationales de Cancérologie de Constantine, les 15, 16 et 17 octobre 2010.

- **Communication affichée :**
  - *Efficacité pharmaco-chimique des Glymepirides par rapport au Glybenclamide*
  - *Efficacité pharmaco-chimique des Glitazones dans le DT2*, présentée aux 1ères Journées Aurassiennes de Médecine (JAM) à Batna, les 03 et 04 novembre 2010.
- **Communication affichée :**
  - *Nitosourées*, présentée lors du **First Meeting of Medical Oncology in Annaba**, les 8 et 9 avril.
  - *Fluorouracile*, présentée lors du **First Meeting of Medical Oncology in Annaba**, les 8 et 9 avril.
- **Communication affichée :**
  - *Efficacité pharmaco-chimique des Glinides dans le traitement du DNID*, présentée lors de la **Vème Journée Internationale de FMC** de l'Association Sciences & Vie des Médecins de la Wilaya de Constantine, le 30 avril 2011.
  - *La famille des Biguanides (Metformine)*, présentée lors de la **Vème Journée Internationale de FMC** de l'Association Sciences & Vie des Médecins de la Wilaya de Constantine, le 30 avril 2011.
- **Communication affichée :**
  - *Intérêt du Rituximab dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde*, présentée lors des **Xèmes Journées Nationales et 1ère Conférence Internationale de Pharmacie** à Batna, les 06 et 07 juin 2012.
- **Communication affichée :**
  - *Risques du travail au laboratoire de chimie thérapeutique*, présentée lors des **6ème Journées de Toxicologie**, les 19, 20 et 21 octobre 2012.
- **Communication affichée :**
  - *Inhibiteurs des récepteurs de Tyrosine Kinase*, présentée lors des **8ème Journées Internationales de Cancérologie de Constantine**, les 12, 13 et 14 octobre 2012.



**Nom et Prénom : Mehdi GUEROUI**

**Titre : Conception in silico de nouveaux analogues de la pipérine : évaluation des activités analgésique, anti-inflammatoire et antibactérienne de la pipérine isolée du poivre noir et de ses analogues n-arylamides synthétisés**

Thèse en vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat d'état en  
Sciences Médicales en Chimie Thérapeutique

## **RESUME**

Cette étude porte sur l'extraction, la caractérisation, la synthèse et l'évaluation des propriétés biologiques de la pipérine et de ses analogues de synthèse de type N-arylamides. Elle vise à explorer leur potentiel en tant qu'agents anti-inflammatoires, analgésiques et antibactériens, tout en combinant des approches expérimentales et in silico.

La pipérine a été extraite du poivre noir par différentes méthodes, dont l'extraction avec l'acide acétique glacial, qui a permis d'obtenir un produit pur et cristallin. Sa structure chimique a été confirmée par des techniques spectrales (UV, IR, RMN). Ensuite, deux analogues amides de l'acide pipérique (08 et 09) ont été synthétisés avec des rendements élevés (64,7 % et 70,12 %), et leur structure a été validée par des analyses similaires.

Les études biologiques in vivo ont révélé que la pipérine et ses analogues possèdent des activités anti-inflammatoires et analgésiques significatives. La pipérine, administrée à une dose de 50 mg/kg, a montré des effets comparables à ceux de l'aspirine (150 mg/kg) et du tramadol, respectivement pour les activités anti-inflammatoires et analgésiques.

Les analyses in vitro n'ont révélé aucune activité antibactérienne significative pour la pipérine et l'acide pipérique, tandis que les analogues 08 et 09 ont montré une activité antibactérienne contre les souches testées. En parallèle, les études in silico de type ADME des analogues ont mis en évidence une absorption gastro-intestinale élevée. Les simulations de docking ont confirmé des interactions solides entre les analogues et la cyclooxygénase-2 (COX-2), ainsi qu'avec diverses protéines bactériennes, suggérant leur potentiel à la fois anti-inflammatoire et antibactérien. De plus, les simulations de dynamique moléculaire ont validé la stabilité structurale des analogues lors de leurs interactions avec la COX-2.

Sur le plan toxicologique, les analogues présentent un profil sécuritaire avec une toxicité modérée, sans risque de cancérogénicité, et un faible impact environnemental.

En conclusion, les résultats mettent en évidence le potentiel thérapeutique des analogues amides de la pipérine, en particulier les analogues 08 et 09, en tant qu'anti-inflammatoires, analgésiques et antibactériens prometteurs. Ces composés méritent des études précliniques supplémentaires pour évaluer leur efficacité et leur sécurité.

**Mots Clés.** Pipérine, in silico, Cyclooxygénase2, Anti-inflammatoire, Antibactérien, Analogues amides.

**Directeur de thèse :** Karima BENEMEBAREK -Université Constantine 3

Année Universitaire : 2024-2025