



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et  
de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques

Référence ..... / 2021

# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

---

Présenté et soutenu par :  
**DJORNI Mohamed Idriss et BEN ZETTA Nabil**

Le : mardi 6 juillet 2021

## **Evaluation de l'activité antimicrobienne du poivre noir (*Piper nigrum*)**

---

Jury :

<b>Mme. BOULMAIZ Sara</b>	<b>MAA</b>	Mohamed Khider - Biskra	Président
<b>Mme. CHOUIA Amel</b>	<b>MCB</b>	Mohamed Khider - Biskra	Rapporteur
<b>Mme. BOUGUENOUNE Widad</b>	<b>MCB</b>	Mohamed Khider - Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020 - 2021



## Remerciements

*Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour effectuer ce travail.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos vœux les plus sincères et nos remerciements*

*Mme CHOUIA Amel, Docteur au Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université de Biskra, pour avoir dirigé ce travail et accepté de l'encadrer, pour ses conseils et pour ses orientations.*

*Nous tenons à remercier le président du jury pour le grand honneur de présider le jury et les examinateurs d'avoir bien voulu examiner ce travail.*

**Merci**

## Dédicaces

*Je dédie cet humble travail à mes chers parents qui se sont sacrifiés pour moi toute ma vie afin d'atteindre ces rangs et de m'encourager matériellement et moralement. A tous mes frères "Ali, Okba Al-Fateh , Hamza, Nourhan"*

*A toute l'honorable famille djorni et Ben nasib qui m'a beaucoup soutenu dans la réalisation de ce succès*

*A tous les amis qui m'ont aidé de près ou de loin*

*A l'ensemble des amis que j'ai connu pendant mes études.*

*Je dédie spécialement à mon binôme «Nabil » pour l'aide à mon travail.*

*A tous les étudiants de la promotion*

*Master 2020-2021 Microbiologie appliquée du département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et. Université Mohamed Khider de Biskra.*

**MOHAMEDIDRISS**



## Dédicaces

*Je dédie ce travail ...*

*A la mémoire de **Ma Mère**, Qu'Allah l'accueille au paradis, à **Mon Père (Ammar)** que j'aime tant.*

*Pour tout le respect, l'amour et l'admiration que je vous porte au fond de mon cœur.*

*Pour toutes les difficultés et les obstacles que nous avons traversés ensemble.*

*Pour toutes les fois où vous m'avez poussé vers la réussite alors que la défaite m'attendait.*

*Pour toutes les duâas que vous avez prononcées ; pour toutes les fois où vous m'avez soutenu.*

*Pour l'éducation que vous m'avez transmise, les sacrifices que vous avez dû faire et l'amour que vous m'avez porté depuis ma plus tendre enfance... Qu'Allah vous Protège et vous comble de Bonheur !*

*A mes **Frères et Sœurs** !*

*Fateh, Mohamed Iyad, Samira et Mounira*

*A **Mes Amis** qui sont devenus **Mes frères de cœur** !*

*DJORNI Mohamed Idriss - GOUITAYA Abdelhakim - GHERBIA Nacer - GUETTIANI Ilyas - DJERIBIAI Amor - SAADAOUI Abderrahmane - TAKAOUI Tayeb - DRAHEM Saddam - ROKIM Younes - BECHICHI Mohamed - DJELJAL Hatem - LAZREG Yassine - AKKAF Khaled - AYACHE Mohamed - KIR Younes - BENDAHMANE Abdelhafedh - GUETTAYEL-Bachir Ennadhir - KERBAA Yakoub - SOUDANI Oussama - Abdelmouiz - SAADI Djamel - CHALA Mohamed Elamine - BOUZIGA Zineddine - LAMRI Omar - KASSOSI Oussama - DERRIDJ Ilyes - MAOUCHE Akram - MAAMACHE Abdellatif - LAIADI Hicham*

*A tous Ceux et Celles que j'estime et que je n'ai pas cité !*

## NABIL



# Table des matières

Remerciements .....	
Dédicaces.....	
Table des matières .....	
Liste des tableaux .....	I
Listes des figures.....	II
Listes des abréviations.....	III
Introduction.....	1

## Partie Théorique

### Chapitre 1 :

#### Présentation de la plante étudiée (*Piper nigrum*)

1.1. Généralités sur le poivre noir ( <i>Piper nigrum</i> ).....	3
1.1.1. Historique .....	3
1.1.2. Description botanique de la plante .....	4
1.1.3. Classification systématique .....	5
1.2. Répartition Géographique.....	6
1.3. Composition du <i>Piper nigrum</i> .....	6
1.3.1. Composition générale du <i>Piper nigrum</i> .....	6
1.3.2. Composition biochimique du <i>Piper nigrum</i> .....	7
1.4. Domaines d'utilisation .....	7

### Chapitre 2 :

#### Activité antimicrobienne

2.1. Infection microbienne.....	8
2.2. Agents antimicrobiens.....	8
2.2.1. Agents antibactériens .....	9
2.3. Antibiothérapie .....	10
2.3.1. Antibiotiques (ATB ) .....	10
2.3.2. Caractère des antibiotiques.....	11
2.3.3. Mode d'action des antibiotiques.....	11
2.4. Mécanismes de résistance des microbes .....	11

## Partie Expérimentale

### Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1. Matériel.....	13
--------------------	----

---

3.1.1. Poivre noir « <i>Piper nigrum</i> ».....	13
3.1.2. Souches microbiennes testées .....	13
3.1.3. Disque d'antibiotiques .....	14
3.2. Méthodes .....	14
3.2.1. Préparation de l'extrait organique .....	14
3.2.2. Détermination du rendement des extraits secs .....	15
3.2.3. Tests phytochimiques .....	15
3.2.4. Dosage des polyphénols totaux .....	17
3.2.5. Activité antibactérienne .....	17
3.2.6. Activité antifongique .....	19
<b>Chapitre 4 : Résultats et discussion</b>	
4.1. Résultats de rendement.....	21
4.2. Résultats des tests phytochimiques .....	21
4.3. Teneur en polyphénols totaux.....	22
4.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	22
4.4.1. Activité antibactérienne .....	22
4.4.2. Activité antifongique .....	26
<b>Conclusion .....</b>	<b>28</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>29</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>34</b>
<b>Résumés .....</b>	<b>.....</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Mode d'action des substances antifongiques (Florence et <i>al.</i> , 2010).....	10
<b>Tableau 2.</b> Les souches bactériennes utilisées pour tester l'activité biologique d'extrait organique de poivre noir .....	14
<b>Tableau 3.</b> Les souches fongique utilisées pour tester l'activité des extraits de poivre noir ..	14
<b>Tableau 4.</b> Les résultats de rendement de l'extrait organique de <i>Piper nigrum</i> . .....	21
<b>Tableau 5.</b> Résultats des tests phytochimiques de l'extrait organique de <i>Piper nigrum</i> .....	21
<b>Tableau 6.</b> Activité antibactérienne de l'extrait organique testé vis-à-vis les souches bactériennes.....	24
<b>Tableau 7.</b> Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de l'extrait Organique mg/ml.....	25
<b>Tableau 8.</b> Diamètres des zones d'inhibitions de la croissance fongique obtenus par l'extrait organique de poudre végétale de <i>Piper nigrum</i> (moyenne $\pm$ écart type).....	26
<b>Tableau 9.</b> Valeurs de CMI et CMF des souches fongiques testées avec les extraits étudiés de poudre végétale de <i>Piper nigrum</i> .....	26

---

## Listes des figures

<b>Figure 1.</b> La récolte du poivre, illustration tirée du « Livre des merveilles » du monde de Marco Polo .....	4
<b>Figure 2.</b> <i>Piper nigrum</i> .....	5
<b>Figure 3.</b> Production mondiale de poivre en 2017 selon les pays en pourcentage (www.nedspice.com Pepper crop report 2017 Alfons van Gulick) .....	6
<b>Figure 4.</b> Les mécanismes et le mode d'action de l'antibiotique .....	11
<b>Figure 5.</b> Grains de Poivre noir .....	13
<b>Figure 6.</b> Poudre de Poivre noir.....	15
<b>Figure 7.</b> Taux de polyphénols de l'extrait organique de <i>Piper nigrum</i> en µg EAT/mg.....	22
<b>Figure 8.</b> Image illustrant l'effet des antibiotiques témoins sur les deux souches bactériennes: (A) <i>B. cereus</i> ; (B) <i>E. coli</i> .....	23

## Listes des abréviations

<b><i>A. niger</i></b>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>ATB</b>	Antibiotiques
<b><i>B. cereus</i></b>	<i>Bacillus cereus</i>
<b><i>C. albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i>
<b>CMB</b>	Concentration minimale bactéricide
<b>CMF</b>	Concentration minimale fongicide
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Eschérichia coli</i>
<b>EO</b>	Extrait organique
<b>m</b>	masse de l'extrait sec
<b>M</b>	masse de la poudre
<b>MHA</b>	Mueller Hinton Agar
<b>MHB</b>	Bouillon Muller Hinton
<b>r</b>	rendement d'extraction
<b>Uv-vis</b>	Ultra violet visible

# **Introduction**

Les plantes médicinales sont des plantes qui sont utilisées pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Ce sont des plantes qui ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent en premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît (**Harrar, 2012**), les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés à leurs métabolites secondaires, qui sont largement utilisés en thérapeutique comme agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiseptiques, diurétiques et antioxydants (**Ouelbani et al., 2016**).

L'Algérie est riche en diverses plantes utilisées par nos ancêtres dans divers domaines, en particulier le domaine médical, comme le poivre noir, du nom scientifique *Piper nigrum* Linnaeus. Ce fruit est considéré comme la « reine des épices » en raison d'une part, de son usage dans l'industrie des épices, et d'autre part. (**Djiwonou et al., 2019**).

Les épices sont classées parmi les plantes médicinales. Ce sont des parties des plantes aromatiques à la saveur forte ou des préparations, notamment des mélanges faits à partir de ces plantes. Elles sont utilisées dans différents domaines, en cuisine, comme conservateur ou colorant. Elles peuvent provenir de différentes parties de la plante, de rhizome (exemple du curcuma et du gingembre), des fruits (fraise), des écorces (la cannelle), de feuilles (la mélisse) de graines (la coriandre et la cardamome et le poivre noir) (**Manandhar, 1995**).

L'objectif de notre travail est consacré à l'évaluation de l'activité antimicrobienne du poivre noir (*piper nigrum*).

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties.

La Première partie propose une mise au point bibliographique. elle est divisée en deux chapitres. le premier chapitre est consacré à la présentation de la plante étudiée et leurs composés phénoliques. le second chapitre traite les notions de l'activité antimicrobienne.

Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel végétal, et l'étude de l'activité antimicrobienne. les résultats obtenus sont ensuite discutés, mais aussi une analyse des articles qui portent le même sujet de notre étude pour remplacé la partie qui est manquée a cause de la pandémie mondiale covide 19. En fin, le manuscrit est achevé par une conclusion générale.

# **Partie Théorique**

**Chapitre 1 :**  
**Présentation de la plante**  
**étudiée (*Piper nigrum*)**

## 1.1. Généralités sur le poivre noir (*Piper Nigrum*)

Le poivre noir, est une plante médicinale précieuse. c'est l'une des épices les plus utilisées et connue dans le monde. c'est une liane à feuillage persistant cultivée sous les tropiques. L'essentiel de la production se fait en Inde et en Asie du Sud-est. les grains de poivre sont les parties les plus exploitée de la plante. le poivre noir est utilisé en tant qu'épice alimentaire pour sa saveur piquante et aromatique, ainsi que son pouvoir releveur de gout. cependant il est aussi employé depuis des siècles en médecine traditionnelle en tant qu'agent médicinal et même en parfumerie. (Srinivasan, 2013).

### 1.1.1. Historique

L'histoire des épices est aussi ancienne que l'histoire de la civilisation humaine. De nombreux textes religieux comportent des références sur l'utilisation du poivre. Du fait de son inestimable valeur, cette épice a indiscutablement amené l'humanité à parcourir la planète, et les peuples à se rencontrer. (Ravindran et al., 2000).

- **Points de repère dans l'histoire du poivre (dates approximatives) :**

**3000 avant J.C** Decrit par l'Empereur Chinois Shen Nong comme épices et aromates

**XVIe avant J.C** Le poivre est mentionné dans le papyrus d'Ebers

**1214 avant J.C** Utilisé pour parfumé et embaumé (propriétés antiputrefication) le corps momifié dupharaon Ramsès II, les grains ont été retrouvé dans la cavité nasale.

**4e siècle avant** Théophraste un philosophe grec, évoque deux types de poivres : *le Piper nigrum* et *le Piper longum*.

**J.C** Ce qui laisse supposer d'éventuels échanges entre le l'Asie et le bassin méditerranéen

**40 après J.C** Rome a capturé l'Egypte et l'ancien commerce du poivre est passé sous leurs contrôle. Il est à la fois une drogue médicinale et une substance culinaire

**330 après J.C** Alexandrie devient le principal port de commerce entre les pays occidentaux et orientaux

**641 après J.C** La prise d'Alexandrie par les arabes, ils prennent alors le contrôle du commerce et mirent fin à celui entre Rome et l'Inde

**1095-1291** Le poivre est à cette époque très convoité et estimé. Vendu au prix de l'or, chez lesapothicaires il devient « l'or noir ». Posséder du poivre était signe de richesseet d'opulence.

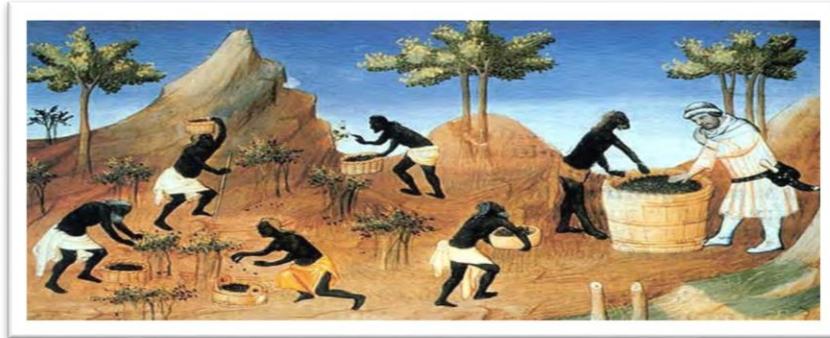
Certaines expressions y font référence : « cher comme poivre », « payer en

Espèces(en épices) » etc.

**1095-1291** Les croisades marquent la reprise du commerce avec l'orient.

**1280** Marco Polo, célèbre marchand vénitien a décrit en détail la culture du poivre à Java.

Venise prend le dessus du commerce pendant plus d'un siècle .



**Figure 1.** La récolte du poivre, illustration tirée du « Livre des merveilles » du monde de Marco Polo (Lewis wright, 2020)

### 1.1.2. Description botanique de la plante

Le poivre noir est une plante vivace, assez épaisse et ligneuse qui rampe sur le sol ou grimpe quand elle rencontre un support (tuteur, arbre). Elle peut atteindre 8 à 10 mètres de long (Baker, 2008). Les racines pénètrent en terre lorsqu'elles reposent sur le sol ou se transforment en griffes quand elles s'appuient sur un tuteur. Les feuilles en forme d'as de pique sont simples, ovales et vert foncé. Ses fleurs sont petites, disposées en épis allongés, cylindriques, serrés et pendants. L'inflorescence peut contenir plus de 150 petites fleurs de couleur blanc jaunâtre. Les fruits du poivre sont d'abord des baies vertes, puis rouges, puis noires. En séchant, elles deviennent ridées et brun foncé. leur intérieur est gris ou jaunâtre. Ils ne renferment qu'une seule graine. Ces fruits sont aromatiques ; ils ont une saveur chaude et piquante (Liweiet al., 2004).



A - Aspect de la plante

B - Baies vertes

C - Fruits de poivre

D - Grain de poivre

**Figure 2.** *Piper nigrum*

### 1.1.3. Classification systématique

Le terme de poivre incarne ses nombreux périples à travers l'histoire.

Il dérive du sanskrit *pippali* (*Piper longum*) qui devient péperi (πέπερι) en grec ancien puis *piper* en latin.

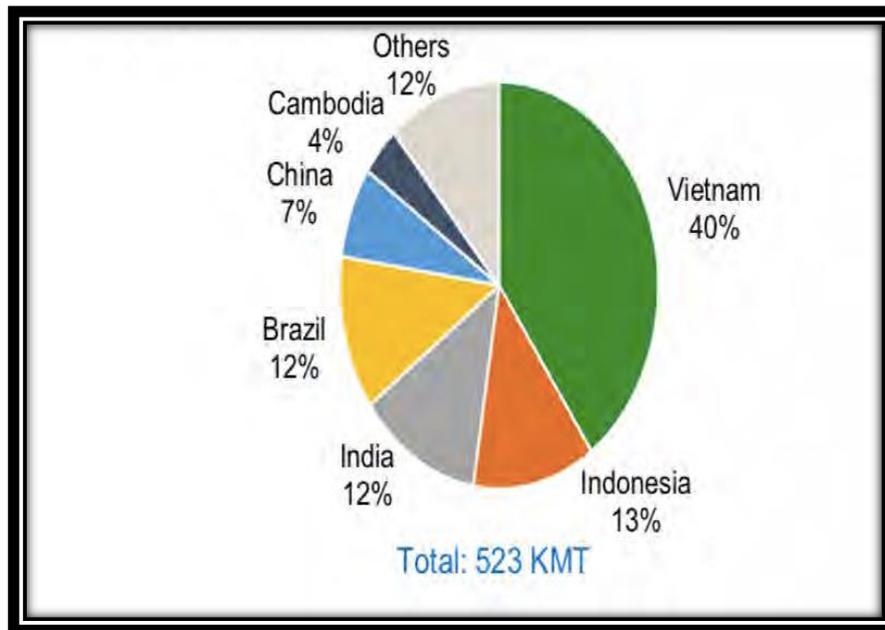
Les deux premiers termes durant l'Antiquité désignant une épice qui provenait d'un poivrier mais pas forcément du *Piper nigrum*. L'histoire antique de ce dernier étant souvent liée, et confondue avec celle du poivrier long. (**Biological Activities of Pepper Alkaloids 2013**).

Le genre *Piper* selon la classification APG IV (Angiosperms Phylogeny Group) (**Catalogue of Life - 2019**) appartient à:

Règne.....	<i>Plantae</i>
Division.....	<i>Magnoliophyta</i>
Classe.....	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre.....	<i>Piperales</i>
Famille.....	<i>Piperaceae</i>
Genre.....	<i>Piper</i>
Espèce.....	<i>Piper nigrum</i>

## 1.2. Répartition Géographique

Le poivrier noir est une liane d'habitat forestier et de climat équatorial. Il prospère idéalement dans une zone géographique située entre le 15<sup>ème</sup> degré de latitude nord et le 15<sup>ème</sup> degré de latitude sud. Il peut être rencontré aussi en climat tropical mais à saison sèche plus ou moins marquée (**Pham, 2007**). Les principales zones de culture du poivre sont montrées dans la figure ci-dessous:



**Figure 3.** Production mondiale de poivre en 2017 selon les pays en pourcentage

## 1.3. Composition du *Piper nigrum*

### 1.3.1. Composition générale du *Piper nigrum*

En général, le poivre contient en pourcentage de la masse brute :

- ✓ 4 à 6 % de matières minérales
- ✓ 40 à 50 % d'amidon pour le poivre noir, et 60 à 65% pour le poivre blanc
- ✓ 5 à 10% de lipides présents dans le poivre sont représentés par des acides gras comme l'acide palmitique (16-30%) ; l'acide oléique (18-29%), l'acide linoléique (25-35%) et l'acide linoléique (8-19%).
- ✓ 10 à 12% de protéides
- ✓ 5 à 10% de résine pour le poivre noir, et moins pour le poivre blanc
- ✓ 1 à 3% d'huile essentielle (**Pham, 2007**).

### 1.3.2. Composition biochimique du *Piper nigrum*

Les investigations phytochimiques sur le *Piper nigrum* indiquent qu'il contient différents types de composés phénoliques telles que les flavonoïdes, alcaloïdes, amides, stéroïdes, lignanes, neolignanes, terpènes, chalcones...etc. Et parmi les composés identifiés on trouve : Pipéramide, Pipéramine, Pipérettine, Pipéricide, Pipérine, Pipérolein B, Sarmentine, Sarmentosine, Retrofractamide. Pipérine est le premier composé pharmacologiquement actif (**Ahmad et al., 2012**).

Le poivre est également riche en huiles essentielles avec un rendement de 10 à 35 ml/kg. (**Botrel et al., 2001**).

### 1.4. Domaines d'utilisation

Le poivre noir est caractérisé par un large spectre d'utilisation. Cette épice à la saveur piquante se marie très bien avec les plats de viande, les grillades, les sauces, le poisson et autres. Comme les grains du poivre noir sont bactéricides, ils sont également excellents pour la conservation des aliments (**Mena, 2016**). Les propriétés du poivre noir sont nombreuses ; il réchauffe, fébrifuge, diurétique, stimulant digestif et utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise comme médicament naturel calmant. Ses substances sont également utilisées dans la médecine ayurvédique contre le nez bouché, les vertiges et les inflammations de la peau. (**Mena, 2016**).

Pipérine, pipene, Pipéramide et le Pipéramine se sont avérés pour posséder des différentes activités pharmacologiques (**Ahmad et al., 2012**). Ces composés montrent une gamme de propriétés physiologiques, telles que les effets anti-inflammatoires, antioxydants et antimicrobiens (**Ayyad, 2014**).

# **Chapitre 2 :**

# **Activité antimicrobienne**

Face au problème posé par les résistances des microorganismes aux antibiotiques classiques, il y a un besoin impérieux de renouvellement constant des principes actifs (**Mwambete, 2009**). Ces molécules recherchées doivent posséder diverses autres propriétés chimiques et utiliser de nouveaux mécanismes d'action contre ces microbes pathogènes (**Mada et al., 2013**).

Les plantes médicinales restent la source la plus importante de molécules entrant dans la composition des médicaments pharmaceutiques (**Marin et Chrestin, 2007**). Il devient donc logique de continuer ou même d'intensifier la recherche dans cette direction sachant que les plantes restent une source quasi inépuisable de biomolécules. La rationalité industrielle trouve dans cette démarche une base d'innovation pour la mise au point de médicaments nouveaux qui peut être source de gain de temps dans les processus de recherche et développement (**Chominot, 2000**). En plus actuellement une attention particulière est portée vers les médicaments et produits d'origine naturelle (**Biswas et al., 2013**).

### **2.1. Infection microbienne**

Les infections microbiennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. (**Ben Abdallah et al., 2019**).

Les infections microbiennes sont des inflammations et des dommages tissulaires causées par les bactéries pathogènes, les virus, les parasites ou les champignons (**Page et al., 1999**). Les bactéries pathogènes sont capables d'envahir l'organisme et de s'y multiplier, généralement dans un site privilégié, pour cela elles ont besoin d'armes offensives leur permettant de franchir les barrières anatomiques, le plus souvent les muqueuses, et éventuellement d'agresser l'hôte par la libération de substances nocives ou des toxines. En effet, les infections bactériennes peuvent être transmises par différentes voies qui sont, fréquemment, les voies transcutanées, digestive au cours l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, par voie aérienne, conjonctivale ou génitale (**Nauciel et vilde, 2005**). Ou à travers les trous dans les feuilles ou les coupures dans la tige de la plante.

### **2.2. Agents antimicrobiens**

Le terme agent antimicrobien désigne toute substance utilisée pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens, antiviraux, antifongiques et antiparasitaires (**Adkhis et al., 2015**).

### 2.2.1. Agents antibactériens

#### 2.2.1.1. Notion du bactériostatique et du bactéricide

Quand l'ATB inhibe seulement la croissance des bactéries, on parle ici de l'effet bactériostatique, mais lorsque l'ATB provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide (**Haddouchi et al., 1999**).

##### a. Effet bactériostatique

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît.

En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées.

L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice. Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration inhibitrice d'antibiotique pour laquelle il n'y a plus de germes microbiens visibles (**Muanda, 2010**).

##### b. Effet bactéricide

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'ATB utilisées *in vivo* ou *in vitro*; s'il persiste moins de 0,01% de survivants après 18 h de culture (**Muanda, 2010**).

## 2.2. Agents antifongiques

Les champignons pathogènes constituent les principaux agents infectieux chez les plantes, en causant de nombreuses altérations particulièrement dans les légumes et les fruits. En effet, il s'agit d'une grande variété de germes fongiques qui peuvent effectuer des problèmes liés à l'aspect organoleptique, durée de conservation limitée et caractéristiques (**Agrios, 2004**). Plus les infections fongiques systémiques ou profondes ne deviennent fréquentes en nombre mais aussi en diversité des espèces incriminées, et en gravité. Ces infections sont la cause d'une importante morbidité et conduisent parfois à la mortalité (**Chavante, 1997**). Il s'agit d'infections invasives et sévères qui se diffusent dans le corps provoquant une atteinte grave d'un ou plusieurs organes.

Les substances antifongiques sont utilisées alors dans trois domaines en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongiques systémiques ou topiques), dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement

des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux. En effet, les antifongiques d'origine microbiologique utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (**Bastide et al., 1986**). Le mode d'action des agents antifongiques sont envisagés sur le **tableau 2** ci-dessous.

**Tableau 1.** Mode d'action des substances antifongiques (**Florence et al., 2010**)

Agent antifongique	Mode d'action
Amphotéricine B désoxycholate (Fungizone)	Complexe avec l'ergostérol et altération de perméabilité membranaire
Amphotéricine B liposomale (Ambisome)	Formulation liposomale d'amphotéricine B
Amphotéricine B complexe lipidique (Abelcet)	Complexe phospholipidique d'amphotéricine B
5-fluorocytosine (Ancotil)	Perturbation de la synthèse d'ADN de la synthèse protéique
Itraconazole (Sporanox)	Blocage du cytochrome P450 et de la C14 lanostérol déméthylase inhibant alors la synthèse de l'ergostérol membranaire

### 2.3. Antibiothérapie

Sont des traitements d'une affection par un médicament antibiotique.

Le principe thérapeutique des infections microbiennes base sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (**Billing et Sherman, 1998**).

#### 2.3.1. Antibiotiques (ATB)

Un antibiotique est une substance antimicrobienne d'origine biologique, c'est à dire produite par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres micro-organismes, par exemples :

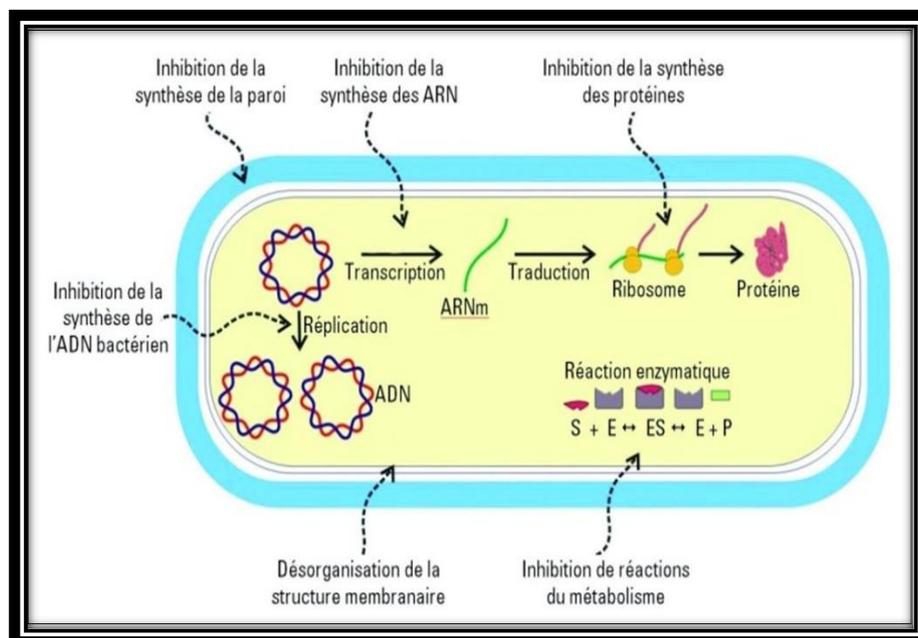
- ✓ La Pénicilline est produite par un champignon "*penicillium notatum*".
- ✓ Le Chloramphénicol est un antibiotique de synthèse chimique.

### 2.3.2. Caractère des antibiotiques

- ✓ Activité antibactérienne (spectre d'activité) .
- ✓ Toxicité sélective (mode d'action).
- ✓ Activité en milieu organique (pharmacocinétique).
- ✓ Bonne absorption et diffusion dans l'organisme.( **Yalaet al ., 2001** )

### 2.3.3. Mode d'action des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie. Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (**Singh et Barrett, 2006**).



**Figure 4.** Les mécanismes et le mode d'action de l'antibiotique

### 2.4. Mécanismes de résistance des microbes

Un problème d'importance croissante en pratique médicale est la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens. En effet, un espoir avait suscité l'apparition de bactéries devenues résistantes avec l'apparition des premiers antibiotiques, les sulfamides en 1935 puis la pénicilline (**Lemaoui et al., 2017**). Cela fait appel à l'évolution d'autres antibiotiques qui sont utilisés ultérieurement tels la streptomycine, le chloramphénicol, la tétracycline et l'érythromycine (**Vaubourdolle, 2007**). Cette résistance soit naturelle liée à la patrimoine génétique de bactéries elles-mêmes et présente chez tous les membres d'une même

espèces ou d'un même genre bactérien (**Nauciel et Vildé, 2005**), soit acquise due à l'acquisition de gènes étrangers de résistance pouvant provenir de la même espèce ou d'espèces bactériennes différentes et les transmis par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmide, les transposons, les phages et les intégrons ou à des mutations chromosomiques (**García-Ruiz et al., 2008 ; Kempf et Zeitouni., 2009**) . Dans ce contexte, les mycoses peut être considéré comme des maladies infectieuses très contagieuses due au développement de champignons pathogènes qui touchent différents tissus et organes chez l'animal ou chez les végétaux (**Guillot, 1999**).

# **Partie Expérimentale**

# **Chapitre 3 : Matériel et méthodes**

Le but de ce travail est l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait organique de poivre noir « *Piper nigrum* ».

### 3.1. Matériel

#### 3.1.1. Poivre noir « *Piper nigrum* »

Le matériel végétal qui est le poivre noir a été acheté au marché. En veillant sur l'odeur forte et la couleur éclatante caractéristique de poivre noir.



**Figure 5.** Grains de Poivre noir

#### 3.1.2. Souches microbiennes testées

Afin d'évaluer aussi bien l'effet antibactérien que l'effet antifongique des substances à tester, différentes souches microbiennes de référence ont été choisies comme cibles pour mener le test d'activité antimicrobienne. Il s'agit de deux souches bactériennes (à Gram+ et à Gram-) et deux souches fongiques (une levure et une moisissure).

##### 3.1.2.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées pour tester l'activité biologique d'extrait organique de poivre noir c'est *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* .

Avant utilisation, les bactéries sont sub-cultivées d'abord en stries sur milieu Muller Hinton Agar puis en Bouillon de Muller Hinto.

**Tableau 2.** Les souches bactériennes utilisées pour tester l'activité biologique d'extrait organique de poivre noir

Souches bactériennes	Le gram	La forme	Type de respiration
<i>Bacillus cereus</i>	Gram +	Bacille	Aéro-anaérobie
<i>Eschérichia coli</i>	Gram -	Coccobacille	Anaérobie facultative

### 3.1.2.2. Souches fongiques

Les souches fongiques utilisées pour tester l'activité antifongiques des extraits de poivre noir c'est *Candida albicans* et *Aspergillus niger*.. Ces souches ont été conservées puis revivifiées sur le milieu Sabouraud, le milieu Mueller Hinton Agar (MHA) a été utilisé pour la détermination de leurs diamètres des zones d'inhibitions (Kanoun et al., 2015).

**Tableau 3.** Les souches fongiques utilisées pour tester l'activité des extraits de poivre noir

Souches fongiques	Type de champignon	Forme de champignon	La maladie causale
<i>Candida albicans</i>	Levure	Ovalaires ou rondes	Candidose
<i>Aspergillus niger</i> .	Moisissure	Filamenteux	Aspergillose

### 3.1.3. Disque d'antibiotiques

Le disque utilisé comme témoin positif contre *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* est imprégné de l'antibiotique aminopénicilline.

## 3.2. Méthodes

### 3.2.1. Préparation de l'extrait organique

Tout d'abord, les graines ont été nettoyées à l'eau courante, séchées à la température ambiante à l'abri de la lumière pendant 15 jours, puis conservées dans une étuve à 45°C durant 3 jours, pour éviter l'oxydation.

Les graines séchées ont été réduites en poudre avec un broyeur électrique, et conservées dans des bocaux en verre hermétiquement fermés.



**Figure 6.**Poudre de Poivre noir

La préparation des extraits organiques bruts est effectuée par :

Épuisement successif de poudre végétal au soxhlet par des solvants organiques (Nikiema *et al.*, 2005).

Les extraits ont été ensuite concentrés sous pression réduite à sec et à une température de 50°C à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Les résidus formés ont été conservés à 4°C pour utilisation ultérieure.

### 3.2.2. Détermination du rendement des extraits secs

Le rendement est la quantité d'extrait obtenue à partir de la poudre végétale. Il est exprimé en pourcentage ou sans unité. En pratique, on a fait le rapport de la masse de l'extrait sur la masse de la poudre végétale qui a servi pour l'extraction qu'on a multiplié par 100. Ceci se traduit par la formule suivante :

$$r = (m \times 100) / M$$

(r : rendement d'extraction ; m : masse de l'extrait sec ; M : masse de la poudre)(Djenebet *al.*, 2016).

### 3.2.3. Tests phytochimiques

Les composés chimiques sont déterminés par une étude photochimique qui consiste à caractériser les différentes catégories de molécules existantes dans les graines de la plante.

Ces dernières vont servir à obtenir des principes actifs utilisés comme agents thérapeutiques (**Bruneton, 1999**).

### **3.2.3.1. Détection des polyphénols**

#### **a. Détection des tanins**

Les tanins sont mis en évidence à partir de 1 ml d'extrait placé dans un tube en présence de quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> (1% préparé au méthanol). Après agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins (**Karumiet al., 2004**).

#### **b. Détection des coumarines**

Les coumarines sont révélées à partir de 5 ml d'extrait placé dans un tube porté à ébullition jusqu'à l'obtention d'un volume de 1 ml, ce volume est ajouté à 1ml d'eau chaude. Après l'agitation, le volume total est divisé en deux volumes, l'un sert de témoin et l'autre est ajouté à 0.5ml de NH<sub>4</sub>OH (10%) puis examiné sous lampe UV. L'émission de la fluorescence indique la présence des coumarines (**Bruneton, 1999**).

#### **c. Détection des anthocyanes**

Les anthocyanes sont détectés en plaçant 5 ml d'extrait dans un tube auquel on ajoute 15ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à (10%) (milieu acide), après agitation, le mélange est ajouté à 5 ml NH<sub>4</sub>OH à (10%) (milieu basique). La présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleu-violacée en milieu basique (**Bruneton, 1999**).

#### **d. Détection des flavonoïdes**

Un mélange de 3ml de l'extrait + 4 ml chlorure d'aluminium (1% méthanol), l'apparition de la coloration jaune foncé indique la présence des flavonoïdes (**Khan et al., 2011**).

#### **e. Détection des anthraquinones**

Pour la détection des anthraquinones, 10 ml d'extrait sont ajoutés à 5 ml de NH<sub>4</sub>OH à (10%). Après agitation, l'apparition d'un anneau rouge indique la présence d'anthraquinone (**Oloyede, 2005**).

#### **f. Détection des saponosides**

Pour la détection des saponosides, 10 ml d'extrait placé dans un tube à essais sont agités pendant 15 secondes puis déposés durant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides (**Koffi et al., 2009**).

### 3.2.3.2. Détection des terpènes

#### a. Détection des stéroïdes

Les stéroïdes sont révélés après addition de 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml d'extrait à chaud. Le mélange est ajouté à 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. Après agitation l'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive (**Bruneton, 1999**).

### 3.2.3.3. Détection des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Mayer ou Wagner. 10 ml d'extrait sont évaporés jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,2ml, sur lequel 1,5 ml de HCl à (2%) sont ajoutés. Après agitation de la solution acide, 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer ou Wagner sont ajoutés. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre ou brun indique la présence d'alcaloïdes (**Mojab et al., 2003**).

Toutes les expériences des tests phytochimiques sont réalisées en triplicata pour vérifier la reproductibilité des résultats.

### 3.2.4. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits des plantes a été déterminée par la méthode de Manian et al. (**Manian et al., 2008**) utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu.

Dans des tubes à essais on introduit un volume de 50 µl de chaque extrait, 450 µl d'eau distillée puis 250 µl de FolinCiocalteu dilué 2 fois est rajouté. Le mélange est agité au

vortex. Après 5 min, 1,25 ml de carbonate de sodium (20 %) est additionné. Les tubes sont agités et conservés à l'obscurité pendant 40 min.

L'absorbance est mesurée à 725 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide tannique a été préparée. Les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits sont exprimées en µg équivalent d'acide tannique par mg d'extrait (EAT/mg).

### 3.2.5. Activité antibactérienne

#### 3.2.5.1. Méthode des disques

Dans cette méthode, un tapis de la souche indicatrice est réalisé sur la surface d'un milieu solide, ensuite des disques d'antibiotiques ou des autres agents antimicrobiens sont déposés sur le tapis bactérien. Après incubation, les boîtes sont examinées pour la présence des zones d'inhibition (**Berecka et al., 2009**).

### 3.2.5.2. Technique de diffusion en puits

Verser 10 ml du milieu Muller Hinton Agar sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles et laissés refroidir. Après solidification du milieu, des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés.

A partir des cultures bactériennes de 24 h, des dilutions dans l'eau peptonée (0.01%) sont effectuées, 100 µl de la dilution 10<sup>6</sup> bactéries estensemencée à la surface. Les puits sont ensuite remplis par 20 µl de l'extrait (50 mg/ml) à tester. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 h.

L'activité antibactérienne des extraits est révélée par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits, les diamètres des zones d'inhibition formés autour des puits ont été mesurés en millimètre.

### 3.2.5.3. Technique de micro-dilution

#### a. Détermination de CMI

La méthode de micro-dilution (Ismaili H et Milella L, 2004) est utilisée avec quelques modifications pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Des séries de dilutions allant de 0.75 à 24 mg/ml dans le Bouillon Muller Hinton (MHB) et le tween 80 sont préparées. Dans chaque puits d'une plaque à 96 puits, on dépose 20 µl de la souche bactérienne (10<sup>7</sup> UFC/ml), 80 µl du Bouillon Muller Hinton et 100 µl d'une dilution d'extrait déjà préparée. Ainsi les dilutions sont réduites en moitié et passent de 0.75 - 24 mg/ml à 0.375 - 12 mg/ml.

Les puits servant de contrôle négatif ne contiennent pas d'extrait, et ceux servant de contrôle positif contiennent l'extrait sans bactérie. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 18 h.

Pour la révélation de la CMI, 5 µl de la résazurine 0.01% (w/v) sont ajoutés à chaque puits. La CMI correspond à la plus petite concentration de l'extrait qui ne produit pas de changement de coloration de la résazurine, et qui correspond à l'absence de la croissance bactérienne (Mann et Markham, 1998).

#### b. Détermination de CMB

La CMB est la concentration minimale de l'extrait capable de tuer l'inoculum.

Elle est déterminée par ensemencement des aliquotes de 10 µl prélevés à partir des puits où on n'a pas eu de changement de la coloration de la résazurine, sur le milieu Muller Hinton

Agar (MHA), et la CMB correspond à la plus petite concentration qui ne donne aucune subculture. (Barchanet *al.*, 2015) .

### 3.2.6. Activité antifongique

L'étude antifongiques a consisté à déterminer des paramètres antifongiques (CMI et CMF) de l'extrait obtenu. (Moroh *et al.*, 2008) .

#### 3.2.6.1. Méthode de diffusion de disque sur gélose

Après le contrôle de pureté des souche fongique testées, les suspensions de poudre végétale ont été préparées dans 10 ml de solution de Tryptone-sel (Roques *et al.*, 2002). Elles ont été passées par la suite au vortex pendant 3-5 min (Ponnusamy *et al.*, 2010) , la culture de 24 heures obtenue par un ensemencement sur gélose Sabouraud et incubation à 30°C. Cette opération nous a permis de prélever les colonies purifiées résultantes puis les remettre dans une solution de Tryptone-sel afin de préparer la suspension fongique. Cette dernière a été bien homogénéisée et son opacité a été équivalente à 0,5 Mc Farland (106 cellules/ml) à une transmission optique de 530 nm (Amoo *et al.*, 2009).

Pour la détermination des zones d'inhibitions, un ensemencement des souches testées a été effectué dans les 15 min qui ont suivi la préparation de l'inoculum par étalement sur boîtes de Pétri, contenant au préalable 10 ml de la gélose Muller Hinton solidifiée et séchée (l'inoculum) pendant 10 min. Par la suite, et à l'aide d'une pince, des disques en papier stériles de 6 mm de diamètre (Kirby-Bauer, 1996) ont été imprégnés avec 10 µl (500 µg/disque) d'extrait organique à partir d'une solution mère de 50 mg/ml dans le DMSO à 10% stérilisé à travers un filtre millipore de 0,45 µm de diamètre. Ces disques ont été déposés à la surface de la gélose contenue dans des boîtes de Pétri, pendant 30 minutes à la température du laboratoire pour permettre une meilleure diffusion de l'extrait avant l'incubation à 30°C. Après 48 h, les diamètres des zones d'inhibitions de la croissance fongique ont été mesurés (Al-Zoreky, 2009).

#### 3.2.6.2. Détermination de CMI et fongicide CMF

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite concentration de la substance antifongique pour laquelle aucune croissance microbienne n'est observée après 48h pour les levures et moisissures (Martini *et Eloff*, 1998).

La concentration minimale fongicide (CMF) correspond à la plus faible concentration en agent antimicrobien capable de tuer plus de 99,99 % de l'inoculum microbien initial (soit moins de 0,01 % de survivants) (Degryse, 2008).

La concentration minimale létale (fongicide) est déterminée par un repiquage d'un inoculum à partir des boîtes de la CMI sur un milieu gélosé. Après une incubation à 30°C pendant trois jours, la CMB/CMF est déterminée par l'observation de la présence ou non d'une subcroissance microbienne. La CMB/CMF correspond à la plus petite concentration de l'agent antimicrobien testée pour laquelle aucune subcroissance n'a été observée.

# **Chapitre 4 :**

# **Résultats et discussion**

#### 4.1. Résultats de rendement

**Tableau 4.** Les résultats de rendement de l'extrait organique de *Piper nigrum*.

Paramètre EO	Premier rendement en (%)	Deuxième rendement en (%)
Extraits organiques	25.40	29.76

#### 4.2. Résultats des tests phytochimiques

La phytochimie qualitative est basée sur des réactions colorées ou des précipitations par des réactifs chimiques spécifiques réalisées sur l'extrait organique de *Piper nigrum*.

Le résultat de ce criblage phytochimiques est résumé dans le **Tableau 05**, qui révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolite secondaire. Effectivement 08 groupes de composés bioactifs sont : tannins, coumarine, anthocyanes, anthraquinone, flavonoïdes, saponines, alcaloïdes et stéroïdes.

**Tableau 5.** Résultats des teste phytochimiques de l'extrait organique de *Piper nigrum*

Groupe chimique		Extrait organique
Polyphénols	Tannins	(+)
	Coumarines	(-)
	Anthocyanes	(-)
	Flavonoïdes	(+)
	Anthraquinone	(+)
	Saponosides	(+)
Terpènes	Stéroïdes	(+)
Alcaloïdes	Alcaloïdes	(-)
(-): Absence		(+): Présence

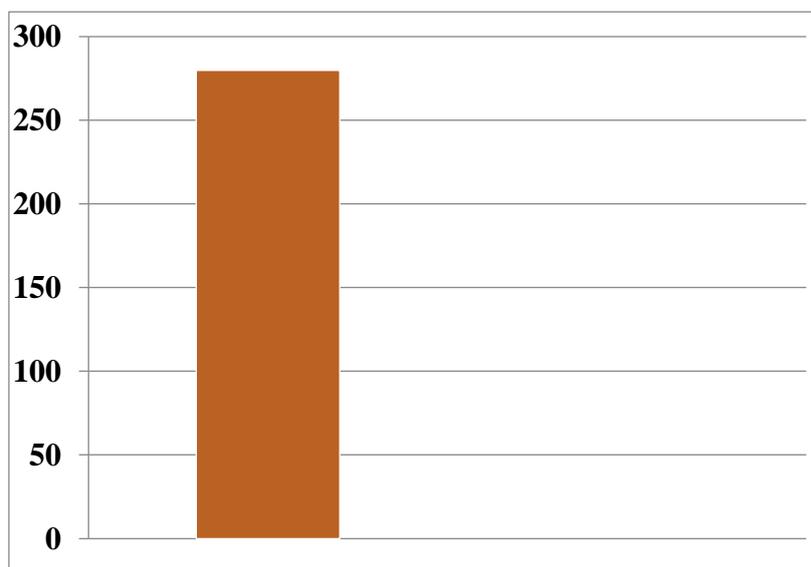
Les résultats obtenus la présence des Polyphénols sous forme des Tannins, et Anthraquinone, et des Saponosides avec l'absence d'Anthocyane et Coumarine ; La présence des terpènes sous forme des stéroïdes dans la composition d'extrait organique du poivre noir.

Les résultats de ce criblage phytochimiques indiquent aussi l'absence d'alcaloïdes dans la composition d'extrait organique du poivre noir. (Bruneton, 1999).

### 4.3. Teneur en polyphénols totaux

L'extraction avec des solvants, utilisée dans ce travail, permet de séparer les composés d'une poudre végétale selon leur degré de solubilité. La plupart des effets pharmacologiques des plantes sont attribués à leur richesse en polyphénols.

Les taux de polyphénols totaux enregistrés dans l'extraits organique del'espèces *Piper nigrum* étudiées sont résumés dans la **figure 7**.



**Figure 7.** Taux de polyphénols de l'extrait organique de *Piper nigrum* en µg EAT/mg.

D'après ces résultats on constate clairement que le taux de polyphénols de l'extrait organique ont présenté taux plus élevés (280 µg EAT/mg) ( Lee et al., 2007).

### 4.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

#### 4.4.1. Activité antibactérienne

##### 4.4.1.1. Méthode des disques

L'action antimicrobienne autour des puits imprégné de l'agent antimicrobien étudié. Le diamètre des zones d'inhibition autour des puits détermine l'action antimicrobienne.

Selon les intervalles des zones d'inhibition établis par De Billerbeck (2007), l'activité antimicrobienne des extraits ou des composés purs est classée selon le diamètre de la

Zone d'inhibition ( $\emptyset$ ) comme suit :

- ✓ Souche résistante ( $\emptyset < 6$  mm)
- ✓ Souche intermédiaire ( $\emptyset < 13$  mm)
- ✓ Souche sensible ( $\emptyset > 13$  mm)

**A****B**

**Figure 8.** Image illustrant l'effet des antibiotiques témoins sur les deux souches bactériennes: (A) *B. cereus* ; (B) *E. coli*

Les antibiotiques Aminopeniciline et Cephalosporine (temoins positifs). Les résultats ainsi obtenus sont illustrés dans la **figure 8**. Les antibiotiques utilisés présentaient des zones d'inhibition de 14 mm sur *E. coli* et de 25 mm sur *B. cereus* .

La comparaison des diamètres de la zone d'inhibition obtenus avec *B. cereus* (15 à 30 mm) et *E. coli* (15 à 25 mm) permet de relever une différence de 5 mm, ceci permet d'affirmer la sensibilité plus élevée de *B. cereus* par rapport à *E. coli*. (**Bouhadidet al ., 2006**) .

#### 4.4.1.2. Technique de diffusion en puits

En fonction des diamètres des zones d'inhibition des bactéries testées on a classé l'extrait en deux catégories : ceux à faible activité, et ceux à forte activité antibactérienne **tableau 6**.

**Tableau 6.**Activité antibactérienne del'extrait organiquetesté vis-à-vis les souches bactériennes.

EO Bactérie	Extrait organique
<i>Eschérichia coli</i>	+
<i>Bacillus cereus</i>	++

(+) :Faibles inhibition

(++) : Forte inhibition

Selon les résultats obtenus on a constaté que les diamètres des zones d'inhibition varient en fonction de l'extrait et de la souche testée. La souches Gram (+) se sont montrées sensibles vis-à-vis de l'extrait organique avec des diamètres supérieures à 12 mm. Alors que le souches Gram (-) se sont montrées résistantes contre l'extrait organiqueont pratiquement manifesté les plus faibles activités en induisant des diamètres inférieurs à 8 mm (**Hambaba et al.,2008**) .

#### 4.4.1.3 . Détermination des valeurs de CMI et CMB

Les résultats de l'évaluation des **CMI** et **CMB** résumés dans le **tableau 7**. À partir de ces résultats, on remarque que les extraits ayant induit une importante zone d'inhibition présentent les plus faibles valeurs de **CMI** sur les germes .

Nos résultats sont en accord avec un grand nombre d'études déjà faites et qui montrent que les extraits aqueux sont moins efficaces contre les bactéries que les extraits organiques.(**El-Amraoui et Biard, 2010**) .

**Tableau 7.** Concentration minimal inhibitrice (**CMI**) et bactéricide (**CMB**) de l'extrait Organique mg/ml.

<b>Bactérie</b>  <b>EO</b>	<i>Eschérichia coli</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
	<b>CMI</b> <b>(mg/ml)</b>	<b>CMB</b> <b>(mg/ml)</b>	<b>CMI</b> <b>(mg/ml)</b>	<b>CMB</b> <b>(mg/ml)</b>
<b>Extrait</b> <b>Organique</b>	<b>12</b>	<b>&gt;12</b>	<b>1.5</b>	<b>3</b>

Le souche Gram (+) ont montré des valeurs de **CMI** plus faibles que celles enregistrées par le souche Gram (-). Cela confirme la sensibilité des souches Gram (+) testées par rapport à Gram (-) Dans la présente étude, le test de diffusion en puits a démontré que les souches Gram (+) testées sont plus sensibles que les souches Gram (-). Ces résultats ont été confirmés après la détermination des **CMI** par le test en milieu liquide. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études. En effet, il est connu dans la littérature que les souches Gram (+) représentent une sensibilité toujours supérieure à celle des bactéries Gram (-) (**Cosentino et Tuberoso 1999**) Ceci est dû principalement à la différence de la structure de la paroi cellulaire entre les Gram (+) et les Gram (-) (**Ali-Shtayeh et Yaghmour, 1998**). Par ailleurs, d'après ce qu'est rapporté par Basli et al. la paroi des bactéries Gram (+) est riche en protéines tandis que chez les souches Gram (-), elle est surtout composée en lipopolysaccharides (LPS), la membrane extérieure de ces dernières constitue une barrière efficace à la diffusion des molécules antibactériennes. Le LPS, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophobes, et les protéines excluent le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaire élevé. Alors que les bactéries Gram (+) sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des molécules supérieures à plus de 50 000 D (**Hogan et Kolter, 2002**).

#### 4.4.2. Activité antifongique

##### 4.4.2.1. Méthode de diffusion de disque sur gélose

**Tableau 8.** Diamètres des zones d'inhibitions de la croissance fongique obtenus par l'extrait organique de poudre végétale de *Piper nigrum* (moyenne  $\pm$ écart type).

EO Souches fongique	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	Extraits Organique	18 $\pm$ 0

Ces résultats ont suggéré aussi que l'activité antifongique de l'extrait n'est pas fonction du rendement d'extraction .

C'est ainsi que les résultats obtenus ont montré que *C. albicans* était la souche sensible par rapport à *Aspergillus niger*.

##### 4.4.2.2. Détermination de la CMI et CMF de l'extrait étudiés

La présence des flavonoïdes et des tanins comme les gallotanins, 1,2,4-tri-O-galloyl- $\beta$ -glucopyranose et 1,3,4-tri-O-galloyl- $\beta$ -glucopyranose dans le poudre *Piper nigrum* peut être responsable de différentes activités biologiques comme l'activité antifongique.

**Tableau 9.** Valeurs de CMI et CMF des souches fongiques testées avec l'extrait organique de poudre végétale de *Piper nigrum*

EO Souches fongique	<i>Candida albicans</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	CMI (mg/ml)	CMF (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CMF (mg/ml)
Extraits Organique	1,56 $\geq$ CMI $\geq$ 0,78	$\geq$ 1,56	3,125 $\geq$ CMI $\geq$ 1,56	$\geq$ 3,125

Par ailleurs plusieurs métabolites de espèces de plantes, y compris les alcaloïdes, les tanins et les stérols, sont responsables des activités antifongique (Leven et al., 1979). Toutefois, dans leur mode d'action, les tannins peuvent s'accrocher sur la membrane cellulaire des micro-organismes grâce à leur capacité de précipiter les protéines.

Ces activités antifongiques des différents extraits peuvent s'expliquer par l'existence des composés biologiquement actifs. Les extraits contiennent, entre autres des flavonoïdes, des flavanes, des saponines et des anthocyanes. Ces composés ont été identifiés comme produits antimycotoxiques et/ou antifongiques. En effet les saponines se sont montrées également capables d'inhiber la croissance fongique (**Turner et al., 1975**)

Le mécanisme de résistance des levures aux antifongiques dans ce cas, les extraits est dû généralement à l'ergostérol, principal constituant de la membrane fongique. Par contre leurs sensibilités étaient dues à :

- ✓ la formation des complexes insolubles
- ✓ l'altération de la perméabilité cellulaire
- ✓ l'inhibition de la synthèse protéique par incorporation de l'ARN
- ✓ l'inhibition de la synthèse d'ADN (**Boiron, 1996**).

Ces perturbations cellulaires conduisent à l'altération de la paroi du filament fongique. Tout cela pourra vraisemblablement expliquer la sensibilité des souches de *C. albicans*, testées. L'efficacité d'un extrait dépend de sa concentration, de la plante à partir de laquelle il est issu et de la souche testée. L'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principe actif (**Wagner et al., 1996**)

L'activité antimicrobienne de nos extraits pourrait s'expliquer par la présence d'un/ou plusieurs constituants bioactifs à l'image des phénols, acide phénolique, tanins, quinones, flavonoïdes et coumarines (**Das et al., 2010**).

# **Conclusion**

Les propriétés thérapeutiques restent toujours le facteur déterminant de la valeur des plantes médicinales, qui représente la source inépuisable des substances bioactives et composés naturels tels que les métabolites secondaires.

Ce travail était basé sur l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait organique du poivre noir ou scientifiquement appelé *Piper nigrum* vis-à-vis des bactéries et champignons pathogènes, dont l'extrait possède un rendement de **29.76%**, et les résultats de dosage présentent un taux de polyphénols plus élevés dans l'extrait (**280 µg EAT/mg**).

Sur le plan phytochimique, les résultats montrent que les quatre extraits organiques du poivre noir sont riches en métabolites secondaires ; Stéroïdes, Tannins, Flavonoïdes, Saponines et montre l'absence d'Anthocyanes, alcaloïdes.

Concernant l'activité antimicrobiennes, l'extrait organique du poivre noir a montré une activité antibactérienne plus élevée sur *B. cereus* par rapport *E. coli*. Alors qu'une grande efficacité contre la souche fongique *C. albicans* par rapport la souche *A. niger*

Une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur l'activité antimicrobienne de cette plante. Cela nous ouvrira la voie pour trouver une nouvelle voie dans le traitement de nombreuses maladies, telles que : maladies inflammatoires chroniques (arthrose et compagnie), maladies cardiovasculaires et cancer.

# **Bibliographie**

## A

1. **Ahmad N., Hina Faza., Bilal Haider Abbasi., Shahid Farooq., Mohammad Ali1., Mubarak Ali Khan., 2012** - Biological role of *Piper nigrum L.* (Black pepper): A review. the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. P 1945-1953.
2. **Agrios., G.N.** 2004. Losses caused by plant diseases. p. 29-45. Plant Pathology. Elsevier, Oxford, UK.
3. **Ali-Shtayeh M ., Yaghmour R (1998)** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. J Ethnopharmacol 60:265–71
4. **Al-Zoreky NS (2009)** Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. Int J Food Microbiol 134: 244–8.
5. **Amoo SO., Ndhlala AR., Finnie JF (2009)** Antibacterial, antifungal and anti-inflammatory properties of *Burchellia bubaline*. S Afr J Bot 75 (1): 60–3.

## B

6. **Barchan . M. , Bakkali . A. Arakrak ., A. Laglaoui (2015),** Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha* : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*
7. **Bastide A., M. de Méo, M. Andriantsoa, M. Laget & G. Duménil., (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique *mircen J. 2* : 453-466.
8. **Berahou A, Auhmani AN, Fdil A, et al (2007)** Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. J Ethnopharmacol 112 (3):426–9 .
9. **Biswas B., Rogers K., McLaughlin F., Daniels D. and Yadav A.,** Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava L.*) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. International Journal of Microbiology Volume 2013, Article ID 746165, 7 pages, 2013.
10. **Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 3eme Ed, Tec &Doc Lavoisier, Paris, pp.1120.
11. **Boiron P (1996)** Organisation et Biologie des Champignons. Collection et éditions Nathan, 128p.
12. **Botrel A., Bloch J., Biaujeaud M., Ringuet J., Ybert E., Delesallefeat T., Vican P., De la roque R., De la roque O., 2001-** encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larousse/VUEF. 21. Paris.335p .

- 13. BOUHDID S., DAOMARL M., ZHIRI A., BOUHDID D., SKALI N.S., ABRINI J. (2006).** Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès International de biochimies, Agadir.* P: 324-327.

## C

- 14. Catalogue of Life - 2019 Annual Checklist.**
- 15. Chavanet P. (1997)** Amphotéricine B désoxycholate (Fungizone): Vieux médicament ,nouvelles version. *Rev Med Interne ;*18pp. 153-165.
- 16. Chominot A.,** Valorisation des plantes médicinales par l'industrie pharmaceutique complémentarités et contradictions, *Courr. Env. INRA, 39,19-26, 2000.*
- 17. Cosentino S, Tuberoso C.IG (1999)** *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett Appl Microbiol* 29:130–5

## D

- 18. Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK (2010)** Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *J Med Plants Res* 4 (2): 104–11
- 19. Djeneb Camara Kouadio Bene, Goueh Gnahoue, N'guessan Bra Yvette Fofie, Guede NOËL Zirihi.,2016.** Etude Ethnobotanique, Evaluation De L'activite Antifongique Sur *Candida Albicans* Et De La Toxicite Sur Des Cellules Hff De *Bersama Abyssinica* (Fresen.), Une Plante De La Pharmacopee Ivoirienne *European Scientific Journal* January 2016 edition vol.12, No.3 ISSN : 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431p.
- 20. Djiwonou et al, 2019** Étude phytochimique et évaluation du potentiel antioxydant de deux cultivars de *Piper nigrum L.* cultivés en Côte d'Ivoire.
- 21. Doumaindji A., Doumaindji S., Doumaindji B., 2003.** Cours de technologie des céréales. Ed. Office des publications Universitaires Ben-Aknoun-Alger ; pp 01-20.
- 22. D.yala , A.S. merad D. mohamedi, M.N. ouar korich** classification et mode d'action des antibiotiques , *Médecine du Maghreb* 2001 n°91.

## E

- 23. El-Amraoui B, Biard JF (2010)** Antifungal and antibacterial activity of Porifera extracts from the Moroccan Atlantic coasts. *J Mycol Med* 20:70–4

## F

24. **Florence R.G., Sylviane Ch., Claude G.** 2010. Les antifongiques pour le traitement des mycoses systémiques et cutanées profondes. Service de Parasitologie- Mycologie. 16(4).313- 315.

## H

25. **Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer KA., Carson CF., Riley TV.,** 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86:985-990. **Page C., Curtis M., Walker M., Sutter M., Hoffman B.** 1999. Pharmacologie intégrée. 1 édition, De Boeck université, paris, p.419.
26. **Hambaba L, Boudjellal K (2012)** Etude in vitro des activités antimicrobienne et antioxydante des extraits du fruit d'*Elaeagnus angustifolia* L. *Phytothérapie* 10:350–6
27. **Hogan D, Kolter R (2002)** Why are bacteria refractory to antimicrobials. *Curr Op Microbiol* 5:272– 4

## I

28. **Ismaili H., Milella L (2004)** In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J Ethno-Pharmacol* 91: 31–6

## K

29. **Kanoun K., Abbouni B., Bénine ML, et al (2014)** Etude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorces de *Punica granatum*. Linn sur deux souches phytopathogènes: *Ascochyta rabiei* (pass.) labr. et *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis –lycopersici*. *Eur Sci J* 10 (12) : 301–15
30. **Karumi, Y., Onyeyili, P.A. & Ogugbuaja., V.O., 2004.** Identification of active principals of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Sci* 4, 179-182.
31. **Khan A., Qureshi R., Ullah F., Gilani S., Nosheen A., Sahreen S., Laghari M K., Laghari M Y., Rehman S., Hussain I., Murad W., 2011.** Phytochemicals analysis of selected medicinal plant of Margalla Hills and surroundings. *Jornal of medicinal plants research*, Vol 5 (25) : 6017-6023.
32. **Koffi, N., Beugré, K., Guédé, N., Zirihi, D. & Laurent, A., 2009.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature* 6 (1), 1-15.

## L

33. **Lee SB, Cha KH (2007)** The antimicrobial activity of essential oil from *Dracocephalum foetidum* against pathogenic microorganisms. *J. Microbiol* 45:53–7

34. **Lemaoui C.E., Layaida.H .,Badi.A.,Foudi.N.**2017.Stratégie actuelle de lutte contre la résistance aux antibiotiques.Département de Pharmacie.Faculté de médecine.Universit Farhat Abbas Setif.19 :13p.
35. **Leven MD, Vanden BDA, Marten T, et al (1979)** Screening of higher plants for biological activity. *Planta Medica* 36: 311–2
36. **Lewis WRIGHT , These doctorat en pharmacie,2020 .** Le poivre de l'épice au médicament .

## M

37. **Mada S. B., Garba A., Mohammed H. A., Muhammad A., Olagunju A. and Muhammad A. B.,** Antimicrobial activity and phytochemical screening of aqueous and ethanol extracts of *Momordica charantia* L. leaves. *J. Med. Plants Res.* 7(10), 579-586, 2013.
38. **Manian R., Anusuya N., Siddhuraju P., et al (2008)** The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry* 107:1000–7.
39. **Mann C, Markham J (1998)** A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol* 84:538–44 .
40. **Mojab, F., Kamalinejab, M., GhaderI, N. et Vahidipour., H.R., 2003.** Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* , 77-82.
41. **Moroh JLA ., Bahi C ., Dje K ., et al (2008)** Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (Rubiaceae) sur la croissance *in vitro* des souches d'*Escherichia coli*. *Bull Soc Roy Sci Liège* 77: 44–61.
42. **Marin B. et Chrestin H.,** La valorisation des plantes médicinales. Fond documentaire ORSTOM, 2007.
43. **Muanda FN., 2010.** Identification de Polyphenols, Evaluation de leur Activité Antioxydante et Etude de leurs Propriétés Biologiques. Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine-Metz. P 239.
44. **Mwambete K. D.,** The *in vitro* antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: a tanzania medicinal plant, *Afr. Health Sci.* 9 (1), 34-39, 2009.

## N

45. Nauciel .C .,et Vildé J.L.(2005).Bactériologie médicale,2ème Ed.Masson.Paris.pp :24-40.
46. Nikiema W (2005) Propriétés pharmaco-chimiques de *Calotropis Procera* Ait. (Asclepiadaceae) récolté au Mali : étude préclinique des effets anti-inflammatoires et antimicrobiens des extraits des écorces de racines. Thèse de Doctorat en pharmacie, université de Bamako, 162 p .

## P

47. PHAM ,2007 *Piper nigrum* L : aspects botaniques, chimiques et pharmacologiques. Thèse de Docteur en Pharmacie, Université de Nantes.
48. PITT J. I., 1973. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Noveltaxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycology* 65: 1135-1157.
49. Ponnusamy K ., Petchiammal C., Mohankumar R., et al (2010) In vitro antifungal activity of indirubin isolated from a South Indian ethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R. *Br J Ethnopharmacol* 132(1) 28: 349-54.

## R

50. Ravindran PN. Black Pepper: *Piper nigrum*. 2000. 582 p.
51. R. ben abdallah, D. frikha, S. maalej et S. sassi ,evaluation in vitro de l'activite antibacterienne et antifongique de quatre especes algales marines, J.I. M. Sfax, N°31;; 38 – 44 Février 2019 .

## S

52. Singh P., Srivastava B., Kumar A., Kumar R., Dubey NK., Gupta R., 2008. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *J. Sci. Food. Agric.* 88:2421–2425.
53. Site web [www.nedspice.com](http://www.nedspice.com) Pepper crop report 2017 Alfons van Gulick .
54. Srinivasan KP-2013/01/01. Biological Activities of Pepper Alkaloids.2013.

## T

55. Touré A, Bahi C (2011) Phytochemical screening and in vitro antifungal activities of extracts of laves of *Morinda morindoides* (*Morinda*, Rubiaceae) *J Med Plants Res* 5(31):6780–6
56. Turner RB, Lindsey DL, Bishop RD (1975) Isolation and identification of 5,7 dimethoxyisoflavone. An inhibitor of *Aspergillus flavus* from peanuts. *Mycopathol* 57: 39–40.

## V

**57. Vaubourdolle, M.** Infectiologie. 3<sup>ème</sup> édition. Paris : Wolters Kluwer, 2007.

**W**

**58. Wagner H., Bladt S., Rickl V (1996)** Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K 2<sup>nd</sup> ed. 384 p

# **Annexes**

<b>Groupes chimiques</b>	<b>Extrait organique</b>
<b>Tannins</b>	
<b>Saponosides</b>	
<b>Stéroïdes</b>	
<b>Flavonoïdes</b>	
<b>Anthraquinone</b>	
<b>Annexe 1.:Les tests phytochimiques</b>	



**Annexe 2.:** Photos illustrant l'ensemble des étapes effectuées pour la méthode des puits

# Résumés

## الملخص:

يهدف العمل إلى دراسة تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلص العضوي للفلفل الأسود « *Piper nigrum* » على بعض الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض ، حيث تم تحضير المستخلصات العضوية بنسبة 29.76% وقدمت نتائج الفحص وجود مستوى عالي من مادة البوليفينول في المستخلص (280 ميكروغرام / ملغ ) . حيث أظهرت النتائج أن المستخلص العضوي له فعالية عالية ضد السلالة البكتيرية *Bacillus cereus* مقارنة بسلالة *Escherichia coli* ، بينما فعالية عالية ضد سلالة *Candida albicans* الفطرية مقارنة بسلالة *Aspergillus niger* .

كما ركز العمل أيضا على دراسة الإختبار الكيمائي لأجل التعرف على المركبات الكيمائية الموجودة في المستخلص العضوي لنبات الفلفل الأسود، حيث تبين وجود كل من مركبات القلوبيدات ، الفلافونويد ، التانينات ، الستيرويد ، الصابونين وغياب الانثوسيانين و قلوبيدات . هذه المواد تلعب دورا حاسما في نشاط مضاد للمكروبات .

**الكلمات المفتاحية:** *Piper nigrum* ، الاختبارات الكيمائية النباتية ، النشاط المضاد للبكتيريا ، النشاط المضاد للفطريات ، الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض.

## Résumé

Notre travail vise à étudier l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait organique du poivre noir « *Piper nigrum* » sur certains microorganismes pathogènes, où l'extrait organiques ont été préparés avec un rendement de 29,76 %, et le résultats de dosage présenté une taux de polyphénols plus élevés dans l'extrait (280 µg EAT/mg). Des résultats ont montré que l'extrait organique a une grande efficacité contre la souche bactérienne *Bacillus cereus* par rapport la souche *Escherichia coli*, alors qu'une grande efficacité contre la souche fongique *Candida albicans* par rapport la souche *Aspergillus niger*.

Les tests phytochimiques qui ont été effectués sur quelques échantillons du poivre noir ont révélé la présence de stéroïdes, tannins, flavonoïdes, saponines et l'absence d'Anthocyanes, alcaloïdes. Ces substances jouent un rôle important dans l'activité antimicrobienne.

**Mots clés :** *Piper nigrum* , tests phytochimiques, activité antibactérienne, activité antifongique, microorganismes pathogènes.

## Abstract:

Our work aims to study the evaluation of the antimicrobial activity of the organic extract of black pepper « *Piper nigrum* » on certain pathogenic microorganisms, where the organic extracts were prepared with a yield of 29.76% , and the assay results presented a higher level of polyphenols in the extract (280 µg EAT / mg), results have shown that the organic extract has high efficacy against the bacterial strain *Bacillus cereus* compared to the *Escherichia coli* strain, while high efficacy against the fungal strain *Candida albicans* compared to the *Aspergillus niger* strain.

Phytochemical tests carried out to detect the different groups of chemical compounds contained in the cold and hot aqueous extracts revealed the presence of steroids, tannins, flavonoids, saponins and the absence of anthocyanins, alkaloids. These substances play a determining role in antimicrobial activity .

**Key words:** *Piper nigrum*, phytochemical tests, antibacterial activity, antifungal activity, pathogenic , microorganisms.