



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 :  
**GOURI Raida MAZOUZ Wissem**

Le : samedi 26 juin 2021

## Evaluation de l'activité antibactérienne du poivre noir (piper nigrum) commercialisé à Biskra

---

### Jury :

Mme. HAMMIA Hadjra	MAA	Université	Président
Mme. CHOUIA Amel	MCB	Université	Rapporteur
Mme. RECHID Rima	MAA	Université	Examineur

Année universitaire : 2020 - 2021

## **Remerciements**

*Merci a Dieu Le tout puissant qui nous a dotées de  
Volonté*

*Tout d'abord nous tenons surtout à adresser nos plus  
vifs remerciements à notre promotrice  
Madame chouia Amel, qui nous a fait  
l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction,  
pour sa grande patience, pour sa  
Disponibilité et ses conseils judicieux.*

*Un grand merci a tous ce qui ont contribué de près ou  
de  
Loin pour que ce projet soit possible.*

## Dédicace

*Je remercie dieu tout puissant qui ma permet d'arri ver à ce but. Je*

*dédié ce modeste travail à deux personnes les plus chers à mon cœur :*

*mon père et ma mère qui ont sacrifié de leur existante pour bâtir la*

*mienne, Qui par leur précieux conseils et contient ont sa me guider ver*

*la voix de la réussite.*

*À toue ma famille Je À mes chère amies, pour leur aidées et*

*encouragement pendant cette Période. À tous mes amis*

**Raida et Wissem**

# Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des Abréviations .....	III
Introduction.....	1
<b>Chapitre 1 Plante <i>Piper Nigrum</i> et Leur intérêt thérapeutique</b>	
1.1 Généralité sur plante Piper Nigrum .....	3
1.2 Description botanique .....	3
1.3 <i>Habitat et culture</i> .....	4
1.4 Taxonomie.....	4
1.5 Composition chimique .....	5
1.5.1. <i>L'huile essentielle</i> .....	5
1.5.2. <i>Polyphénols</i> .....	5
1.5.3. <i>flavonoïdes</i> .....	5
1.5.4. <i>Alcaloïde</i> .....	6
1.5.5. <i>Pipérine</i> .....	6
1.6. Usage thérapeutique de poivre noir .....	6
1.6.1. <i>Usages médicinal</i> .....	6
a) Abaissement du cholestérol et amplificateur immunitaire .....	6
b) Anticancer.....	6
c) Actions antioxydant.....	6
d) Activité digestive .....	7

e) Effet anti-inflammatoire .....	7
f) L'effet hépatoprotecteur.....	7
g) Propriétés antipyrétiques .....	7
1.6.2. Usage cosmétique.....	7

## **Chapitre 2 Notions de l'activité antibactérienne**

2.1. Généralités sur l'activité antibactérienne .....	8
2.2. Infections bactériennes.....	8
a. Antibiotique.....	8
b.Plantes comme antibiotiques.....	8
2.3. Antibiotiques et leur mode d'action .....	8
2.4. Mode d'action d'antibiotique .....	9
2.5. Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	10
2.6. Types de résistance .....	10
2.6.1. Résistance naturelle .....	10
2.6.2. Résistance acquise.....	10

## **Chapitre 3 Matériel et Méthodes**

3.1. Sélection des données .....	11
3.2. La zone d'échantillonnage .....	11
3.3. Collecte d'échantillons .....	11
3.4. Séchage et Broyage.....	12
3.5. Préparation de l'extrait de <i>Piper Nigrum</i> .....	12
3.5.1. Extraction par Soxhlet .....	13
3.5.1. Extraction par macération .....	13
3.6. Filtration et concentration .....	13

3.7. Préparation des dilutions des l'extrait.....	14
3.8. Rendement d'extraction .....	14
3.9. Dosage des polyphénols totaux (analyse quantitative).....	14
3.10. Souches bactérienne.....	15
<i>Milieux de culture</i> .....	16
3.11. Préparation de l'inoculum .....	16
3.12. Activité antibactérienne .....	16
3.12.1. Méthode diffusion sur disques.....	16
3.12.2. Méthode de diffusion sur puits.....	18
3.12.3. Détermination de CMI et CMB.....	19
<b>Chapitre 4 Résultat et discussions</b>	
4.1. Extraction de poivre noir.....	22
4.2. Calcule du rendement.....	22
4.3. Dosage des polyphénols totaux (analyse quantitative) .....	23
4.4. Méthode de diffusion sur disque .....	25
4.5. Méthode de diffusion en puits .....	31
4.6. Détermination de CMI et CMB .....	34
Conclusion .....	38
Bibliographie.....	39
Annexes .....	43
Résumés .....	43

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Partie souterraine et aérienne de <i>Piper Nigrum</i> (Pandya <i>et al.</i> , 2012).....	3
<b>Tableau 2.</b> Classes des antibiotique les plus utilisé chez l'homme (Munk <i>et al.</i> , 2014).....	9
<b>Tableau 3.</b> Les sources de la collection de poivre noir de différents études analysés. ....	11
<b>Tableau 4.</b> Extraction de poivre noir à partir différentes études analysent. ....	13
<b>Tableau 5.</b> Les souches à testes à partir de différentes études d'analyse .....	15
<b>Tableau 6.</b> Rendement des extraits de poivre noir Alka <i>et al.</i> (2017).....	22
<b>Tableau 7.</b> Activité antibactérienne des extrait de poivre noir déterminé par la méthode de diffusion sur disque (Vani <i>et al.</i> ,2009).....	27
<b>Tableau 8.</b> Effet de l'extrait de <i>piper nigrum</i> sur la croissance des bactéries (Shiva <i>et al.</i> ,2013).....	28
<b>Tableau 9.</b> Un seul extrait de poivre noir dilué contre E.coli ( Primanda <i>et al.</i> ,2021) .....	29
<b>Tableau 10.</b> Zone d'inhibition par différents antibiotique contre les souches bactériennes (Sahrawat <i>et al.</i> , 2013).....	29
<b>Tableau 11.</b> Activité antibactérien de différents extraits de <i>piper nigrum</i> contre les bactéries par méthode de diffusion sur disque(Alka <i>et al.</i> ,2017). ....	30
<b>Tableau 12.</b> Résultats des tests d'effet d'extrait de poivre noir au <i>S.mutans</i> (Hasen <i>et al.</i> ,2020).....	31
<b>Tableau 13.</b> Effet d'extrait de poivre noir sur la croissance des bactéries (shiva <i>et al.</i> ,2013). ..	32
<b>Tableau 14.</b> Activité antibactérienne de l'extrait de <i>piper nigrum</i> contre les bactéries (Kavitha <i>et al.</i> 2017) .....	33
<b>Tableau 15.</b> Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait de piper nigrum en ppm(Vani <i>et al.</i> 2009). ....	34
<b>Tableau 16.</b> Concentration inhibitrice minimale de Piper nigrum contre <i>K.pneumoniae</i> (Alka Sahrawat <i>et al.</i> 2017).....	35
<b>Tableau 17.</b> Activité antibactérienne de poivre noir contre les souches bactériennes (Ram <i>et al.</i> ,2010).....	36

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> <i>piper nigrum</i> (Ridan,2014) .....	3
<b>Figure 2.</b> feuilles de <i>piper nigrum</i> (Ali ,2013). .....	3
<b>Figure 3.</b> Inflorescences de <i>piper nigrum</i> (Yala, 2012).....	4
<b>Figure 4.</b> fruits et graine de <i>piper nigrum</i> (Yala, 2012).....	4
<b>Figure 5.</b> Fleurs de <i>piper nigrum</i> (nordi, 2013).....	4
<b>Figure 6.</b> Mode d'action d'antibiotique (Milane <i>et al</i> , 2012).....	10
<b>Figure 7.</b> Courbe d'etalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux(Hasan <i>et al</i> .2020).....	24
<b>Figure 8.</b> Les zones inhibition effectuées par l'extrait de poivre noir sur différentes souches bactériennes tétées par la méthode de diffusion par disque (Ram et al .,2010) .....	26
<b>Figure 9.</b> Les zones d'inhibition effectuées par extrait de poivre noir sur différentes bactéries testées par la méthode de diffusion sur puits (Shiva et <i>al</i> .2013).....	32
<b>Figure 10.</b> Effet inhibiteur de l'extrait de pipérine sur les bactéries (Dalia et al . ,2018).....	33

# Liste des Abréviations

*Piper Nigrum Linnaeus : P.nigrum L*

**Ca** : Calcium

**Fe** : Fer

**Mg** :Magnésium

**P** : Phosphate

**K** :Potassium

**Na** : Nitrate

**Zn** :Zink

**DMSO** :Diméthylesulfoxyde

**ATB** : Antibiotique

**EAG**: Equivalent d'Acide Gallique

**EQ**:Equivalent de quercitine

**GN** :Gélose Nutritive

**MH** :Gélose Mueller Hinton

**MHB**: BouillonMueller Hinton

**CMI**:ConcentrationMinimal Inhibitrice

**CMB** :Concentrations Minimales Bactéricides.

**NBT** : Nitroblue Tetrazolium.

**UV** : UltraViolets

**GEN** : Gentamycine

*B .Megaterium :Bacillus Megaterium*

*B.Subtilis : Bacillus subtilis*

*P.aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa*

**P.fluorescens** :Pseudomonas fluorescens

**P.vulguris** :Proteus vulguris

*P.syringae* : *Pseudomonas syringae*

*E.coli* : *Escherichia coli*

*E.faecalis* : *Enterococcus faecalis*

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

*S. Mutans* : *Streptococcus mutans*.

*S. Typhi* : *Salmonella typhi*

*S. Typhimurium* : *Salmonella typhimurium*

*S. Enterica* : *salmonellaEnterica*

*M.Tuberculosis*: *mycobacterium Tuberculosis*

*M.smegmatis* : *Mycobacterium smegmatis*

*K.pneumoniae* : *klebsiella pneumoniae*

# **Introduction**

Les épices sont des additifs alimentaires naturels qui contribuent énormément au goût de nos aliments .depuis les temps anciens, ils ont été utilisés pour égayer nos aliments. Les épices possèdent des propriétés médicinales et nutritionnelles, ils ont été utilisés efficacement comme l'un des constituants les plus importants dans le domaine médical dans le monde entier. Ils ont une influence bénéfique sur l'efficacité du métabolisme des lipides et tant qu'antibiotique( Arun *et al.*,2013).

*Piper nigrum* est célèbre comme le roi des épices en raison de sa qualité piquante. Les grains de poivre chauds et piquants sont obtenus à partir du poivre noir, qui est l'épice la plus célèbre et l'une des épices les plus couramment utilisées dans le monde. Ils ont été cultivés dans de nombreuses régions tropicales comme le Brésil, l'Indonésie et l'Inde ( Kumar *et al.*,2017).

*Piper nigrum* (*P. nigrum* L.) appartient à la famille des Piperaceae. Le genre piper compte plus de 1000 espèces mais les espèces les plus connues sont *P. nigrum*, *P. longum* et *P. betle* ; environ 51 cultivars. Les fruits de *P.nigrum* sont également utilisés pour produire du poivre blanc et du poivre vert et sont valorisés en raison de la présence de pipérine et de ses différents isomères(Vineuy *et al.*,2015).

Le poivre est utilisé dans le monde entier dans différents types de sauces et de plats comme les plats de viande. Il contient un alcaloïde piquant majeur Pipérine, qui est connu pour posséder de nombreuses actions pharmacologiques intéressantes. Il est largement utilisé dans différents systèmes de médecine traditionnelle tels que le système de médecine ayurvédique ,présente diverses activités pharmacologiques comme antihypertensive et antiplaquettaire , antioxydant, antitumoral , antiasthmatique , antipyrétique, analgésique, anti-inflammatoire, antidiarrhéique, antispasmodique, anxiolytique, antidépresseur , hépatoprotecteur, immunomodulateur, antibactérien, antifongique, antithyroïdien, antiapoptotique, antimétastatique, antimutagène, antispermatozoïde, antitoxine du côlon, insecticide et larvicide, etc. La pipérine s'est avérée améliorer les activités thérapeutiques. L'efficacité de nombreux médicaments, vaccins et nutriments en augmentant la biodisponibilité orale en inhibant diverses enzymes. Il est également connu pour améliorer l'action cognitive et la fertilité. La pipérine stimule également les enzymes pancréatiques et intestinales qui facilitent la digestion. Aussi utilisé dans le monde entier dans différents types de sauces et de plats comme les plats de viande ( Zohein *et al.*,2014).

De nombreuses activités thérapeutiques de cette épice sont attribuées à la présence de pipérine en dehors d'autres constituants chimiques. Alcaloïde ,flavonoïdes,Polyphénols ,L'huile essentielle, oléorésine, acide aminés libre, protéine , glucides, Valeur énergétique :

330 Kcal et quelque minéraux et vitamines comme :Ca ,Fe ,Mg ,P ,k, Na , Zn (Zoheir et al,2014).

Afin de réaliser notre travail, que s'intéresse sur l'activité antibactérienne de poivre noir nous avons choisi 45 articles scientifique ont été sélectionnés pour faire la partie: revue de synthèse. Celui-ci est subdivisé en deux parties essentielles

**Une partie bibliographique : se compose de deux chapitres :**

**Chapitre1 :** Le premier chapitre regroupant des généralités sur la plante étudiée (piper nigrum) et une description botanique et taxonomie de l'espèce étudiée. Leur composition de plante et répartitions géographiques, Un aperçu sur l'exploitation des plantes médicinales à des usages pharmaceutiques et cosmétiques a été inclus à cette partie.

**Chapitre 2 :** un rappel sur les activités biologiques étudiées.

Une partie expérimentale : englobe deux chapitres :

**Chapitre 3 :** est principalement consacré aux matériel et méthodes utilisés par les différents articles étudiés, en détaillant leurs principes.

**Chapitre 4 :** montre et discute les résultats obtenus par ces études.

Le manuscrit est achevé par une conclusion présentant une synthèse des résultats Des différents articles étudiés obtenus avec les perspectives envisagées, la liste des références bibliographiques, les annexes .

**Chapitre 1 Plante *Piper*  
*Nigrum* et Leur intérêt  
thérapeutique**

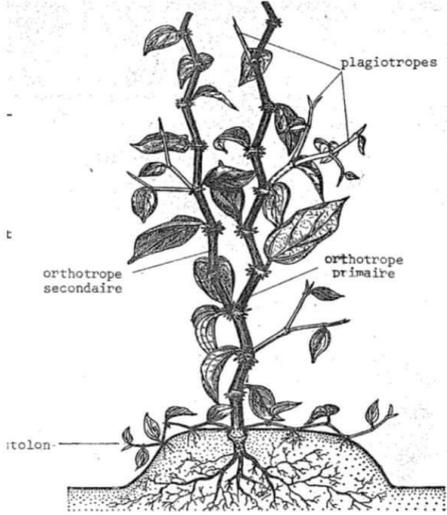
## 1.1 Généralité sur plante *Piper Nigrum*

Le poivre noir, du nom scientifique *Piper Nigrum Linnaeus*, 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. Le poivre noir est utilisé en tant qu'épice alimentaire pour sa saveur piquante et aromatique, ainsi que son pouvoir releveur de goût.

## 1.2 Description botanique

Le poivre noir contient des huiles essentielles dans les feuilles et les graines, dégageant un fort parfum, peut atteindre plus de 6 à 8 mètres. Il a une grande adaptabilité à une large gamme de conditions environnementales (Pandya *et al.* 2012).

**Tableau 1.** Partie souterraine et aérienne de *Piper Nigrum* (Pandya *et al.* 2012).

Racine	De ces racines émergent un réseau de racines latérales souples et sarmenteuses formant un abondant chevelu superficiel, les racines plongeantes peuvent atteindre de 50 cm de profondeur ou plus (Pandya <i>et al.</i> , 2012).	 <p><b>Figure 1.</b> <i>Piper Nigrum</i> (Ridan, 2014).</p>
Tige	Elles forment la structure de la plante et ne dépassent pas 4 mètres. Elles portent les racines adventives et génèrent les rameaux secondaires. La dernière partie porte les inflorescences (Pandya <i>et al.</i> , 2012).	
Feuilles	Sont alternes, de forme allongée et acuminées en leur sommet, la couleur vert foncé présente un pétiole. Portant un limbe de forme entier, ovale et mesure de 10 à 15 cm de long, et de 5 à 10 cm de large (Silva <i>et al.</i> , 2018).	 <p><b>Figure 2.</b> Feuilles de <i>Piper Nigrum</i> (Ali, 2013).</p>

Inflorescences	Se présente comme un épi pend de 20 à 50 fleurs. De long 7 à 10 cm, opposés aux feuilles, disposées en spirale. Il se détache en entier à maturation (Mera, 2010).	 <p><b>Figure 3.</b> Inflorescences de <i>Piper Nigrum</i> (Yala, 2012).</p>
Fruits et Graine	Baie charnue, de forme globulaire avec un diamètre de 4 à 6 mm, La couleur des fruits sont verts, mais ils deviennent jaunes à rouges et enfin noirs, Les fruits à poivre apparaissent 9 mois après la floraison. À l'intérieur de chaque fruit, il y a une graine (Merad, 2010).	 <p><b>Figure 4.</b> fruits et graine de <i>Piper Nigrum</i>(Yala, 2012).</p>
Fleurs	Sont jaune verdâtre, disposées en spirale. Elles ne comportent ni sépales, ni pétale, sont entourés à leur base de quatre bractées. Ils ont un ovaire, qui occupe le centre de la fleur, un style très court et stigmates (nordi, 2013).	 <p><b>Figure 5.</b> Fleurs de <i>Piper Nigrum</i>(nordi, 2013).</p>

### 1.3 Habitat et culture

C'est une plante originaire ghâts occidentaux de l'inde du sud, cependant, certains rapports de culture de Malaisie, Indonésie, Brésil, Sri-Lankais et Antilles sont également disponibles. Les poivres noirs pousseront mieux dans les climats tropicaux humides à des températures ambiantes comprises entre 25 et 30 ° c dans un sol profond et bien drainé avec une bonne capacité à retenir l'eau. Le sol doit être riche en matière. Il est multiplié à partir de graines sèches ou, à partir de boutures ou de stolons de plantes établies (Vinay *et al* 2017).

### 1.4 Taxonomie

Le poivre noir (*P.Nigrum L*) appartient à la famille des pipéracées dans l'ordre pipérales. Il appartient au genre piper composé plus de 1000 espèces (Kunaret *al.*2017).

**Règne :** plante

**Sous règne :** trachenobionta

**Division :** magnoliophyta

**Classe :** magnoliopsida

**Sous-classe:** magnoliidae

**Ordre:** piperales

**Famille:** piperaceae

**Genre:** *Piper*

**Espèce:** *Piper nigrum*

### 1.5 Composition chimique

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisés en petites quantités par les plantes médicinales. Ils sont divisés principalement en trois grandes familles: les Polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (Lutge *et al.*, 2002).

La plante de *piper nigrum* est composé de différents constituants :La composition standard de 100 g de poivre noire est : glucides 32,1 - 42,8 ; Protéines 2,1 - 6,0 ; Sucres 2,3 - 8,0 ; alcaloïdes 1,8 - 4,2 ; Huile essentielle 1,4 - 5,2 ; Oléorésine 5,9 - 13,9 ; composé Phénolique 0,3 – 0,6 ; Valeur énergétique : 330 Kcal et quelques minéraux et vitamines comme : Ca, Fe, Mg, P, K, Na, Zn (Zoheir *et al.*, 2014).

#### 1.5.1. L'huile essentielle

Contient de composés essentiellement terpènes représentés par des : Monoterpènes et Sesquiterpènes (Möller *et al.*, 2008).

#### 1.5.2. Polyphénols

Constituent une famille des molécules organiques spécifique du règne végétal. Ils possèdent un nombre in substitué de groupements hydroxyles ou de sucres sont des composés polaires, généralement solubles dans les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, le butanol, l'acétone, etc. (Benkrief *et al.*, 1990).

#### 1.5.3. Les flavonoïdes

Sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Touafek *et al.*, 2010). Ils peuvent être sous forme aglycone ou hétéroside (Markham, 1982). Appartenant à la famille

des Polyphénols (Cermak *et al.*, 1998) sont synthétisés dans les plantes au niveau des chloroplastes. Ils interviennent dans la protection des plantes contre les radiations UV de type B et leur défense contre les attaques microbiennes (Harborne *et al.*, 2000).

#### **1.5.4. Alcaloïde**

Est une substance organique d'origine végétale, azotée et caractère alcaline, qui appartient principalement à quatre familles botaniques : papavéracées, papilionacées, renonculacées et les solanacées, et en utilise comme antalgiques (Zalm *et al.*, 1998).

#### **1.5.5. Pipérine**

Est un alcaloïde piquant, sous forme solide de formule moléculaire C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>, point de fusion 128 °C, optiquement inactif, peu soluble dans l'eau. La quantité de pipérine varie dans les plantes appartenant à la famille des pipéracées, sa teneur peut être influencée par les facteurs environnementaux (Heim *et al.*, 2002).

### **1.6. L'usage thérapeutique de poivre noir**

Le poivre noir est connu pour ses nombreux effets thérapeutiques depuis l'antiquité, Des applications en usage interne et externe avec plus ou moins des preuves scientifiques. Cette partie concerne surtout les potentiels usages thérapeutiques de nos jours et les études scientifiques les plus récentes pour illustrer les modes d'action.

#### **1.6.1. Usages médicinaux**

##### **a) Abaissement du cholestérol et amplificateur immunitaire**

Il améliore le processus de digestion en aidant à décomposer plus rapidement les grosses molécules de graisse en molécules simples facilement digestibles et empêche l'accumulation de graisse dans le corps (Jean *et al.*, 2016).

##### **b) Anti – cancer**

Il inhibe certaines cytokines proinflammatoires produites par les cellules tumorales, réduisant ainsi les chances de progression tumorale. (Nisar *et al.*, 2012) ; (Yala *et al.*, 2016).

##### **c) Actions antioxydantes**

Composés phénoliques ils inhibent la peroxydation lipidique. Ils maintiennent et améliorent les niveaux et l'efficacité des composés antioxydants importants (Jean *et al.*, 2016).

**d) Activité digestive**

Le poivre noir améliore la digestion par la stimulation des enzymes pancréatiques, et diminue considérablement le temps de transit alimentaire du tractus gastro-intestinal, et augmente la production de salive et les sécrétions gastriques (Yala *et al.* ,2016).

**e) Effet anti-inflammatoire**

Un anti-inflammatoire signifie quelque chose qui réduit l'inflammation du corps humain et le poivre noir en fait partie. On constate que la pipérine inhibe de manière significative la production de deux médiateurs proinflammatoires importants, IL6 et PGE, l'inhibition de la production de PGE est importante en raison de son rôle central dans le déclenchement de la douleur (Yala *et al.* ,2016).

**f) L'effet hépatoprotecteur**

Il a empêché l'augmentation des taux de GPT et de GOT dans le sang, et cet effet inhibiteur dépend de la diminution de la sensibilité des cellules hépatiques au facteur de nécrose tumorale (Hina *et al.* ,2012).

**g) Propriétés antipyrétiques**

La pipérine contenue dans le poivre était déjà connue comme possédant des propriétés antipyrétiques (Hina *et al.* ,2012).

**1.6.2. Usage cosmétique**

Sabina Corporation, a rapporté que la pipérine utilisée en cosmétique, un bio-activateur naturel qui améliore la perméabilité des composés actifs à travers la peau et stimule le pouvoir naturel de la peau d'absorber les nutriments (Nisar *et al.* ,2012).

# **Chapitre 2 Notions de l'activité antibactérienne**

## 2.1. Généralités sur l'activité antibactérienne

Les consommateurs exigent aujourd'hui des produits naturels et non toxiques. Ainsi, les produits alimentaires doivent être protégés contre les bactéries pendant le stockage pour éviter toute contamination. Les conservateurs chimiques sont actuellement largement utilisés, mais leur utilisation répétée peut déclencher le développement d'une résistance chez les bactéries pathogènes, ce qui pourrait entraîner de graves problèmes de santé (Lanzou *et al.* 2015).

Les plantes sont riches en substances bioactives, telles que terpènes, alcaloïdes, flavonoïdes. Plusieurs substances ont été étudiées pour leurs activités biologiques et antibactériennes. De nombreuses études ont prouvé que les extraits d'éthanol de poivre et les huiles volatiles peuvent inhiber la détérioration des aliments et les agents pathogènes alimentaires (Lanzou *et al.* 2015).

## 2.2. Infections bactériennes

Les infections microbiennes sont causées par différents microorganismes et sont la Cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (Bergogne *et al.*, 1995).

### a. Antibiotique

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la Croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes). Ils peuvent être produits de manière naturelle par des champignons et des bactéries ou obtenus par semisynthèse ou synthèses chimique (Mangin., *et al* 2016).

### b. plantes comme antibiotiques

Les plantes s'explique par l'élaboration d'un système de défense naturelle, qui leur permet de lutter efficacement contre les pathogènes (Jones et al, 2006). A partir d'un composé présent dans plante qui inhibe le développement d'une bactérie ou la tue. (Lewis, 2001).

## 2.3. Les antibiotiques et leur mode d'action

Les antibiotiques sont des agents dont la toxicité sélective résulte d'un mode d'action spécifique. Ils agissent à faible dose pour inhiber la croissance des micro-organismes ou pour

les détruire. Ils peuvent être produits de manière naturelle par des champignons et des bactéries ou obtenus par synthèse et hémisynthèse. (Mangin *et al* 2016).

**Tableau 2.** Classes des antibiotiques les plus utilisés chez l'homme (Munk *et al.*, 2014)

Classe d'antibiotique	Exemple	Action	Spectre
Beta-Lactamines	Pénicillines Céphalosporines	Inhibent le peptidoglycane de la paroi bactérienne	Cocci (gram positive et gram négative) Bacilles gram positive
Aminosides	Amikacine Gentamicin Obramycine	Inhibent la synthèse protéique des bactéries	Les bactéries (gram + et gram négative), les germes anaérobies sont résistants
Quinolones	Norfloxacine Ofloxacine Pefloxacine	Inhibent la réplication de l'ADN	Germes aérobies G+ et G-, peu actives sur les anaérobies, activité sur les mycobactéries
Macrolides	Roxythromycine larithromycine Azithromycine Spiramycine	Inhibent la synthèse protéique	Cocci gram positive streptocoques, Cocci gram négative, bacilles gram positive, exclusion des bacilles gram négative (entérobactéries, pseudomonas)
Glycopeptides	Vancomycine Teicoplanine	Inhibent la synthèse de la paroi bactérienne	Bactéries gram positive sauf L.monocytogenes
Rifamycin	Rifampicine	ARN polymérase	Les bactéries (gram + et gram négative)

#### 2.4. Mode d'action d'antibiotique

Les ATB agissent à des niveaux précis de la structure bactérienne, les principales cibles sont (figure 6).

- Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique due à l'intercalation des
- Polyphénols dans les phospholipides membranaires (Daglia *et al*, 2012).
- Inhibition de la synthèse d'acide nucléique (Hilliard *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2009).
- Inhibition du métabolisme énergétique microbien (Haraguchi *et al.*, 2015, Daglia, 2012).
- Séquestration des substrats requis pour la croissance microbienne (Milane *et al*, 2012).

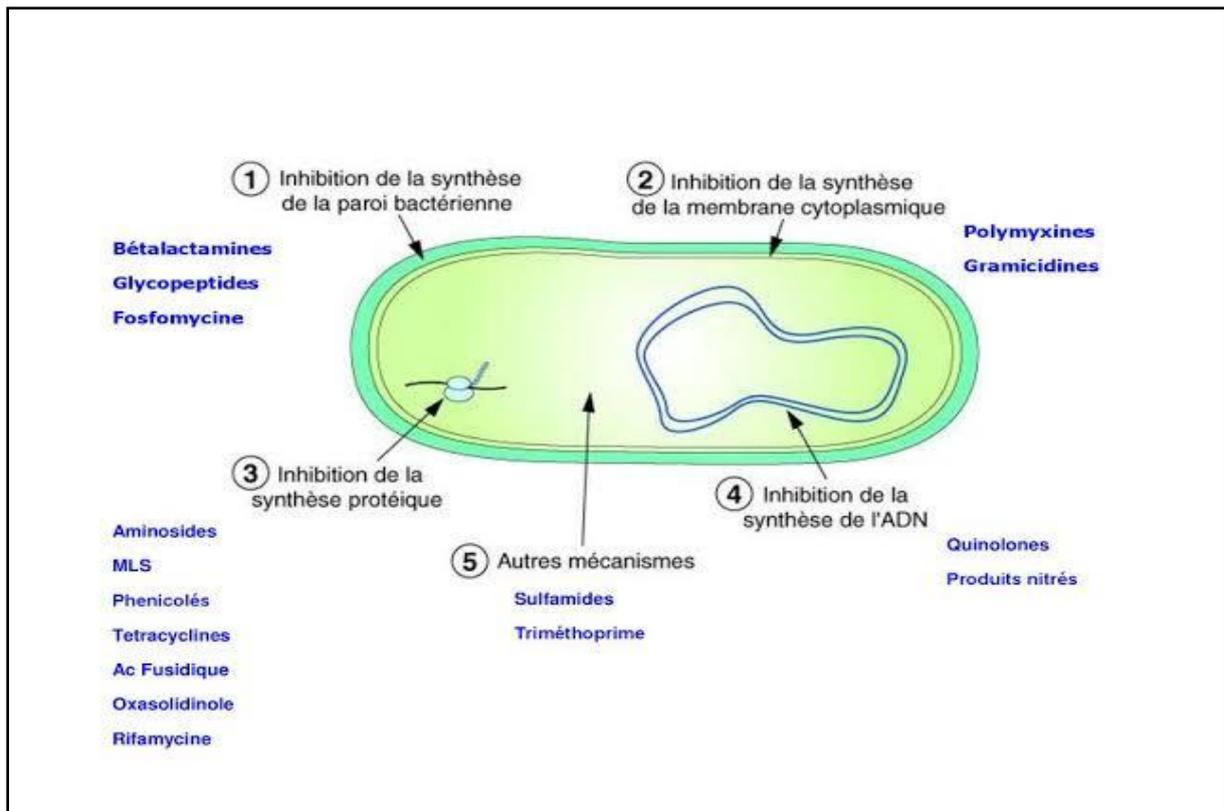


Figure 6. Mode d'action d'antibiotique (Milane *et al.*, 2012).

## 2.5. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne est définie comme la capacité des bactéries à résister aux effets des antibiotiques ou des biocides censés les contrôler ou les tuer (Zia *et al.*, 2014).

## 2.6. Types de résistance

### 2.6.1. Résistance naturelle

Elle fait partie du patrimoine génétique de l'espèce et est donc présente chez toutes les souches d'une même espèce héréditaire, elle se transmet à la descendance de manière verticale et reste stable en fonction du temps. Elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques par sa spécificité familiale (Zia *et al.*, 2014).

### 2.6.2. Résistance acquise

C'est l'acquisition de nouveaux gènes. Ces gènes de résistance peuvent provenir de chromosomes d'autres espèces, ou être portés par des éléments mobiles (transposons, plasmides, intégrons) et être acquis par conjugaison surtout, mais également par transformation, transduction, transposition. L'acquisition de la résistance peut également être la conséquence d'une mutation chromosomique (Jam *et al.*, 2017).

# **Chapitre 3 Matériel et Méthodes**

### 3.1. Sélection des données

Des articles scientifiques pertinents sur la activité antibactérienne de poivre noire ont été téléchargés de divers sites web tels que Google Scholar, Sites Scientifiques, pub Med, web of science, et springer, ainsi que science directe. Environ 45 des articles scientifiques ont été lus et analysés, et après un examen préliminaire, 20 ont été sélectionnés pour faire la partie : revue de synthèse.

### 3.2. Zone d'échantillonnage

Les poivre noir ont été collectées aux différents endroits dans le monde, Inde (Jamil *et al.*,2001 ; Gawai *et al.*,2007 ; Vani *et al.* ,2009; Ganesh *et al.*,2014 ; Ahmed *et al.* ,2016 ; Lohidas *et al.* ,2016 ; Alka *et al.* ,2017 ; Hira *et al.* ,2018 ),Haryana (Ram *et al.* ,2010), Varanasi (Chandan *et al.* ,2011),Tunisie(Zied *et al.*,2013), Bagdad (Al-Shahwany *et al.* ,2014), Malaysia (Mohd *et al.*,2014),Turquie (Gulten *et al.*,2017), Egypte (Dalia *et al.* ,2018), Indonésie (Hasan *et al.* ,2020),France (Irina *et al.* ,2019) et Lampung (Primananda *et al.* ,2021).

### 3.3. Collecte d'échantillons

Les échantillons de plantes suivants ont été collectés à partir de différentes sources, comme indiqué dans le tableau n ° 3.

**Tableau 3.** Les sources de la collection de poivre noir de différents études analysés.

Référence	Source de la collection
Jamil <i>et al.</i> ,2001	Poivre noire ont collectés dans l'andhra pradesh, Inde.
Gawai <i>et al.</i> ,2007	Poivre noir ont été achetées sur le marché local de pune Inde.
Vani <i>et al.</i> ,2009	Poivre noir les baies ont été achetées sur le marché local de Inde.
Ram <i>et al.</i> ,2010	Poivre noire ont été collectés dans Kurukshetra, Haryana.
Chandan <i>et al.</i> ,2011	Poivre noir ont été collectés dans le jardin d'herbes d'ayurveda Varanasi.
Sk shiva rani <i>et al.</i> ,2013	Poivre noir ont été collectés dans les villages tribaux du district de vishakhapatnam dans l'andhra pradesh.
Zied <i>et al.</i> ,2013	Poivre noir ont été acheté sur le marché local de Tunisie.
Al-shahwany <i>et al.</i> ,2014	Povre noir ont été achetés sur le marché local Bagdad.
Mohd <i>et al.</i> ,2014	Poivre noir ont été achetés sur le marché local Malaysia.
Ganesh <i>et al.</i> ,2014	Poivre noir ont été collecté dans une papetrie chidambaram, district de Cuddalore.
Lohidas <i>et al.</i> ,2016	Poivre noir district de kanyakumari, tamil nadu, Inde.
Ahmed <i>et al.</i> ,2016	Poivre noir ont été collectés dans chembur, magasin de condiments.
Alka <i>et al.</i> ,2017	Poivre noir a été collecté road bulandshahr région Inde.
Gulten <i>et al.</i> ,2017	Poivre noir ont été obtenus sur le marché local de Mugla.
Kavitha <i>et al.</i> ,2017	Poivre noir ont été collectées à karumandhuri, district de Salem.
Dalia <i>et al.</i> ,2018	Poivre noir été collectés sur les marchés de mansoura, en Egypte.
Hira <i>et al.</i> ,2018	Poivre noir ont été collectés dans les différentes zones du district de

	Lalitpur, Bhaktapur et Népal.
Irina <i>et al.</i> ,2019	Poivre noir de biowagner.
Hasan <i>et al.</i> ,2020	poivre noir ont été collectés dans district de Lhoknga, Aceh Besar.
Primananda <i>et al.</i> ,2021	Poivre noir de lampung.

### 3.4. Séchage et Broyage

Après la collection d'échantillons, le poivre noir sont soumis à séchage et broyage pour être prêt à préparer la solution.

Selon Jamil *et al.*(2001) ; Gawai *et al.*(2007) ;Vani *et al.* (2009) ; Ram *et al.* (2010) ; Kavitha *et al.*(2017) ; Dalia *et al.* (2018) ; Irina *et al.* (2019) .

L'étape de séchage de la plante récoltée a pour but d'abaisser la teneur en eau des organes récoltés afin d'éviter toutes réactions d'altération et de prolifération des micro-organismes. Les plantes récoltées sont bien étalées sur un papier absorbant, sec, elles sont séchées naturellement à température ambiante.

La plante sont transformées en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique à hélice. Les poudres obtenues sont conservées à l'abri de l'air et de la lumière dans des flacons en verre hermétiquement fermés. Ensuite, ils ont été conservés à 4 ° c jusqu'à utilisation.

### 3.5. Préparation de l'extrait de *Piper Nigrum*

Le type d'extraction utilisé diffère d'un auteur à l'autre soit par Soxhlet soit par macération, de plus les solvants utilisés diffèrent d'un auteur à l'autre et la majorité utilise méthanol et chloroforme.

- **Principe**

C'est une opération de séparation d'une substance se trouvant dans une matière première solide généralement végétale grâce à l'utilisation d'un solvant liquide dans lequel la substance à extraire est soluble (Hira *et al.*, 2018) .

**Tableau 4.**Extraction de poivre noir à partir différentes études analysent.

Extraction	Mode opératoire	Solvant	Références
<b>3.5.1. Extraction par sohxlet</b>	10 g de poudre (poivre noir) résultante a été introduite dans la cartouche d'extraction et scellée avec un tampon de coton. La cartouche d'extraction chargée de l'échantillon d'intérêt a été insérée dans l'extracteur sohxlet. Le ballon à fond rond a été rempli de 95 % de solvant connecté à l'extracteur sohxlet et inséré dans un bain d'huile silicone chauffé à 86 ° c. Pour limiter l'extraction des sous-produits, le processus d'extraction a été arrêté après 3,5 à 4 heures (deux cycles d'extraction)	Méthanol	(Ram <i>et al.</i> .,2010 ; Ganesh <i>et al.</i> ,2014 ; Mohd <i>et al.</i> ,2014 Gulten <i>et al.</i> ,2017 ; Lohidas <i>et al.</i> .,2016 ; Dalia <i>et al.</i> .,2018 )
		Chloroforme	(Vani <i>et al.</i> .,2009 ; Ganesh <i>et al.</i> ,2014 Ahmed <i>et al.</i> .,2016 ;Irina <i>et al.</i> .,2019 ; al-shahwany <i>et al.</i> ,2014 ; Chandan <i>et al.</i> .,2011 ; Jamil <i>et al.</i> ,2001)
<b>3.5.1. Extraction par macération</b>	1g de poudre (poivre noire) est stockée dans un récipient fermé contenant du 5ml de solvant et laissée au repos pendant une période minimale de trois jours avec une fréquence d'agitation jusqu'à ce que le solvant soit dissous.	Methanol	(Gawai <i>et al.</i> ,2007 ; Al-Shahwanybet <i>al.</i> ,2014 Alka <i>et al.</i> .,2017; Hira <i>et al.</i> .,2018 ; Hasan <i>et al.</i> .,2020 ; Primananda <i>et al.</i> .,2021)
		Chloroforme	(Zied <i>et al.</i> ,2013 ; Kavitha <i>et al.</i> ,2017 ;)

### 3.6. Filtration et concentration

Dans tout études, après préparation de l'extrait alcoolique, il est filtrés et concentré cet extrait.

Selon Gawai *et al.*(2007) ;Zied *et al.*(2013) ;Mohd *et al.*(2014) ;Ganesh *et al.*(2014) ;Ahmed *et al.*.(2016) ; Primananda *et al.*.,2021 ;Les extraits de plantes homogénéisés ont d'abord été filtrés à travers le tissu de mousseline et ensuite à travers le papier filtre Whatman n°1 . Le filtrat obtenu a été concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif à 50 ° c. Jusqu'à ce que l'extrait devienne épais ou concentré. Ensuite emballée dans une bouteille en verre à bouchon à vis et conservés au réfrigérateur à 4 ° c, jusqu'à ce qu'elle soit nécessaire.

### 3.7. Préparation des dilutions des l'extrait

Extrait de poivre noir épais (*piper nigrum l.*) De concentration de 100% a été diluée pour obtenir une concentration de 75%, 50%, 25%, 12,5%, une dilution de 6,25% a été réalisée avec de l'éthanol ou DMCO et homogénéisée au vortex.

- Selon Dalia *et al.* (2018) ont utilisé concentrations différentes comme 0,2, 0,3 et 0,5% .
- Selon Chandan *et al.* (2011) ont utilisé autre concentrations de composés de 5 ;2,5 ;1,25 ;0,625 ; 0,312 ;0,156 ; 0,078,et 0,039 %.
- Selon Al-shahwany *et al.*, (2014) ont utilisé différentes concentrations de 0,002, 0,004, 0,02, 0,04, 0,2 et 0,4% .
- Selon Ganesh *et al.* (2014) ont utilisé différentes concentrations 1; 2; 3et 4%.

### 3.8. Rendement d'extraction

Selon Irina *et al.* (2019) ont calcul le rendement comme suit :Le rendement en extrait méthanolique (R) est le rapport entre la masse de l'extrait et la masse de la matière végétale utilisée. Il est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{Pp}{Pe} \times 100$$

Pe : poids de l'extrait méthanolique en g

Pp : poids de la plante en g.

### 3.9. Dosage des polyphénols totaux (analyse quantitative)

La plupart des études citées dans ce travail ont suivi le même afin de réaliser une Dosage des Polyphénols totaux.SelonAouadi.et al (2015) la dosage des Polyphénols totaux était la suivante.

#### •Principe

le taux de polyphénols des extraits éthanoliques est déterminé par spectrophotométrie selon la méthode de folin-cioclateu , ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique.

Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de folin-cioclateu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène.

L'intensité de la couleur, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760 nm,

est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés et présents dans les extraits végétaux.

- **Mode opératoire**

- ✓ Dans une fiole jaugée, on introduit 0.1 ml de solution d'extrait. 46 ml d'eau distillée et 1 ml de réactif de folin-ciocalteu sont ajoutés.
- ✓ Le mélange est agité vigoureusement.
- ✓ Après 3 minutes, on ajoute 3 ml d'une solution de  $Na_2CO_3$  à 2%.
- ✓ Le mélange est laissé au repos pendant 2 heures avec agitation intermittent.
- ✓ La lecture de l'absorbance est mesurée à 760 nm.
- ✓ Une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique avec différentes concentrations.

- **Expression des résultats**

les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique, par Milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mg) en utilisant l'équation de régression. Cette équation est Obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. (boizot et charpentier, 2006).

### 3.10. Souches bactérienne

**Tableau 5.** Les souches à testes à partir de différentes études d'analyse

Référence	Bactéries Gram +	Bactérie Gram-
Jamil <i>et al.</i> ,2001	<i>B.Sphaericus ;B.subtilis ;S.aureus.</i>	<i>E. coli;p. Syringae;s.typhimurium.</i>
Gawai <i>et al.</i> ,2007	<i>S.aureus.</i>	<i>E.coli, P.aeruginosa,K. pneumoniae.</i>
Vani <i>et al.</i> ,2009	<i>S. aureus ;B. cereus,S. faecalis.</i>	<i>E.coli,k. Pneumoniae, P.aeruginosa,et S. typhi</i>
Ram <i>et al.</i> ,2010	<i>B. megaterium , B. sphaericus, B.polymyxa, S.aureus</i>	<i>E. coli.</i>
Chandan <i>et al.</i> ,2011	<i>M.tuberculosis.M.smegmatis, S.aureus , E. faecalis.</i>	<i>E.coli; P.aeruginosa ; S .typhi</i>
Shiva <i>et al.</i> ,2013	<i>S.aureus, B.subtilis.</i>	<i>E.coli ,P. aeruginosa.</i>
Zied <i>et al.</i> ,2013	<i>S. enterica ; B. subtilis</i>	<i>E.coli ;klebsiella</i>
Al-shahwany <i>et al</i> ,2014	<i>S. aureus.</i>	<i>E.coli.</i>
Mohd <i>et al.</i> ,2014	<i>S. typhimurium ; S. aureus.</i>	<i>E.coli;P.aeruginosa.</i>
Ganesh <i>et al.</i> ,2014	<i>S. aureus.</i>	<i>E.coli ; P. aeruginosa ; S. typhi.</i>
Lohidas <i>et al.</i> ,2016	<i>S.aureus.</i>	<i>E. coli ; k. pneumoniae,</i>
Ahmed <i>et al.</i> ,2016	<i>B. megaterium, B.subtilis, S.aureus .</i>	<i>E.coli.</i>
Alka <i>et al.</i> ,2017	<i>B. subtilis.</i>	<i>P.aeruginosa, k.pneumoniae, p.vulgaris.</i>
Gulten <i>et al.</i> ,2017	<i>S. aureus.</i>	
Kavitha <i>et al.</i> ,2017	<i>S.aureus, Bacillus sp.</i>	<i>E.coli, klebsiella.</i>
Dalia <i>et al.</i> ,2018	<i>S.aureus .B. subtilis .</i>	<i>E. coli.</i>

Hira <i>et al.</i> ,2018	<i>S. aureus.</i>	<i>E.coli, P.aeruginosa, S.enterica typhi .</i>
Irina <i>et al.</i> ,2019	<i>S. aureus .</i>	<i>E. coli.</i>
Hasan <i>et al.</i> ,2020	<i>S. mutans.</i>	
Primananda <i>et al.</i> ,2021		<i>E.coli .</i>

### ➤ Milieux de culture

D'un part ,dans l'étude analyses , utilise le milieu de culture standard pour l'activitéantibactériennes (Vani *et al.* ,2009 ;Alka *et al.* ,2017 ; Hasan *et al.* ,2020)

- Gélose Nutritive (GN): milieu d'isolement et de conservation non sélectif.
- Gélose Mueller Hinton (MH) : milieu pour l'étude de la sensibilité des bactéries, en
- Milieu Solide, vis-à-vis de l'antibiotique.
- Bouillon Mueller Hinton (MHB) : milieu pour l'étude de la concentration minimale Inhibitrice (CMI).

### 3.11. Préparation de l'inoculum

Selon Kavitha *et al.*(2017) ; Irina *et al.* .(2019) , la préparation de la suspension bactérienne se fait comme suit: Les souches bactériennes sont enrichies sur un tube contenant 9 ml de MHB, puis incubées à 37 °c pendant 18-24 h. A l'aide d'une anse de platine on ensemence une goutte de la culture sur une boîte de pétri contenant de la GN, elle sera par la suite incubé à 37°c pendant 18-24 heures. A partir de ces cultures pures, la suspension bactérienne (l'inoculum) est préparée : à l'aide d'une anse de platine on racle 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques, on décharge l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% NaCl. Puis homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex.

### 3.12. Activité antibactérienne

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'activité antibactériennes des composés présents dans l'extraits de poivre noire.

#### 3.12.1. Méthode diffusion sur disques

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé est utilisée pour la détermination de l'activité antibactérienne de l'extraits de poivre noire selon la méthode décrite par Gulluce *et al.* , (2007).

D'autre part, dans la plupart des études choisies La méthode diffusion sur disques selon (Vani *et al.*.,2009 ;Chandan *et al.*.,2011 ; Zied *et al.*,2013 ; Alka *et al.*.,2017 ; Hira *et al.*.,2018 ;Hasan *et al.*.,2020 ; Gulen *et al.*,2017).

- **Principe**

La technique utilisée est celle de la diffusion sur disque en milieu gélosé ou encore méthode des disques .c'est une méthode d'évaluation qualitative *in vitro* du pouvoir antibactérien de poivre noir.

Dans cette méthode, on utilise des disques de papier Whatman n°1 (6 mm), imprégnés dans l'extrait de poivre noir et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne. Après incubation, l'effet de l'agent antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure du diamètre de la zone claire autour du disque en millimètres. En fonction du diamètre d'inhibition on peut classer les souches étudiées en souches sensibles ou résistantes.

- **Mode opératoires**

Ensemencement dans des boîtes de pétri, le milieu de culture gélosé MH en surface est coulé aseptiquement à raison de 15 ml par boîte. Après la solidification, un écouvillon stérile imbibé avec la suspension bactérienne fraîchement préparée est étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. On laisse sécher les boîtes pendant 15 à 20 min.

- **Application des disques**

- des disques de papier filtre stérilisés de 6 mm de diamètre (Whatman N° 1) sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile puis imprégnés d'un volume de 5 µl d'huile essentielle ou d'extrait méthanolique de piper nigrum

- le disque d'antibiotique (gentamicine) à 10 µg/disque est déposé à la surface de la gélose à

L'aide d'une pince bactériologique stérile. L'antibiotique est utilisé comme contrôle positif.

- les disques de papier filtre stérilisés de 6 mm de diamètre (whatman n°1), imprégnés de 5µl de méthanol sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile. Le méthanol est utilisé comme contrôle négatif.

- **Incubation**

Placer les boîtes de pétri à basse température (+4°C) pendant 15 à 30 mn afin de permettre aux extraits de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier, retirer les boîtes du réfrigérateur et les placer à l'étuve, à la température optimale de croissance du germe à étudier (37 °c) pendant 24 h. Les boîtes doivent être placées couvercle en bas.

- **Lecture des résultats**

Après 24 heures d'incubation, mesurer à l'aide d'une règle graduée le diamètre d'inhibition des bactéries autour des disques. Le diamètre (mm) de la zone entourant le disque est proportionnel à la sensibilité du germe étudié.

### 3.12.2. Méthode de diffusion sur puits

C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet anti microbien, elle est aussi appelée: la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs.

D'autre part, autre études (Al-shahwany *et al* .,2014 ;Dalia *et al* .,2018 ; Ram *et al* .,2010 ) ont choisis la méthode de diffusion sur puits .

- **Mode opératoire**

Pour réaliser ce test on utilise le milieu MH agar pour la culture des différentes souches bactériennes examinées. Le milieu est coulé dans des boîtes de pétri (9 cm de diamètre) avec une épaisseur de 4 mm, puis les boîtes sont séchées à 37°C pendant 30 min avant l'utilisation.

A partir de cultures bactériennes de 6 heures en bouillon nutritif avec agitation à 37°C, des dilutions sont faites en eau physiologique stérile ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ), 5 ml de la dilution ( $10^{-2}$ ) de chaque souche sont versés sur le milieu solidifié et l'excès est éliminé après 2 à 3 min (méthode d'inondation).

A la surface des boîtes inoculées on provoque 1 ou 3 puits de 8mm et chacun est imprégné par 60 µl d'échantillon dissout dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) ou dans l'eau avec une concentration de 30 mg/ml (1.8mg/puit) (vardar *et al.*, 2003) .

- **Incubation**

Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

- **Lecture des résultats**

L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions et comparées avec celles du DMSO ou H<sub>2</sub>O comme contrôle négatif et d'un ATB comme contrôle positif ; un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm.

### 3.12.3. Détermination de CMI et CMB

La plupart des études citées dans ce travail ont suivi le même afin de réaliser une étude Détermination de la CMI et de la CMB

Selon, Jamil *et al.*(2001) ont utilisé la méthode CMI seulement.d'autre part, Al-shahwany *et al.* (2014) n'a pas fait cette méthode CMI et CMB .d'autre part, Gulten *et al.*(2017) ont suivi la méthode comme suit :

- **Mode opératoire**

Les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI), qui représentent la plus faible concentration d'extraits de plantes qui inhibe complètement la croissance des microorganismes.

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont étudiées pour les souches bactériennes sensibles aux extraits éthanoliques dans l'essai de diffusion sur disque. Les CMI de extraits contre les souches bactériennes testées sont déterminées par la méthode de microdillution (Gulluce et al. 2007):

- ✓ A partir de la solution mère extraits éthanoliques de à 50 mg/ml (dans le DMSO à 10%), on prépare une gamme de concentration par la méthode de dilution en progression géométrique à raison de 2 dans des tubes contenant MHB, pour aboutir à des concentrations allant de 0,048 à 50 mg/ml.
- ✓ Les plaques de 96 puits sont préparées en distribuant dans chaque puits 95 µl de MHB et 5 µl de l'inoculum préalablement préparé.
- ✓ 100 µl de la solution mère des huiles essentielles préparée d'une concentration égale à 50 mg/ml sont ajoutés dans les premiers puits.

- ✓ 100 µl de chaque dilution sont transférés dans les 10 puits consécutifs et le dernier puit contenant 195 µl de MHB sans huile essentielle et 5 µl de l'inoculum est utilisé comme contrôle négatif.
- ✓ Le volume final dans chaque puits est de 200 µl. Les plaques sont couvertes avec du parafilm stérile et ensuite incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

En outre Ram *et al.* (2010) ont suivi cette méthode :

Pour le calcul des concentrations minimales bactéricides (CMB), on prélève un volume de 100 µl de chaque puit qui ne montre pas une croissance bactérienne et on l'ensemence sur un milieu de gélose nutritive qu'on incube à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

- **Expression des résultats**

- La croissance bactérienne est indiquée par la présence d'un "culot" blanc sur le fond du puit. A titre d'indicateur de la croissance de microorganismes, 10 µl de nitrobleu tétrazolium (NBT) à une concentration de 2 mg/ml dans l'eau distillée stérile sont ajoutés aux puits et incubés à 37 °C pendant 30 min. Le sel de NBT agit comme un accepteur d'électrons et la couleur jaune de l'NBT est réduite en un produit formazan bleu-violet par les organismes biologiquement actifs (bactéries viables).

- La CMI est indiquée par le puit qui contient la plus faible concentration d'extrait végétal où il y a absence de croissance bactérienne et qui ne montre pas un changement de couleur.

- Les CMB sont interprétées comme la plus haute dilution (concentration la plus basse) d'extrait végétal qui a montré un liquide clair sans le développement de la turbidité et sans croissance bactérienne visible sur la boîte de Pétri.

- Le rapport CMB/CMI est calculé, il permet de déterminer le pouvoir antibiotique de l'extrait végétal.

Lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 4, on dit que l'extrait est bactéricide et lorsqu'il est supérieur à 4, l'extrait est qualifié de bactériostatique. Tous les tests sont effectués en triplicata.

# **Chapitre 4 Résultat et discussions**

#### 4.1. Extraction de poivre noir

Après travail qui a été réalisée par Vani *et al.* (2009), ils ont trouvé que l'extrait méthanolique de poivre noir par la méthode d'extraction soxhlet est solution verdâtre plus ou moins trouble, de saveur piquant et d'odeur très aromatique

Dans une autre étude réalisée par Gawai *et al.* (2007), ils ont trouvé que l'extrait méthanolique de *Piper Nigrum* obtenue après macération est de couleur vert clair, saveur piquant et d'odeur très aromatique.

Dans d'autre étude de Hasan et al (2020) ont trouvé l'extrait méthanolique de *Piper Nigrum* par la méthode soxhlet de couleur **jaune**, de saveur piquante et d'odeur fortement aromatique.

Après réalisé résultat Gawai *et al.* (2007), ils ont mentionnés le méthanol est le solvant le plus largement utilisé pour l'extraction de substances phénoliques. Les composés qui pourraient contenir les différents extraits préparés à l'aide du méthanol sont : flavonoïdes, alcaloïdes, acides aminés, tanins, acides phénoliques, triterpènes et stérols glycosylés.

#### 4.2. Calcul du rendement

L'extraction des composés phénoliques des plantes étudiées par le méthanol et chloroforme, déterminer les rendements de ces extraits bruts.

Le rendement, qui est déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal sec et broyé, est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau 6.** Rendement des extraits de poivre noir Alka *et al.* (2017).

REFERENSE	Essaie	Rendement (%)	
<i>Piper nigrum</i> Irina <i>et al.</i> , 2019	1	14.35	14.35±0.004
	2	14.34	
	3	14.35	
<i>Piper nigrum</i> Alka <i>et al.</i> , 2017	1	24.87	24.87±0.01
	2	24.85	
	3	24.89	

A partir de ce tableau on remarque que le rendement de poivre noir de région d'Inde est plus important que le poivre noir de la marque biowagner de France.

D'après travail qui a été réalisé par Alka *et al.* (2017), ont mentionné que le rendement d'extraction estimé à 24.87%, révélant sa richesse en molécules bioactives. Ce rendement est important comparé à celui rapporté par Irina *et al.* (2019) Le rendement d'extraction estimé à 14.35 (faible).

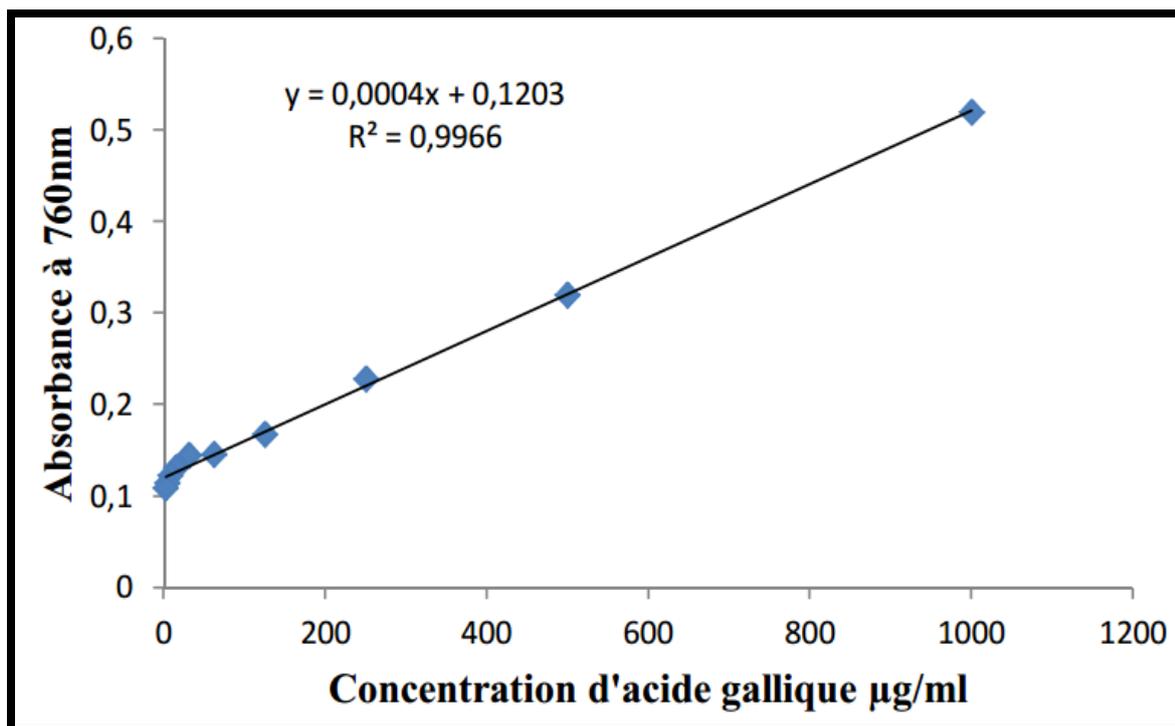
Après résultat Alka *et al.* (2017), ils ont montré que la différenciation de ces rendements peuvent être influencés par plusieurs paramètres et dépendent entre autre de la composition chimique et les caractéristiques physiques de la matière végétale ainsi que la méthode telle que séchage, broyage et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. Peut-être le temps d'extraction par macération (Inde) et d'autre (France) par Soxhlet, le solvant utilisé par méthanol (Inde) et par chloroforme (France). Ils ont rapporté que le méthanol donnait un rendement d'extraction plus élevé que l'acétone, le chloroforme, l'eau et l'éther de pétrole.

### 4.3. Dosage des polyphénols totaux (analyse quantitative)

L'étude quantitative des extraits méthanolique de *Piper Nigrum* moyen de dosage spectrophotométrique de la méthode au réactif de Folin Ciocalteu, a pour objectif la détermination de la teneur des Polyphénols totaux. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

Le contenu en Polyphénols totaux est déterminé à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage réalisée avec un extrait de référence, l'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique (EAG) par mg d'extrait.

La courbe d'étalonnage est établie avec une équation de régression (figure 7) :  $y$  (absorbance) =  $0.0004 \mu\text{g}$  acide gallique +  $0.1203$  ; coefficient de corrélation  $R^2 = 0.9966$ .



**Figure 7.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des Polyphénolstotaux (Hasan *et al.* 2020)

Dans travaille de Hasan *et al* (2020), ils ont trouvé que Le résultat de dosage des Polyphénols totaux révèlent que l'extrait de l'espèce *piper nigrum* contient une teneur de l'ordre de 526.75 µg EAG/mg d'extrait. Cette concentration est très élevée et importante, et pour cette plante dont l'extrait méthanolique n'a fait objet que de très peu d'études, elle laisse à présager des activités pharmacologiques importantes.

D'autre étude réalisée par Gawai *et al.* (2007), ont réalisée sur cette même espèce récoltée dans la région d'Inde, la détermination de la teneur en Polyphénols totaux de l'extrait méthanolique, a donné un taux de phénols totaux de 55.15 mg EAG/g d'extrait, ce qui est 10 fois moins que celui obtenu dans notre étude.

Autre études réalisée par Mohd *et al.* (2014), ont remarqué La concentration des Polyphénols totaux pour l'extrait méthanolique de *piper nigrum* dans région Malaisie est de 586.33 µg EAG/mg d'extrait. Cette teneur reste très élevée par rapport à celle trouvée dans d'autres travaux scientifiques.

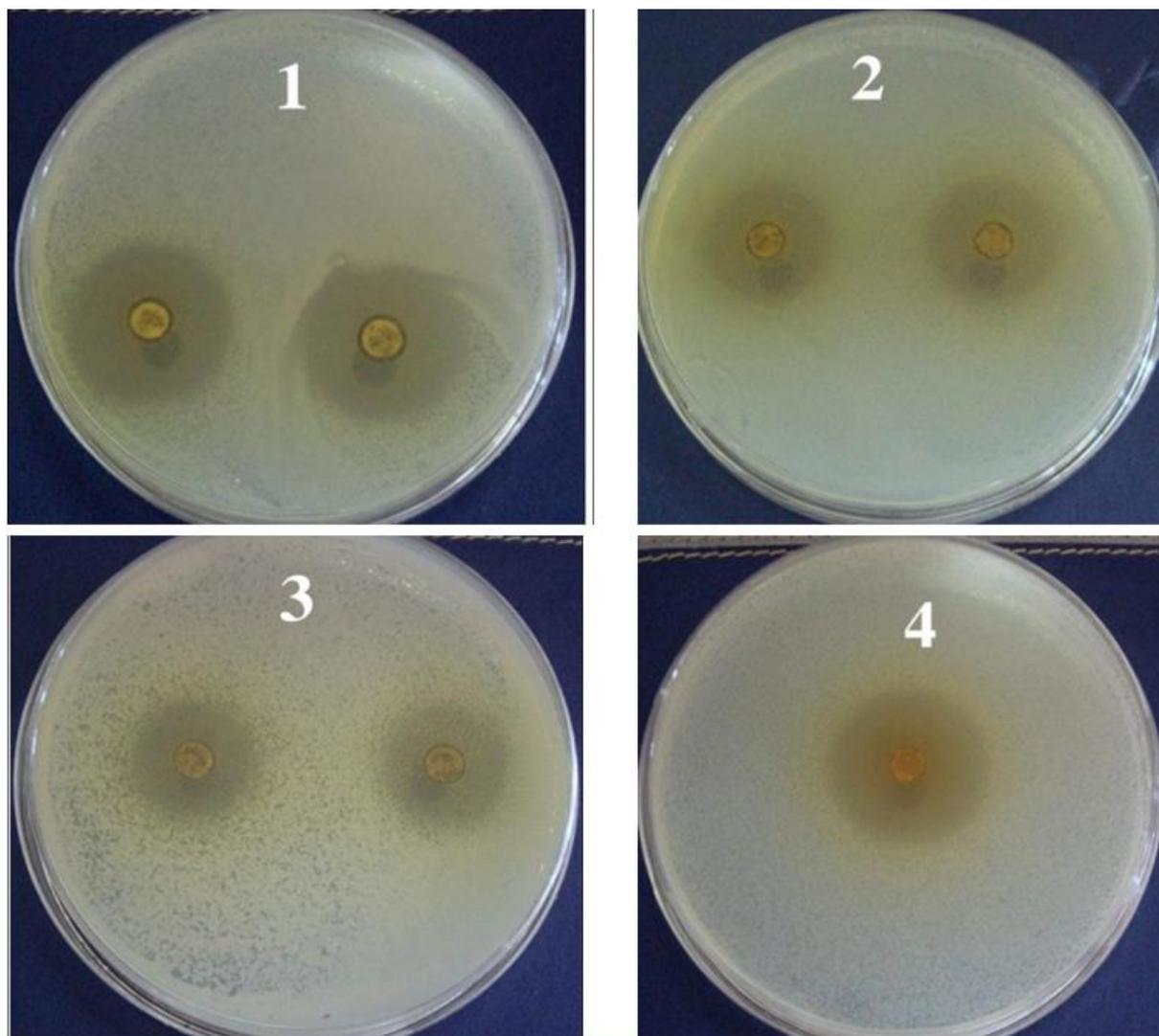
Al Shahwany *et al.* (2014), ont rapporté que les composés phénoliques contenus dans *Bagdad* montrent des taux de 20.1 à 56.6 mg EAG/g. Cette teneur reste très faible par rapport à celle trouvée.

Ces différences de résultats ont montré par des études récentes que la quantité de Polyphénols dans les plantes dépende de facteurs biologiques (génotype, organes et ontogenèse, agents pathogènes...), ainsi que de conditions édaphiques et environnementales (température, salinité, stress hydrique, rayonnement U.V et l'intensité lumineuse). En outre, la solubilité des composés phénoliques est régie par le type de solvant utilisé, le degré de polymérisation des composés phénoliques, et leurs interactions.

A l'issue de ces résultats concernant la caractérisation quantitative, les extraits méthanolique de *piper nigrum*, à travers leurs teneurs en Polyphénols totaux, constituent une source prometteuse en composés bioactifs bénéfiques à la santé humaine.

#### **4.4. Méthode de diffusion sur disque**

L'effet de l'extrait ( poivre noir) sur la croissance bactérienne ont été réalisés en mesurant le diamètre de la zone inhibitrice ou zone claire formée autour du disque à différentes concentrations ainsi que des contrôles négatifs et positifs, La formation de zones inhibitrices autour du disque montre la présence de composés antibactériens dans les extraits de poivre noir tels que les alcaloïdes, les phénols, les tanins, la coumarine, les saponines, les glycosides et l'huile .



**Figure 8.** Les zones inhibition effectuées par l'extrait de poivre noir sur différentes souches bactériennes têtées par la méthode de diffusion par disque (Ram et al .,2010)

- (1) *Bacillus sp*
- (2) *E.coli*
- (3) *K.pneumoniae*
- (4) *S.aureus*

Selon Ram *et al.* (2010) ,ils ont remarqué que l'extrait de *piper nigrum* avait la capacité d'inhiber quatre souches bactériennes *Bacillus sp* ,*E.coli* , *K.pneumoniae* et *S.aureus* et avec des zones inhibition 9 à 11 mm , donc tous les souches bactérienne sont sensibles à l'extrait de *piper nigrum*.

**Tableau 7.**Activité antibactérienne des extrait de poivre noir déterminé par la méthode de diffusion sur disque (Vani *et al.* ,2009).

bactérie	Zone d'inhibition (mm)		
	Extrait d'acétone 5µl	Extrait DCM 5µl	Ampicilline 10 µg / disque)
<i>S.aureus</i>	20	14	22
<i>B. cereus</i>	15	12	19
<i>S. faecalis</i>	18	15	13
<i>P.aeruginosa</i>	15	14	24
<i>E. coli</i>	10	-	18
<i>K.pneumoniae</i>	10	12	20
<i>S. typhi</i>	14	-	26

(-):indique Aucune inhibition

Vani *et al.* (2009), Ils ont travaillé sur l'activité antibactérienne du *piper nigrum* contre certaine bactéries pathogènes Gram positives ( *S.aureus* ; *B. cereus* ; *S. faecalis* ), et grame négatives ( *E. coli* ; *P.aeruginosa* ; *K.pneumoniae* ; *S. typhi*).ils ont trouvé que L'extrait acétonique une excellente inhibition sur la croissance des bactéries Gram positives,et l'extrait DCM sont moine efficace contre *S.typhi* et *E. coli*. Tandis que l'antibiotique standard (l'ampicilline) est efficace contre toutes les bactéries (Tableau 7).

D'autre part, On a trouvé que les bactéries Gram positives ( *S.aureus* ; *B. cereus* ; *S. faecalis*) étaient plus sensibles que les bactéries Gram négatives ( *E. coli* ; *P.aeruginosa* ; *K.pneumoniae* ; *S. typhi*) (Tableau 7).

Après ces résultat Vani *et al.* (2009), ont montré que les extraits de poivre noir a une bonne activité antibactérienne, cela indique la présence d'alcaloïdes, d'huile volatile, de mono- et polysaccharides et de résines. Les alcaloïdes comme la pipérine, l'huile volatile et les résines pourraient être responsables de l'activité antibactérienne.

Des études ont montré que le mécanisme d'action du poivre noire sur les bactéries (antibactérienne) en altérant la perméabilité de la membrane cellulaire à cause de La fuite de matériaux intracellulaires peut entraîner la mort cellulaire (Tableau 7).

**Tableau 8.** Effet de l'extrait de *piper nigrum* sur la croissance des bactéries (Shiva *et al.*, 2013).

Bactérie	Zone d'inhibition (mm)			
	25	50µl	75µl	100µg
<i>S. aureus</i>	4	6	8	18
<i>B. subtilis</i>	6	8	9	14
<i>P. aeruginosa</i>	2	3	5	9
<i>E. coli</i>	-	5	6	8

(-):indique aucune inhibition

Shiva *et al.* (2013), ils ont mentionné une activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées avec une zone d'inhibition allant de 8 mm à 18 mm. La zone d'inhibition maximale était contre les bactéries Gram positives *S. aureus* (18 mm) et *B. subtilis* (14 mm) que les bactéries à Gram négatif *P. aeruginosa* (9 mm) et *E. coli* (8 mm). La zone maximale d'inhibition était de 100ul pour toutes les cultures bactériennes. Cela indique que la zone d'inhibition augmente à mesure que la concentration du poivre noir augmente (**Tableau 8**).

Shiva *et al.* (2013), ont indiqué que le poivre noir ont montré une activité maximale contre les bactéries Gram positives par rapport aux bactéries Gram négatives individuellement et par mélanges. La variation de l'inhibition parmi les bactéries Gram positives et Gram négatives est due à la composition de la paroi cellulaire et de la membrane cellulaire.

D'autre part ont mentionné, L'extraction méthanolique dissout les composés organiques entraîne la libération des composants antimicrobiens. L'effet de *piper nigrum* sur bactéries peut être dû à la lyse de la paroi cellulaire bactérienne et de la membrane cytoplasmique due à la libération de produits antimicrobiens et il a également été rapporté que les enzymes lytiques végétales agissent sur la paroi cellulaire bactérienne (**Tableau 8**).

**Tableau 9.** Un seul extrait de poivre noir dilué contre *E.coli* ( Primanda *et al.* ,2021) .

Concentration	Extrait de pépérins de poivre noir		
	I	II	III
Control-	-	-	-
100	-	-	-
50	-	-	-
25	+	+	+
12.5	+	+	+
6.25	+	+	+
3.125	+	+	+
1 565	+	+	+
0,781	+	+	+
0,3905	+	+	+
Control+	+	+	+

(-) : pas de croissance bactérienne.

(+) : il y a une croissance bactérienne.

Primanda *et al.* (2021), ils ont étudiés sur l'activité antibactérienne d'un seul extrait de poivre noir a été testé contre *E.coli*. Chacun d'eux a été fabriqué avec une série de concentrations avec contrôle négatif et contrôle positif. Ont trouvé aucune inhibition contre bactérie *E.coli*, dans la concentration a inférieur à 50 mg / ml, mais dans concentration 50 mg/ml a plus peuvent inhiber la croissance bactérienne. Donc l'extrait de poivre noir est efficace contre *E. coli* (Tableau 9).

**Tableau 10.** Zone d'inhibition par différents antibiotique contre les souches bactériennes (Sahrawat *et al.* , 2013)

	acetat d'ethyle	chloroforme	k.pneumoniae
Tabramycine	21	-	23
Céphaloridine	17.5	-	14.5
Kanamycine	22.5	11.5	12.5
Lincomycine	-	-	-
Norfloxacine	13	-	18.5
Oleandomycine	-	-	-

Sahrawat *et al.* (2013), ils ont trouvé certaines souches bactériennes présentant une résistance aux médicaments pour certains antibiotiques, à savoir que la *K. pneumoniae* était une résistance à de nombreux médicaments comme la lincomycine et l'oléandomycine (tableau 10).

**Tableau 11.** Activité antibactérienne de différents extraits de *piper nigrum* contre les bactéries par méthode de diffusion sur disque (Alka *et al.*, 2017).

Agents pathogènes	Pourcentage d'inhibition de croissance à 100 µl / ml			
	Méthanol	Acétate d'éthyle	Chloroforme	Benzène
<i>P. aeruginosa</i>	41,17%	48,52%	52,94%	- 32,03%
<i>P. fluorescens</i>	1,85%	25,92%	- 1,85%	40,74%
<i>B. subtilis</i>	42,15%	62,74%	52,94%	67,64%
<i>P. vulgaris</i>	25,07%	0%	27,27%	- 28,07%
<i>K. pneumoniae</i>	61,65%	80,04%	69,17%	81,20%

Alka *et al.* (2017), ils ont observé que tout l'extrait de poivre noir a montré une activité antibactérienne contre toutes les souches bactériennes pathogènes.

- L'extrait méthanolique de *Piper Nigrum* a montré une inhibition maximale de la croissance 61,65% contre *K. pneumoniae* et a également montré une inhibition de croissance minimale de 1,85% contre *P. fluorescens*.
- L'extrait Acétate d'éthyle de *Piper nigrum* a montré inhibition maximale de la croissance 80,04% contre *K. pneumoniae* et a également montré une inhibition de croissance minimale de 0% contre *P. vulgaris*.
- L'extrait chloroforme de *Piper nigrum* a montré une inhibition maximale de la croissance 69,17% contre *K. pneumoniae* et a également montré une inhibition minimale de la croissance -1,85% contre *P. fluorescens*.
- Le Extrait benzénique de *Piper nigrum* a montré inhibition maximale de la croissance 81,20% contre *K. pneumoniae* et a également montré une inhibition minimale de la croissance -32,03% contre *P. aeruginosa* (Tableau 11).

Alka *et al.* (2017), Ils ont constaté que l'extrait *piper nigrum* de feuille inhibe la croissance bactériennes. Selon l'étude, non seulement la partie du fruit de poivre noir montre l'efficacité, mais également chaque partie montre l'efficacité d'activités antibactériennes.

**Tableau 12.** Résultats des tests d'effet d'extrait de poivre noir au *S.mutans*(Hasen *et al.* ,2020).

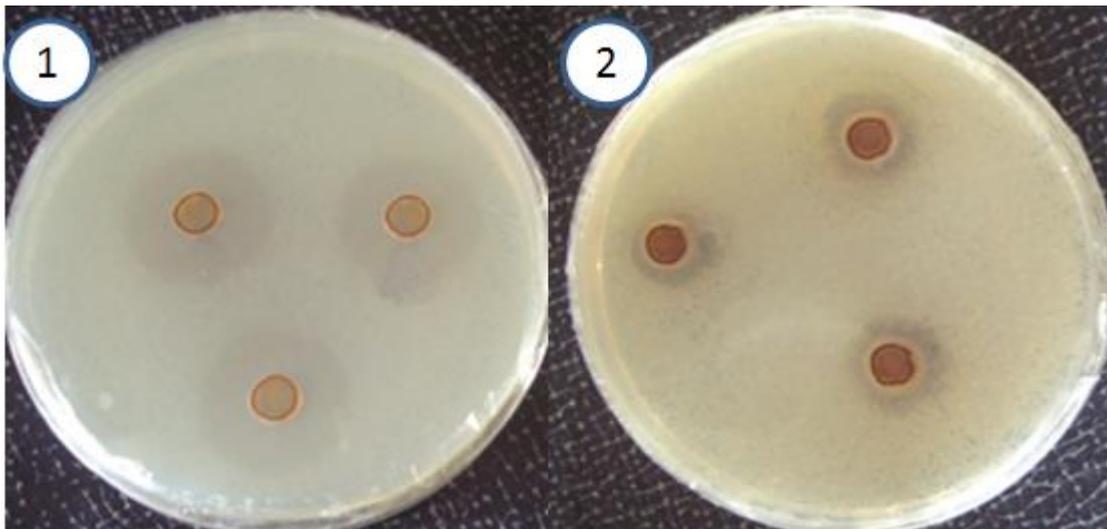
concentration	R1	R2	R3	zone inhibition moyenne
Contrôle négative	0	0	0	0
6.25	12.2	13	12	12.4
12.5	13.5	13.6	14	13.7
25	15	15.2	14.5	14.9
50	16	16.5	15	15.83
75	16.8	17	16	16.6
Contrôle positive	17	17.1	16.5	16.87

Hasen *et al.* ,(2020), ils ont montré que l'extrait de poivre noir (*Piper nigrum*) peut inhiber la croissance de *S.mutans* à chaque concentration du test avec une capacité inhibitrice faible à modérée. Des diamètres de zone d'inhibition de 6,25%, 12,5%, 25% ont un diamètre d'inhibition moyen de 12,4 mm, 13,7 mm et 14,9 mm, y compris la faible capacité d'inhibition. Alors que les concentrations de 50% et 75% ont un diamètre d'inhibition de 15,83 mm et 16,6 mm inclus dans la classification d'inhibition modérée(**Tableau 12**).

Les résultats des tests montrent une amélioration le pourcentage de concentration d'extrait (poivre noir) entraînant une augmentation du diamètre des zones d'inhibition bactérienne. Cela est dû à la concentration plus élevée de substances plus actives qu'il contient piper nigrum, de sorte qu'il peut affecter la zone inhibitrice formée. La présence de composés antibactériens d'extrait de poivre noir ainsi que d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de tanins, d'huiles essentielles affecte le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance de *S.mutants*.le Témoin négatif dans cette étude, l'eau distillée n'a pas la capacité d'inhiber les bactéries indiquée par l'absence d'une zone claire autour du disque (**Tableau 12**).

#### 4.5. Méthode de diffusion en puits

Les résultats finals des études qui réaliser par (shiva et al.2013 ;Dalia et al.2018 ; Kavitha et al .2017) sur l'activité antibactérienne poivre noire contre différentes bactéries de gram positif et gram négatif par la méthode de diffusion de puits.



**Figure 9.** Les zones d'inhibition effectuées par extrait de poivre noir sur différentes bactéries testées par la méthode de diffusion sur puits (Shiva et al.2013)

(1) *S.aureus*

(2) *E.coli*

**Shiva et al.2013**, ils ont remarqué La zone d'inhibition maximale était contre la bactérie *S.aureus* (18mm) que la bactérie *E.coli*(8mm). Ils ont trouvé que l'extrait de *Piper Nigrum*, présentait une plus grande d'activité contre les bactéries gram positives que les bactéries gram négatives.

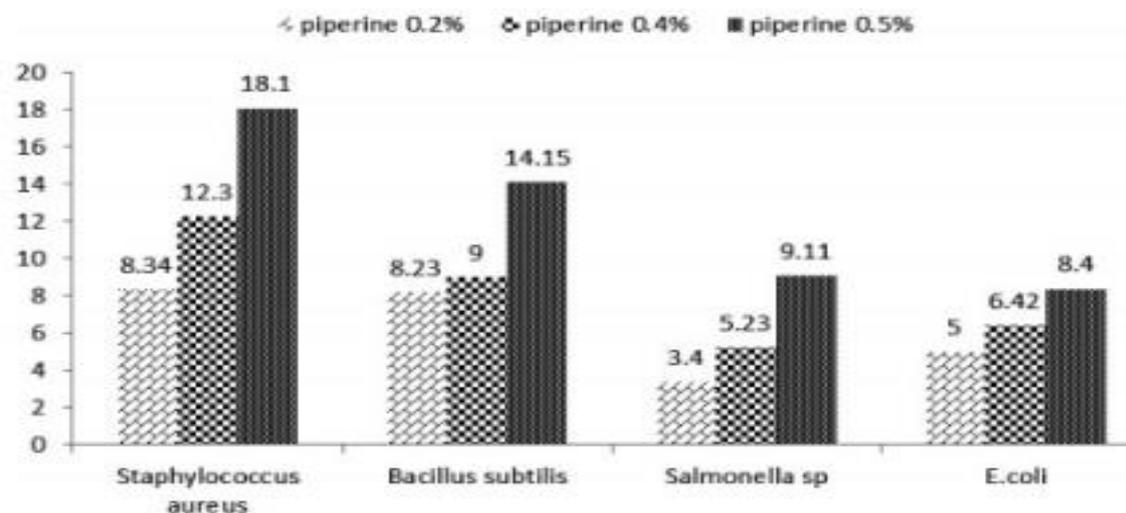
**Tableau 13.** Effet d'extrait de poivre noir sur la croissance des bactéries (shiva et al.,2013).

Nom de la bactérie	25ul	50ul	75ul	100ul
<i>S. aureus</i>	4	6	8	18
<i>B.subtilis</i>	6	8	9	14
<i>P.aeruginosa</i>	2	3	5	9
<i>E. coli.</i>	-	5	6	8

(-) : pas de croissance bactérienne.

**Shiva et al. (2013)**, ils ont travaillé sur l'activité antibactérienne de l'extrait de poivre noir contre les bactéries. La zone d'inhibition maximale était contre les bactéries Gram positif *S.aureus* (18mm) et *B.subtilis* (14mm) que les bactéries Gram négatif *P.aeruginosa*(9mm) et *E.coli*(8mm). La zone maximale d'inhibition était à 100ul pour

toutes les cultures bactériennes. Les résultats ont montré que la zone d'inhibition augmente à mesure que la concentration de poivre noir augmente (**Tableau 13**).



**Figure 10.** Effet inhibiteur de l'extrait de pipérine sur les bactéries (Dalia et al . ,2018).

Dalia *et al.* (2018) ils ont remarqué que l'activité antibactérienne de la pipérine de poivre noir augmente à mesure que les concentrations augmentent. Il soutient le point de vue de 3,4. En revanche, les zones maximales d'inhibition étaient enregistré avec à la fois de la pipérine de poivre noir à la concentration de 0,5% contre toutes les bactéries Gram positives (*S. aureus* et *B.subtilis*) avec des zones de 18,1 ; 14,15 ; 10,43 et 8,34mm, respectivement (Figure 10).

Dalia *et al.*(2018), ont mentionné que l'extrait de poivre noir avec toutes les concentrations n'a donné aucune zone d'inhibition contre toutes les espèces à Gram négatif .

L'activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif plus que les bactéries à Gram négatif à travers individuellement et par mélanges. La variation de l'inhibition entre les bactéries Gram positif et Gram négatif est due à la paroi cellulaire et à la membrane (Figure10)

**Tableau 14.**Activité antibactérienne de l'extrait de *piper nigrum* contre les bactéries (Kavitha et al .2017).

Extrait éthanolique (Zone d'inhibition en mm)	Extrait chloroforme Zone d'inhibition en mm)	Extrait d'étherdiéthylique Zone d'inhibition en mm)

<i>Bacille sp.</i>	18	18	10
<i>E. coli</i>	11	9	7
<i>S. aureus</i>	16	14	14

Kavitha *et al.* (2017), Ils ont étudiés sur l'activité antibactérienne contre trois souches bactériennes (*Bacille sp* , *E.coli* et *S.aureus*),ils ont trouvé que les trois extraits individuelles ainsi que des mélanges ,présentaient une plus grande d'activité contre les bactéries gram positives que les bactéries gram négatives ,et par l'ordre décroissant la sensibilité des souches sélectionnées de bactéries gram positives et gram négatives était *Bacille.sp* suivi *S.aureus* suivi *E.coli* (Tableau 15).

#### 4.6. Détermination de CMI et CMB

Les résultats finals des études qui réaliser par (Vani et al.2009 ; Gulten et al. 2017 ;Alka Sahrawat et al.2017) sur la concentration minimale inhibitrice des extraits de poivre noir sont résumés dans les tableaux suivants .

**Tableau 15.**Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait de *piper nigrum* en ppm(Vani et al.2009).

Les bactéries	CMI en ppm			
	Extrait acétone	extrait DCM	Extrait piperine	Ampicilline
<i>S .aureus</i>	125	125	250	0,98
<i>B. cereus</i>	250	62,5	250	125
<i>S.faecalis</i>	500	125	250	1,9
<i>P.aeruginosa</i>	62,5	125	250	0,98
<i>E.coli</i>	125	125	250	1,9
<i>K.pneumoniae</i>	125	125	250	1,9
<i>S. typhi</i>	250	250	250	15,625

A partir Vani et al. (2009), Ils ont travaillé sur l'activité antibactérienne du *Piper nigrum* contre certaine bactéries pathogènes Gram positives ( *S.aureus* ; *B.cereus* ; *S.faecalis* ), et grame négatives ( *E. coli* ; *P.aeruginosa* ; *K.pneumoniae* ; *S. typhi* ).ils ont mentionné que :

- l'extrait acétonique de poivre noir possède une excellente inhibition sur la croissance des bactéries Gram positives, *S.aureus* était plus sensible suivi de *B.cereus* et *Streptococcus*. Parmi les bactéries Gram négatif *P.aeruginosa* a été plus sensible au poivre noir suivi de *E. coli*, *K.pneumoniae* et *Salmonella*.
- l'extrait de pipérine est efficace contre les bactéries gram positives et négatives
- Alors L'extrait DCM de poivre noir a montré une bonne activité, inhibé à la fois les bactéries Gram positives et Gram négatives.
- Tandis que l'antibiotique standard (l'ampicilline) est efficace contre toutes les bactéries.

**Tableau 16.** Concentration inhibitrice minimale de *Piper nigrum* contre *K.pneumoniae* (Alka Sahrawat et al.2017).

Souches bactériennes	CMI contre les agents pathogènes en µl / ml			
	Méthanol	d'acétate d'éthyle	Chloroforme	Benzène
<i>K.pneumoniae</i>	$1,56 \times 10^{-6}$	$6,25 \times 10^{-4}$	$3,12 \times 10^{-5}$	$12,5 \times 10^{-3}$

Selon Alka Sahrawat et al. (2017), Ils ont travaillé sur l'activité antibactérienne du *Piper nigrum* contre une seule souche *K.pneumoniae* ont mentionné que l'extrait Benzène de *Piper nigrum* montré une excellente inhibition contre *Klebsiella*. Suiver respectivement l'extrait acétonique, extrait Chloroforme et l'extrait méthanolique (**Tableau 16**).

**Tableau 17.**Activité antibactérienne de poivre noir contre les souches bactériennes (Ram *et al.*, 2010)

Souches testées	Extrait de poivre noir			
	Dia	CMI	CMB	CMI/CMB
<i>E.coli</i>	49.66±1.15	0.78	0.78	1
<i>K.pneumoniae</i>	46.66±1.52	1.56	1.56	1
<i>P.aeruginosa</i>	15 ± 1.73	6.25	6.25	1
<i>S.aureus</i>	63.33±3.05	1.56	1.56	1

Note :

Dia = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné avec 5 µl Extrait de poivre noir.

CMI = Concentration Minimale Inhibitrice (mg /ml).

CMB = Concentration Minimale Bactéricide (mg /ml).

Ram *et al.* (2010), ils ont trouvé que, les diamètres d'inhibition de bactéries Gram négatif varient entre (49.66 ± 1.15 mm et 51.83 ± 2.56 mm) et entre (0.78 mg/ml et 1.56 mg/ml) pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Exception faite pour *P.aeruginosa* qui est moins sensible (DI = 15 ± 1.73 mm et CMI = 6.25 mg/ml), alors que *E.coli* et *K.pneumoniae* est la souche la plus sensible à l'extrait de poivre noir avec un DI = 8.33 ± 1.15 mm.

Les souches Gram positif sont également extrêmement sensibles : *S. aureus* est la souche la plus sensible avec un DI = 63.33 ± 3.05 mm.

Notant que les valeurs de CMB ont été les mêmes que celles des CMI excepté pour *K. pneumoniae* où CMB est égale à 3.125 mg/ml.

Les rapports CMB/CMI indiquent des valeurs inférieures à 4, ce qui prouve que l'huile Essentielle exhibe un effet bactéricide sur toutes les souches bactériennes testées

# **Conclusion**

## Conclusion

*Piper Nigrum L.* est considéré comme le roi des épices à travers le monde en raison de son principe piquant, la pipérine. La pipérine est l'alcaloïde majeur responsable des propriétés pharmacologiques antioxydant, antibactérienne, anti-inflammatoire ...etc.

Dans le présent travail, on a tenté de contribuer à la valorisation de cette plante aromatique qui est très utilisées en médecine traditionnelle pour leurs vertus thérapeutiques en établissant une relation entre leurs compositions chimiques et leurs activités biologiques.

L'extrait préparé par macération et soxhlet a donné un extrait brut de couleur verdâtre, avec une odeur très aromatique, ont rapporté que l'extrait méthanolique préparés par macération donnait un meilleur rendement d'extraction avec 24.87%.

D'après l'analyse quantitative de dosage spectrophotométrie (graine) de notre plante, montrent que le poivre noir est majoritairement les plus riches en Polyphénols totaux avec une teneur de (586.33µg EAG/mg)

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode des disques et la méthode de diffusion en puits a été fait, et d'après les résultats obtenus on peut constater que les bactéries gram positives présentent une sensibilité vis-à-vis le poivre noir que les bactéries gram négatives et donc on peut dire que cet épice a une activité antibactérienne importante.

On peut conclure de la présente étude que les extraits du poivre noir ont une bonne activité antibactérienne, Et peuvent être utilisés comme une source potentielle de composé antibactérien naturel. Cette étude nous a aidés comprendre l'importance de la médecine traditionnelle dans le traitement de différentes maladies infectieuses. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour l'identification de la molécule bioactive présente dans les extraits in vivo efficacité contre les microorganismes d'altération.

# **Bibliographie**

## Bibliographie

- Alka S, Siddarth N. Rahul, Sushil S. (2017). Poivre noir (Piper nigrum) Activité d'extrait de fruit contre certaines souches bactériennes pathogènes par la méthode de diffusion sur disque. 561-566
- Arina P, Laksmi A, Rika M. (2020). Test d'activité antibactérienne Extrait éthanolique à 70% de graines de poivre noir (Piper Nigrum L) Contre les bactéries Escherichia Coli Atcc 25922. *Journal of Physics*. 1-4
- Aurelian C., Irina R, Bogdan N. (2019). Aperçu de L'activité antibactérienne de la pipérine extraite de poivre noire IL. *Pharmacie*. 1105-1099
- Ayad W. (2014) Alkaloids and Phenolic Compound Activity of Piper Nigrum against Some Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicine and Biotechnology*. 20-28
- Sasikumar B, Johnson K. George, K. Saji, S. J. Anke, T. J. Zachariah. (2014). Two unique black pepper accessions with very long spikes from the centre of origin. 1-3.
- Chandan S, Santosh K. Singh, Gopal N,. (2011). Anti-mycobacterial activity of Piper longum L. fruit extracts against multidrug resistant Mycobacterium Spp. *International Journal of Phytomedicine*. 353-361
- Chen Y, Cheksum S. Tawan. (2020). Botany, Diversity, and Distribution of Black Pepper (Piper nigrum L.) Cultivars in Malaysia. *Borneo Journal of Resource Science and Technology*. 10-23
- Dalia M.. (2014). Activité antibactérienne de la pipérine et de l'huile de poivre noir. dans *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 877-880
- Gulten O, Mustafa V, Ali A, Olcay C. (2017). Les activités antibactériennes de Piper nigrum L. Contre les agents pathogènes de la mammite et ses antioxydants Activités. *Journal indien de l'enseignement et de la recherche pharmaceutiques*. 170-175
- Gurdip S, P Marimuthu, Ccatalan, MP Delampasona. (2004). Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1878-1884
- Hina F, Nisar A, Bilal H, Shahid F, Mohammad A, Mubarak A. (2012). Rôle biologique de Piper nigrum L. (Poivre noir). 1-10

- Hira S, Rejila H, Shilpa Sh, Shreeya A, Dinesh D, Srijana T, Kamil P. (2018). Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria. 1-6
- Kapoor N, Bandana S, Gurdip S, Carola S. (2009). Chemistry and in Vitro Antioxidant Activity of Volatile Oil and Oleoresins of Black Pepper (*Piper nigrum*). *American Chemical Society*. 5358–5364
- Janique L, Garry F, Mamdouh A. (2010). Activité antimicrobienne de produits naturels originaires du Nord de l'Ontario. 220-236
- Fabrice Y, Véronique N, Alain S. (2016). Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'*Eryngium foetidum* récolté dans la ville de Franceville. *Journal of Applied Biosciences*. :9886 -9893
- K. Vasavirama, Mahesh U. (2014). A Valuable Alkaloid From Piper Species. 34-38
- Kavitha S, Mani P. (2017). Activité antibactérienne de l'extrait de *Piper nigrum* Feuille. 1-9
- Kumar A. S, Vinay K.S. (2017). Biological action of *Piper nigrum* - the king of spices. *Journal européenne de la recherche biologique*. 11 :223-233
- Lan Zou, Yue, Ying Hu, Wen, Xue Chen. (2015). Antibacterial mechanism and activities of black pepper chloroform extract (12):8196–8203
- Majeed, Prakash.L. (2000). The Medicinal Uses of Pepper. *International Pepper News*. 23-31.
- Manisha N, Archana K, Urmila D. V, Charmi P, D Santani. (2011). Pharmacognostic, Phytochemical Analysis antimicrobial activity of two piper species. 1-4
- Mengliang Zh, Peter de B. Harrington, Pei Ch. (2015). Classification of Cultivation Locations of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) using Gas Chromatography and Chemometrics 145-151.
- Mirza Md, M. Moshfekus, M. Aminul, M. Matiur. (2018). Chemical, pharmacological and nutritional quality assessment of black pepper (*Piper nigrum* L.) seed cultivars. *Journal of Food Biochemistry* 1-21.
- Mohd. Sayeed A, Guteta B, Shiferaw D. (2014). Antimicrobial activity of *Piper nigrum* L. and *Cassia didymobotrya* L. leaf extract on selected food borne pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 911-919
- Murlidhar M, Goswami N. (2012). Chemical Composition, Nutritional, Medicinal and Functional Properties of Black Pepper. *Open Access Scientific Reports*. 1-5

N Bermawie, S Wahyuni, R Heryanto, I Darwati.(2019).Morphological characteristics, yield and quality of blackpepper Ciinten variety in three agro ecological conditions.*International Conference on Food Science & Technology*. 1-9.

Nagesh M, SamreenA. (2016).Antimicrobial Activity of Carica papaya, Piper nigrum andDatura stramonium Plants on Drug Resistant Pathogens Isolated from Clinical Specimens.*Journal of Biotechnology and Biochemistry*.56-61

Nisar A,HinaF , Bilal H.A, Shahid F, Mohammad A, Mubarak Al.(2012).Biological role of Piper nigrum L. (Black pepper). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*p.1-10

P. Ganesh, R. Suresh Kumar and P. Saranraj. (2014).Phytochemical analysis and antibacterial activity of Pepper (Piper nigrum L.) against some human pathogens.*Central European Journal of ExperimentalBiology*.36-41

P. Srinivasa Reddy, Kaiser Jamil, P. Madhusudhan, G. Anjani, B. Das.(2001).Activité antibactérienne des isolats de Piperlongum et Taxus baccata.*Biologie pharmaceutique*.236-238

Pavithra V. (2009).Activité antibactérienne du poivre noir (Piper nigrum Linn.) Avec référence spécialeà son mode d'action sur les bactéries.*Journal indien des produits et ressources naturels*.213-215

Pennapa Ch, Jintanaporn W, SupapornM. (2010).Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects againstneurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitivedeficit like condition of Alzheimer's disease.*Food and Chemical Toxicology*.798–802.

Rachmi F. H, Fakhrurrazi,Fadli A.(2020)Effect of Black Pepper Extract (Piper nigrum L) towards Streptococcus Mutans Growth. 3-17.

Ram Kumar P, PranayJain. (2010).Études Comparatives sur L'activité antimicrobienne du poivre noire (PIPER NIGRUM) et Turmérique (CURCUMA LONGA) extraits *Journal international de biologie appliquée et de technologie pharmaceutique* .501-492

SK Shiva R, Neeti S,Udaysree. (2013).Activité antimicrobienne du poivre noir (Piper nigrum L.).*Global Journal of Pharmacology* .87-90,

Suraj Sh, Nibedita Ch, Rajkumari S, Neera M. (2020) Analysis of Piperine in Black Pepper by High Performance LiquidChromatography.*Journal of Nepal Chemical Society*.8086

Wenxuechen , Lan Zou, Weijun Chen , Yueying Hu, Haiming Chen.(2018).Effects of Black Pepper (Piper nigrum L.) Chloroform Extracton the Enzymatic Activity and Metabolism of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Journal of Food Quality*.1-9

Zied Z, Emna B, Nadia B, Youssef G, Adel S.(2013).Activités antioxydantes et antimicrobiennes de divers extraits de solvants, pipérine etacide pipérique de Piper nigrum.*Science et technologie des aliments*.634-641.

Zoheir A, Aftab A.(2014).A Review on Therapeutic Potential of Piper nigrum L. (Black Pepper): The King of Spices.1-7

Zorica S, Milica P, Marina D, Ana A. (2019).Piperine-A Major Principle of Black Pepper: AReview of Its Bioactivity and Studies. 1-29

# **Annexes**

# Annexe

## Annexe 1 : Description des quelques souches bactérienne

- *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires, présentent dans la flore résidente de la peau de l'Homme et des animaux et de façon transitoire dans les autres flores. Morphologiquement, ce sont des Cocci à Gram positif Il a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$ , immobile, sporulégroupés en amas d'où l'origine de leur nom « *staphyle* » qui désigne la grappe de raisin en grec. Sont des germes peu exigeants, ils ont un métabolisme aérobie-anaérobie facultatif et se cultivent facilement sur les milieux usuels de laboratoire à 37°C, catalase positive (**Bergoet al.,2016**).

- *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est un bacille a Gram négatif aérobie-anaérobie facultatif, Oxydase -, catalase + lactose +, ONPG +, H<sub>2</sub>S -, Culture facile sur milieux ordinaires, lactoses, Culture Sur milieux solides après 18-24h les colonies sont arrondies, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre.

Appartenant a la famille des entérobactéries (*Enterobacteriaceae*) qui colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux. (**Danielleet al.,2015**)

- *Klebsiella pneumoniae*

Les espèces du genre *Klebsiella* sont des bactéries en forme de bâtonnet à Gram négatif(coloration bipolaire fréquente) de (0,3 à 1,0  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 0,6 à 6,0  $\mu\text{m}$  de longueur)et font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles se distinguent par leur immobilité constante, et leur groupement en diplobacilles. Elles sont souvent encapsulées et forment des colonies mucoïdes Les Klebsielles sont ONPG positives et VP positif(**Janda et al .2006**).

- *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis*, bactérie ubiquitaire à Gram positif, catalase positive, aérobie pouvant se développer en anaérobiose, mobile par des flagelles péritriches, formant des spores très résistantes dont l'élimination efficace nécessite des conditions particulières. Malgré le fait

qu'il s'agisse d'une bactérie à faible potentiel pathogène, elle peut donner lieu à de redoutables infections dans certains cas ou encore être à l'origine d'une intoxication alimentaire. (**Bouhairiet al.,2017**)

- ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif ubiquitaire, présent notamment dans le sol et dans les milieux aquatiques, non sporulant de forme droite ou légèrement courbée. Il mesure de 1 à 5 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large. Bien que ce pathogène, ayant un métabolisme oxydatif, non fermentaire, aérobic stricte, plusieurs isolats ont montré une capacité à croître en milieu anaérobic. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie mobile grâce à la présence d'un flagelle monotrichepolaire. Cette bactérie est catalase positive et oxydase positive. Elle possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie mésophile capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 4 à 45°C (**kamalet al.,2011**).

## ملخص

اللفل الأسود، الاسم العلمي *Piper nigrum Linnaeus* هو نبات طبي قيم. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا عن طريق طريقة الانتشار على القرص وطريقة الانتشار في آبار مستخلص الفلفل الأسود. أعطى المستخلص المحضر بالنقع والتنعيم محلولاً خاماً ذو لون مخضر ورائحة عطرية جداً. ، أفاد بأن المستخلص الميثانولي المحضر بالنقع أعطت محصول استخلاص أفضل بنسبة 24.87%. وفقاً للتحليل الكمي ، أظهر الفحص الضوئي (البذور) لنباتنا أن الفلفل الأسود هو الأغنى بشكل أساسي في البوليفينول الكلي بمحتوى (586.33 ميكروغرام ملغ). تم إجراء دراسة النشاط المضاد للبكتيريا على السلالات البكتيرية ، وتشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن جميع مستخلصات الفلفل الأسود قد ثبت أنها مثبطة بشكل فعال ضد السلالات التي تم اختبارها وهي أكثر نشاطاً على البكتيريا موجبة الجرام وليست نشطة جداً في البكتيريا سالبة الجرام.

الكلمات المفتاحية: Soxhlet، مادة البوليفينول ، النشاط المضاد للبكتيريا ، الفلفل الأسود ، *Piper nigrum L*

## Résumer

Le poivre noir, le nom scientifique *Piper nigrum Linnaeus*, est une plante médicinale précieuse. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disque et la méthode de diffusion en puits de l'extrait du poivre noir. L'extrait préparé par macération et soxhlet a donné solution brut de couleur verdâtre, avec une odeur très aromatique, ont rapporté que extrait méthanolique préparés par macération donnait un meilleur rendement d'extraction avec 24.87%. D'après l'analyse quantitative le dosage spectrophotométrique (graine) de notre plante, montrent que le poivre noir est majoritairement les plus riches en Polyphénols totaux avec une teneur de (586.33µg EAG/mg). L'étude de l'activité antibactérienne a été effectuée sur les souches bactériennes Les résultats obtenus indiquent que tous les extraits de poivre noir se sont révélés activement inhibitrices vis à vis les souches testées, et sont beaucoup plus actives sur les bactéries à Gram positif et peu actives sur les bactéries à Gram négatif.

**Mots clés :** *Piper nigrum L*, Polyphénols totaux, activité antibactérienne, poivre noir, soxhlet.

## Summary

Black pepper, the scientific name *Piper nigrum Linnaeus*, is a valuable medicinal plant. The objective of this study is to evaluate the antibacterial activity by the method of diffusion on disc and the method of diffusion in wells of the extract of black pepper , The extract prepared by maceration and soxhlet gave crude color solution greenish, with a very aromatic odor, reported that methanolic extract prepared by maceration gave a better extraction yieldwith 24.87%. According to the quantitative analysis the spectrophotometric (seed) assay of our plant, show that black pepper is mainly the richest in total polyphenols with a content of (586.33µg EAG / mg). The study of the antibacterial activity was carried out on the bacterial strains The results obtained indicate that all the blach pepper extracts were found to be actively inhibitory withe respect to the strains tested, and are much more active against Gram-positive bacteria and not very active on Gram-negative bacteria.

**Key words :** *Piper nigrum L*, Total polyphenols, antibacteri alactivity, black pepper, soxhlet.