

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Université Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physiologie végétale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا و فيزيولوجيا النبات

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biologie et physiologie végétale (Biodiversité / Reproduction)

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antifongique
de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L.

Présenté par :

BESSIKRI ines

Le 22/06/2022

BENZEGHDA youssra

BOUTROUF rayane

Jury d'évaluation :

Encadreur : CHIBANI Salih (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : BAKA Moubarek (Pr - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : DJERROUNI Aissa (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année Universitaire:

2021-2022

Remerciement

On remercie dieu le tout puissant de nous à voir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Dr SALIH CHIBANI**, MCA à l'Université Frères Mentouri Constantine 1. On le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nous sommes conscients de l'honneur que nous a fait Mr **M.BAKA** Pr - Université Frères Mentouri, Constantine 1. en étant président du jury et **A.DJERROUNI** MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1. D'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Notre remerciement s'adresse également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

*Remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenue. Nous exprimons aussi nos remerciements et notre gratitude à **MME Boukabache Meriem**, pour leur encouragement et leur aides précieuse durant toute la période de notre travail.*



Dédicace

Avant tout chose, je dédie le **Dieu**, le tout puissant
Pour m'avoir donné la force et la patience.

À ma belle mère **Leila** et mon beau père **Abdelhamid**
Source de vie, d'amour et d'action

Je leur dédie avec fierté ce travail qui reflète les fruits de l'éducation et
l'attention qu'ils m'ont tant donnée, et je suis très reconnaissant et adore
partager avec eux la joie de ma réussite.

À mes belles sœurs **Imane, Rania**

Source de joie et de bonheur, qui m'ont toujours soutenu et encouragé
durant ces années d'études.

À toute ma grande famille (**Bessikri, Boukhetouta**)

À mes adorables amies : **Khawla, Lina, Hassna**
Pour votre fidèle amitié et les bons moments passés ensemble.

À mes chers binômes **Youssra, Rayane**
Avec qui j'ai partagé des moments de joie mais aussi de difficultés au
cours de la réalisation de notre travail.

À toutes personnes qui m'a aidé d'un mot, d'une idée ou d'un En-
couragement. Je dis

« **Merci** ».

INES

Dédicace

Je commence mon discours en remerciant **Dieu** qui m'a permis d'atteindre ce que je suis maintenant.

Je dédie ce travail :

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui :

Particulièrement **A** mon très cher père **Noureddine** tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A mon très chère mère **Chahrazed** qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mon grand-père **Moustapha** et mes grand-mères **Nedjma** Merci pour tout et que **Dieu** vous donne bonne santé et longue vie parmi nous.

Mon chère frère et sœurs pour leur dévouement, leur compréhension et leur grande tendresse, qui en plus de m'avoir encouragé tout le long de mes études, m'ont consacré beaucoup de temps et disponibilité, leurs conseils et leur amour : **Oussama, Imene, Roumeissa, Ahlam** et la femme de mon frère **Oumnia**.

A ma petite princesse **Julia**.

A tous ma famille mes tantes et oncles paternels et mes tantes et oncles maternel surtout : **Saloua, Warda, Sabah, Amina, Wahida**.

Cousines au goût de sœurs surtout : **Ikram, Fifa**.

Ames chères binômes **Ines, Rayan** qui en la patience de me supporter durant ce mémoire, et qui m'a soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles vécus

A mes amis :

Amel, Bouchra, Safa, Rania, Meriem, Naima, Racha, Ines, Rayane, Hayam, Nessrine.

En souvenir des moments heureux passés ensemble, avec mes vœux sincères de réussite, bonheur, santé et de prospérité.

A mes chers amis qu'on a étudiés ensemble et ceux que j'ai rencontré à Mon parcours scolaires avec vous j'ai passé de très beaux moments.

YOUSSRA





Dédicace

Avec la générosité et l'aide d'**ALLAH** Le majestueux qui m'a donné la patience, le courage et la santé, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

Aucune dédicace ne serait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma reconnaissance pour mes parents **Azzedine** et **Warda** qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études, pour tous les sacrifices qu'ils ont consenti pour mon instruction et mon bien être, j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que **DIEU** vous protège et vous garde en bonne santé

À mon cher frère **Wassim** Merci de m'avoir soutenu tant moralement que matériellement pour que je puisse attendre mon but. Je lui souhaite une vie pleine de bonheur.

À mes très chères frères et sœurs : **Hamza, Mehdi, Zakiet Manel** et **Omayma** pour leur appui, encouragements et pour leur aides incessante.

À mes trinômes et mes amies **Yousra** et **Ines** Merci énormément pour tes soutiens moraux, vos patiences et vos compréhensions tout au long de ce projet.

À mes chères copines **Foufa** et **Lina**, Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de réussite et que dieu vous les protégées pour moi.

À mes adorables amies: **Suzy, Racha, Amira, Iness, Asrar, Rayen Nesrine, Yousra** et **Hayam**. Merci pour vos aides, vos soutiens et la motivation que vous m'avez offert durant toutes mes années universitaires.

À mon cher **Saber** que je remercie pour son soutien et sa patience.

À mes chers amis qu'on a étudiés ensemble et ceux que j'ai rencontré à Mon parcours scolaires avec vous j'ai passé de très beaux moments.

À tous ceux qui me sont chers.

RAYANE

Liste des figures

Figure 1: Répartition géographique de la famille des Malvacées.....	6
Figure 2: Variations de l'androcée, du gynécée et du fruit des Malvacées.	7
Figure 3 Organisation générale des <i>Malvacées</i>	7
Figure 4: la plante d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	8
Figure 5: Les grains d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	10
Figure 6: Fleur et fruit d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> .L.....	10
Figure 7: Répartition géographique d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	11
Figure 8: jus de bissap (Source: alsagarden.com).	13
Figure 9: Thé d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> .L (BAHAELDEEN, 2012).	14
Figure 10: Structure chimique des quinones.....	23
Figure 11: structure chimique des anthraquinones.....	24
Figure 12: Squelette de base des flavonoïdes (Girotti-Chanu, 2006).	25
Figure 13: squelette d'anthocyanes (Kueny-Stotz, M. 2008).....	27
Figure 14: Structure chimique (A) Tanin condensé (proanthocyanidine), (B)	28
Figure 15: Schéma explicatif du phénomène du stress oxydatif (Bonnefont R.2007).....	34
Figure 16: Structure de l'ABTS.....	37
Figure 17: La forme réduite ABTS et la forme radicale de cation ABTS.....	38
Figure 18: La forme réduite DPPH et la forme radical DPPH•(POPOVICI et al., 2009).....	38
Figure 19: Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (CONGO, 2012).....	39
Figure 20: Structure de Phénanthroline.	40
Figure 21: champignon <i>Aspergillus ochraceus</i>	43
Figure 22: champignon <i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i>	43
Figure 23: Protocole d'étude expérimentale.	47
Figure 24: Les feuilles sèches d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	48
Figure 25: Le broyage.	48
Figure 26: le poudre végétale.	49
Figure 27: Extraits étheriques, chloroformiques et méthanoliques de la plante	49
Figure 28: Le macérât hydro-méthanolique.....	50
Figure 29: Filtration du macérât hydro-méthanolique.....	51

Figure 30: Evaporateur rotatif.	51
Figure 31: L'extrait brut des fleurs d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	52
Figure 32: préparation de l'extrait.	55
Figure 33: l'extrait au bain marie à 85°C pendant 20 min.	55
Figure 34: principe de chromatographie.	56
Figure 35: les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM.	57
Figure 36: plaque de CCM.	57
Figure 37: Dépôt des échantillons.	58
Figure 38: développement de la plaque.	59
Figure 39: Observation des chromatogrammes.....	59
Figure 40: préparation de milieu de culture PDA.	62
Figure 41: écoulement des boîtes.	63
Figure 42: la mise des disques fongiques.	63
Figure 43: Résultats de criblage des flavonoïdes.....	66
Figure 44: Résultats de criblage des anthocyanes.....	67
Figure 45: Résultats de criblage des Tanins galliques.....	67
Figure 46: Résultats de criblage des coumarines.	69
Figure 47: Résultats de criblage des stérols, stéroïdes.	69
Figure 48: Résultats de criblage des stérols, stéroïdes.	69
Figure 49: Résultats de criblage des Alcaloïdes.....	70
Figure 50: Résultats de criblage des Alcaloïdes par CCM.....	71
Figure 51: La plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) de l'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	73
Figure 52: courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait.....	74
Figure 53: courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de Trolox et Ascorbic acid.	75
Figure 54: histogramme représentant les valeurs des CI50 de l'extrait et standards obtenus par le test DPPH.....	76
Figure 55: La plaque de dosage de l'activité du piégeage du cation radical ABTS ^{•+} de l'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	76
Figure 56: courbe des pourcentages d'inhibition du radical ABTS en fonction de la concentration de l'extrait.....	77
Figure 57: courbe des pourcentages d'inhibition du radical ABTS en fonction de la concentration de Trolox et Ascorbic acid.	78

Figure 58: histogramme représentant les valeurs des CI50 de l'extrait et standards obtenus par le test ABTS.....	78
Figure 59: La plaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² - phénantroline par l'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	79
Figure 60: Courbe d'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait phénanthroline.....	80
Figure 61: courbe d'absorbance en fonction de concentration Phénanthroline de Trolox et Ascorbic acid.	81
Figure 62: Histogramme représentant les valeurs des A0.5 de l'extrait et standards obtenus par le test phénanthroline.	81
Figure 63: La plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (FRAP) de l'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	82
Figure 64: courbe d'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait (FRAP).....	83
Figure 65: courbe d'absorbance du (FRAP) en fonction de la concentration de Trolox et Ascorbic acid.	83
Figure 66: histogramme représentant les valeurs des A0.5 de l'extrait et standards obtenus par le test (FRAP).	84
Figure 67: La plaque de dosage de l'activité silver nanoparticle (SNP) par l'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	84
Figure 68: courbe d'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait (SNP).	85
Figure 69: courbe d'absorbance en fonction de la concentration de Trolox et Ascorbic acid.	86
Figure 70: histogramme représentant les valeurs des A0.5 de l'extrait et standards obtenus par le test SNP.....	86
Figure 71: Activité antifongique de l'extrait MeOH d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L., vis-à-vis des champignons phytopathogènes : <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Fusarium oxysporium</i>	88
Figure 72: Activité inhibitrice in vitro de l'extrait méthanolique d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L., sur la croissance radiale de <i>Fusarium oxysporium f.Sp Albedinis</i> après 7 jours d'incubation sur milieu PDA.	89
Figure 73: Activité inhibitrice in vitro de l'extrait méthanolique d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L., sur la croissance radiale de: <i>Aspergillus ochraceus</i> après 7 jours d'incubation sur milieu PDA.....	89

Liste des tableaux

●Tableau N° 1: classification de l'espèce <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	11
●Tableau N° 2: Classification phylogénétique d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> .L APG III	12
●Tableau N° 3: mécanisme d'action de quelques antioxydants.....	36
●Tableau N° 4: Résultats des criblages des composés phénoliques.....	68
●Tableau N° 5: Résultats de criblages des sterols, steroïdes et triterpènes.	70
●Tableau N° 6: Résultats de criblages des Alcaloïdes.....	71
●Tableau N° 7: Visualisation des chromatogrammes prise sous UV (254 et 366nm) pour l'extraits EMHS.	72
●Tableau N° 8: Inhibition du radical DPPH par l'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. ...	74
●Tableau N° 9: Inhibition du cation radical ABTS ^{•+} par l'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	77
●Tableau N° 10: Inhibition du Phénanthroline par l'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	80
●Tableau N° 11: Inhibition du pouvoir réducteur (FRAP) par l'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	82
●Tableau N° 12: Inhibition du silver nanoparticle (SNP) par l'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	85
●Tableau N° 13: Taux d'inhibition et diamètre moyen des thalles exposés aux extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	87

Liste des abréviations

%.	Pourcentage
[C]	Concentration
°C	Degré Celsius
A_{0.5}	Concentration indiquant 0,50 d'absorbance
ABTS	2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).
CCM	Chromatographie sur couche mince
CHCl₃	Chloroforme
Cm.	Centimètre
DPPH	α,α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl
EMHS	Extrait méthanolique <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.
FRAP	Pouvoir réducteur
g	Gramme
H₂SO₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
mg	Milligramme
min	Minute
Na Cl	Chlorure de sodium
nm	Nanomètre
pH	Potentiel hydrogène

s	Seconde
SNP	Silver nanoparticle
TCA	Tri-chloro acetic acid
Trolox	Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique
UV	Ultra-violet
μl	microlitre

Sommaire

Introduction générale	1
1^{er} Partie.....	4
Chapitre I : Etude botanique.....	5
I. La plante <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	6
I.1 La famille des malvacées :	6
I.1.1 Classification et phylogénie :	6
I.2 L'espèce <i>Hibiscus sabdariffa</i>.L :.....	8
I.2.1 Généralités :.....	8
I.2.2. Dénomination :	8
I.2.3 Description botanique :	9
I.2.4. L'écologie:.....	10
I.2.5. Origine et répartition géographique :.....	11
I.2.6. Classification :	11
I.2.7. Domaines d'utilisations d' <i>H.sabdariffa</i> L:	13
Chapitre II : Métabolite secondaire.....	16
Introduction	17
I. Généralités sur les métabolites secondaires	18
I.1. Les métabolites secondaires	18
I.2. Synthèse de métabolites secondaires chez les végétaux.....	18
I.3. Fonction de métabolisme secondaire	19

I.4. Classification des métabolites secondaires	19
I.4.1. Les composés phénoliques	19
II. Les activités biologiques des composés phénoliques.....	20
II.1 Rôle des composés phénolique	21
II.2 Les principales classes de composés phénoliques :.....	22
II.2.1- Les polyphénols	22
II.3. Les stérols :	29
Les stérols végétaux dans les aliments	29
II.4. Les terpènes	29
II.5. Les saponosides	30
II.6. Les alcaloïdes.....	30
Chapitre3 : Les Activités Biologiques.....	32
I. Activité antioxydante:	33
Historique:	33
I.1. Définition du stress oxydant :	33
I.2. Définition d'un antioxydant :.....	34
I.3. Mécanisme d'action des antioxydants	36
I.4. Les maladies liées au stress oxydant	37
I.5. Quelques méthodes de dosage des antioxydants.....	37
I.5.1. Méthode L'ABTS:	37
I.5.2. Méthode DPPH.....	38
I.5.3. Méthode phenanthroline :	40
I.5.4. Méthode Reducing power :	40
I.5.5. Methods Silver Nanoparticle (SNP) assay :.....	41
II. L'activité antifongique :.....	41

2^{ème} Partie..... 44

Chapitre I : Matériel et Méthodes 45

I. Matériel et méthodes..... 46

Protocole d'étude phytochimique 46

I.1. Matériel végétal: 47

a.1. Principe :..... 50

a.2. Protocole 50

I.2. screening phytochimique:..... 52

I.2.1. Criblage des Quinones: 52

I.2.2. Criblage des Anthraquinones: 52

I.2.3. Criblage des flavonoïdes: 53

I.2.4. Criblage des Tanins: 53

I.2.5. Criblage des Alcaloïdes : 53

I.2.6. Criblage des Coumarines: 54

I.2.7. Criblage des stérols, stéroïdes et triterpènes: 54

I.2.8. Criblage des saponosides: 54

I.2.9. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM): 56

I.3 Evaluation des activités biologiques: 59

I.3.1 Etude de pouvoir antioxydant : 59

I.4. Evaluation de l'activité antifongique:..... 62

II. Protocole expérimentale 63

Chapitre II : Résultats et Discussion..... 65

III. Résultats et discussion 66

III.1. Screening phytochimique: 66

III .1.1. Criblage des composés phénoliques:	66
III .1.2. Criblage des stérols, stéroïdes et tri-terpènes	69
III.1.3 Cribbage des saponosides:.....	69
III .1.4. Criblage des Alcaloïdes:.....	70
III.1.5. Chromatographie sur couche mince CCM:.....	71
III.2. Les activités antioxydantes.....	73
III .2.1. Activité antiradicalaire DPPH	73
III .2.2.activité du piégeage du cation radical ABTS•+.....	76
III .2.3.Activité – Phénanthroline	79
III .2.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP).....	82
III .2.5 Activité silver nanoparticle (SNP) :	84
III.3. Résultats des essais antifongiques à la croissance mycélienne de deux champignons testés :	87
III.3.1. Effet de l'extrait MeOH d'Hibiscus sabdariffa L., sur la croissance mycélienne d'Aspergillus ochraceus et Fusarium oxysporium f. Sp Albedinis:	87
Conclusion	90
Références Bibliographiques	93
Résumé.....	101

The image features a decorative border with a repeating geometric pattern in a dark red color. In the center, there are several abstract, layered shapes in shades of red and brown, resembling folded paper or overlapping planes. The text is centered within these shapes.

Introduction générale

Introduction générale

Depuis plusieurs années, l'homme qui vit côte à côte avec les plantes, est habitué à les consommer pour leurs propriétés nutritives et médicinales. Les produits naturels issues de végétaux présentent un grand intérêt destiné comme matière première aux différents secteurs d'activités tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, la phytosanitaire et l'industrie. (Selles, 2012). Les plantes médicinales jouent un rôle important dans la prévention et le traitement des maladies humaines. Cette relation entre les plantes et l'homme s'est développée au fil des décennies et devenue une tradition, à cause de leur potentielle pharmacologiques (Shakya, 2016).

Les plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels, attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structures chimiques et qui possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (Mostafa *et al*, 2018).

Certaines métabolites secondaires sont des antioxydants naturels tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tanins dans les plantes peut fournir une protection contre un certain nombre de maladies, et leur utilisation a été inversement associée à la morbidité et à la mortalité dues aux troubles dégénératifs (Baba et Malik, 2015).

Les plantes médicinales sont une bonne source de produits naturels pouvant avoir une activité antioxydante, anti-alzheimer, anti-inflammatoire et antifongique en raison de leur richesse en métabolites secondaires tels que les terpènes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. (Shakya, 2016)

Parmi ces plantes les plus utilisées l'*Hibiscus sabdariffa* L. qui est une plante maraîchère de la famille des *Malvacées*. Elle est principalement cultivée pour des raisons thérapeutiques. Les infusions de cette plante sont recommandées dans les traitements de cholestérol, de tension artérielle et de diverses infections microbiennes et comme un antiseptique et cardiorégulatrice. En alimentation, elle est consommée comme légumes, boisson, confiture etc. (LEPENGUE Alexis Nicaise, 2011).

Dans ce contexte, nous avons pour objectif d'apporter notre contribution concernant le screening phytochimique et l'évaluation des activités antioxydante et antifongique de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L.

Nos travaux de mémoire sont divisés en deux parties. La première partie comprend trois chapitres

- ✚ **Le premier chapitre** est consacré à l'étude bibliographique : la description botanique de la famille *malvacées* et du genre *Hibiscus* et l'utilisation dans la médecine traditionnelle.
- ✚ **Le deuxième chapitre** : porte sur l'étude des métabolites secondaires (composés phénoliques, terpènes et alcaloïdes)
- ✚ **Le troisième chapitre** : concerne les activités biologiques, l'activité antioxydante et l'activité antifongique.
- ✚ **La deuxième partie** comprend deux chapitres le premier chapitre illustre : matériel et méthodes. Enfin le dernier chapitre présente les résultats obtenus et leur discussion, suivie d'une conclusion générale.

The page features a decorative border with a repeating geometric pattern in the corners. In the center, there are several abstract, overlapping shapes in shades of brown and maroon, resembling folded paper or geometric folds. The text is centered within this composition.

Première Partie

Etude bibliographique

The page features a decorative border with a repeating geometric pattern in a dark brown color. In the center, there are several abstract, layered shapes in shades of brown and dark brown, resembling folded paper or geometric forms. The text is centered within these shapes.

Chapitre I : Etude botanique

I. La plante *Hibiscus sabdariffa* L.

I.1 La famille *des malvacées* :

Les *Malvacées* représentent une grande famille de plantes à fleurs qui contient 244 genres et 4225 espèces différentes, dont font partie l'Hibiscus, tilleul, guimauve, baobabs, coton et le cacao. On les trouve un peu partout dans le monde, à l'exception des régions froides, mais surtout dans les régions tropicales d'Amérique du Sud. Les *Malvacées* sont des herbes ou des arbustes, plus rarement des arbres ou des lianes. Les feuilles sont alternées et possèdent des stipules. Les tiges contiennent des canaux muqueux. Les fleurs sont souvent solitaires, bisexuelles ou unisexuées, comprenant 5 pétales soudés. Les fruits sont des capsules ou des noix. La majorité des espèces se fait polliniser par des insectes. Les *Malvacées* sont extrêmement importantes dans l'agriculture (conservation-nature.fr).



Figure 1: Répartition géographique de la famille *des Malvacées*.

I.1.1 Classification et phylogénie :

Les *Malvaceae* sont classiquement proches des Tiliacées, mais en diffèrent par leurs anthères uniloculaires et leur androcée monadelphie. Elles représentent probablement un climax descendant du stock ancestral des Tiliaceae.

La classification des *Malvaceae* pose de nombreux problèmes et les opinions diffèrent quant à la délimitation des genres et des tribus.

La plupart des systèmes modernes reconnaissent cinq tribus:

Chapitre I : Etude botanique.

- Les *Malopeae* possèdent deux verticilles de carpelles, qui sont superposés ou disposés en spirales: Malope, Palaua, Kitaibelia...
- Les *Hibisceae* ont des fruits capsulaires et des carpelles persistants : Hibiscus, Gossypium...
- Les *Malvacées* ont des fruits schizocarpiques et des stigmates décurrents sur les ramifications
 1. du style : Malva, Malvastrum, Lavatera, Althaea, Sidalcea ; Hoheria...
- Les *Abutilae* ont des fruits schizocarpiques et des stigmates apicaux ou subapicaux : Abutilon, Sphaeralcea, Modiola, Sida...
- Les *Ureneae* ont des ramifications du style et des stigmates deux fois plus nombreux que les carpelles : Malvastrum, Pavonia, Urena.. (plantes-botanique 2006).

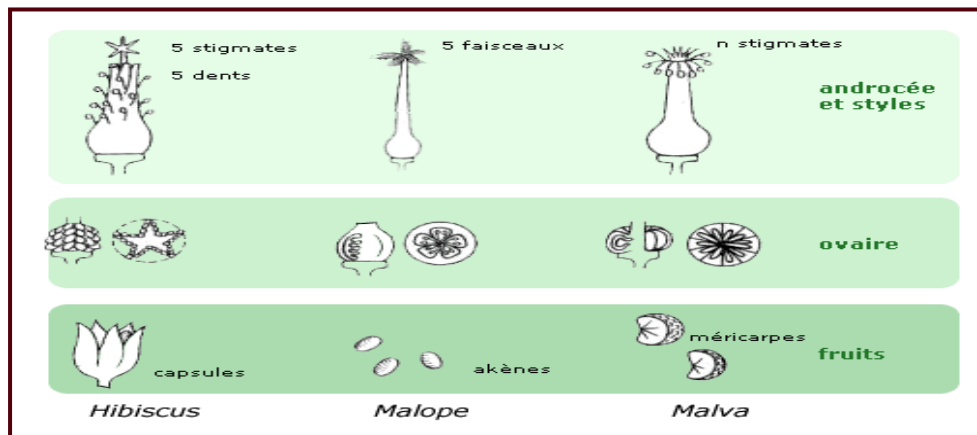


Figure 2: Variations de l'androcée, du gynécée et du fruit des *Malvacées*.
(Source : https://www.plantes-botanique.org/famille_malvaceae)

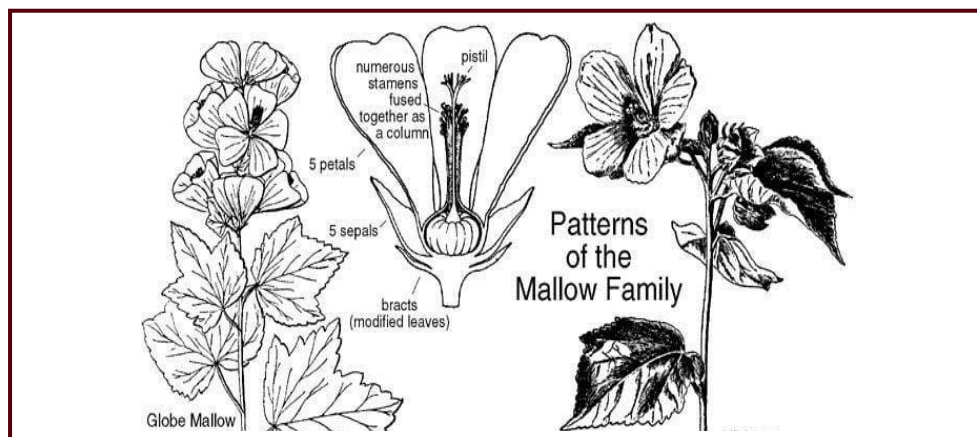


Figure 3 Organisation générale des *Malvacées*.
(Source : <https://nanopdf.com/download/malvacees-botagora>)

I.2 L'espèce *Hibiscus sabdariffa* L.



Figure 4: la plante d'*Hibiscus sabdariffa* L.

(Source : <https://lavierebelle.org/hibiscus-sabdariffa-roselle-bissap>)

I.2.1 Généralités :

L'*Hibiscus* comporte une diversité d'espèces, dont plus de 300 espèces sont réparties dans les régions tropicales et subtropicales du monde entier. L'*Hibiscus sabdariffa* L est une espèce largement employée dont elle est composée de plusieurs parties : les calices (contiennent des colorants rouges, utilisée comme nourritures, colorants, boissons), les fleurs, les feuilles, les racines et les tiges. Certaines variétés de cette plante sont employées en tant que Plantes ornementales (V.H.Shruthi, 2016).

Ainsi, recommandée contre l'hypertension et le cholestérol, est utilisée comme un antiseptique urinaire, ces fleurs remédient aux douleurs menstruelles, la racine est utilisée pour calmer le toux, comme elle est utilisée le plus souvent dans l'alimentation y a compris les calices rouge charnus pour faire sirop, jus, vin, confiture, pudding, gâteaux, crème glacée ou thé (AL-HASHIMI, 2012).

I.2.2. Dénomination :

- **Nom Scientifique:** *Hibiscus sabdariffa* L.
- **Arabe:** الكركدية.
- **Française:** Oseille de Guinée.
- **Anglaise:** Roselle.
- **Mexique:** la flore de Jamaïque.

- **Africaine:** Karkadé, Bissap.
- **Thaïlandaise:** Kra-chiap.
- **Allemagne :** Rosellahan.
- **Autres dénominations :** thé rose, thé de l'Empire (**ENDRIAS, 2006**).
- **Préparations et formes d'utilisations:** jus, infusions, tisanes.

I.2.3 Description botanique :

Hibiscus sabdariffa L. est une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des Malvaceae. Elle est largement distribuée dans les zones tropicales et subtropicales et est connue sous divers noms en français : oseille de Guinée, oseille rouge, thé rose d'Abyssinie, karkadé ou carcadé, roselle ou bissap. Au Burkina Faso, cette plante est abusivement appelée oseille en français. En mooré on l'appelle bidgo (singulier) ou bito (pluriel) et en dioula dâ ou dâkumu (**Abu-Tarboush et al, 1997 ; Morton, 1987; Nacoulma-Ouédraogo, 1996**).

Hibiscus sabdariffa L. est décrit comme une plante qui peut atteindre 1 à 2 m de haut et plus suivant les types de l'espèce et les modes de culture . Sa tige robuste est verte ou rouge, glabre ou hispide selon les variétés. Elle porte des feuilles alternes dont le limbe présente un polymorphisme relatif ; il est généralement trilobé et denté. Les fleurs , réparties le long de la tige ont de 7 à 10 cm de diamètre ; elles sont axillaires de couleur jaune-crème possédant une corolle à cinq pétales et un calice à cinq sépales qui prennent la couleur de la tige.

Au Burkina Faso la plante *d'H. Sabdariffa* est communément cultivée en bordure des champs de brousse et dans les champs autour des habitations. Elle est également exploitée en culture maraîchère. Les variétés blanche et rouge sont les plus emblavées et leur culture est essentiellement réalisée pour la fourniture de légumes condiments. (**Omobuwajo et al., 2000**)



Figure 5: Les grains d'*Hibiscus sabdariffa* L.

(Source: <https://lavierebelle.org/delicieux-hibiscus-sabdariffa>)



Figure 6: Fleur et fruit d'*Hibiscus sabdariffa* L.

(Source : <https://www.visoflora.com/photos-nature/photo-hibiscus-sabdariffa-fleur-et-fruit.html>)

I.2.4. L'écologie:

Elle ne supporte pas le froid. La croissance de la plante s'arrête à 14 °C et elle meurt alors au bout de 15 jours. A 10 °C, la mort survient au bout de 2–3 jours seulement. La production de fleurs et de calices diminue en dessous de 17 °C. Les cotylédons ne supportent pas les températures inférieures à 10 °C pendant plus de 2–3 heures. La roselle est souvent implantée en association avec d'autres espèces telles que le mil, le sorgho, l'arachide, la patate douce, l'igname ou le niébé, et on laisse souvent pousser des plantes spontanées de roselle parmi d'autres cultures.

I.2.5. Origine et répartition géographique :

Hibiscus sabdariffa L. est probablement originaire d'Afrique, où il pourrait avoir été domestiqué au Soudan il y a environ 6000 ans, d'abord pour ses graines et ensuite pour la production de feuilles et de calices. Au XVII^e siècle, des types légumiers furent introduits en Inde et aux Amériques. C'est en Asie, où la culture est signalée depuis le début du XX^e siècle, que la sélection pour la production de fibres a eu lieu (Inde, Sri Lanka, Thaïlande, Malaisie et Java). La roselle est présente aujourd'hui dans toutes les régions tropicales. En Afrique tropicale, elle est commune en particulier dans les zones de savane d'Afrique occidentale et centrale. On la rencontre souvent comme plante échappée des cultures. Mais des spécimens d'apparence vraiment sauvage d'*Hibiscus sabdariffa* L ont été récoltés au Ghana, au Niger, au Nigeria et en Angola. (Boonkerd, T 1993)

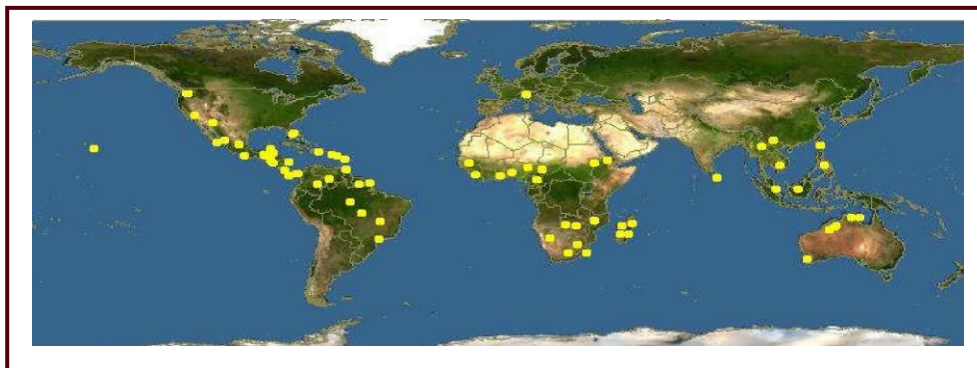


Figure 7: Répartition géographique d'*Hibiscus sabdariffa* L.

I.2.6. Classification :

- **Tableau N° 1:** classification de Cronquist de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L.

Règne	Plantae
Sous-règne	Viridiplantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Diléniidées

Chapitre I : Etude botanique.

Ordre	Malvales
Famille	Malvacées
Genre	<i>Hibiscus.</i>
Espèce	<u><i>Hibiscus sabdariffa L.</i></u>

● **Tableau N° 2:** Classification phylogénétique d'*Hibiscus sabdariffa L.* APG III .

Règne	Archéplastides
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies
Clade	Noyau des Dicotylédones vraies
Clade	Rosidées
Clade	Malvidées
Ordre	Malvales
Famille	Malvacées
Sous-famille	Maloidées
Genre :	<i>Hibiscus.</i>
Espèce :	<u><i>Hibiscus sabdariffa L.</i></u>

I.2.7. Domaines d'utilisations d'*H.sabdariffa* :

Toutes les parties d'*Hibiscus* (calice, tige, feuille) sont utilisées soit dans l'alimentation, soit dans la médecine traditionnelle, soit dans l'industrie textile.

- Utilisations alimentaires :

L'espèce d'*H.sabdariffa* est utilisée dans l'alimentation humaine et dans l'industrie Agroalimentaire. La plante est exploitée pour ses calices, feuilles et graines. Les Calices qui sont parfois appelés « fleurs d'Hibiscus », connus comme la partie de la plante la plus exploitée dans l'alimentation humaine, qui est utilisée pour faire des différentes boissons rouge carmin, tonifiantes et fraîches, l'extrait des calices obtenu après trempage dans de l'eau chaude de façon artisanale où les transformatrices utilisent 1 kg de calices secs pour 35 litres d'eau. Après 3 heures de macération, l'extrait est filtré et sucré à une dose de 150g de sucre, il peut être mélangé avec d'autres jus de fruits, aromatisants ou des morceaux de fruits (ananas, fraise) (ENDRIAS, 2006). Les boissons préparées à partir des calices de cette variété rouge, appelées « jus bissap » au Sénégal, sont également considérées comme rafraichissantes et tonifiantes et elles sont très appréciées de la population musulmane du Sénégal qui en fait une grande consommation pendant la période du Ramadan.



Figure 8: jus de bissap (Source: alsagarden.com).

Cette boisson est connue sous plusieurs appellations, en Afrique et en Asie, largement répandue. Au Sénégal, nommée « bissap », au Mali, est appelée « dabilenni ». En Égypte elle est dénommée « boisson des pharaons », Au Soudan « thé de karkadé », Au Nigeria « zobo », cette boisson consommée soit froide où chaude selon la saison. Au Mexique, la production du sirop d'*Hibiscus* à partir des sépales est connu sous le nom « flore de Jamaïque », utilisé pour parfumer et colorer des cocktails où être simplement mélangé avec l'eau bien fraîche et du sucre

Chapitre I : Etude botanique.

(ENDRIAS, 2006). Les calices sont utilisés également pour fabriquer de la confiture, gelée et dessert. L'extrait de calice séché (concentrés ou de poudre) est employé comme colorant naturel dans les industries alimentaires (pâtisserie, jus de fruits, boissons, etc.). Les graines d'*H.sabdariffa* L sont utilisées dans la fabrication de condiments traditionnels et la production de farine par la cuisson et la fermentation de ces graines (MADY, 2009).

Au nord du Nigeria, les graines sont fermentées et mélangées avec d'autres épices pour préparer un aliment appelé « mungza ntusa », d'autre part, elles sont utilisées pour préparer un produit de remplacement de la viande connu sous le nom « viande d'oseille », l'huile résultante utilisée essentiellement en cuisine au Tchad, en Tanzanie et en Chine et également dans la fabrication de savon et de produits cosmétiques (MADY, 2009).

Les feuilles d'*H.sabdariffa* sont aussi propices à leur utilisation dans l'alimentation humaine pour fabriquer une sauce aigre, épaisse, appelée « békëj », servie avec le riz au poisson (MADY 2009).



Figure 9: Thé d' *Hibiscus sabdariffa* L. (BAHAELDEEN, 2012).

• Utilisations médicinales :

De nombreuses propriétés thérapeutiques présentées par l'espèce d'*Hibiscus* où elle est utilisée dans la médecine traditionnelle (MADY, 2009).

Elle est connue comme un antiseptique, antimicrobienne et antifongique, hypotenseur, sédatif, digestif, diurétique, maintien un bon niveau de cholestérol et de triglycérides,

Chapitre I : Etude botanique.

antioxydant, prévention de certains cancers et réduction des troubles diabétiques, antibiotique et protecteur cardiovasculaire (MADY, 2009).

L'infusion de calice utilisée pour soigner les rhumes, les maux de dents, l'anémie et la rougeole. De plus, le jus des feuilles a été exploité pour traiter la conjonctivite et pour traiter les plaies et les ulcères (ENDRIAS, 2006).

Des études suggèrent que le bissap réduit la tension artérielle, car cette plante contient de nombreux composants ayant une activité anti hypertensive s'explique via une activité anti aldostérone et vasodilatateur et les anthocyanines contenant dans la plante inhibe l'enzyme de conversion de l'angiotensine et que l'effet rapide d'*Hibiscus* sur la pression artérielle lié à un mécanisme d'action vasoactif et peuvent être plus efficace que l'hydrochlorothiazide qui est une molécule utilisée contre l'hypertension artérielle (Lépengué et al., 2008).

D'autres études chez les personnes diabétiques montrent qu'un verre une fois par jour de l'infusion d'*Hibiscus* aide à lutter contre la résistance à l'insuline. En effet, cette infusion peut aider à maintenir un bon taux de glycémie, l'extrait d'*Hibiscus* suite à un repas peut diminuer l'absorption d'amidon et de saccharose (ENDRIAS, 2006).

Ainsi que, l'infusion de cette plante joue un rôle d'antidépresseur naturel en agissant contre les signes de la fatigue, le tonus, le manque de motivation grâce aux certains bio flavonoïdes qui se trouvent dans la fleur d'*Hibiscus* (ENDRIAS, 2006).

The page features a decorative border with a repeating geometric pattern in a dark red color. In the center, there are four abstract, layered shapes in a lighter red color, arranged around the text. The text is centered and reads:

**Chapitre II :
Métabolite
secondaire**

Introduction

Le métabolisme (du grec : métabole, changement) est un processus très dynamique, dont les molécules sont en continuel renouvellement, la composition d'une cellule à un instant donné est un équilibre entre synthèse et dégradation. L'essentiel des synthèses est orienté vers la production de molécules qui sont importantes pour la structure et le fonctionnement de la cellule (**Hopkins, 2003**). Les produits de métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200 000 structures définies et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité (**Mansour, 2015**).

Après l'énoncé il y a plus d'un siècle par Ernst Stahl de l'hypothèse que les métabolites secondaires pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, de nombreux métabolites dits secondaires se sont avérés jouer des rôles essentiels dans les relations entre les plantes et leur environnement : plusieurs composés phénoliques participent à la filtration des UV. (**Poutrain, 2008**).

Ces métabolites secondaires constituent, aujourd'hui, un des leviers d'une possible intensification écologique de l'agriculture, en substituant notamment l'usage d'intrants chimiques, par des mécanismes de défense naturelle des plantes. (**Hopkins, 2003**).

Beaucoup de métabolites secondaires sont aussi importants pour notre alimentation (goût, couleur..) et d'autres parmi eux les alcaloïdes, et les flavonoïdes, ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutique et biomédicaux et font partie des drogues, colorants, arômes, parfums et insecticides. Cette appréciation croissante des effets biologiques hautement diversifiés de ces produits naturels a permis une réévaluation des rôles joués par ces composés chez les végétaux, surtout dans le contexte des interactions écologiques (**Croteau et al., 2000**).

I. Généralités sur les métabolites secondaires

Ce sont toute molécule organique complexe présente chez les végétaux, qui est indirectement essentielle à leur vie et leur interaction avec l'environnement (**Poutrain, 2008**).

Les métabolites secondaires sont synthétisés par les plantes autotrophes à partir des métabolites primaires (**Boudjouref, 2011**), on les trouve dans toutes les parties des plantes supérieures par faible concentrations différentes (**Merghem, 2009**).

I.1. Les métabolites secondaires

Le terme « métabolite secondaire » qui a probablement été introduit, par (**Albert Kosselben, 1891**), est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques, dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphériques, indirectement, essentielles, à la vie des plantes telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques (**Guillaume, 2008**). Les métabolites secondaires, sont présent dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée, dans l'organisme de la plante. Dont plus de 200.000 structures on été définit (**Hartmann, 2007**), et sont d'une variété extraordinaire.

I.2. Synthèse de métabolites secondaires chez les végétaux

De nombreuses familles de métabolites secondaires ont été activement étudiées Certains procédés de synthèse sont aujourd'hui bien décrits depuis 30 ans, Comme les flavonoïdes (**Pfeiffer et Hegedus, 2011 ; Tanaka 2008**), dérivés de l'acide caféique (**Weng et Chapple, 2010**), coumarines et furanocoumarines, Terpènes et stérols (**Lee et al., 2012**), ou certains alcaloïdes (**Jirschitzka, 2012**).

Cependant, comme les plantes produisent des dizaines de milliers de composés Deuxièmement, il reste encore aujourd'hui de nombreux itinéraires à découvrir. L'organisation La synthèse des métabolites secondaires est illustrée par les exemples suivants Les furanocoumarines font partie des ombellifères (céleri, persil, panais, etc.) (**Bourgaud et al., 2006**). D'une manière générale, le stress Les facteurs environnementaux, à la fois biotiques et abiotiques, peuvent entraîner des cascades réactionnelles conduisant à la transcription de certains.

I.3. Fonction de métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires se sont pas vitaux pour l'organisme mais jouent nécessairement un rôle important, de part la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production.

Ils ont des rôles écologiques (allomone, phéromone ...). Ces molécules furent sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un autre organisme. Elles représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques. (Thomas, 2009).

Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, et dans les relations entre les plantes et leur environnement : plusieurs composés phénoliques participent à la filtration des UV, les pigments floraux sont essentiels aux processus de pollinisation. (Bruneton, 1999).

I.4. Classification des métabolites secondaires

I.4.1. Les composés phénoliques

- Généralités :

C'est un très vaste groupe de substances dont l'élément structural commun c'est la présence d'au moins : un noyau aromatique lié à un groupement hydroxyle (libre ou engagé). Les composés phénoliques sont issus de deux voies biogénétiques différentes :

- Φ Voie de l'acide shikimique : acide cinnamique, acide benzénique, coumarines, lignanes...

- Φ Voie de l'acide acétique (poly acétate): chromons, quinones...

Il y a des composés d'origines mixtes telle que : les flavonoïdes, les tanins.

- Définition :

Les composés phénoliques sont des dérivés aromatiques hydroxylés non azotés dont les cycles aromatiques sont issus du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un poly acétate.

- **Classification:** On distingue :

A) les phénols simples : ce sont des composés rares dans la nature :

B) les acide phénols: ce sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque (C6-C1) ou de l'acide cinnamique (C6-C3).

B. 1) Acides phénols dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1): très présent dans le règne végétal soit sous forme libre ou sous forme combinée à l'état d'ester ou d'hétéroside ex :

B.2) Acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3) : ils présentent une distribution très large dans le règne végétal, le plus souvent estérifiés. Ex :

II. Les activités biologiques des composés phénoliques

- **Propriétés physico-chimique, extraction et caractérisation :**

La solubilité :

- ◆ Les phénols libres sont solubles dans les solvants organiques polaires (alcool, cétone, éther),
- ◆ les solutions d'hydroxyde de Na et de carbonate de Na.
- ◆ Les hétérosides sont solubles dans l'eau.
- ◆ Les phénols sont des composés instables :
- ◆ Oxydation surtout en milieu alcalin.
- ◆ Isomérisation sous l'action des UV L'extraction :
- ◆ Ils sont extrais par l'alcool ou les solutions hydro-alcooliques à pH légèrement acide

La caractérisation :

- ◆ Elle se fait par les réactifs généraux des phénols (FeCl₃, vanilline sulfurique...)
- ◆ Par technique chromatographique (CCM- CPG- **HPLC**)

- **Propriétés pharmacologiques et emplois :**

Les composés phénoliques simples présentent un intérêt thérapeutique très limité, ex :

- ◆ Propriétés antiseptiques urinaires (arbutoside)
- ◆ Propriétés anti-inflammatoires (acide salicylique)
- ◆ Propriétés antibactériennes et antifongiques

En général, les drogues sont employées soit en nature ou sous forme galénique simple (poudre, extrait, teinture).

II.1 Rôle des composés phénolique

Outre l'implication des composés phénoliques dans les interactions des plantes avec leur environnement, les fonctions physiologiques des polyphénols au sein des végétaux demeurent encore assez imprécises.

Cependant, l'implication de certains composés phénoliques dans différents domaines de la physiologie de la plante a été prouvé (**Ignat et al., 2011**). Ainsi, il est actuellement admis que l'acide salicylique, outre son implication dans la mise en place de signaux à la suite de l'attaque de la plante par des agents pathogènes, est aussi impliqué dans la régulation de la floraison, de la tubérisation et de la thermogenèse (**Ferrazzano et al., 2011 ; Macheix et al., 2006**). Aussi, les lignines de par la nature complexe de leurs structures, contribuent à la rigidification des parois cellulaires des vaisseaux du bois. Cela permet d'une part la conductance de la sève brute à l'intérieur de la plante et d'autre part la formation d'une structure rigide qui participe au port dressé des végétaux ligneux (**Macheix et al., 2006**). Par ailleurs, certaines hypothèses stipulent que les composés phénoliques interviennent dans les différents processus physiologiques.

• La germination

Plusieurs composés phénoliques, notamment les acides caféique, férulique et chlorogénique, sont connus en tant qu'inhibiteurs chimiques pour leurs effets dépresseurs sur le développement embryonnaire (**Heller et al., 1995**). En effet, la capacité de ces molécules à s'oxyder facilement piège l'oxygène qui ne peut plus parvenir à l'embryon. D'ailleurs, l'acide caféique, comme la coumarine, est un inhibiteur de la germination. Ces substances constituent « les blastokolines » qui empêchent les pépins de germer tant que le péricarpe n'est pas dégradé par les bactéries de la putréfaction. Ils constituent aussi les substances télotoxiques émises par les racines de certaines plantes et qui inhibent la germination des graines pouvant être tombées à leur voisinage (**Heller et al., 1995**).

- **Floraison :**

Grâce à une interférence positive avec les gibbérellines, les polyphénols sont capables d'inhiber la biosynthèse de l'éthylène et ils sont ainsi capables d'induire la floraison de plantes notamment celles placées en condition de dyspériode particulièrement chez les lamiacées (Heller et al., 1995). Par ailleurs, chez les Aracées, l'acide salicylique est responsable du phénomène de la thermogénèse qui se manifeste au cours de la floraison. Lors de ce phénomène, les fleurs mâles à la base de l'inflorescence produisent jusqu'à 100 fois plus d'acide salicylique (Heller et al., 1995).

- ***Maturation des fruits:***

Certains composés phénoliques, notamment les anthocyanes, sont des marqueurs de maturation particulièrement chez les fruits charnus. Ainsi, le stade mûr de ces fruits est caractérisé par un profil polyphénolique où dominent les anthocyanes et où l'astringence due aux tanins diminue progressivement. Ceci correspond à une diminution, voire même une disparition de la chlorophylle et une apparition des pigments phénoliques synthétisés dans les chloroplastes ou dans des plastes spécialisés, les chromoplastes (Heller et al., 1995). Ce phénomène se retrouve aussi dans les autres organes où elles sont quelques fois accompagnés, lorsqu'une déshydratation progressive des tissus intervient (cas des fruits secs et des graines), par une insolubilisation des composés phénoliques et par des liaisons quasi-irréversibles avec les structures des parois cellulaires (Macheix et al., 2006).

II.2 Les principales classes de composés phénoliques :

II.2.1- Les polyphénols

II.2.1.a. Les Quinones:

D'après Bruneton en 2009 On peut décrire les quinones comme des cétones aromatiques qui sont le résultat de l'oxydation de diphénols, se sont des substances biologiquement actives vue qu'elles jouent le rôle d'antibiotique (antimicrobiennes), aussi elles sont des fongicides et des vermifuges. Parmi les quinones on peut citer la vitamine K1 qui est abondante dans le groupe des plantes tinctoriales comme la luzerne. Il y a aussi les anthraquinones qui agissent sur le colon et

la résorption de l'eau ceci revient à la présence d'une base NaOH ou KOH, les quinones ont la caractéristique de donner une coloration rouge allant au violet. Lesquinones en quatre groupes (Guignard, 1995) :

- Benz quinones
- Naphtoquinones
- Anthraquinones
- Isoprenoides quinones

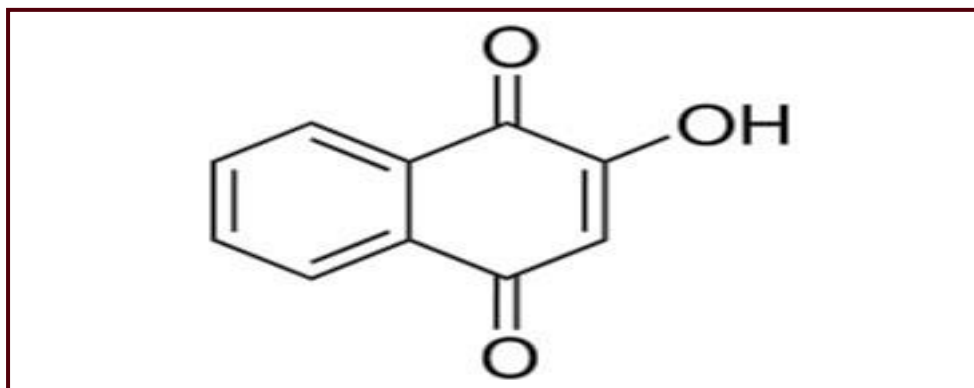


Figure 10: Structure chimique des quinones.

II.2.1. b. Les Anthraquinones :

L'antraquinone est une molécule dérivée de l'anthracène, elle appartient aux hydrocarbures aromatiques polycycliques.

L'antraquinone existe dans les plantes, les champignons et les insectes. On peut la trouver dans les racines, tiges vertes et les graines.

L'antraquinone fait partie des quinones naturelles, c'est une substance oxygénée engendrée par l'oxydation des composés aromatiques (Gérard Gomez, 2015)

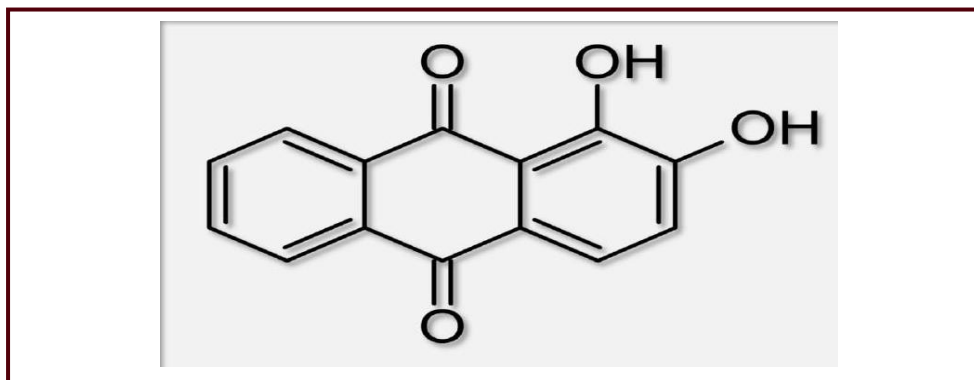


Figure 11: structure chimique des anthraquinones.

II.2.1.c. Les Flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal qui sont caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols. (Ghedira, 2005)

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl. (Beecher, 2003 ; Williams et Grayer, 2004 ; Kueny-Stotz, 2008).

- Structure chimique et classification :

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyran (Skerget *et al.*, 2005). Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atomes de carbone (C6-C3 -C6), constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (Dacosta, 2003).

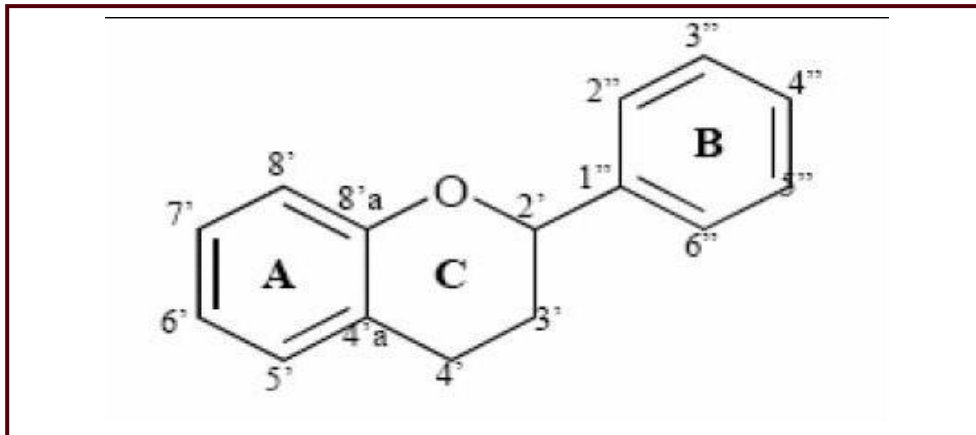


Figure 12: Squelette de base des flavonoïdes (Girotti-Chanu, 2006).

- Les principales catégories de flavonoïdes sont définies par :

1/ la présence ou l'absence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C, qui déterminent la planéité de la molécule. Les flavones, flavonols et dérivés présentent un double Liaison et sont des molécules planes, contrairement aux flavanes, flavanones et dérivés.

2/ la présence de fonctions cétones, alcools et méthoxy.

- Propriétés des flavonoïdes

+ Rôle dans les plantes. :

Les flavonoïdes sont les pigments colorés des fleurs. Par exemple, les couleurs orange, rouges et bleues des légumes, fruits, fleurs et tissus de stockage des plantes sont dues à des anthocyanes hydrosolubles (qui sont des flavonoïdes jaunes réduits). De ce fait, ils jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines) (Pietta, 2000). Ils sont impliqués dans les interactions plantes microorganismes: dans les pathogénèses comme dans les symbioses (nodules des Légumineuses). Ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponses à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ce sont également des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. De plus ils sont impliqués dans la

photosensibilisation et les transferts d'énergie, la morphogenèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (Mascolo et al., 1999)

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Pietta, 2000)

Intérêt thérapeutique :

Les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent-Györgyi (prix Nobel, 1937), chercheur de l'université de Szeged (Hongrie) (Narayana et al., 2001).

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse par action sur la microcirculation. Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et augmentent leur résistance. Cette action est appelée « vitamine P ». Différents mécanismes sont évoqués pour expliquer cette activité :

- Des propriétés antioxydantes, piègeurs de radicaux libres.

- Des propriétés inhibitrices d'enzymes...

À côté de cette action principale « vitamine P », les flavonoïdes présentent plusieurs activités: antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, anticancéreuses ainsi que d'autres activités particulières: diurétiques, et antispasmodique (Seyoum et al., 2006)

II.2.1.d. Les anthocyanes :

Sont des composés naturels de la famille des flavonoïdes. Leurs propriétés pharmacologiques, notamment antioxydantes, sont nombreuses et bien décrites dans la littérature (Morazzoni, 1990).

Structure :

Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C3. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (**Bessas et al., 2007**).

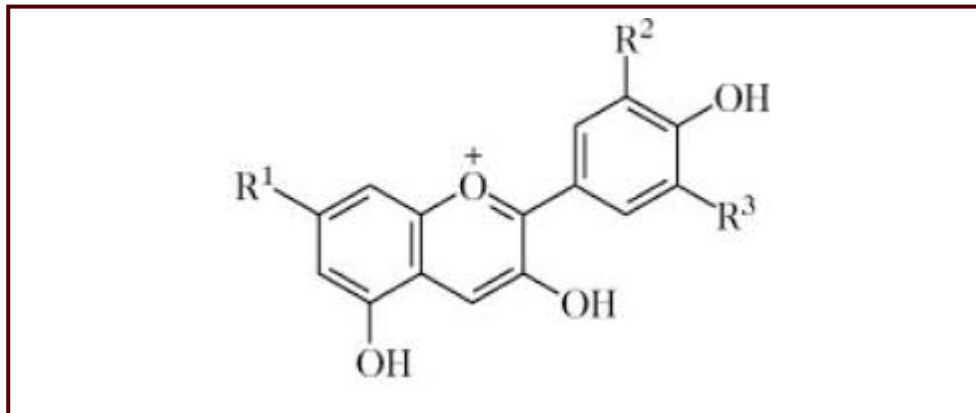


Figure 13: squelette d'anthocyanes (**Kueny-Stotz, M. 2008**).

II.2.1.e. Les tanins :

Définition :

Les tannins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir (**Bruneton, 1999**). Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau.

D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par Bate-Smith, (1973) c'est que les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da, ils sont caractérisés de se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes pour former un précipité (**Brunet, 2008**).

Classification :

Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes :

• Les tannins hydrolysables

Ces tannins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycolyse, Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique. Comme leur nom l'indique, ces tannins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (Conrad *et al.*, 1998).

• Les tannins condensés

Les tannins condensés (TCs), ou proanthocyanidols, sont des polyphénols appartenant à la famille des flavonoïdes. Sont chimiquement définis comme étant des oligomères ou des polymères d'unités de flavonoïdes. L'unité de base (ou monomère) des TCs est un flavan-3-ol (catéchine).liés par des liaisons de type C-C (Type B) ou C-O-C (type A) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992).

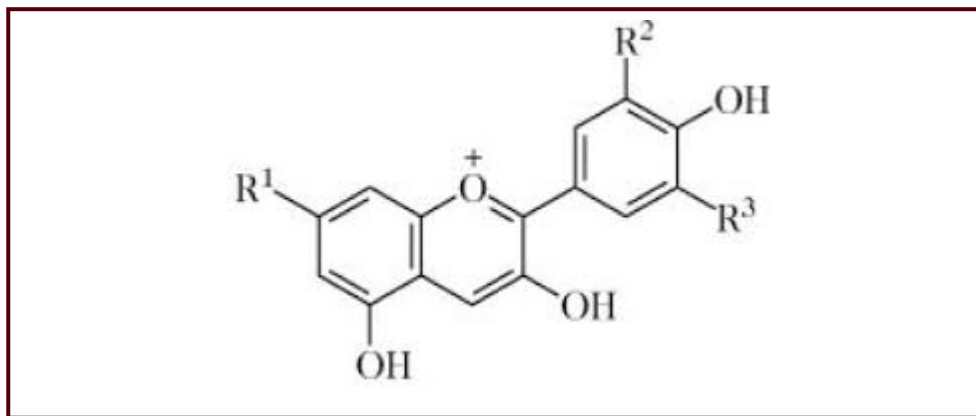


Figure 14: Structure chimique (A) Tanin condensé (proanthocyanidine), (B) Tanin hydrolysable (gallotanin) (Derbel et Ghedira, 2005).

II.2.1.f. Les coumarines :

Ces composés issus de la cyclisation du résidu C3 de dérivés du cinnamate, sont souvent synthétisés en réponse à des attaques pathogènes. On parle de coumarines pour les dérivés du noyau de base qu'est la coumarine. Plusieurs coumarines ont des propriétés bactériostatiques, ces composés représentent donc des phytoalexines chez un certain nombre de plantes (ex : la

scopolétine qui s'accumule chez le tabac au cours de la réaction hypersensible). La coumarine est une molécule aromatique (au sens olfactif). Elle est présente sous forme glycoconjuguée chez certaines graminées (ex : la flouve odorante), mais c'est lorsque les tissus sont endommagés par la coupe que les glycosidases libèrent la coumarine libre à l'origine de l'odeur de foin coupé. La coumarine est utilisée dans la composition de nombreux parfums et pour aromatiser des alcools (ex : Zubrowka, une vodka polonaise).

II.3. Les stérols :

Les stérols végétaux sont également appelés phytostérols. Ils correspondent à des substances naturelles que l'on trouve dans les parois cellulaires des plantes. Ces molécules disposent de nombreuses vertus pour le corps humain. Elles sont connues, entre autres, pour agir efficacement contre le cholestérol.

Les stérols végétaux dans les aliments

Il est possible de trouver naturellement des stérols végétaux dans différentes catégories d'aliments. Ils sont présents dans les céréales, les fruits, les légumes, les légumineuses, les noix, les graines et les huiles végétales. Il faut cependant noter que la quantité de phytostérols contenus dans ces produits reste relativement faible. En effet, la dose présente n'est pas assez importante pour permettre à l'organisme d'en tirer les bénéfices hypocholestérolémiants.

II.4. Les terpènes

Les terpènes sont des composants organiques aromatiques dérivés de l'isoprène (hydrocarbure de 5 atomes de carbone) qui se trouvent dans tout type de végétation et sont importants dans de nombreuses interactions biotiques (**Goodwin, 1971**), en exerçant des fonctions primaires comme la protection face à divers facteurs comme les températures élevées, les insectes ou les prédateurs herbivores. On les trouve et font partie de la chlorophylle et de quelques pigments caroténoïdes.

Les fonctions des terpènes au niveau végétal sont variables. Les terpènes sont, par exemple, responsables de processus hautement spécialisés qui permettent que les plantes aient une protection sur les éléments qui les entourent. Entre ses fonctions, ils mettent l'accent sur la

coloration, agissent comme un répulsif et l'aromatisation qui facilite la pollinisation des plantes. (Oldfield et al., 2012).

II.5. Les saponosides

Les saponosides, appelés aussi les saponines, constituent un vaste groupe d'hétérosides. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensio-actives. C'est pour cette propriété qui est fondée l'utilisation de certaines plantes riches en saponines comme détergents tel que la saponaire (*Saponaria officinalis* L.), qui forme en contact avec l'eau une mousse savonneuse.

C'est grâce à leur structure amphiphile que les saponosides possèdent cette propriété tensio-active. En effet, Leur structure comporte deux pôles : un pôle lipophile, qui correspond à la partie génine (aglycane), qui peut être soit de nature stéroïdique, soit de nature triterpénique et un pôle hydrophile qui correspond à la partie sucrée qui est constitué par un ou deux oligosides. (Jean Bruneton, 2009)

II.6. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène et, plus spécialement, de l'azote. La plupart possèdent une activité biologique marquée qui a suscité de longue date un intérêt thérapeutique. Leur dénomination – de l'arabe *al kali* (qui a donné « alcali ») et du grec εἶδος (forme) – fait référence à leur caractère « alcalin » ou « basique ».

En fait, les alcaloïdes forment un groupe hétérogène, du point de vue tant de la structure et des propriétés chimiques que des effets biologiques qu'ils manifestent, et dont il est impossible de donner une définition satisfaisante.

Représentant les principes actifs de nombreuses plantes médicinales ou toxiques connues parfois depuis l'Antiquité, ils ont joué un rôle important dans la découverte des médicaments chimiques (morphine, quinine, cocaïne, atropine...) et dans le développement de l'industrie pharmaceutique en France à la fin du XIX^e siècle. Cela ne les empêche pas d'être encore d'actualité en thérapeutique et de constituer d'importants réactifs biologiques.

Chapitre II : Métabolite secondaire.

On admet selon M.-M. Janot que, pour être rangée parmi les alcaloïdes, une substance doit répondre à cinq critères : rattachement aux molécules organiques, présence d'azote, formation de sels, activité physiologique, obtention de dérivés insolubles avec certains réactifs dits « réactifs généraux des alcaloïdes ». La formation de sels n'est pas rigoureusement respectée : ainsi la caféine et la colchicine, non salifiables, sont cependant assimilées aux alcaloïdes par la plupart des chimistes. (**Jacques E. POISSON**).

The page features a decorative border with a repeating geometric pattern in a dark red color. In the center, there are several abstract, layered shapes in shades of red and brown, resembling folded paper or overlapping triangles, which frame the central text.

Chapitre 3 :
Les Activités
Biologiques

I. Activité antioxydante:

Historique:

Radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, R. Gerschman puis D. Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme *n* produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène (**Favier, 2003**). Plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle sont douées de propriétés antioxydants remarquables. Elles contiennent une grande variété d'antioxydants comme la vitamine C et E, les caroténoïdes, les oligoéléments et surtout les polyphénols (**Popovici et al ., 2009**).

I.1. Définition du stress oxydant :

Le stress oxydatif est un mécanisme physiopathologique caractérisé par un déséquilibre de la balance entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou d'espèces réactives de l'azote (ERN) (**Duranteau J. 2008**), et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières (Figure 15). Ce phénomène se traduit par l'accumulation des biomolécules au niveau plasmatique et cellulaire (**Bensakhria A. 2018**).

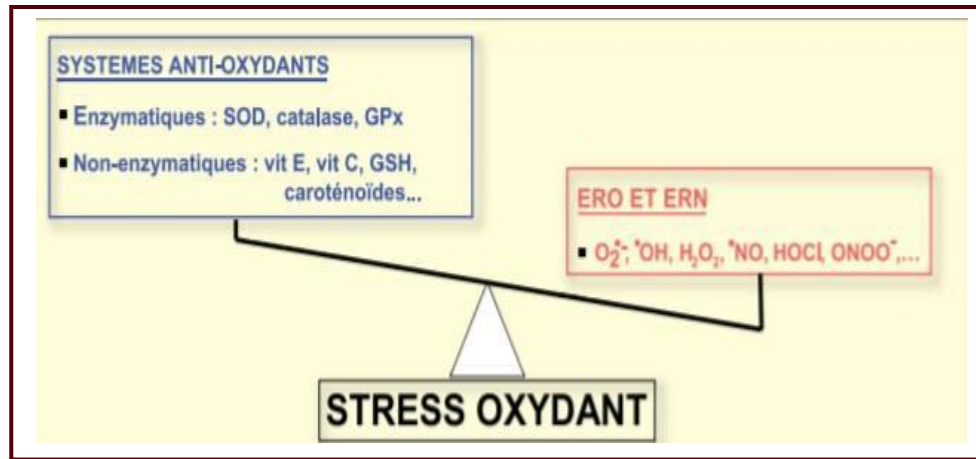


Figure 15: Schéma explicatif du phénomène du stress oxydatif (Bonnefont R.2007).

I.2. Définition d'un antioxydant :

Les antioxydants sont des composés capables à ralentir ou à empêcher les processus d'oxydation qui se produisent sous l'influence de l'oxygène atmosphérique ou d'une espèce réactive oxygénée. Ils sont employés pour la stabilisation des polymères, des produits pétrochimiques, des produits alimentaires, des produits cosmétiques et pharmaceutiques (Pisoschi et Negulescu, 2011).

— Les antioxydants endogènes

La production physiologique d'ERO, est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine, ...).

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (Pincemail, 2002).

— Les antioxydants exogènes :

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en :

Chapitre III : Les Activités Biologiques.

- **Médicaments**

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéïnémiques, les bêta bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés anti-oxydantes.

- **Antioxydants naturels**

- √ **La vitamine C ou acide ascorbique**

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E.

- √ **La vitamine E ou tocophérol**

Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant radicaux peroxydes.

- √ **Le sélénium**

Les effets bénéfiques de cet oligo-élément sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure). Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers.

- √ **Le β -carotène (Les Caroténoïdes)**

Outre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulet.

- √ **Les flavonoïdes**

Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation

- √ **Les tanins**

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.

√ Les coumarines

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes.

√ Les phénols

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (**Diallo, 2005**).

I.3. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition (**Favier, 2006**). Les antioxydants naturels semblent contribuer de manière significative à la prévention des maladies telles que le cancer ou encore des maladies cardio-vasculaires (**Diallo, 2005**).

● **Tableau N° 3:** mécanisme d'action de quelques antioxydants.

	Nature	Mode d'action
Antioxydants non Enzymatique	Vitamine E	Neutralise les radicaux libres
	Vitamine C	Participe à la réaction d'oxydoréduction
	Beta carotène	Fixation des métaux de transition
Antioxydants Enzymatique	Superoxyde dismutase	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde
	Catalase	Métabolise H ₂ O ₂
	Glutathion peroxydase	Action réductrice sur H ₂ O ₂ et les hydroperoxydes

I.4. Les maladies liées au stress oxydant

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. (Favier, 2003).

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accélère Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003).

I.5. Quelques méthodes de dosage des antioxydants

Il existe différentes méthodes pour tester la capacité de piégeage d'un radicale libre et l'activité antioxydante d'un extrait du plante.

I.5.1. Méthode L'ABTS:

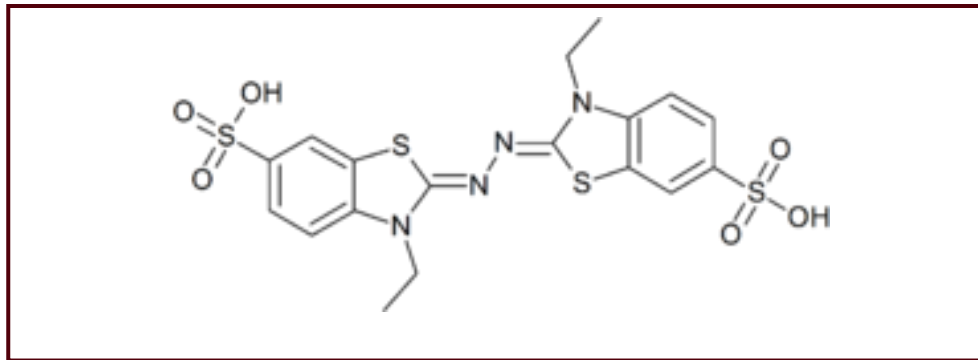


Figure 16: Structure de l'ABTS.

L'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) est un composé chimique utilisé notamment en biochimie dans l'étude de la cinétique de certaines enzymes. Il est couramment employé par la méthode immuno--enzymatique ELISA pour détecter la liaison des molécules entre elles.

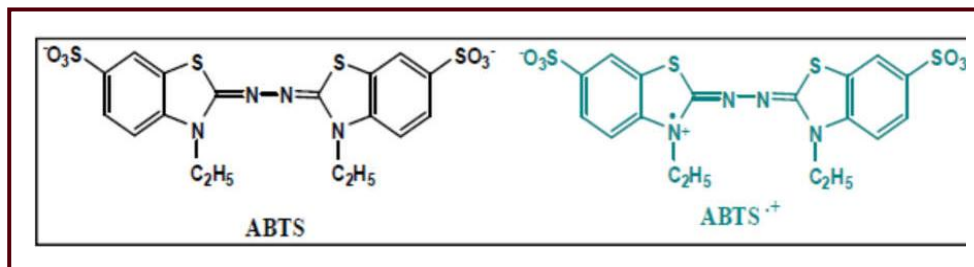
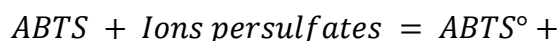


Figure 17: La forme réduite ABTS et la forme radical de cation ABTS.

Le test ABTS est un test simple, opérationnel, reproductible et peut être utilisé dans différents milieux. Il est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration vert bleu et qui présente un spectre d'absorption dans le visible à 734 nm en le transformant en ABTS incolore. De plus, le radical ABTS^{•+} est généré en présence des ions persulfates (BOUCHOUKA, 2016).



I.5.2. Méthode DPPH

Le 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH.) est un radical stable et de couleur violette en solution, il fut l'un des premiers radicaux libres utilisés dans l'étude visant à déterminer la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Blois 1958). Le DPPH est réduit en présence d'une substance réductrice (antioxydant) pour donner la couleur jaune du diphenylpicrylhydrazine. Cette réduction est suivie par spectrophotométrie UV, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm ; ce qui nous permet de mesurer le pouvoir anti radicalaires de l'échantillon testé (Figure 18).

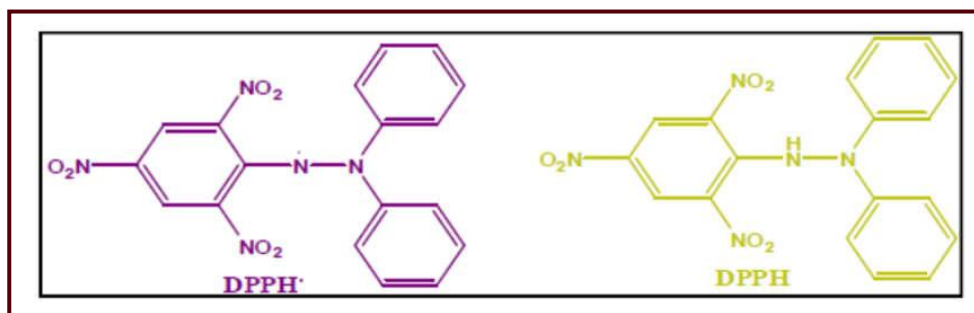


Figure 18: La forme réduite DPPH et la forme radical DPPH. (POPOVICI et al., 2009).

Principe:

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par les antioxydants peut être suivie par spectrophotométrie UV-Vis en mesurant la diminution d'absorbance induite par les antioxydants à 517 nm (MOLYNEUX, 2004). En présence de piègeurs de radicaux libres, DPPH. Le violet (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) est réduit au jaune 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (Figure 19) (MAATAOUI *et al.*, 2006).

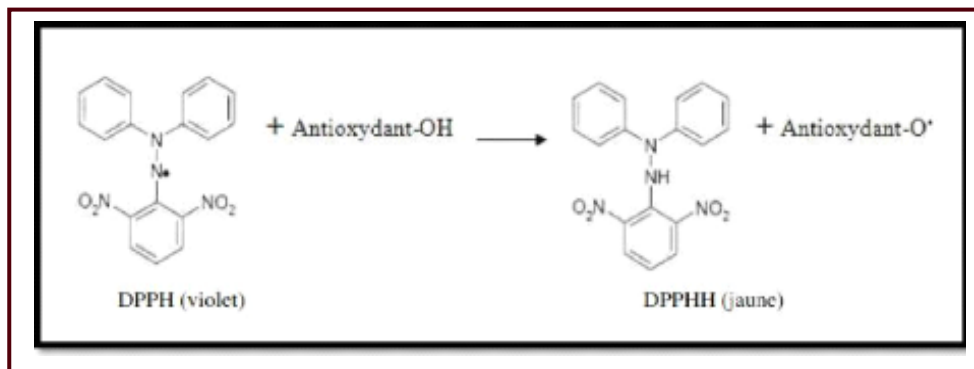


Figure 19: Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (CONGO, 2012).

Avantages du dosage DPPH :

- ◆ Le dosage DPPH est simple, bon marché, rapide et très sensible.
- ◆ Les antioxydants provenant de systèmes biologiques complexes peuvent être quantifiés.
- ◆ Les résultats des tests sont reproductibles et ont une bonne sensibilité par rapport aux autres méthodes de piégeage des radicaux.
- ◆ Même les antioxydants faibles donnent une bonne réponse dans le test avec 30 minutes d'incubation.
- ◆ Plusieurs échantillons peuvent être analysés.

Limites du test DPPH:

- Le radical DPPH ne peut être dissous que dans des solvants organiques.
- Le DPPH peut réagir avec d'autres radicaux présents dans les échantillons.
- Le dosage DPPH doit être effectué dans l'obscurité car l'absorbance diminue lors de l'exposition à la lumière.
- DPPH est sensible aux bases de Lewis.

I.5.3. Méthode phénanthroline :

La **1,10**-phénanthroline ou orthophénanthroline est un composé organique de formule brute $C_{12}H_8N_2$, formé de trois cycles aromatiques adoptant la disposition du phénanthrène. Les deux cycles opposés contiennent chacun un atome d'azote se faisant face. Elle fait partie des ligands bidentates. À ce titre, elle est susceptible de former des complexes, avec le fer par exemple. Seul le fer ferreux — $Fe(II)$ ou Fe^{2+} — forme un complexe stable avec l'orthophénanthroline de couleur rouge orangé. On nomme ce complexe *ferroïne* et il se prête bien à l'analyse colorimétrique ou photométrique à une longueur d'onde de 510 nm (vert). L'orthophénanthroline est souvent abrégée *o*-phen et a les mêmes propriétés chélatantes que les bipyridines. La forme monohydratée possède un point de fusion de 117 °C. (Atomic weight, 2007).

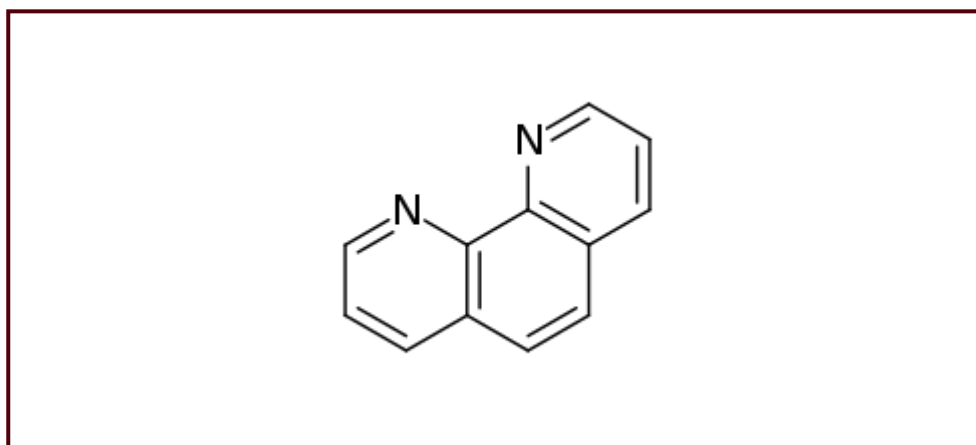


Figure 20: Structure de Phénanthroline.

I.5.4. Méthode Reducing power :

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydo-réduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ fournit des ions Ferriques (Fe^{3+}) qui seront réduits en Ferreux (Fe^{2+}) par les antioxydants présents dans l'extrait végétal. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**. Cette méthode consiste à mélanger 1 ml de l'extrait à différentes concentrations avec 2,5 ml de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 2.5 ml d'une solution de $K_3Fe(CN)_6$ à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 minutes à 50°C, puis 2.5 ml d'acide trichloracétique (CCl_3COOH) à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange est

Chapitre III : Les Activités Biologiques.

centrifugé à 650 g pendant 10 mn à température ambiante et 2.5 ml du surnageant sont additionnés de 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de chlorure de fer (FeCl_3) à 0.1%. La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc ou l'extrait est remplacé par le tampon d'extraction. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace, concentration de l'extrait correspondant à une absorbance égale à 0.5, obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire ou logarithmique. L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle des antioxydants de synthèse (témoins positifs), butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA).

I.5.5. Méthode Silver Nanoparticle (SNP) assay :

Considérant la quintessence des découvertes et des inventions scientifiques depuis l'avènement de l'homme sur Terre, l'émergence des nanotechnologies est un développement relativement récent. Cependant, les 30 dernières années ont été témoins de l'invention de la nanotechnologie dans les années 1980 et de sa montée en puissance au début des années 2000 avec de larges applications commerciales dans divers secteurs. Les matériaux aux propriétés uniques sont réduits au niveau d'atomes et de molécules individuels, collectivement appelés nanoparticules, généralement compris entre 1 et 100 nm. Les utilisations potentielles de ces particules comprennent des applications commerciales, industrielles, agricoles et médicales. Bien que les nanoparticules aient une composition chimique identique à celle du matériau d'origine, les propriétés physiques, notamment la couleur, la résistance, les propriétés magnétiques et thermodynamiques et d'autres aspects physiques, peuvent différer considérablement. L'application des nanomatériaux en médecine est également une entreprise récente dont la plupart des applications sont encore au stade de la recherche et du développement (Slawson RM. 1992)

II. L'activité antifongique:

Les antifongiques sont des médicaments destinés à détruire les champignons microscopiques et donc soigner les mycoses. Ce sont des substances qui détruisent les champignons (fongicides) ou qui du moins limitent le développement (fongistatiques).

Chapitre III : Les Activités Biologiques.

Certains sont à base d'iode, d'autres à base de produits actifs spécifiquement contre les levures, dans le nom de domination commune international (DSI) se termine souvent en « nazol ».

→ Les différents types des antifongiques :

• Les antifongiques externes :

- Appliqué localement sur la peau

- Les antiseptiques à base d'iode sont surtout fongistatiques.

- Les fongicides ou antifongiques locaux sont de divers types : Les « imidazolés » (éconazole, isoconazole, miconazole, tinidazole...) les anti-candidosiques comme la fungizone, les antidématophytes (sporiline, mycodécyl) le sulfure de sélénium.

• Les antifongiques généraux :

Ils sont réservés aux mycoses profonds. Ils sont sous formes de comprimés ou de formes injectables. Ils s'agissent de l'amphotéricine, la flucytosine, la fluconazole, la kétoconazole, l'itraconazole.

Certains comme l'amphotéricine sont efficaces mais toxiques et provoquent lors de leur injection intraveineuse de la fièvre, des vomissements et un malaise. Le rein peut être atteint également.

Le champignon *Aspergillus ochraceus* :

✓ est une espèce de moisissure du genre *Aspergillus* connue pour produire la toxine ochratoxine A, l'une des mycotoxines contaminant les aliments les plus abondantes, et la citrinine. Il produit également la melleine dihydroisocoumarine. C'est un champignon filamenteux dans la nature et possède des conidiophores bisériés caractéristiques.



Figure 21: champignon *Aspergillus ochraceus*.

Le champignon *Fusarium oxysporum f.sp. Albedinis*

√ Le champignon *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* est l'agent d'un flétrissement vasculaire du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera*), appelé maladie du Bayoudh (CMI, 1978, 1992; EPPO/CABI, 1997). La maladie est généralement fatale, et les arbres meurent souvent au bout de 6 mois à 2 ans. Les principaux moyens de transmission sont les spores et le mycélium dans le sol. La contamination a lieu principalement par les racines et s'étend dans les plantes par le système vasculaire. Le pathogène se dissémine par les rejets, le sol, les hôtes ne présentant pas de symptômes, les tissus de palmier-dattier ou l'eau d'irrigation infectés. Aucune invasion des hampes florales ou des fruits n'a jamais été signalée. Il n'existe aucune indication de transmission par les semences.



Figure 22: champignon *Fusarium oxysporum f.sp. Albedinis*.

The page features a decorative border with a repeating geometric pattern in a dark red color. In the center, there are several abstract, layered shapes in shades of red and brown, resembling folded paper or geometric forms. The text is centered within this composition.

Deuxième Partie

Partie expérimentale

The page features a decorative border in a dark red color with a traditional geometric pattern at the corners. In the center, there are several abstract, layered shapes in shades of red and brown, resembling folded paper or fabric, which frame the title text.

Chapitre I :

Matériel et Méthodes

I. Matériel et méthodes

Protocole d'étude phytochimique

Une étude phytochimique d'une espèce végétale passe impérativement par ces étapes:

- Récolte de la plante.
- Séchage.
- Broyage.
- Extraction.
- Séparation et identification des produits isolés.

Ce travail a été effectué au laboratoire physiologie végétale département de biologie et écologie végétale et le laboratoire de la biochimie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, université des frères mentouri Constantine 1. Ainsi que le laboratoire de Biochimie du Centre de recherche en biotechnologie (CRBT) et laboratoire de recherche de biochimie appliquée Chaabat erssas. Université Mentouri constantine 1. Les différentes étapes de l'étude sont abrégées dans **la Figure 23**

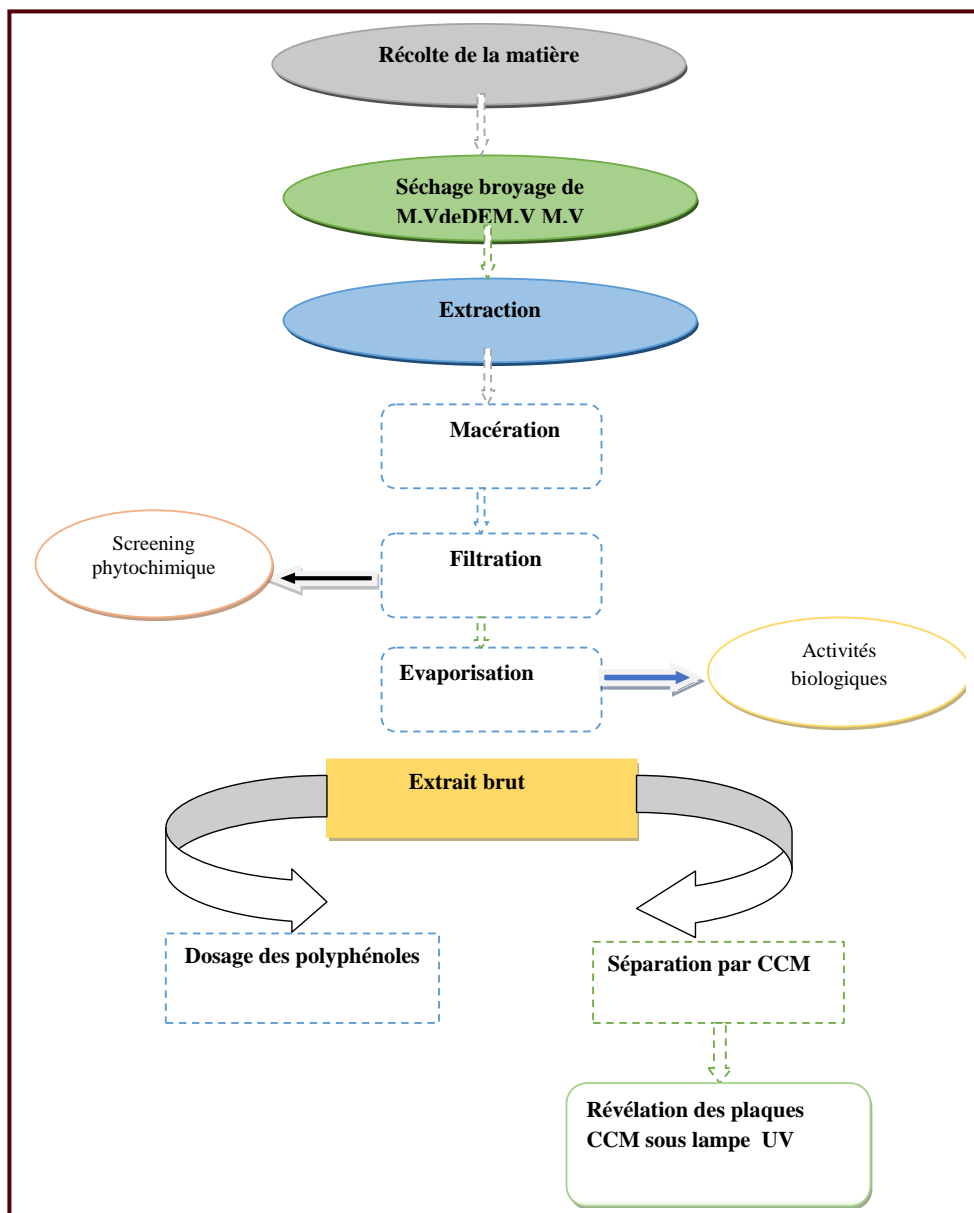


Figure 23: Protocole d'étude expérimentale.

I.1. Matériel végétal:

Le matériel végétal est constitué de fleurs sèches de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L. Obtenus à partir des phytothérapeutes de wilaya de constantine.



Figure 24: Les feuilles sèches d'*Hibiscus sabdariffa* L.

- **Broyage des parties sec:**

Les organes des plantes sélectionnées ont été broyés à l'aide d'un mortier, pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation.



Figure 25: Le broyage.



Figure 26: la poudre végétale.

• Préparation des extraits:

Deux grammes (2g) de poudre végétale des fleurs *d'Hibiscus sabdariffa* L. sont macérer avec des solvants de polarité croissante éther de pétrole, chloroforme et méthanol (70 %) dans des flacons, pendant 24 heures. Après filtration nous obtenons Les extraits étheriques, chloroformiques et hydro-méthanoliques.



Figure 27: Extraits étheriques, chloroformiques et méthanoliques de la plante *Hibiscus sabdariffa* L.

Extraction de métabolites secondaires

Objectif

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules chimiques contenues dans les feuilles de la plante *Hibiscus sabdariffa* L. en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.

a. Macération :

a.1. Principe :

La macération est une méthode qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant, pour en extraire les principaux actifs. Elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules.

a.2. Protocole

On a utilisé 250 g de la plante *d'Hibiscus sabdariffa* L. sous forme de poudre dans un flacon, contenant un mélange solvant: (Méthanol : Eau) (70 :30) (v/v) et puis laisser macérer pendant 72h.

Les macérâts hydro-méthanoliques ont été filtrés. Le filtrat hydro-alcoolique est concentré à sec, sous pression réduite au moyen d'un évaporateur rotatif.



Figure 28: Le macérât hydro-méthanolique.



Figure 29: Filtration du macérât hydro-méthanolique.

b. Évaporation :

Elle est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor) à une température comprise entre 37 et 40° C, afin d'obtenir un extrait sec.



Figure 30: Evaporateur rotatif.

Cette étape a permis d'obtenir un extrait organique brut, qui sera récupéré dans des boîtes de pétris stériles puis conservés jusqu'à l'utilisation.



Figure 31: L'extract brut des fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* L.

I.2.screening phytochimique:

Le screening phytochimique, est un ensemble des méthodes et techniques, de préparation et d'analyse, des substances organiques, naturelles de la plante.

Le criblage phytochimique est un ensemble des méthodes et techniques de préparation et d'analyses des substances organiques naturelles de la plante. Ces techniques permettent de détecter la présence des produits appartenant à des classes de composés ordinairement physiologiquement actifs qui sont les composés phénoliques.

I.2.1.Criblage des Quinones:

Pour cette étape on a utilisé l'extract éthérique. La présence des quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH à 10%, Lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones. (Dohou, 2003).

I.2.2.Criblage des Anthraquinones:

Aux extraits chloroformiques des fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* L., on ajoute 2 ml de KOH 10%, après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge.

I.2.3. Criblage des flavonoïdes:

Le criblage des flavonoïdes se réalise a partir de 12 ml de l'extrait hydro-méthanolique. L'extrait est réparti dans 3 tubes, le premier tube servant de témoin, le deuxième et le troisième tube pour réaliser les deux tests (test de Wilstater et test de Bâte-Smith) :

A- test de Wilstater: 3 à 4 gouttes d'HCl concentré + 3 à 4 tournures de Mg puis laissé agir, après quelques minutes le changement de coloration est observé (la présence des flavones est confirmée par l'apparition d'une couleur qui vire au rouge pourprée« flavonols », rouge violacées « flavonones et flavanols »).

B- test de Bate-Smith : additionner dans le troisième tube quelques gouttes de HCl concentré porté au bain marie pendant 30 minutes à une température de 70 C°, L'apparition d'une coloration rouge ou brun dénote la présence des anthocyanes.

I.2.4.Criblage des Tanins:

La solution hydro-méthanolique est repartie dans trois tubes, le troisième tube servant de témoin:

- **Tube n°1:** Addition de quatre à cinq gouttes de gélatine à 1% l'apparition d'une précipitation signifie la présence de tanins.
- **Tube n°2:** Addition de quatre à cinq gouttes de FeCl₃ en solution hydro-méthanolique. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchique.

I.2.5. Criblage des Alcaloïdes :

Dans un tube à essai de 16 ml, on introduit 0,5 mg de poudre végétale de l'espèce étudiée avec 10 ml d'acide sulfurique (1%), on agite pendant 2 minutes, Après filtration on partage le filtrat entre trois (3) tubes et on ajoute respectivement au :

- **Tube n °1 :** quelques gouttes de réactif Dragendorff.
- **Tube n °2 :** quelques gouttes de réactif Mayer.
- **Tube n °3 :** reste comme un témoin.

L'apparition d'une précipitation et une coloration de tube 1 en orange et le tube 2 en jaune confirme la présence des Alcaloïdes.

I.2.6. Criblage des Coumarines:

• Protocole :

2 g de matériel végétal en poudre mélangé à 10 ml de CHCl_3 , après filtration l'extrait chloroformique a soumi à une chromatographie sur couche mince (CCM) avec un éluant: Mélange Toluène: AcOEt (34:14): (v/v).

Les chromatogrammes obtenus sont visualisés sous UV visible à 366 nm. L'apparition des spots en couleur bleu indique la présence des coumarines.

I.2.7. Criblage des stérols, stéroïdes et triterpènes:

Dépigmenter 100 mg d'extrait hydro-méthanolique par addition de 10ml de cyclohexane et agitation pendant 5 minutes et dissoudre le résidu dépigmenté dans 12 ml de chloroforme. Sécher la solution obtenue sur Na_2SO_4 anhydre, puis filtrer. Répartir le filtrat dans quatre tubes à essai, le 4ème tube servira le témoin.

• **Tube n° 1 (test de Salkowski):** Incliner le tube à 45°C , ajouter 4 à 5 gouttes de H_2SO_4 . Le changement de coloration est noté immédiatement. Agiter le mélange légèrement et noter le changement graduel de coloration : une coloration rouge indique la présence de stérols insaturés.

• **Tube n° 2 (test de Libermann-Burschard) :** Additionner quatre gouttes d'anhydride acétique puis agiter légèrement. Ajouter une goutte de H_2SO_4 concentré. Le changement de coloration est observé pendant une heure : une coloration bleu-vert indique la présence de stéroïdes tandis que rouge-violet à rose dénote la présence de triterpène.

• **Tube n° 3 (test de Badjet-Kedde) :** Additionner quelques grains d'acide picrique.

L'apparition d'une coloration orange est due aux stéroïdes lactoniques.

I.2.8. Criblage des saponosides:

Le saponoside (ou saponine) est un hétéroside généralement d'origine végétale, des propriétés émulsifiantes à travers leur capacité de former des mousses. Pour identifier rapidement

un organe à saponosides, il suffit de mettre en évidence leur pouvoir aphrogène en observant la mousse très fine qui se forme après une simple agitation énergique (pendant 15 secondes).

Protocole expérimental :

On pèse 1 g de poudre végétale et l'introduit dans un tube à essai on ajoute 10 ml d'eau distillée, puis on chauffe l'extrait au bain marie à 85°C pendant 20 min, après refroidissement on agite manuellement de façon que le tube soit en position horizontale pendant 15 secondes. Après 10 minutes de repos une mousse se développe indiquant la présence des saponosides :

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1 à 2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif

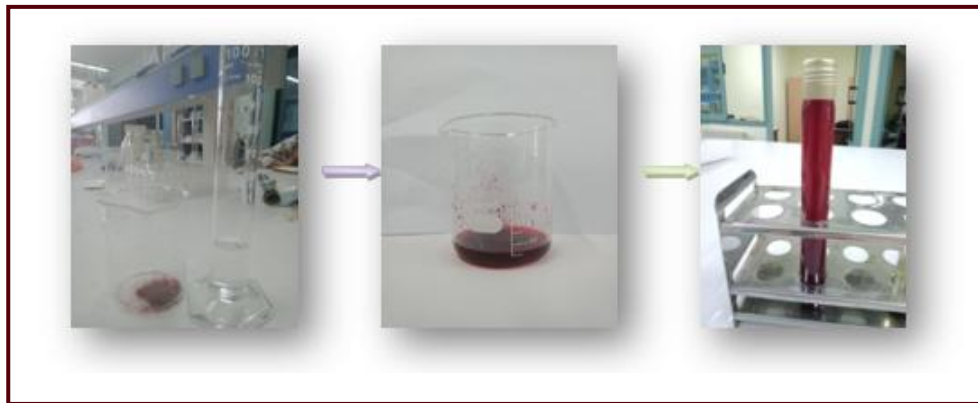


Figure 32: préparation de l'extrait.



Figure 33: l'extrait au bain marie à 85°C pendant 20 min.

I.2.9. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM):

La chromatographie : Et un outil analytique, utilisé pour la séparation, l'identification, et la quantification, de composés chimiques, dans des mélanges complexes, comme les extraits des plantes. La chromatographie sur couche mince a été utilisée pour visualiser la séparation des molécules des extraits.

• Principe :

La chromatographie sur couche mince repose sur les phénomènes d'adsorption, d'interactions et de polarité. Un mélange de composés est placé sur un support solide (phase stationnaire) plongé dans un solvant (phase mobile) qui se déplace par capillarité le long de la phase stationnaire. La phase mobile va entraîner les composés qui migreront à une hauteur variante en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. On peut ainsi caractériser les composés selon leur R_f .

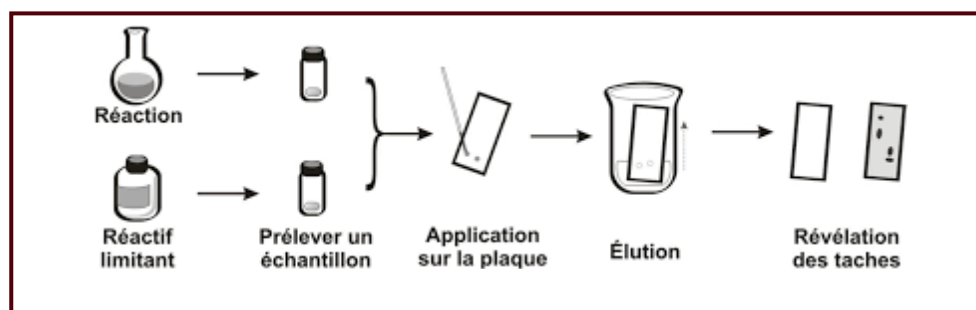


Figure 34: principe de chromatographie.

• Mode opératoire

A / Préparation de la phase mobile : La cuve de migration est partiellement remplie du mélange de solvant (phase mobile) afin qu'elle soit saturée en vapeur d'éluant ce qui facilite et améliore la migration. La phase mobile est constituée d'un mélange de solvants. Différents systèmes solvants ont été essayés pour définir celui qui donne une meilleure séparation.

On a utilisé 3 systèmes solvant (S1, S2 ET S3), à différentes polarités, pour mieux connaître, le profil flavonique de l'extrait méthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* L.

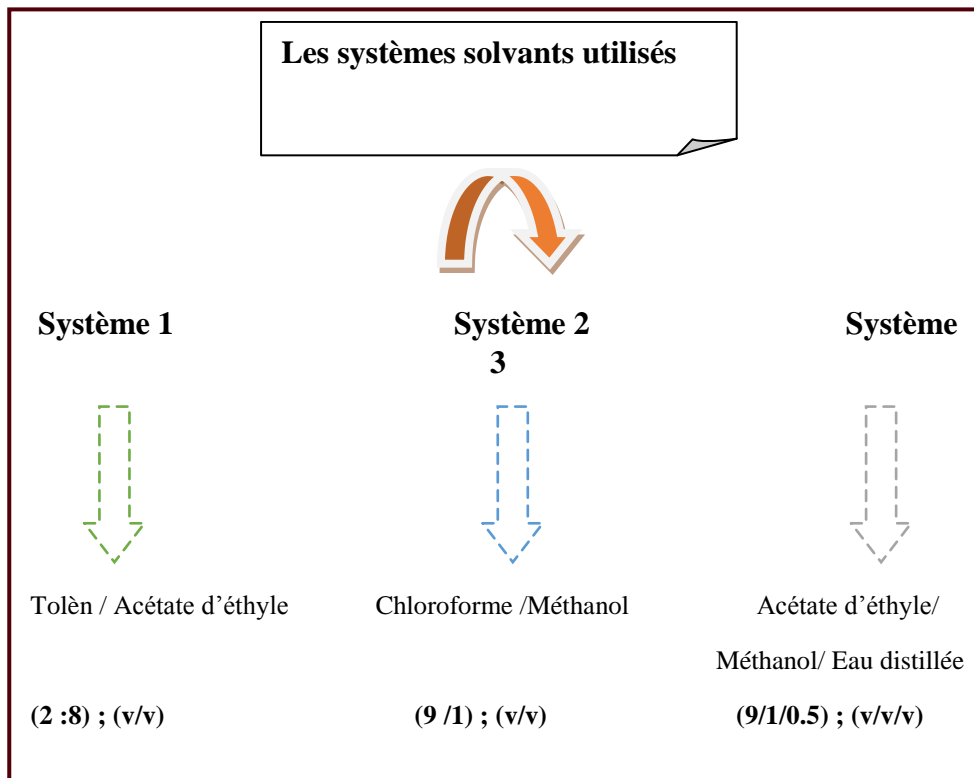


Figure 35: les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM.

B / la phase stationnaire : La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice sur des plaques en aluminium. (**Figure 36**).



Figure 36: plaque de CCM.

C / Le dépôt des échantillons : Le dépôt se fait à l'aide d'une pipette pasteur sur les points marqués au long de la ligne de la plaque CCM. Le diamètre de la tâche ne doit pas dépasser 4 mm pour réussir la séparation des échantillons. faire 2 à 3 dépôts successifs de l'extrait. Le dépôt de produit doit être effectué de façon homogène à l'aide d'un capillaire sans creuser le support solide. **(figure 37).**

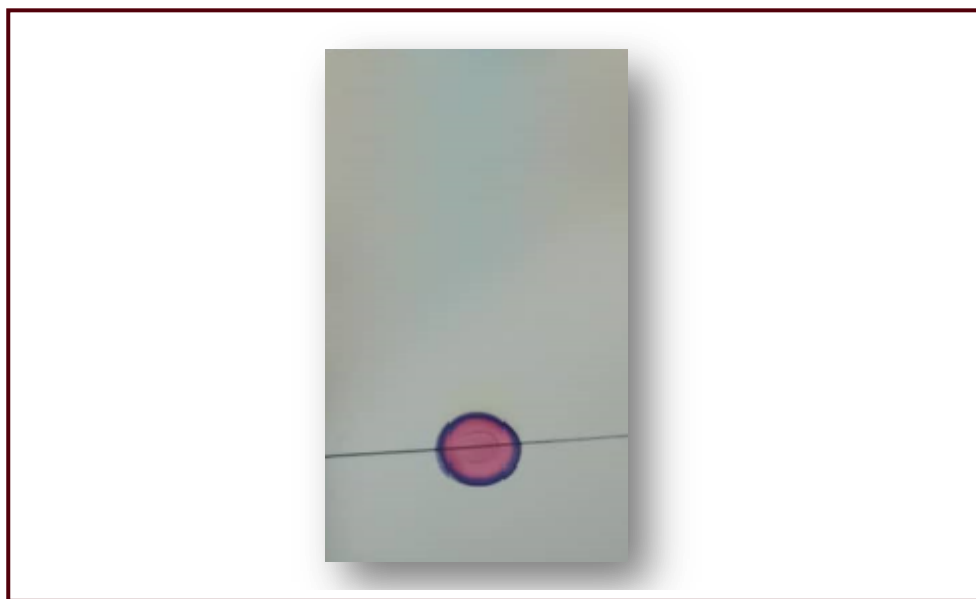


Figure 37: Dépôt des échantillons.

D- Développement des plaques : chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque (chromatographie ascendante). Lorsque le front de séparation arrive à 2 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, on retire cette dernière de la cuve. La plaque est séchée à l'aire libre. **(Figure 38).**

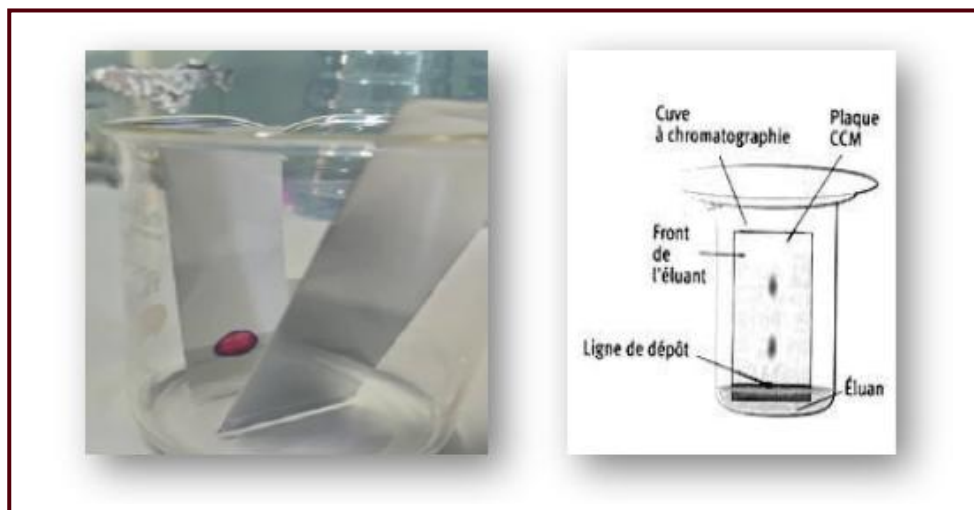


Figure 38: développement de la plaque.

Visualisation sous UV à longueur d'onde : 254 nm. On prépare la phase mobile, dans la cuve chromatographique bien fermée.



Figure 39: Observation des chromatogrammes.

I.3 Evaluation des activités biologiques:

I.3.1 Etude de pouvoir antioxydant :

La concentration préparée a été utilisée pour toutes les méthodes. La concentration de la solution mère de l'échantillon est exprimée en ppm (partie par million). La ppm est la fraction valant (10⁻⁶), c'est-à-dire un millionième. Une quantité de 4 mg de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L., ont été

dissoutes dans 1 ml du méthanol (Solution mère de 4000 ppm) avec 7 concentrations différentes (une série de dilution de 1/2) de l'échantillon en ordre décroissant.

I.3.1.1. Activité anti radicalaire au DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres a été menée selon la méthode de **Blois (1958)**. Brièvement, 40 µL/1 ml MeOH de l'échantillon à différentes concentrations, ont été ajoutés à 160 µL de DPPH fraîchement préparée à une concentration de (0,1 mM). L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm, après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$DPPH (\%) = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

AC: Absorbance du contrôle.

AE: Absorbance de l'extrait.

Nous avons déterminé le paramètre CI50 (valeur de concentration inhibitrice), c'est la concentration de l'extrait qui provoque une inhibition de 50% de l'activité du DPPH (changement de la couleur). Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées. Donc IC 50 de chaque extrait est calculé :

$$CI50 = (Y - b) / a$$

I.3.1.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS•+

Procédure Selon le protocole de **Re et al., (1999)**, un volume 40 µl de l'extrait à différentes concentrations ont été mélangé avec 160 µl de l'ABTS•+. Le mélange est laissé à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 10 min. Un blanc est parallèlement préparé suivant testé par le méthanol. La lecture est réalisée à l'aide d'un lecteur microplaque à 734 nm. ▪ Le pourcentage de réduction du radical ABTS+ est calculé selon l'équation suivante

$$Activité ABTS (\%) = [(Abs \text{ contrôle} - Abs \text{ extrait}) / Abs \text{ contrôle}] \times 100$$

I.3.1.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} , le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans l' extrait a été déterminé selon la méthode décrite par **Aicha Bouratoua en 2017**. Brièvement, 10 μl de l' extrait à différentes concentrations ont été mélangé avec 40 μl d' une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 50 μl d' une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L' ensemble est incubé à l' étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50 μL de l' acide trichloroacétique (TCA) à 10%, 40 μL d' eau distillée et 10 μL d' une solution aqueuse de chlorure ferrique FeCl_3 à 0,1% sont additionnés. La lecture de l' absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 700 nm. Une augmentation de l' absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

I.3.1.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{2+} - phenanthroline

L' activité de réduction par la formation du complexe Fe^{2+} -phenanthroline de l' extrait a été mesurée selon la méthode décrite par **Szydłowska-Czerniaka (2008)**. De l' extrait de différentes concentrations, de volume de 10 μl ont été ajoutés à une solution de : 50 μl FeCl_3 (0.2%), 30 μl Phenanthroline (0.5%) et 110 μl de méthanol. Le mélange a été agité vigoureusement et incubé pendant 20 min à l' étuve à température de 30°C. L' absorbance a été déterminée à 510 nm. Les résultats ont été calculés à titre de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) correspondent à la concentration indiquant 0,50 d' absorbance.

I.3.1.5. Activité Silver nanoparticule (SNP) assay

Procédure selon le protocole décrit par **Mustafa ozyurek. (2012)**, un volume de 10 μl de l' extrait avec un volume de 130 μl de solution SNP, et de 50 μl de H_2O ont été induits dans chaque puits. Ensuite le mélange est incubé à l' obscurité pendant 30min à 25°C. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l' extrait par le solvant utilisé (Méthanol). La lecture des absorbances a été mesurée à 423 nm.

I.4. Evaluation de l'activité antifongique:

↳ préparation de milieu de culture PDA

La gélose glucosée à l'extrait de pomme de terre est recommandée pour le dénombrement des levures et moisissures dans denrées alimentaires ainsi que les produits cosmétiques et pharmaceutiques.

– Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée:

- 200g de l'extrait de pomme de terre, 20g de glucose.,20g de l'Agar .
- Mettre en suspension 200 grammes dans 1 litre d'eau pure. Porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant au moins 1minute.
- Répartir en tubes ou flacons.
- Autoclave à 121°C pendant 20 minutes.
- La gélose stérile bouillie dans un bain-marie pendant environ 1h du temps pour devenir liquide, puis il sera coulé dans des boîtes de pétrie avec une épaisseur de 4 à 5mm dans une zone stérile par le Bec benzène puis laissées séchera température ambiante près du bec benzène pour éviter leurs contaminations avec les bactéries de l'air.



Figure 40: préparation de milieu de culture PDA.

II. Protocole expérimentale

Notre étude a porté sur deux champignons phytopathogènes : *Aspergillus ochraceus* et *Fusarium oxysporum f.Sp Albedinis*. Avant chaque série d'expérimentations, les microorganismes subissent un rajeunissement sur le milieu PDA. L'incubation est faite à $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ et à l'obscurité pendant cinq jours. L'activité antifongique de l'extrait naturel a été recherchée in vitro sur milieu PDA. Le milieu de culture seul est utilisé en guise de témoin. L'extrait a été introduite dans le milieu de culture. Le choix des doses utilisées est basé sur des tests préliminaires. Elles vont de 5mg/ml.

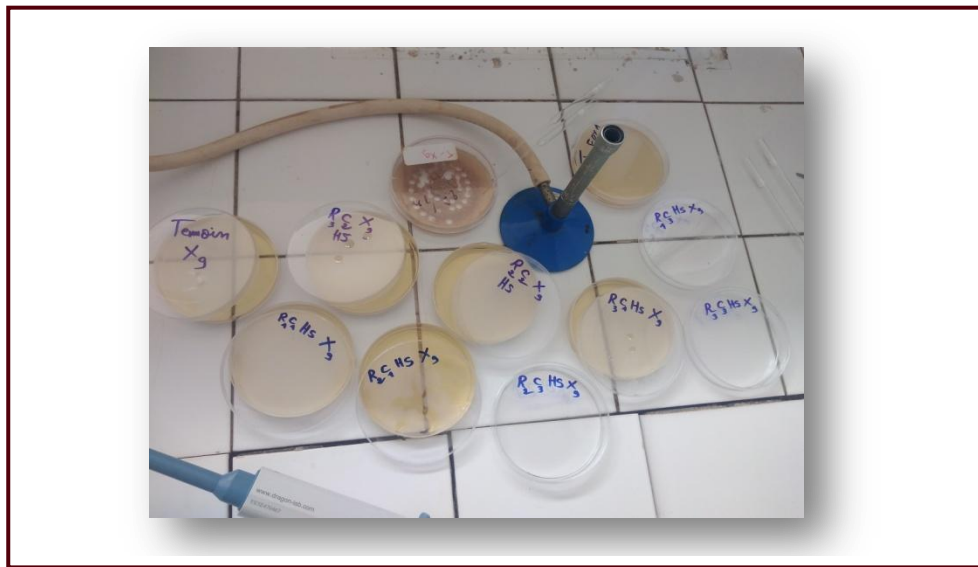


Figure 41: écoulement des boîtes.

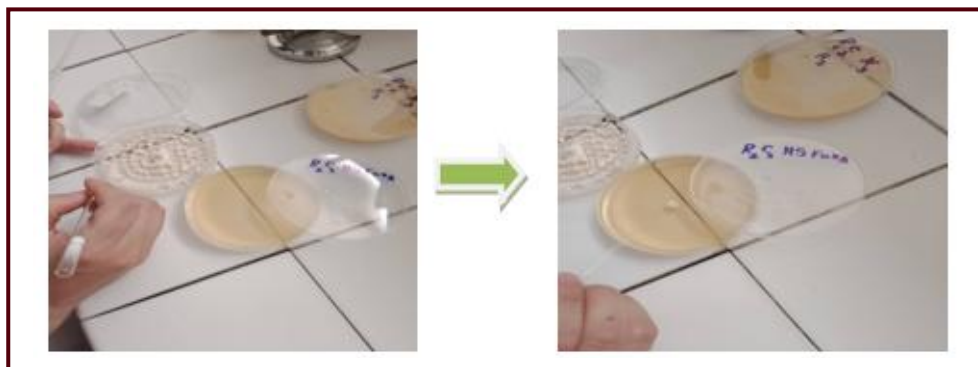


Figure 42: la mise des disques fongiques.

Lecture des résultats

La lecture des résultats a été effectuée après cinq jours d'incubation à 25°C par la mesure du diamètre de la zone de croissance des thalles. Parallèlement, nous avons déterminé le diamètre des souches fongiques en absence de l'extrait de la plante. L'effet antifongique est déterminé par la mesure du pourcentage d'inhibition de la croissance diamétrale en utilisant la formule suivante:

$$P.I.C.D = (\varnothing t - \varnothing e / \varnothing t) \times 100$$

P.I.C.D = pourcentage d'inhibition de la croissance diamétrale.

$\varnothing t$ = diamètre moyen des thalles témoins.

$\varnothing e$ = diamètre moyen des thalles exposés aux extraits végétaux.

L'activité antifongique des extraits de plantes étudiées a été évaluée selon le pourcentage de l'inhibition de la croissance diamétrale des talles (%):

- 30 à 40 %: faible activité.
- 50 à 60 %: activité modérée.
- 60 à 70 %: bonne activité.
- >70 %: excellente activité. (**Abdellatif et al, 2011**).

The page features a decorative border with a repeating geometric pattern in a dark red color. In the center, there are four abstract, layered shapes in a lighter red color, arranged around the text. The text is centered and reads:

**Chapitre II :
Résultats et
Discussion**

III. Résultats et discussion

III.1. Screening phytochimique:

Les tests phytochimiques réalisés sur les extraits méthanoliques, chloroformiques et étheriques des fleurs de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L., afin de caractériser les groupes de métabolites secondaires présents dans cette plante. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques.

III .1.1. Criblage des composés phénoliques:

III.1.1.1. Criblage des Quinones et Anthraquinones

Les réactifs spécifiques des Quinones et Anthraquinones ont révélé que les fleurs de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L. sont dépourvues de ces métabolites secondaires.

III.1.1.2. Flavonoïdes et anthocyanes.

La mise en évidence des flavonoïdes dans l'extrait hydrométhanolique des fleurs d'oseille de Guinée a démontré que ces organes sont riches en flavonoïdes. Le traitement par un acide (HCl) et une base (NaOH) ont donné une coloration rouge et bleue respectivement indiquant la présence d'anthocyanes, molécules responsables de la couleur des fleurs.

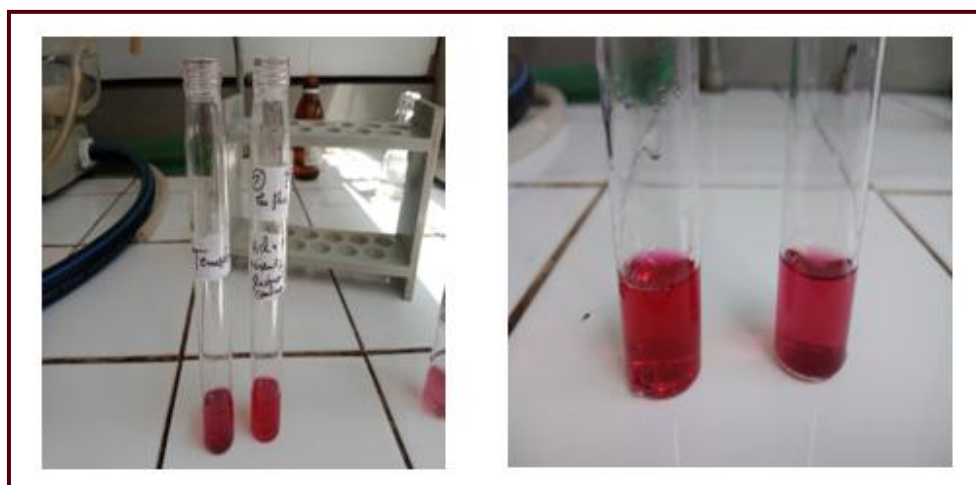


Figure 43: Résultats de criblage des flavonoïdes.

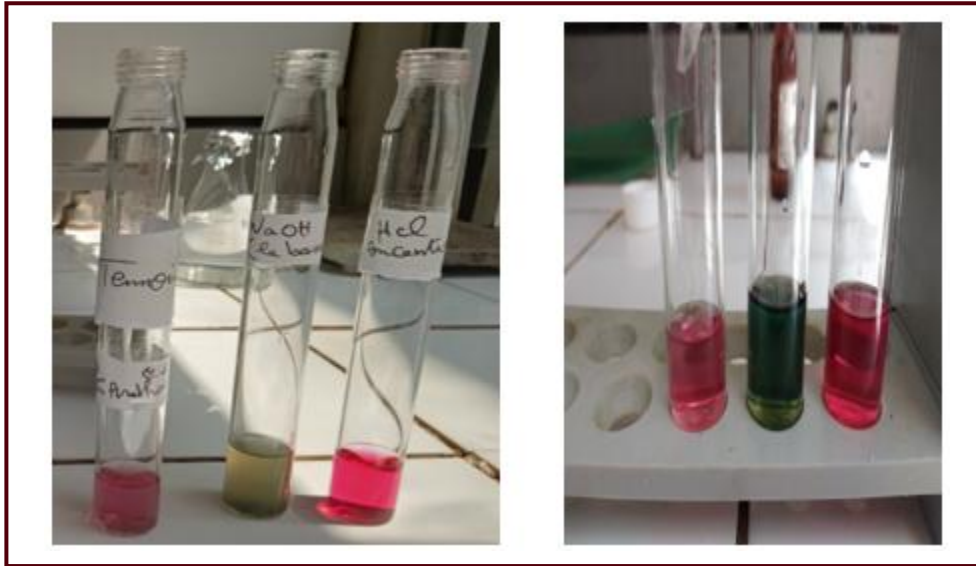


Figure 44: Résultats de criblage des anthocyanes.

III .1.1.3.Tanins

Les réactifs utilisés pour la détection des tanins a mis en évidence l' apparition de précipité blanc et une coloration bleue noiratre intense signifiant que les fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* L. sont riches en tanins galliques.

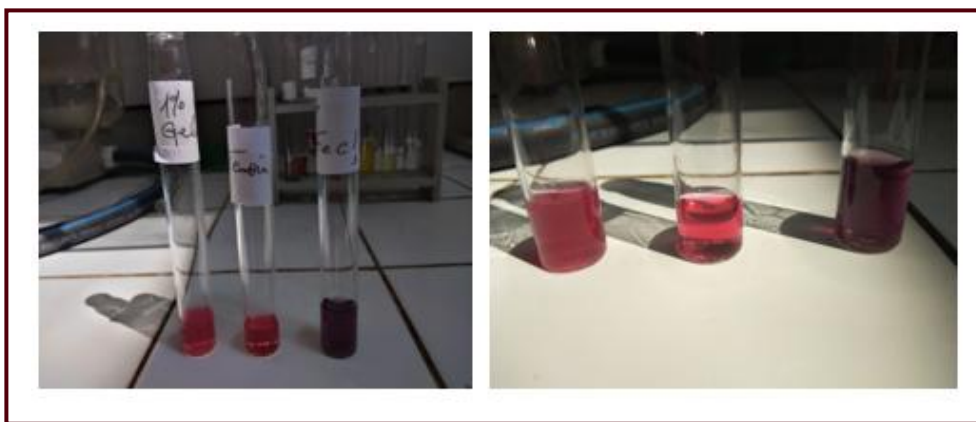


Figure 45: Résultats de criblage des Tanins galliques.

Chapitre II : Résultats et Discussion.

- **Tableau N° 4:** Résultats des criblages des composés phénoliques.

Métabolites secondaires	Quinones	Anthraquinones	Flavonoides	Anthocyanes	Tanins
Flleurs d' <i>H. sabdariffa</i> L.	-	-	+++	+++	+++

- : Test négatif

+ : Test faiblement riche.

++ : Test moyennement riche.

+++ : Test fortement riche.

III.1.1.4. Criblage des coumarines :

L'apparition d'une fluorescence sous une lumière par la méthode du CCM indique la présence des coumarines dans la plante *Hibiscus sabdariffa* L.

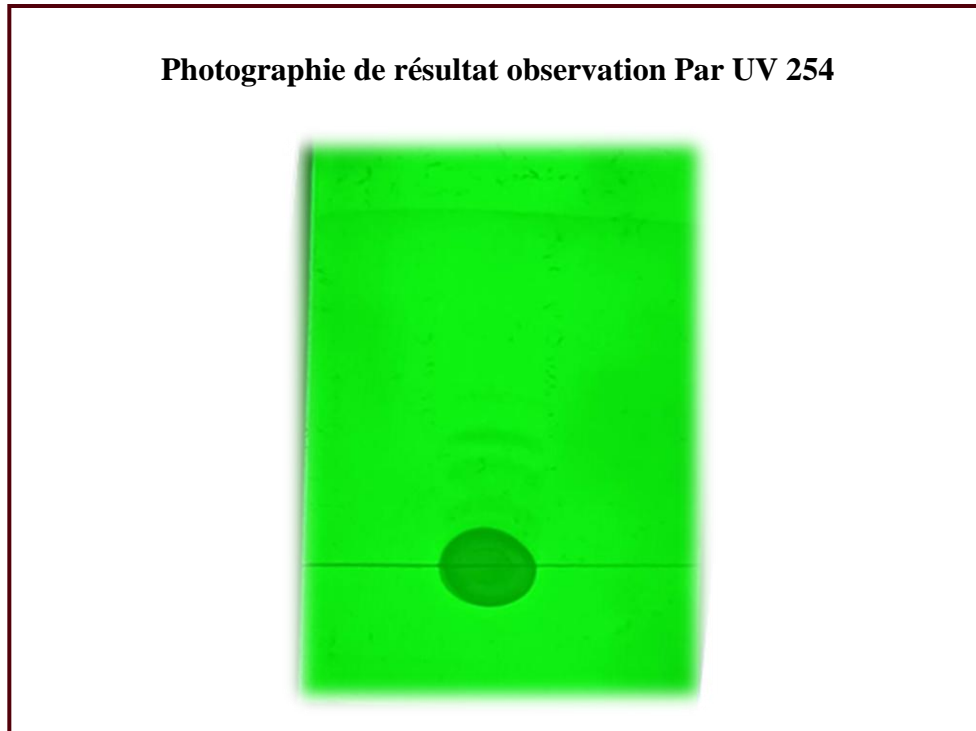


Figure 46: Résultats de criblage des coumarines.

III .1.2. Criblage des stérols, stéroïdes et tri-terpènes

Les tests phytochimiques réalisés sur l' extrait des fleurs de la plante nous ont confirmé la présence des stérols et stéroïdes, par contre les triterpènes sont dépourvus de la plante.

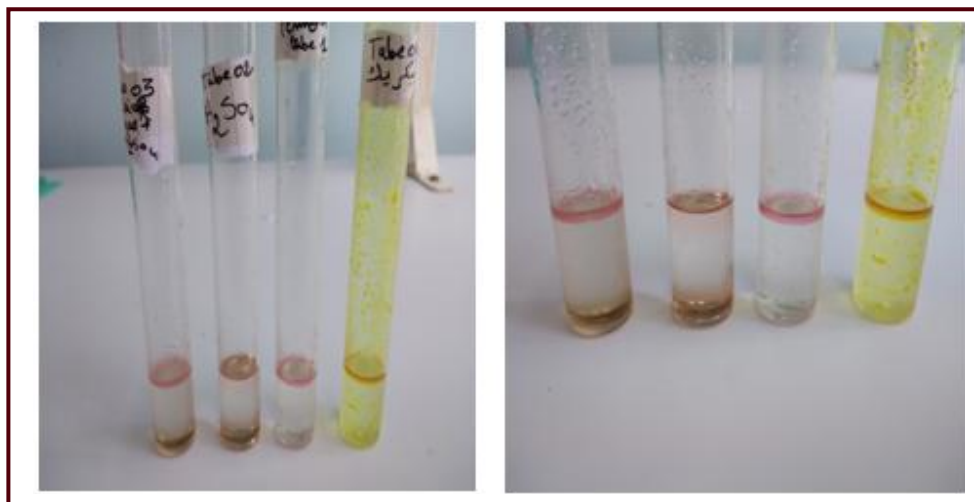


Figure 47: Résultats de criblage des stérols, stéroïdes.

III.1.3 Cribbage des saponosides:

L'apparition d'une mousse persistante durant 30 minutes témoigne la présence de saponosides dans les fleurs.



Figure 48: Résultats de criblage des stérols, stéroïdes.

Chapitre II : Résultats et Discussion.

- **Tableau N° 5:** Résultats de criblages des sterols, steroïdes et triterpenes.

Métabolites secondaires	Stérols	stéroïdes	saponosides
Fleurs d' H. sabdariffa	+++	+++	+++

- : Test négatif

+ : Test faiblement riche.

+ + : Test moyennement riche.

+ + + : Test fortement riche.

III .1.4. Criblage des Alcaloïdes:

Les tests phytochimiques des criblages du alcaloïdes indique que : La plante *Hibiscus sabdariffa* L., est riche en alcaloïdes.

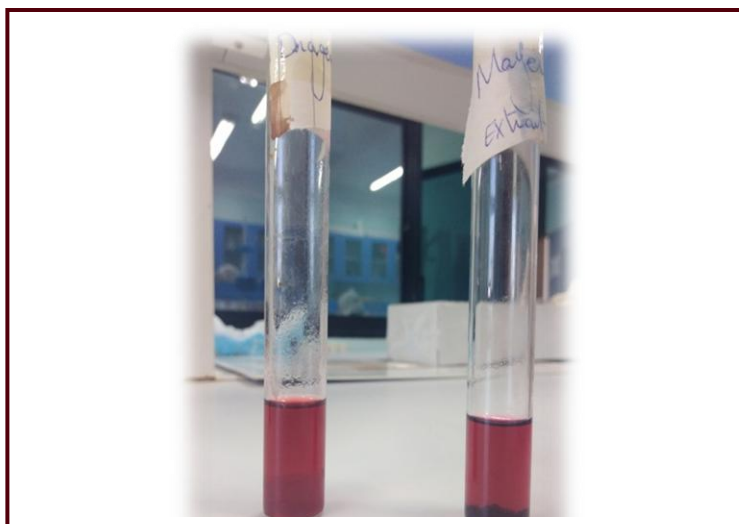


Figure 49: Résultats de criblage des Alcaloïdes.

} Criblage des Alcaloïdes par CCM :

Teste positif confirme la présence des alcaloïdes dans l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L.

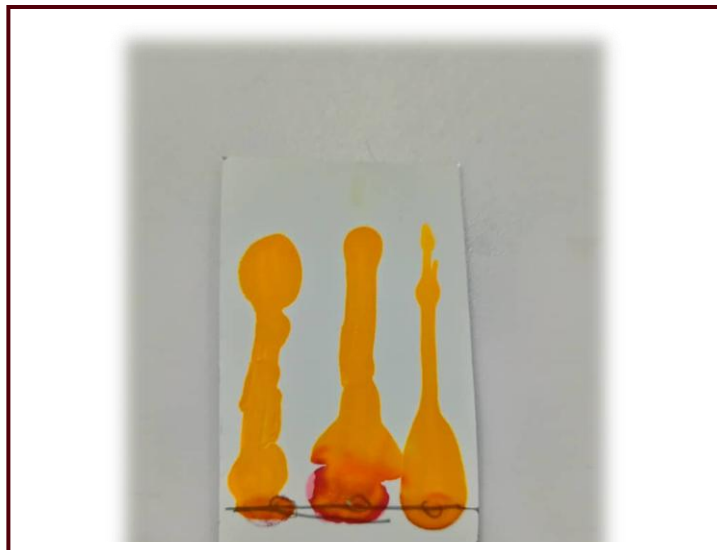


Figure 50: Résultats de criblage des Alcaloïdes par CCM.

● **Tableau N° 6:** Résultats de criblages des Alcaloïdes.

Métabolites secondaires	Mayer	Dragendorff
Fleurs d' H. sabdariffa	+++	+++

- : Test négatif

+ : Test faiblement riche.

+ + : Test moyennement riche.

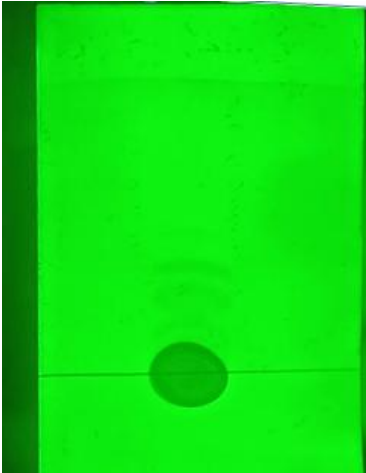

+ + + : Test fortement riche.

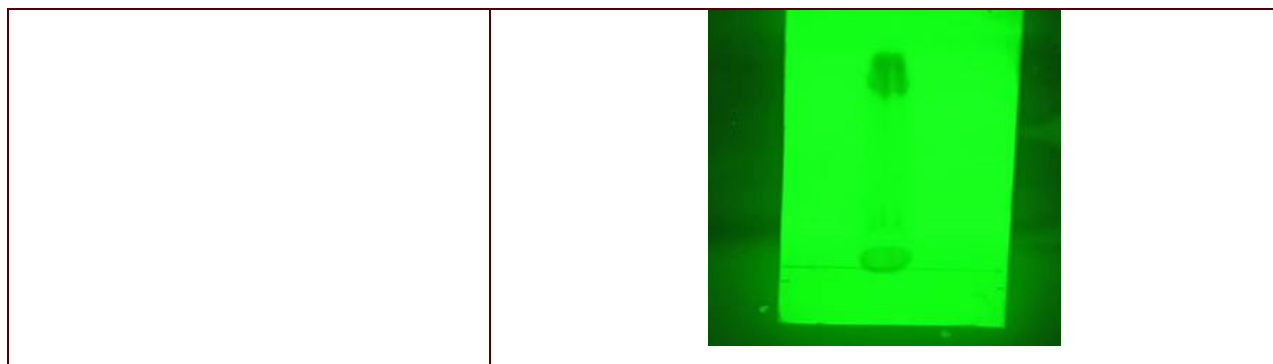
III.1.5. Chromatographie sur couche mince CCM:

L'étude analytique par CCM de l'extrait hydro - méthanolique a montré que la plante *Hibiscus sabdariffa* L., est riche, essentiellement en composés phénoliques, et stérols, ce qui confirme les résultats obtenus par les criblages précédents.

Chapitre II : Résultats et Discussion.

- **Tableau N° 7:** Visualisation des chromatogrammes prise sous UV (254 et 366nm) pour l'extraits EMHS.

Système solvant	Photographie des résultats Observation par UV 254
S1 Chloroforme /MeOH (90/10)	
S2 Acétate d'éthyle /Méthanol / Eau 10/1/0.5	
S3 Butanol / Acide acétique (6 : 1,5 : 2,5).	



III.2. Les activités antioxydantes

L'extrait de la plante a des sources potentielles des composants chimiques naturels responsables d'activité antioxydante. A cet effet, plusieurs essais ont été menés par certain auteur pour évaluer le potentiel antioxydant de l'extrait. C'est dans ce contexte que nous avons évalué l'activité antioxydante de l'extrait *Hibiscus sabdariffa* L. par cinq méthodes différentes.

L'acide ascorbique, Trolox sont connus pour leurs propriétés antioxydante et ils sont utilisés comme control positif.

III .2.1. Activité antiradicalaire DPPH

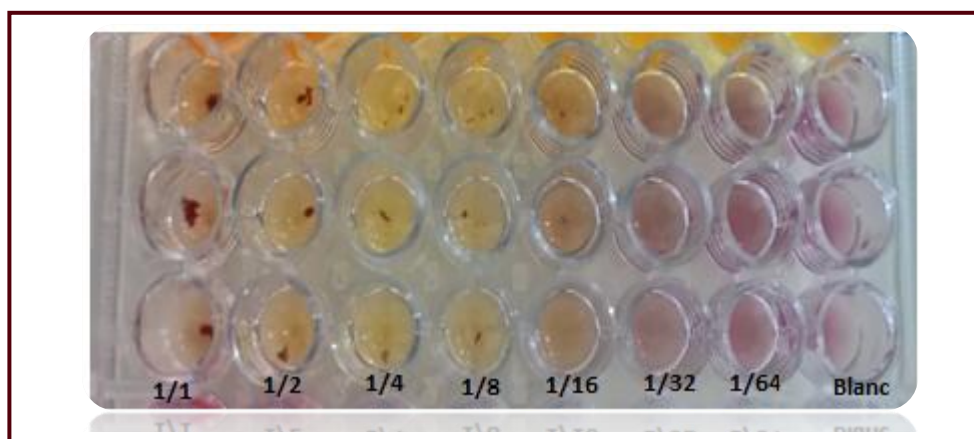


Figure 51: La plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Les résultats obtenus nous ont permet de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait et des standards (**Fig. 52 et 53**)

Chapitre II : Résultats et Discussion.

La comparaison de l'activité scavenger du radical DPPH de l'extrait et des standards (L'acide ascorbique, Trolox) montrent une activité antiradicalaire dose dépendante vis-à-vis du radical DPPH. C'est -à-dire le piégeage des radicaux libres DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait et par conséquent l'augmentation de l'activité antiradicalaire.

● **Tableau N° 8:** Inhibition du radical DPPH par l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

concentrations	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400µg	800µg	IC ₅₀ (µ/ml)
EMHS	19,24 ±4,06	24,56 ±2,72	25,24 ±1,32	42,09 ±14,76	69,44 ±4,60	71,83 ±3,97	77,97 ±1,59	78,46 ±4,31
C.des standards	0.78125 µg	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	IC ₅₀ (µ/ml)
Trolox	6.42 ±0.91	13.33 ±2.14	30.19 ±0.67	61.48 ±2.98	87.16 ±0.28	88.46 ±0.11	87.72 ±0.47	5.12±0.2 1
Ascorbi acid	0.31 ±1.02	12.90 ±0.28	29.69 ±0.39	76.67 ±0.37	84.94 ±0.84	87.78 ±0.49	86.36 ±0.21	4.39 ±0.01

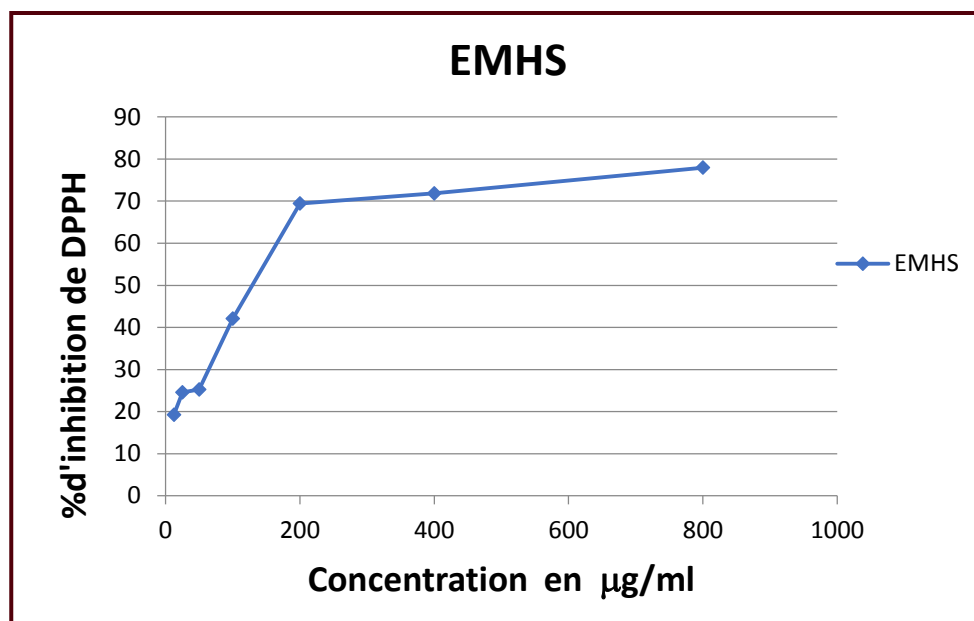


Figure 52: courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait.

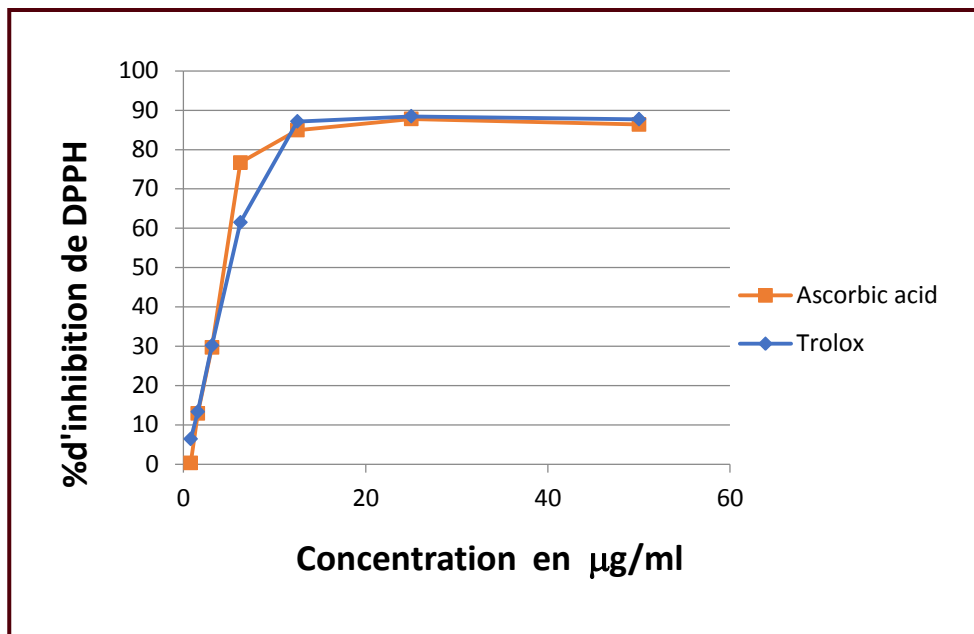


Figure 53: courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de Trolox et Ascorbic acid.

→ Détermination des CI50

Pour mieux comprendre le pouvoir antioxydant de notre extrait, nous avons déterminé la valeur d'CI50 µg/ ml qui est définie comme étant la concentration de l'extrait antioxydant nécessaire pour inhiber et réduit 50% du radical DPPH. Dont les valeurs d'CI50 calculées, nous a permis d'évaluer et comparer l'efficacité de l'extrait plus la valeur est petite, plus l'activité antioxydante à piéger les radicaux libres est élevée. Les valeurs d'CI50 de l'extrait, sont illustrées dans (la figure 54)

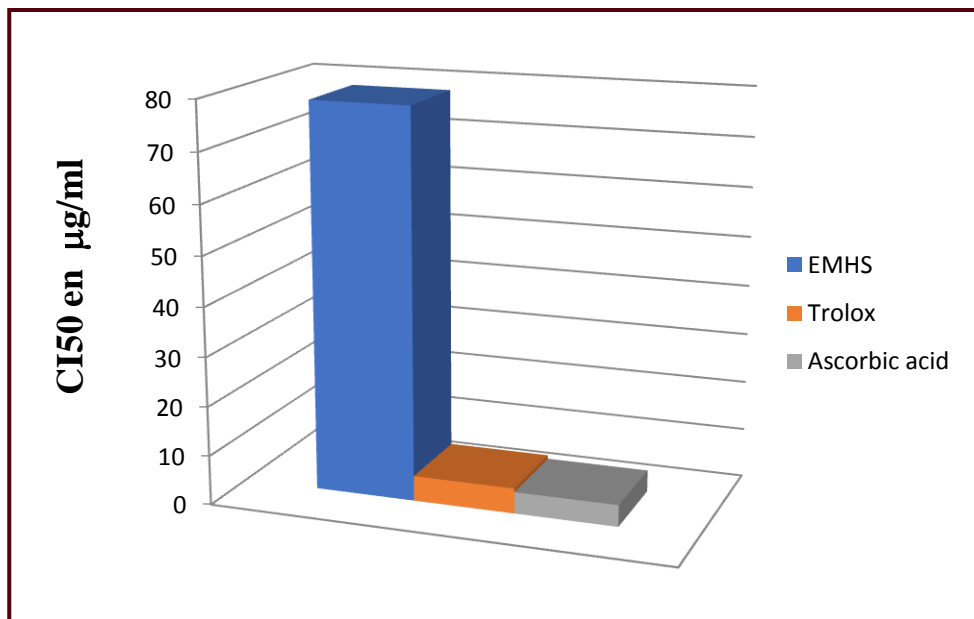


Figure 54: histogramme représentant les valeurs des CI50 de l'extrait et standards obtenus par le test DPPH.

D'après les résultats obtenus par (la figure 46) , on constate que l'extrait méthanolique de la plante *Hibiscus sabdariffa* L., possède une activité antioxydante modéré d'ont IC50 (78,46 ± 4,31 µg/ml) et cette activité antiradicalaire reste inférieure à celle du L'acide ascorbique, Trolox (CI50 = 4.39±0.01 µg/ml ; 5.12±0.21 µg/ml) respectivement.

III .2.2.activité du piégeage du cation radical ABTS•+

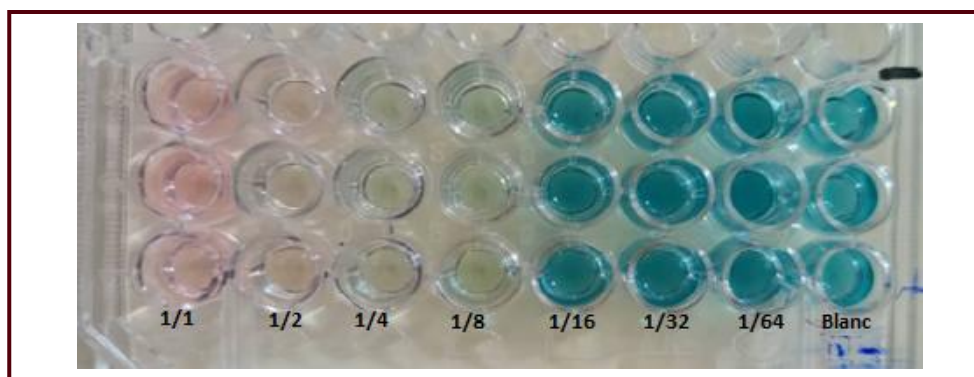


Figure 55: La plaque de dosage de l'activité du piégeage du cation radical ABTS^{•+} de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Chapitre II : Résultats et Discussion.

les résultats obtenus de ce test, nous ont permis de tracer le graphe de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'échantillon et l'histogramme des CI50 de l'extrait (fig. 56, 57 et 58).

- **Tableau N° 9:** Inhibition du cation radical $ABTS^{*+}$ par l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

concentrations	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400µg	800µg	IC ₅₀ (µ/ml)
EMHS	NA	NA	NA	77,30 ±2,93	84,56 ±0,92	90,80 ±1,41	92,04 ±0,52	81,07 ±1,72
C.des standards	0.78125 µg	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	IC ₅₀ (µ/ml)
Trolox	14.74 ±0.37	26.15 ±0.65	51.70 ±1.51	89.72 ±0.67	91.84 ±1.19	92.89 ±0.19	92.89 ±1.19	3.21 ±0.06
Ascorbic acid	13.43 ±0.82	28.76 ±0.67	52.94 ±0.94	92.40 ±0.88	92.96 ±0.11	93.08 ±0.19	93.21 ±0.11	3.04 ±0.05

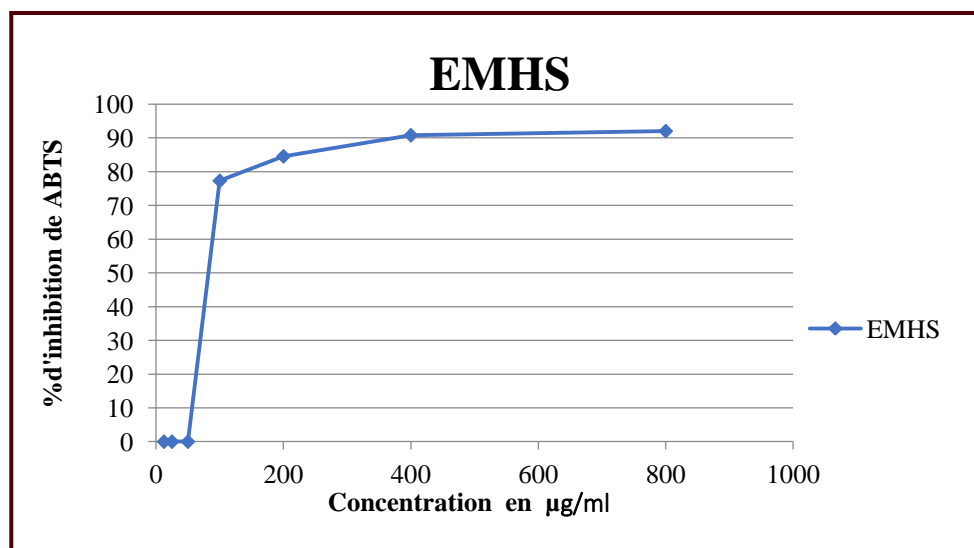


Figure 56: courbe des pourcentages d'inhibition du radical ABTS en fonction de la concentration de l'extrait.

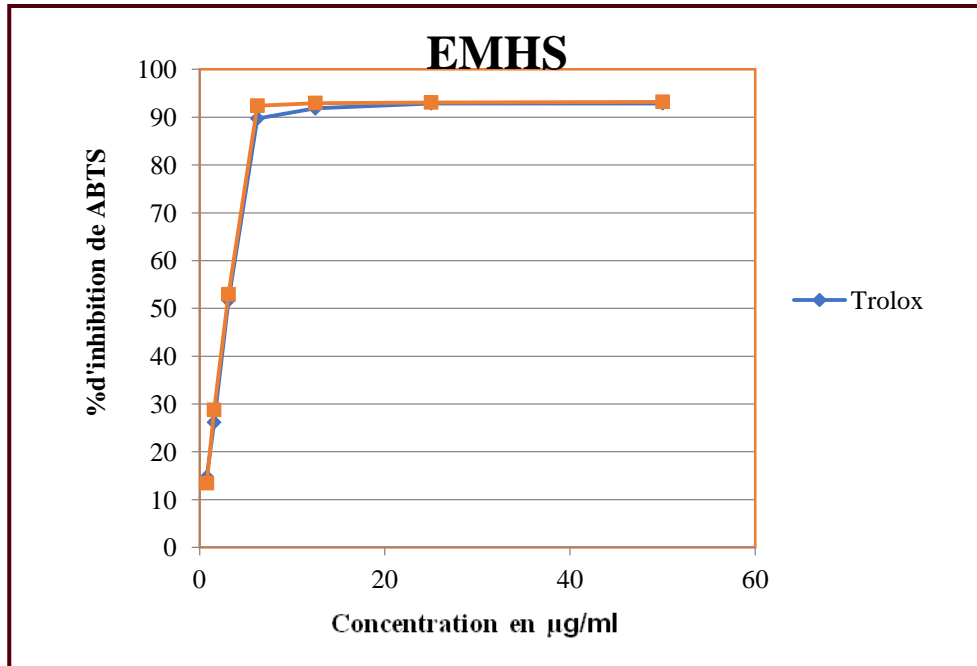


Figure 57: courbe des pourcentages d'inhibition du radical ABTS en fonction de la concentration de Trolox et Ascorbic acid.

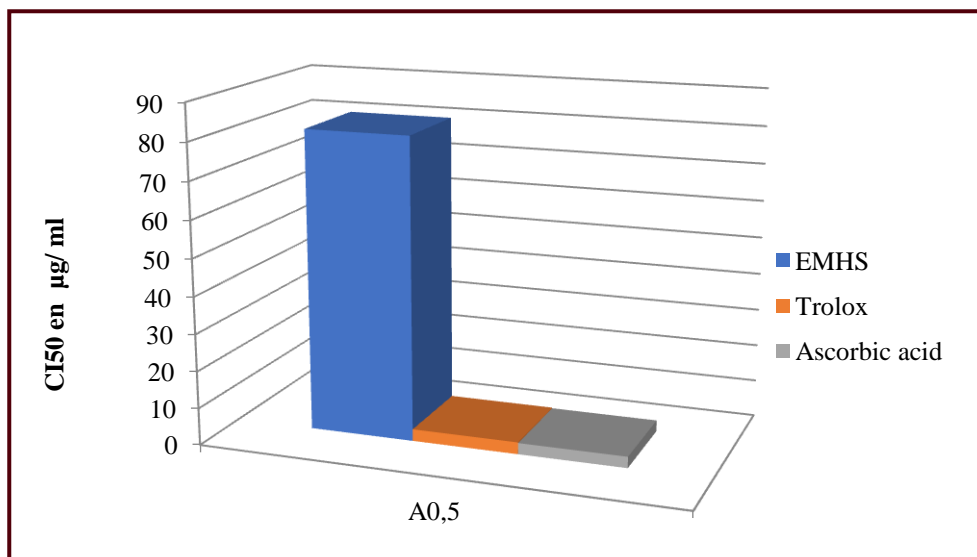


Figure 58: histogramme représentant les valeurs des CI50 de l'extrait et standards obtenus par le test ABTS.

Chapitre II : Résultats et Discussion.

D'après la (figure 58) des pourcentages d'inhibition, nous observons que le taux d'inhibition augmente en fonction de l'augmentation de la concentration utilisée. Les résultats montrent que l'extrait méthanolique de la plante *Hibiscus sabdariffa* L., représente une activité antioxydante modérée. Les CI50 ($81,07 \pm 1,72$) de l'extrait reste faible que celle de L'acide ascorbique, Trolox (3.04 ± 0.05 ; 3.21 ± 0.06 nm). L'analyse comparative d'extrait à aboutit aux résultats suivants :

Ascorbique acide > Trolox > MeOH

III .2.3. Activité – Phénanthroline

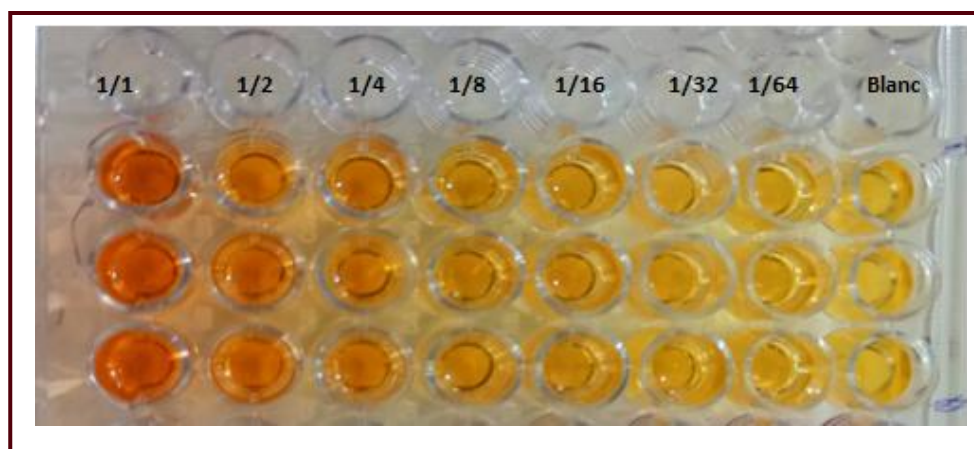


Figure 59: La plaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phénanthroline par l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Les résultats obtenus on permit de tracer la courbe des absorbances en fonction des concentrations de l'extrait et des standards et l'histogramme des concentrations réductrices (IC50) (fig. 60, 61 et 62).

Chapitre II : Résultats et Discussion.

- **Tableau N° 10:** Inhibition du Phénanthroline par l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

concentrations	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0,5} (µ/ml)
EMHS	0.33 ±0.01	0.35 ±0.04	0.42 ±0.01	0.47 ±0.03	0,62 ±0.02	0,80 ±0,08	1,53 ±0,05	33,34 ±0,09
C.des standards	0.0976µg	0.195µg	0.390 µg	0.781 µg	1.562 µg	3.125 µg	6.25 µg	A _{0,5} (µ/ml)
Trolox	0.25 ±0.01	0.24 ±0.01	0.26 ±0.01	0.26 ±0.00	0.32 ±0.01	0.38 ±0.01	0.56 ±0.02	5.21 ±0.27
Ascorbicacid	0.26 ±0.01	0.29 ±0.00	0.29±0.02	0.31 ±0.01	0.37 ±0.01	0.50 ±0.00	0.80 ±0.00	3.08 ±0.02

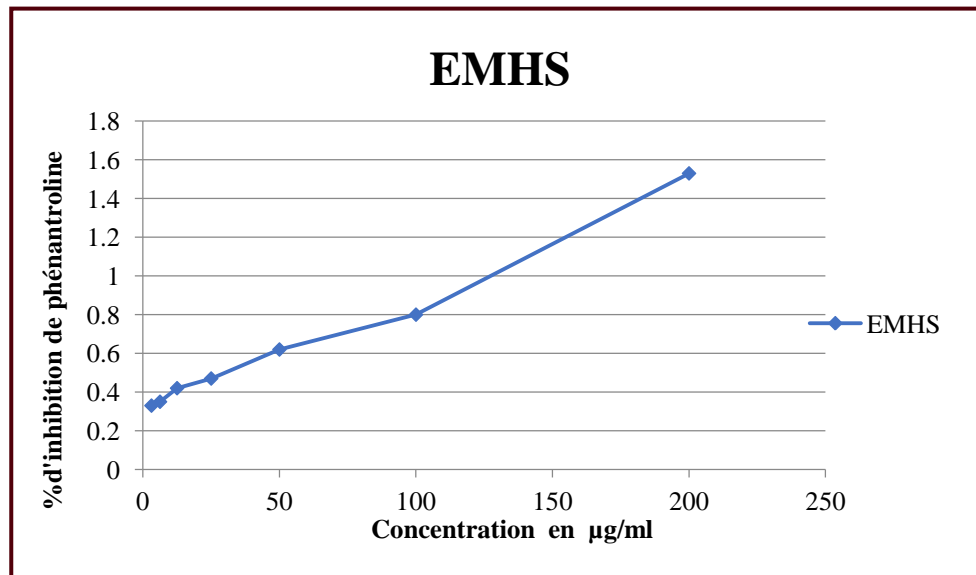


Figure 60: Courbe d'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait phénanthroline.

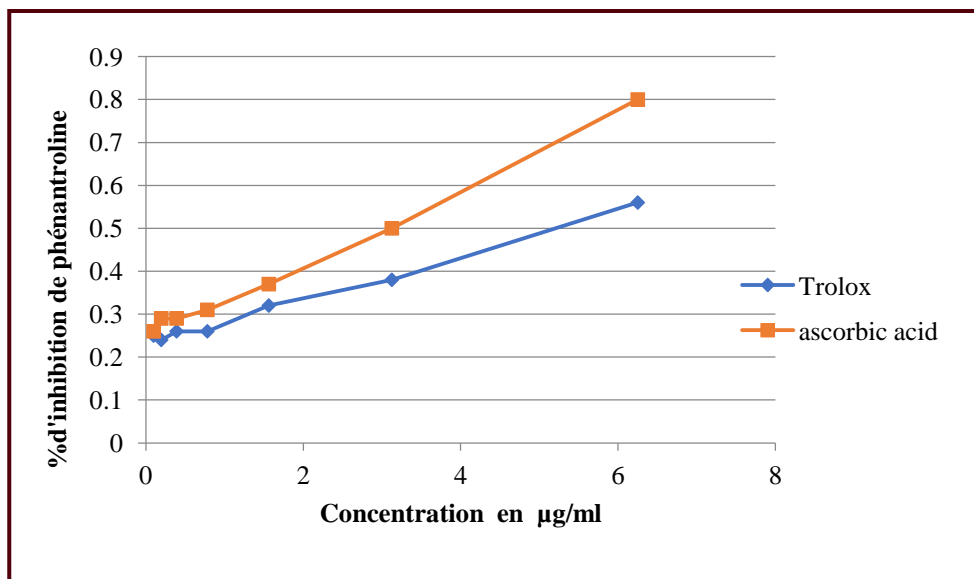


Figure 61: courbe d'absorbance en fonction de concentration Phénanthroline de Trolox et Ascorbic acid.

A partir de l'analyse statistique des résultats, on a trouvé que l'extrait présentent une capacité réductrice de fer ferrique (Fe^{3+}) dose dépendante. A une concentration 800 mg/ml, l'extrait MeOH possède une excellente activité réductrice de fer ferrique (Fe^{3+}) ($33,34 \pm 0,09$ nm).

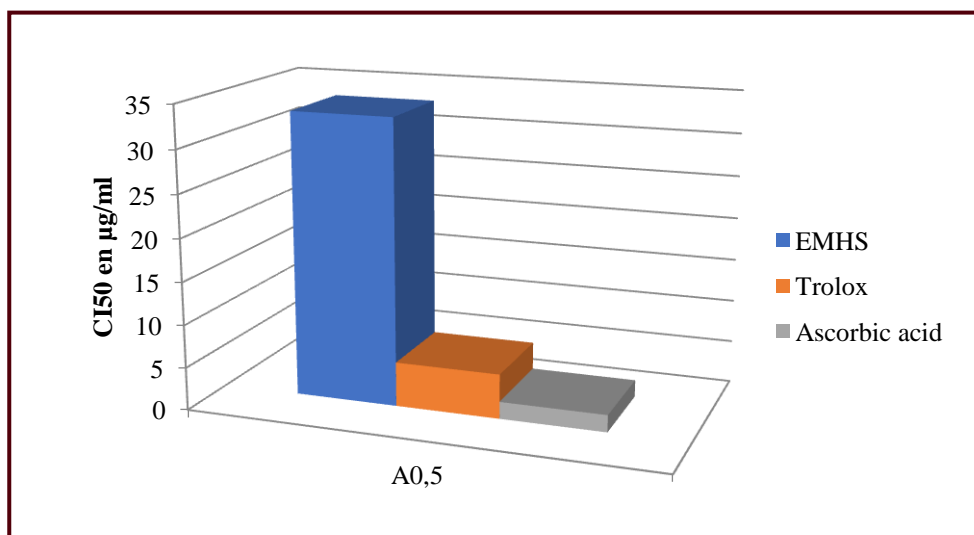


Figure 62: Histogramme représentant les valeurs des A0.5 de l'extrait et standards obtenus par le test phénanthroline.

Chapitre II : Résultats et Discussion.

D'après les résultats représentés dans l'histogramme illustré au-dessus, on constate que l'extrait MeOH exhibent une meilleure activité réductrice du (Fe³⁺) (IC₅₀ = 33,34±0,09 µg/ml) l'extrait a montré une faible activité réductrice de (Fe³⁺) par rapport au l'acide ascorbique et Trolox en tant que contrôle positif. Ceci du à la pureté des standards utilisés.

III .2.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

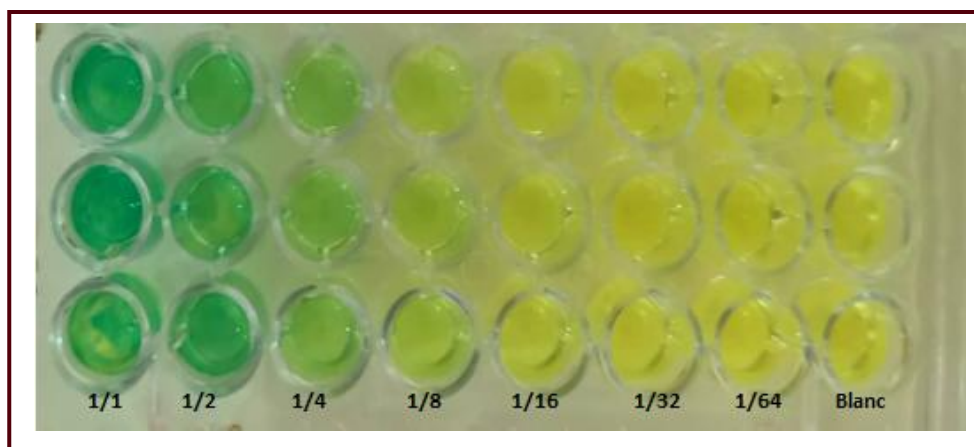


Figure 63: La plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (FRAP) de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Les valeurs des absorbances de l'extrait a illustrée dans la courbe de la figure, et les concentrations réductrices (CI₅₀) de l'extrait et du standard a présenté graphiquement par un histogramme (figure 64, 65et 66).

- **Tableau N° 11:** Inhibition du pouvoir réducteur (FRAP) par l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

concentrations	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0,5} (µ/ml)
EMHS	0.06 ±0.00	0.07 ±0.01	0.10 ±0.02	0.17 ±0.01	0.25 ±0.02	0.43 ±0.01	0.75 ±0,10	123,01 ±4,76
C.des standards	0.0976 µg	0.195µg	0.390 µg	0.781 µg	1.562 µg	3.125 µg	6.25 µg	A_{0,5}(µ/ml)
Trolox	0.07 ±0.00	0.08 ±0.00	0.09 ±0.01	0.13 ±0.00	0.19 ±0.02	0.28 ±0.05	0.60 ±0.04	5.25 ±0.20
Ascorbic acid	0.07 ±0.00	0.09 ±0.01	0.12 ±0.01	0.17 ±0.01	0.25 ±0.02	0.47 ±0.03	0.79 ±0.09	3.62 ±0.29

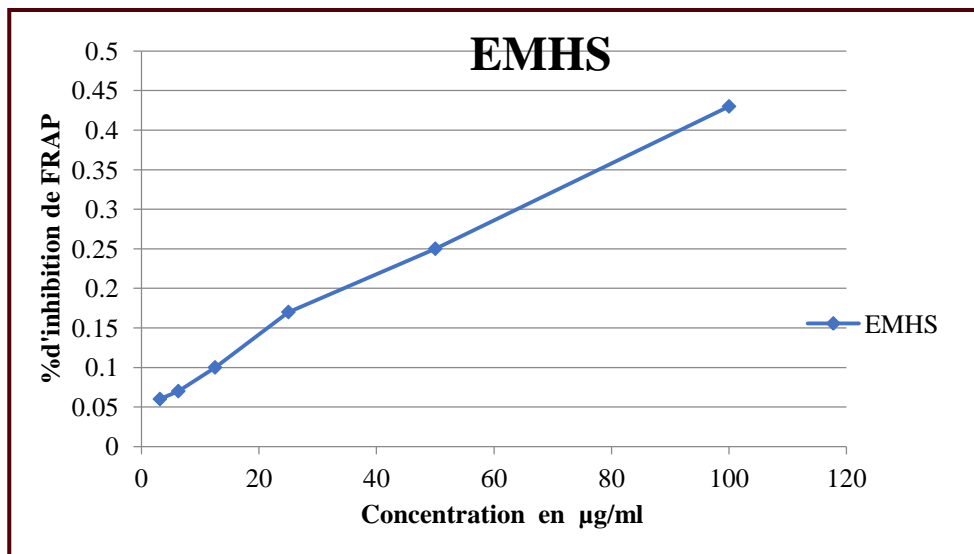


Figure 64: courbe d'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait (FRAP).

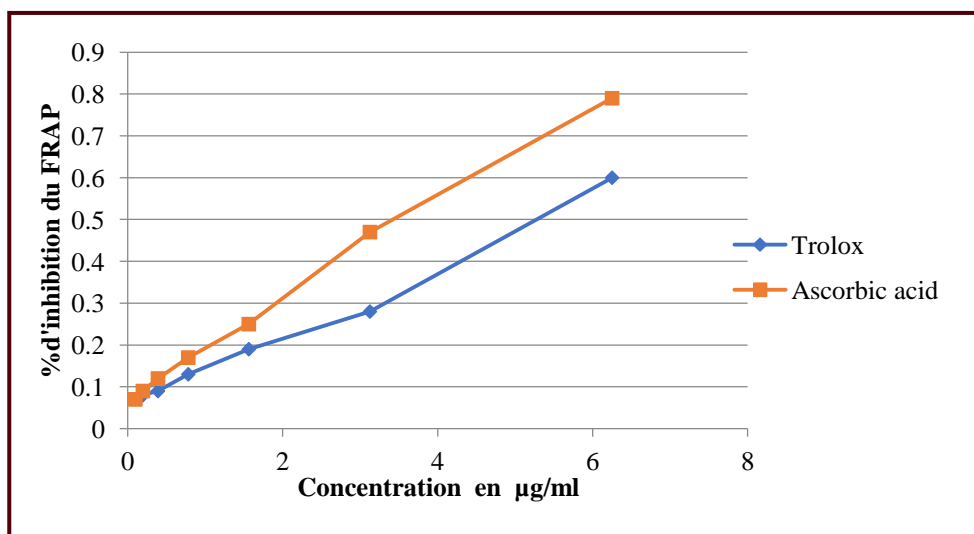


Figure 65: courbe d'absorbance du (FRAP) en fonction de la concentration de Trolox et Ascorbic acid.

L'analyse statistique des résultats manifeste une relation proportionnelle entre les absorbances et leurs concentrations. Plus l'absorbance est élevée, plus le pouvoir réducteur est important.

On a constaté à une concentration finale de 800 mg/ml que l'extrait MeOH a exprimé un pouvoir réducteur faible, une absorbance maximale de $(123,01 \pm 4,76)$.

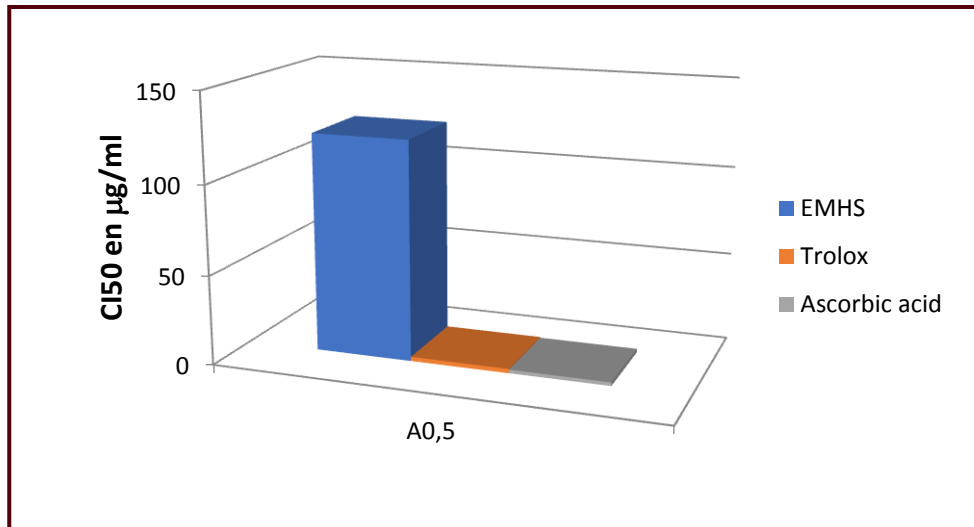


Figure 66: histogramme représentant les valeurs des A0.5 de l'extrait et standards obtenus par le test (FRAP).

Le classement de l'activité FRAP de l'extrait est comme suit :

Ascorbique acide > Trolox > MeOH. Plus CI50 est petit, plus la réaction est intense, plus l'échantillon est actif vis-à-vis l'oxydation.

III .2.5 Activité silver nanoparticle (SNP) :

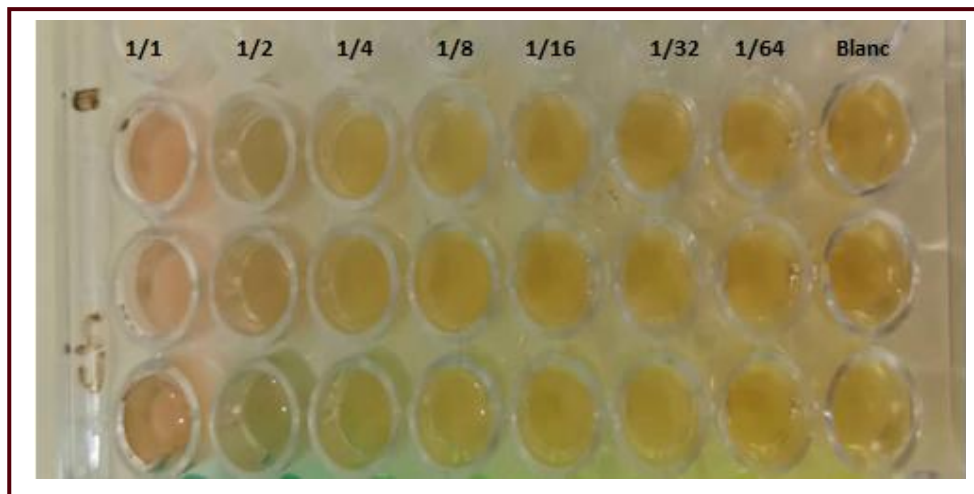


Figure 67: La plaque de dosage de l'activité silver nanoparticle (SNP) par l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Chapitre II : Résultats et Discussion.

Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe des absorbances en fonction des concentrations de l'extrait et des standards et l'histogramme des concentrations réductrices (IC50) (fig. 68, 69 et 70).

- **Tableau N° 12:** Inhibition du silver nanoparticle (SNP) par l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

concentrations	6.25µg	12.5µg	25µg	50µg	100µg	200µg	400µg	A _{0,5} (µ/ml)
EMHS	0.36 ±0.03	0.37 ±0.01	0.38 ±0.00	0.41 ±0.03	0.48 ±0.02	0,54 ±0,04	1,01 ±0,37	3.08 ±0.02
C.des standards	1.5625µg	3.125µg	6.25µg	12.5µg	25µg	50µg	100µg	A _{0,5} (µ/ml)
AC ascorbiq	0.24 ±0.00	0.32 ±0.01	0.45 ±0.01	0.75 ±0.01	1.22 ±0.02	1.90 ±0.03	2.35 ±0.01	7.14 ±0.05
trolox	0.17 ±0.00	0.20 ±0.01	0.23 ±0.00	0.30 ±0.01	0.43 ±0.01	0.64 ±0.03	1.04 ±0.01	34.17 ±1.23

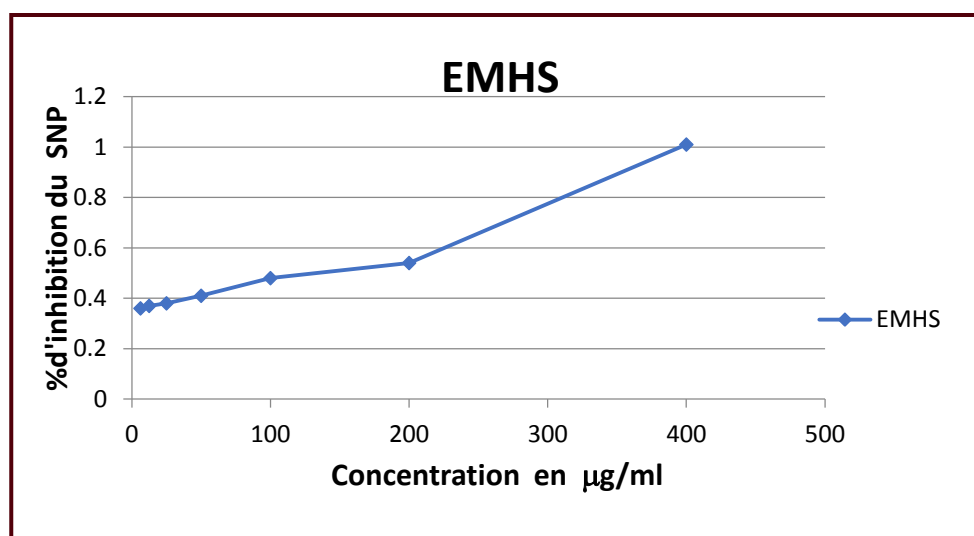


Figure 68: courbe d'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait (SNP).

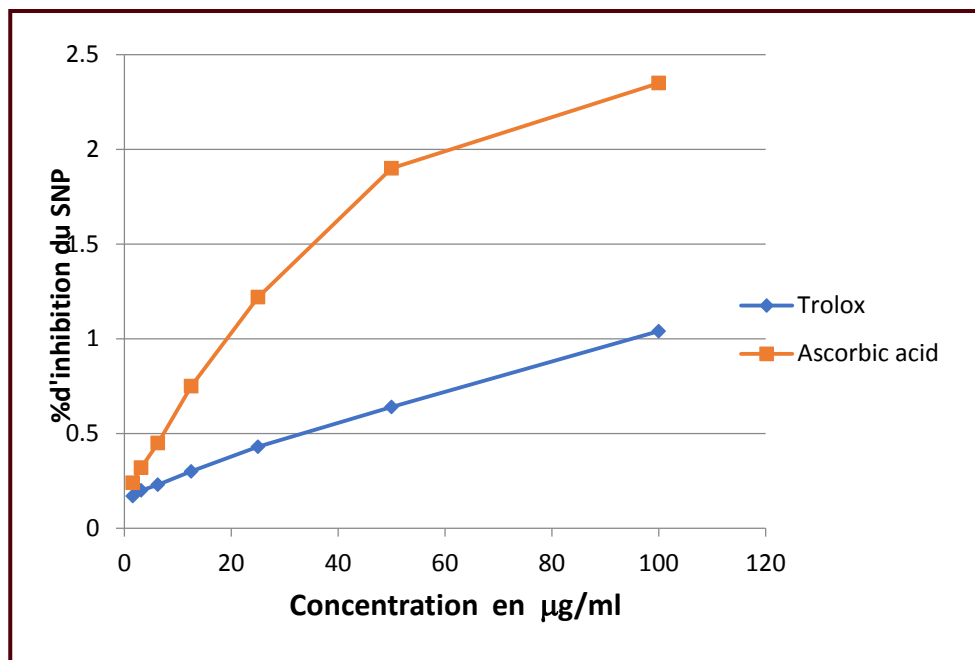


Figure 69: courbe d'absorbance en fonction de la concentration de Trolox et Ascorbic acid.

A partir de l'analyse statistique de ces résultats, on a révélé une proportionnalité entre les absorbances de l'extrait et leur concentration, plus l'absorbance est élevée, plus la capacité réductrice est importante.

En effet, a une concentration 400 µg /ml on remarque que l'extrait MeOH exprime une meilleure capacité réductrice des ions Ag⁺ avec une densité optique élevée (1,01±0,37nm)

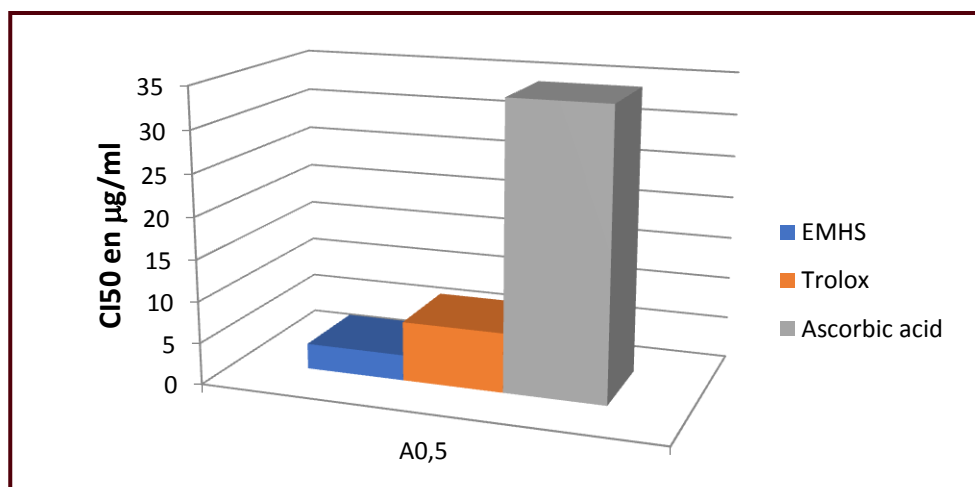


Figure 70: histogramme représentant les valeurs des A0,5 de l'extrait et standards obtenus par le test SNP.

Chapitre II : Résultats et Discussion.

Statistiquement, l'analyse comparative d'extrait à aboutit aux résultats suivants :

Ascorbique acide > Trolox > MeOH

III.3. Résultats des essais antifongiques à la croissance mycélienne de deux champignons testés :

Rappelons que l'activité antifongique est révélée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne de *Aspergillus ochraceus* et *Fusarium oxysporium f. Sp Albedinis* sur le milieu PDA additionné des différentes concentrations de l'extrait.

En premier temps, la croissance mycélienne des souches fongiques était normale (témoin), ce qu'il se diffère en présence de l'extrait de la plante *Hibiscus sabdariffa L.*

Ce paramètre évolue dans le temps, durant l'incubation.

III.3.1. Effet de l'extrait MeOH d'*Hibiscus sabdariffa L.*, sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus ochraceus* et *Fusarium oxysporium f. Sp Albedinis*:

- **Tableau N° 13:** Taux d'inhibition et diamètre moyen des thalles exposés aux extraits d'*Hibiscus sabdariffa L.*

<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>						
Souches fongiques	<i>Aspergillus ochraceus</i>			<i>Fusarium oxysporium f. Sp. Albedinis</i>		
Concentrations mg/ml	1	2.5	5	1	2.5	5
Diamètres moyens des thalles (cm) (7jours)	2.5	2.3	1.75	3.13	3.03	2.46
%d'inhibition	68.75%	71.25%	78%	65.22%	66.33%	72.66%

L'évaluation du diamètre de croissance mycélienne d'*Aspergillus ochraceus* et *Fusarium oxysporium f. Sp Albedinis* est représentée dans le tableau 13 et la figure 71.

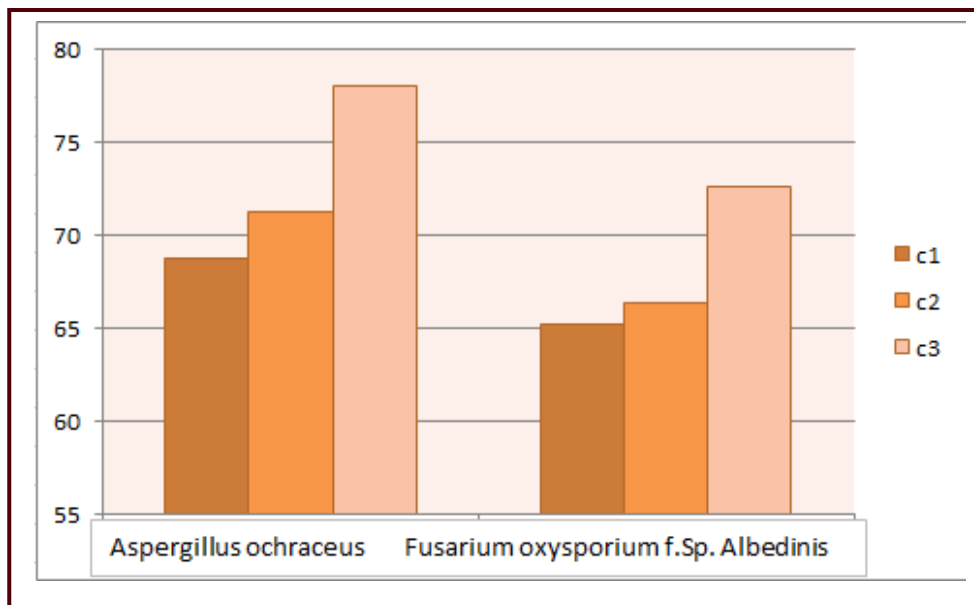


Figure 71: Activité antifongique de l'extrait MeOH d'*Hibiscus sabdariffa* L., vis-à-vis des champignons phytopathogènes : *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporium*.

D'après la figure 71 le %PCID augmente avec l'augmentation de la concentration.

Il ressort des résultats des tests préliminaires (tableau 13) que l'extrait d'*H. sabdariffa* a un pouvoir inhibiteur important sur la croissance diamétrale des deux champignons.

Cet extrait exerce une activité importante sur *A. ochraceus* et *F. oxysporium*. A la concentration 5 mg/ml, le PICD est respectivement de 78% pour *Aspergillus ochraceus* et de 72.66% pour *F. Oxysporum* (Figure....)

En absence d'extrait dans le milieu de culture, la colonie des champignons *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporium f. Sp Albedinis* atteint respectivement un diamètre de 8cm, et 9 cm après 6 jours d'incubation.

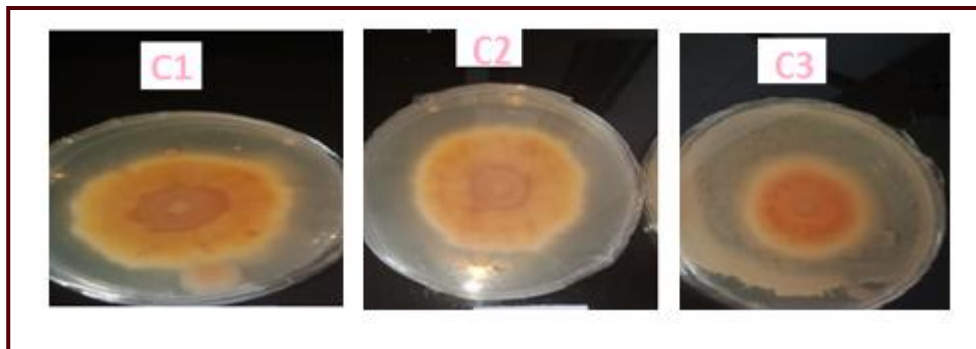


Figure 72: Activité inhibitrice in vitro de l'extrait méthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* L., sur la croissance radiale de *Fusarium oxysporium* f. Sp *Albedinis* après 7 jours d'incubation sur milieu PDA.



Figure 73: Activité inhibitrice in vitro de l'extrait méthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* L., sur la croissance radiale de: *Aspergillus ochraceus* après 7 jours d'incubation sur milieu PDA.

The image features a decorative border with a repeating geometric pattern in a dark red color. In the center, the word "Conclusion" is written in a bold, black, serif font. Surrounding the text are several abstract, layered shapes in various shades of red and brown, creating a sense of depth and movement. These shapes include a horizontal bar at the top, a large triangular shape on the left, a vertical triangular shape on the right, and a horizontal bar at the bottom, all with overlapping, 3D-like effects.

Conclusion

Conclusion :

Les plantes médicinales restent toujours une source fiable des molécules bioactives, Ayant montré leurs efficacités dans le traitement de diverses pathologies, tout en prévenant l'apparition des effets secondaires observés, lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

Le présent travail porte sur l'investigation chimique et biologique d'une plante médicinale appartenant à la famille des Malvacée Cette famille est connu par sa richesse en divers composés, tels que les flavonoïdes, les polyphénols, les sucres et les tanins.

*L'*analyse des extraits a été essentiellement fondée sur l'évaluation des activités biologiques en vue de la valorisation d'une telle espèce. Dans ce contexte, plusieurs tests ont été réalisés dont les plus révélateurs ont été sélectionnés.

Le criblage phytochimique et les tests colorimétriques ont révélé la présence de quelques groupes chimiques (Flavonoïdes, Saponosides, Alcaloïdes, Stérols, Stéroïdes, Coumarines et des tanins).

*L'*activité antioxydante de l'extrait de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L. a été évaluée à différentes échelles par les tests DPPH, ABTS , Phénanthroline, SNP et FRAP ,ce qui nous a permis de confirmer leur pouvoir scavenger de radicaux libres. Cette activité est liée en grande partie à la richesse de l'extrait en métabolite secondaire.

De l'autre part, nous avons étudiés l'activité anti-inflammatoire contre deux souches *phytopathogène Aspergillus sochraceus Fusariumoxysporumf.sp. albedinis* , Leur activité antifongique a été également évaluée grâce au test de sensibilité des souches, l'extrait méthanolique de la plante *Hibiscus sabdariffa* L. contient des substances qui retardent la croissance des champignons .

En perspective, on peut dire que cette espèce peut être utilisée comme un antifongique contre les deux souches étudiées même si nos résultats restent préliminaires et pour cela d'autres études plus approfondies doivent être réalisées telles que

Conclusion

Tester la présence d'autres molécules bioactives et avec d'autres méthodes ou avec d'autres solvants ou même dans d'autres parties des plantes utilisées.

*E*valuer d'autres activités comme: antiviral, anti-inflammatoire, antidiabétique, antibactérienne.

The page features a decorative border with a repeating geometric pattern in a dark red color. In the center, there are several abstract, layered shapes in shades of red and brown, resembling folded paper or overlapping triangles, which frame the central text.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Aberchane M., Fechtal M., Chaouch A., (2004). Analysis of Moroccan Atlas

Cedarwood Oil (*Cedrusatlantica* Manetti). *Journal of Essential Oil Research*, 16:6, 542-547.

Abdellatif, Rahman, Salwa M., (2011). "Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment." *African Journal of Biotechnology* 10.52 10733-10743.

Baba, S.A., and Malik, S.A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content,

antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science*. 9, 449-454.

Bensakhria A., (2018), livre : toxicologie général, chapitre 09: le stress oxydatif, ReserchGate, 70-86.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181, 1199-1200.

Bouchouka E., (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. Thèse : Université de Laghouat.

Boudjouref M., (2011). Etude d'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'Artemisiacampestris L. Thèse de Magister en Biochimie, sous la direction de Belhattab Rachid, Université Ferhat Abbas, Algérie, Sétif. p 99.

Boonkerd T., NaSongkhla B., Thephuttee W., (1993). Hibiscus sabdariffa L. In: Siemonsma, J.S. & KasemPiluek (Editors). Plant Resources of South-East Asia No 8. Vegetables. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, Netherlands. pp. 178–180

Clydesdale F., M., J. H. Main, and F. J. Francis. "Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)

anthocyanins as colorants for beverages and gelatin desserts." *Journal of Food Protection* 42.3 (1979): 204-207.

Références Bibliographiques

Conrad J.; Vogler B.; Klaiber I.; Roos G., Walter U.; Kraus W.,1998. Two triterpene esters from Terminaliamacroptera bark. *Phytochemistry* 48: 647 - 650.

Conservation-nature.fr/plantes/malvaceae Conservation Nature est un projet de sensibilisation sur la nature, l'environnement et la protection de la biodiversité.

Croteau R., Kutchan T.M. Lewis N.G. (2000). Natural products (Secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1251.

Cisse M., Dornier B.M., Sakho M., Ndiaye A., Reynes M., & Sock O., (2009). Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. *Fruits*, 64(3), 179-193.

Dacosta E., (2003). Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (éd). *Paris, p317.*

Derbel S., Ghedira K., (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et nutrition*, 1: 28-34.

Diallo A., (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (Myrtaceae). *PhD. of the University Bamako, Mali*, 38-47.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A., Capasso F., (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. 65(4), 337-353.

Dohou R., (2003) "Screening phytochimique d'une endémique iberomaroquine, *Thymelaealythroides*." *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux* 142.1/4 61-78.

Duranteau J., (2008). Conséquences cliniques du stress oxydant, *Réanimation : Hors-série*, 3, 5-6.

Durán N., Durán M., de Jesus MB, Seabra AB, Fávoro WJ, Nakazato G., (2016) Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity .

ENDRIAS A., (2006) Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à

l'Hibiscus sabdariffa L. et à *l'Artemisia annua*. Thèse de doctorat : Science des Procédés, Sciences des Agro-ressources. Toulouse : Institut National Polytechniques, p. 41-50.

Références Bibliographiques

El Yahyaoui O., (2015) "Etude ethnobotanique: Plantes médicinales commercialisées à la province de Laâyoune; identification et utilisation [Ethnobotanical Study: Medicinal plants commercialized in the province of Laayoune; identification and use]." *International Journal of Innovation and Applied Studies* 12.3 : 533.

F

AVIER A., (2003) Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, vol. 108, no 10, p. 863-832.

Uhedira K., (2005) "Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique." *Phytothérapie* 3.4 (2005): 162-169.

Guignard J.L.; (1995). Abrégé de phytochimie ; Hasson. 224p. Harbone J.B., *Phytochemical Methods : A guide to moderne techniques of plant analysis* 3e ed. : chapman and hill.1998. 303p. 1998.

Guillaume, 2008 *Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products*; Ed: WORLD SCIENTIFIC. P19

Goodwin, T.W. (1971). *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry*. Academic Press, Londres.

ulkoti NI., Taranath TC (2017). Influence of physico-chemical parameters on the fabrication of silver nanoparticles using *Petreavolubilis L.*

Hopkins wiliam G., (2003). *Physiologie végétale*, .2eme edition. Editeur *De Boeck* P267-276.

Références Bibliographiques

Jacques E. POISSON : professeur à l'université de Paris-Sud, Centre d'études pharmaceutiques de Châtenay-Malabry.

Jean B ., (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier. 4éd. 1292 pages.

LEPENGUE, Alexis, André, Muluway, Kalenda, George, and Bertrand

(2011). Interférence de l'acide auxinique dans la croissance de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) au Gabon. Laboratoire de Physiologie végétale, Université de Abobo-Adjamé, Côte d'Ivoire, 2011, vol. 11, N°2, p. 1-9 (ISSN 2071 – 7024).

Lépengué A., Mbatchi B., & Aké S., (2008). Production, caractérisation et utilisation des composés toxiques de *Phoma sabdariffae* SACC. dans la sélection des cultivars résistants de roselle (*Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa*) au Gabon. *Agronomie Africaine*, 20(1), 59-67.

MADY, Cisse , **(2009)** Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : Composition et principales utilisations, *Fruits*, vol. 64, p. 179–193.

Manuel D., (2009). article de synthèse /fruit, vol.64, p 179-193 .

Mansour S., (2015). Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales: *Artemisia absinthium* L, *Artemisia herba alba* Asso et *Hypericum scabroides*—Etude in vivo-, Thèse pour l'obtention du Doctorat en science Université d'Oran Mohamed Boudiaf, p19.

Merghem R., (2009). Eléments de biochimie végétale. 1 ère Edition, Algérie, Constantine : Bahaeddine, p 172.

Morazzoni P., (1990). Magistretti M.J. Fitoterapia, 61 p. 13

Références Bibliographiques

Mostafa B., Khalifa M., Güney K., GC-MS analysis of *Cedrus atlantica* var. *Pendula* (Carrière) Carrière, International Journal of Trend in Research and Development, Volume 5(4), ISSN: 2394-9333.

McClintock N.C., El Tahir I.M., (2004). *Hibiscus sabdariffa* L., in : Grubben G.J.H., Denton O.A. (Eds.), PROTA 2 (Plant Resources of Tropical Africa): vegetables [CD-Rom], PROTA Wagening., Neth.,

Mohamed R., Fernandez J., Pineda M., Aguilar M., (2007). Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed oil is a rich source of γ -tocopherol, J. Food Sci. 72 (3) 207–211.

O

mobuwajo, (2000) [https://www.rapport-gratuit.com/description-botanique-de-la-plante-](https://www.rapport-gratuit.com/description-botanique-de-la-plante-dhibiscus-sabdariffa-l/)

[dhibiscus-sabdariffa-l/](#)

Oldfield, Eric, and Fu-Yang Lin (2012). "Terpene biosynthesis: modularity rules." *Angewandte Chemie International Edition* 51.5 (2012): 1124-1137.

P

ietta P., (2000) Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7), 1035-1042.

Pisoschi, A.M., and Negulescu, G.P. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*.01, 1-10.

Poutrain P., (2008). Etude de la régulation hormonale du métabolisme des alcaloïdes indoliquesmonoterpéniques chez *Catharanthusroseus*. Implication du calcium dans la transduction du signal induit par l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, Thèse de doctorat, sous la direction de Marc Rideau, Université François – Rabelais. Tours, France. p 202.

Popovici , (2009). *Journal Revue de génie industriel*, 4, 25-39.

Références Bibliographiques

Selles Chaouki, (2012). Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum* L, Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M. *Thèse de pharmacie*. 214p.

Shakya, A.K. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*. 4, 59-64.

Slawson RM., Trevors JT., Lee H., (1992). Silver accumulation and resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *Arch Microbiol*1.

Škerget, Mojca, (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities." *Food chemistry* 89.2 (2005): 191-198.

Sohn EK., Johari SA., Kim TG., Kim JK., Kim E., Lee JH.,(2015). Aquatic toxicity comparison of silver nanoparticles and silver nanowires .

Tarik med chaouve (2020).at: <https://www.researchgate.net/publication/338902188>

Williams, Christine A., and Renée J., (2004). Grayer. "Anthocyanins and other flavonoids." *Natural product reports* 21.4 : 539-573.

Zhao G., Stevens SE., (1998). Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *BioMetals*.

- https://www.researchgate.net/figure/Hibiscus-sabdariffa-variete-sabdariffa-a-tige-feuilles-et-calices-de-la-variete_fig1_44208290

- https://www.researchgate.net/figure/Hibiscus-sabdariffa-variete-sabdariffa-a-tige-feuilles-et-calices-de-la-variete_fig1_44208290

Références Bibliographiques

- <https://www.quelleestcetteplante.fr/especes.php?genre=Hibiscus&variete=sabdariffa>
- www.fruit-journal.org
- http://www2.unil.ch/lpc/docs/pdf/Met_sec.pdf .
- www.chem.qmul.ac.uk.

The page features a decorative border with a repeating geometric pattern in a dark red color. In the center, the word "Résumé" is written in a bold, black, serif font. Surrounding the text are several abstract, layered shapes in various shades of red and brown, creating a sense of depth and movement.

Résumé

Résumé :

L'oseille de Guinée *Hibiscus sabdariffa* L., également appelée Karkadé, est une plante herbacée de la famille des Malvacées, originaire de l'Afrique occidentale tropicale.

Nos travaux de recherche ont porté sur l'étude phytochimique de l'extrait méthanolique des fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* L., et l'évaluation des activités antioxydante et antifongique de cette espèce.

Le screening phytochimique, a mis en évidence la présence de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, Saponosides, Alcaloïdes, Stérols, Stéroïdes, Coumarines et tanins, molécules susceptibles d'exprimer le pouvoir pharmacologique de cette plante.

L'évaluation de l'activité antioxydante a été testée à travers cinq méthodes différentes : la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS, méthode du Phénanthroline, Pouvoir réducteur (FRAP), et Silver nanoparticle (SNP) assay. D'après les résultats, l'extrait d'H.sabdariffa est doté d'un potentiel antiradicalaire et antioxydant excellent par rapport à l'antioxydant standard employé (Trolox et acid ascorbic).

L'extrait méthanolique des fruits d'*Hibiscus sabdariffa* L., à des concentrations de 1, 2.5 et 5 mg/ml, ont exhibé d'une façon significative, un effet antifongique contre deux souches phytopathogènes : *Aspergillus ochraceus* et *fusarium oxysporum f.sp Albedinis*.

Mots-clés : *Hibiscus sabdariffa* L., flavonoïdes, Activité antioxydante, Activité antifongique, *Aspergillus ochraceus*, *fusarium oxysporum f.sp Albedinis*.

Abstract:

Guinea sorrel *Hibiscus sabdariffa* L., also called Karkadé, is a herbaceous plant of the *Malvaceae* family, native to tropical West Africa.

Our research work focused on the phytochemical study of the methanolic extract of the flowers of *Hibiscus sabdariffa* L., the highlighting of some chemical groups revealed.

The presence of Flavonoids, Saponosides, Alkaloids, Sterols, Steroids, Coumarins and tannins, molecules likely to express the pharmacological power of this plant.

The evaluation of antioxidant activities were tested through five different methods: DPPH and ABTS free radical scavenging method, Phenanthroline method, Reducing power (FRAP), and Silver nanoparticle (SNP) assay. According to the results, the extract of *H. sabdariffa* has an excellent antiradical and antioxidant potential compared to the standard antioxidant used (Trolox and ascorbic acid).

The estimation of the antifungal power of Karkadé carried out on two phytopathogenic strains *Aspergillus ochraceus* and *Fusarium oxysporum f.sp Albedinis*.

The effectiveness of this plant for three different concentrations (1 mg/ml; 2.5 mg/ml; 5 mg/ml), demonstrated that the growth of the two fungi tested suffered a major or total inhibition.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L., Polyphenols, Antioxidant activity, Antifungal activity, *Aspergillus sp*, *fusarium sp*.

الملخص:

حمض غينيا، الكركدية . المعروف أيضًا باسم كركدية، هو نبات عشبي من عائلة Malvaceae ، موطنه غرب إفريقيا الاستوائية.

ركز عملنا البحثي على الدراسة الكيميائية النباتية للمستخلص الميثانولي لأزهار *Hibiscus sabdariffa* L. ، وتسليط الضوء على بعض المجموعات الكيميائية .

وجود مركبات الفلافونويد ، السابونوزيدات ، القلويات ، الستيرويدات ، المنشطات ، الكومارين والعفص ، الجزيئات التي من المحتمل أن تعبر عن تأثيرها العلاجي .

تم اختبار تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة من خلال خمس طرق مختلفة: طريقة مسح الجذور الحرة DPPH و ABTS ، وطريقة الفينانثرولين ، وتقليل الطاقة (FRAP) ، ومقايسة الجسيمات النانوية الفضية (SNP). وفقًا للنتائج ، يمتلك مستخلص *H. sabdariffa* قدرة ممتازة على مقاومة الجراثيم والأكسدة مقارنة بمضادات الأكسدة القياسية المستخدمة (ترولوكس وحمض الأسكوربيك).

تم تقدير القوة المضادة للفطريات لـ كركدية على سلالتين ممرضتين للنبات *Fusarium* و *Aspergillus ochraceus* .
oxysporum f.sp Albedinis

أظهرت فعالية هذا النبات لثلاثة تركيزات مختلفة (1 مجم / مل ، 2.5 مجم / مل ، 5 مجم / مل) أن نمو الفطرين المختبرين قد عانو من تثبيط كبير أو كلي.

الكلمات المفتاحية: *Hibiscus sabdariffa* L. ، Polyphenols ، Antioxidantivity ، Antifungal activity ،
fusarium sp ، Aspergillus sp

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BESSIKRI ines
BENZEGHDA youssra
BOUTROUF rayane

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie et physiologie végétale (Biodiversité / Reproduction).

Intitulé : Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antifongique de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L.

Résumé :

L'oseille de Guinée *Hibiscus sabdariffa* L., également appelée Karkadé, est une plante herbacée de la famille des Malvacées, originaire de l'Afrique occidentale tropicale.

Nos travaux de recherche ont porté sur l'étude phytochimique de l'extrait méthanolique des fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* L., et l'évaluation des activités antioxydante et antifongique de cette espèce.

Le screening phytochimique, a mis en évidence la présence de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, Saponosides, Alcaloïdes, Stérols, Stéroïdes, Coumarines et tanins, molécules susceptibles d'exprimer le pouvoir pharmacologique de cette plante.

L'évaluation de l'activité antioxydante a été testée à travers cinq méthodes différentes : la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS, méthode du Phénanthroline, Pouvoir réducteur (FRAP), et Silver nanoparticle (SNP) assay. D'après les résultats, l'extrait d'*H.sabdariffa* est doté d'un potentiel antiradicalaire et antioxydant excellent par rapport à l'antioxydant standard employé (Trolox et acid ascorbic).

L'extrait méthanolique des fruits d'*Hibiscus sabdariffa* L., à des concentrations de 1, 2.5 et 5 mg/ml, ont exhibé d'une façon significative, un effet antifongique contre deux souches phytopathogènes : *Aspergillus ochraceus* et *fusarium oxysporum f.sp Albedinis*.

Mots-clés : *Hibiscus sabdariffa* L., flavonoïdes, Activité antioxydante, Activité antifongique, *Aspergillus ochraceus*, *fusarium oxysporum f.sp Albedinis*.

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biochimie Appliquée. (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : CHIBANI Salih (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : BAKA Moubarek (Pr - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : DJERROUNI Aissa (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).