

N° Réf :.....

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila
Institut des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie
Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme
Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologique

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème :

***Etudes phytochimiques et activités
biologiques des extraits des fleurs de la
plantes Hibiscus sabdariffa. L***

Présenté par :

- DEKHMOCHE Radhia
- GUERGOURI Soulaf
- MESSLEM Houria

Devant le jury composé de:

Président : Dr. BOUKARIA Sabah	(MCB)	Centre Universitaire de Mila.
Examineur : Dr. MENAKH Mouna	(MCB)	Centre Universitaire de Mila.
Promoteur : Dr. BAATOCHE Samia	(MCB)	Centre Universitaire de Mila.

Année universitaire : 2022/2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
﴿يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ
دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ﴾ ..

Remerciements

*Notre première gratitude va au tout-puissant **ALLAH**, le créateur du tout, pour nous avoir donné la vie, le bénévolé et la force pour accomplir ce travail.*

Nous remercions

***Dr BOUKARIA Sabah** , enseignante au Centre Universitaire de Mila, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance. Nous tenons à signaler que sa présence en tant que présidente nous honore.*

***Dr MENAKH Mouna**, enseignant au Centre Universitaire de Mila, d'avoir accepté de juger ce travail et de nous avoir honorés par sa présence. Qu'il trouve ici toute notre gratitude*

***Dr. BAATOUCHE Samia** d'avoir accepté de nous encadrer et de nous diriger, pour son soutien, pour ses encouragements ainsi que pour la confiance qu'elle nous a accordée pour la réalisation de ce travail. Nous la remercions profondément pour sa compréhension, sa patience et sa politesse incomparable.*

*Nous voudrions exprimer nos vifs remerciements à **Dr. MIROUH. H** pour ces conseils éclairés ces encouragements, ces efforts avec nous, sa gentillesse ; à tout le personnel du laboratoire MIROUH d'analyses médicales.*

***Melle Imane et Bouchra**, pour leur aide, sa sympathie, et ses connaissances scientifiques qui a joué un rôle important dans la mise à profit du stage appliqué et dans l'obtention des activités nécessaires pour mener à bien ce mémoire de fin d'études.*

*Centre de recherche en biotechnologie CRBT précisément les responsables de la paillasse de mycologie et **DEBBI Ali** et **Houda** et pour leur gentillesse, disponibilité et leur aide pour réussir notre travail.*

Nous remercions tous les enseignants, les enseignantes et chef du département des sciences de la nature et de la vie de l'université de Mila à qui nous présentons un grand respect pour leur modeste et leur richesse en connaissance et de nous avoir fait bénéficier de leur expérience.

Un grand merci à tous les techniciennes de laboratoire de l'université de Mila.

Ces derniers remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour finalisation de ce travail.

Dédicaces

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

De tout mon cœur je dédie ce travail :

*A ma chère mère **Rahima** qui m'encourage à continuer et m'apprend la volonté dans ma vie.*

*A mon cher père **Djahid** aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour lui pour ces précieux conseils et ses grands sacrifices pour mes réussites.*

J'espère qu'un jour, je peux leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, Que dieu les bénisse, les apporte santé et les garde pour nous

*A mes chères sœurs : **Nihad** et **Feriel**.*

*A mes chers frères leur dévouement, leur compréhension et leur grande tendresse, qui en plus de m'avoir encouragé tout le long de mes études, n'ont consacré beaucoup de temps et disponibilité, leurs conseils et leur amour : **Alaa**, **Abderraouf** et particulièrement le petit **Merouane**, et le mari de ma sœur **Mohammed**.*

*A mes très chère Binome **Houria** et **Soulef** et ses familles.*

*A mes fidèles amies (**Chaimaa** ; **Safaa** ; **Khaoula** ; **Rawia** ; **Fairouz** ; **Douaa**) merci pour tous les bons moments que nous Avons passés ensemble.*

A tous mes collègues de la promotion 2018-2023.

A ceux qui m'aime et ceux que j'aime.

Et enfin à tous ceux qui m'ont souhaité le succès et la réussite.

DEKHMUCHE Radia

Dédicaces

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

De tout mon cœur je dédie ce travail :

*A ma chère mère **Fatiha** qui m'encourage à continuer et m'a appris la volonté dans ma vie .*

*A mon cher père **Mouloud** aucun dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour lui pour ces précieux conseils et ses grands sacrifices pour mes réussites.*

J'espère qu'un jour, je peux leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, Que dieu les bénisse, les apporte santé et les garde pour nous

*A mes chères sœurs : **Moufida** et **Rayane**.*

*A mes chers frères leur dévouement, leur compréhension et leur grande tendresse, qui en plus de m'avoir encouragé tout le long de mes études, n'ont consacré beaucoup de temps et disponibilité, leurs conseils et leur amour : **Zaki** , **Nounou** et **Ahmed** et le mari de ma sœur **Housseyn**.*

*A mes petits : **Soudjoud** et **Ziad**.*

*A mes très chère Binome **Houria** et **Radia** et ses familles.*

*A mes fidèles amies(**Abir; Wafa; Soufia; Maroua; Roumaissa; Samah; Sara; Rawia; Chaimaa; Safaa; Khaoula; Rania**) merci pour tous les bons moments que nous Avons passés ensemble.*

A tous mes collègues de la promotion 2018-2023.

A ceux qui m'aime et ceux que j'aime.

Et enfin à tous ceux qui m'ont souhaité le succès et la réussite.

GUERGOURI Soulef

Dédicaces

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

De tout mon cœur je dédie ce travail :

*A ma chère mère **Samira** qui m'encourage à continuer et m'apprie la volonté dans ma vie .*

*A mon cher père **Saad** aucun dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour lui pour ces précieux conseils et ses grands sacrifices pour mes réussites.*

J'espère qu'un jour, je peux leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, Que dieu les bénisse, les apporte santé et les garde pour nous

*A mes chères sœurs: **Amira ; Saltana et Asmaa.***

*A mes chers frères leur dévouement, leur compréhension et leur grande tendresse, qui en plus de m'avoir encouragé tout le long de mes études, n'ont consacré beaucoup de temps et disponibilité, leurs conseils et leur amour : **Nassime, Mouhamed et Lokman**, et les maris de mes sœurs **Souffian et Yassine.***

*A mes petits : **Salah, Mayar, Moukim et Acil.***

*A mes très chère Binome **Radiaet Soulef** et ses familles.*

*A mes fidèles amies (**Rawia ; Bouchra ; Wiaam ; Mouna ; Chaimaa ; Safaa ; Khaoula**)
merci pour tous les bons moments que nous Avons passés ensemble.*

A tous mes collègues de la promotion 2018-2023.

A ceux qui m'aime et ceux que j'aime.

Et enfin à tous ceux qui m'ont souhaité le succès et la réussite.

MESSELEM Houria

Résumé

La présente étude s'est proposé d'évaluer le pouvoir antioxydant, antibactérien, antifongique et anticoagulant des extraits obtenus par deux méthodes d'extractions: macération et infusion des fleurs de l'*Hibiscus sabdariffa* L. Dans cette étude, nous pouvons constater que le rendement enregistré pour l'extraction par infusion 36 % est proche à celui enregistrées pour l'extractions hydro-méthanolique 32.56 % d'*Hibiscus sabdariffa* L. et que l'analyse qualitative, effectuée par des tests phytochimiques spécifiques a relevé la présence des constituants bioactifs responsables des vertus thérapeutiques dans les deux extraits. De plus, l'estimation quantitative des phénols totaux par la méthode de Folein- Ciocalteu montre des convergences importantes dans les résultats des deux méthodes: infusion (34,65mg EAG/g) et macération (37,45 mg EAG/g). D'après la méthode de piégeage du radical DPPH, nous pouvons noter que les extraits issus des deux méthodes d'extraction (macération et infusion) ont dévoilé des activités antiradicalaires nettement modérée et convergent, avec des valeurs d'IC₅₀ varient entre 1.63 et 1.92 mg/ml respectivement. L'effet antimicrobien des extraits a été déterminé sur 4 souches bactériennes et une souche fongique par deux méthodes différentes (méthode de diffusion sur l'agar, et méthode de contact direct) respectivement, les résultats ont révélé que les deux extraits, exercent un effet moyennement inhibiteur sur (*staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Fusarium oxysporum* f) par contre ils se sont inactifs vis-à-vis de *Bacillus* Sp. L'évaluation de l'activité anticoagulante a été également réalisée *in vitro* en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ). Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence des extraits issus des deux méthodes d'extraction (macération et infusion) d'*Hibiscus sabdariffa* L.; indiquent qu'ils exercent une activité anticoagulante sur les deux voies de la coagulation, mais cette activité est plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène.

Mots clé: *Hibiscus sabdariffa* L., screening phytochimique, activités antioxydant, antibactérienne, antifongique et anticoagulantes, extraction.

Abstract

The present study proposed to evaluate the antioxidant, antibacterial, antifungal and anticoagulant activity of the extracts obtained by two extraction methods: maceration and infusion of the flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. In this study, we can see that the yield recorded for the 36% infusion extraction is close to that recorded for the 32.56% hydro-methanolic extraction of *Hibiscus sabdariffa* L. and that the qualitative analysis, carried out by tests specific phytochemicals revealed the presence of the bioactive constituents responsible for the therapeutic virtues in both extracts. In addition, the quantitative estimate of total phenols by the Folein-Ciocalteu method shows significant convergences in the results of the two methods: infusion (34.65mg EAG/g) and maceration (37.45 mg EAG/g). According to the DPPH radical scavenging method, we can note that the extracts from the two extraction methods (maceration and infusion) revealed clearly moderate and convergent anti-radical activities, with IC₅₀ values varying between 1.63 and 1.92 mg/ml respectively. The antimicrobial effect of the extracts was determined on four bacterial strains and one fungal strain by two different methods (diffusion method on agar, and direct contact method) respectively, the results revealed that the both extracts, exert a moderately inhibiting effect on (*staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Fusarium oxysporum* f) on the other hand they were shown to be inactive against *Bacillus* sp. The anticoagulant activity, was also evaluated in vitro by using two tests: the test of the cephalin-kaolin time and the test of Quick time. The times of coagulation obtained on normal plasma in the presence of extracts from the two extraction methods (maceration and infusion) of *Hibiscus sabdariffa* L. indicate that they carry an anticoagulant activity on the two pathways of coagulation but this activity is highly marked on the endogenous pathway than on the exogenous pathway.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L., phytochemical screening, antioxidant activity, antibacterial activity, antifungal activity, anticoagulant activity, extraction.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا والفطريات والمضادة للتجلط للمستخلصات التي تم الحصول عليها من خلال طريقتي استخلاص: التعطين والنقع لأزهار الكركديه (*Hibiscus sabdariffa* L.). في هذه الدراسة، لوحظ أن العائد المسجل لمستخلص النقع (36%) قريباً من العائد المسجل للمستخلص الهيدروميثانولي (32.56%) لنبات الكركديه كما أظهر التحليل النوعي الذي تم بواسطة إختبارات فيتوكيميائية محددة وجود مكونات نشطة حيويًا مسؤولة عن الخصائص العلاجية في كلا المستخلصين. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها لتقدير إجمالي البوليفينول باستخدام كاشف قياس الألوان Folin-Ciocalteu باستخدام حمض الغال كمعيار، تقارباً كبيراً في نتائج الطريقتين: النقع (34,65mg GAE/g) و التعطين الهيدروميثانولي (37,45mgGAE/g). يمكننا ملاحظة أن المستخلصات التي تم الحصول عليها بطريقتي الاستخلاص النقع والتعطين، أظهرت نشاطاً مضاداً للأكسدة معتدلاً ومتفقاً، حيث تتراوح قيم IC_{50} بين 1.63 و 1.92 ملغ/مل على التوالي، وذلك وفقاً لطريقة تقليل الجذور الحرة DPPH. تم تحديد التأثير المضاد للميكروبات للمستخلصات على أربع سلالات بكتيرية وسلالة فطرية باستخدام طريقتين مختلفتين (طريقة الانتشار على الأجار وطريقة الاتصال المباشر) على التوالي. أظهرت النتائج أن المستخلصات تمارس تأثيراً مثبتاً معتدلاً على (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* و *Fusarium oxysporum f*) من ناحية أخرى فقد ثبت أنها غير نشطة ضد *Bacillus subtilis*. كما تم تقييم النشاط المضاد للتخثر في المختبر باستخدام اختبارات زمن السيفالين كولين (TCK) وزمن كويك (TQ). أوقات التخثر التي يتم الحصول عليها على البلازما العادية في وجود مستخلصات من طريقتي الاستخراج (النقع والتعطين) من أزهار الكركديه. أشار إلى أن لديهم نشاطاً مضاداً للتخثر على كلا طريقي التخثر، ولكن هذا النشاط أكثر وضوحاً على المسار الداخلي منه على الطريق الخارجي.

الكلمات المفتاحية: *Hibiscus sabdariffa* L., فحص كيميائي نباتي, نشاط مضادات الأكسدة, مضاد للجراثيم, مضاد للفطريات ومضاد للتخثر, الاستخلاص.

Abréviations

Abs: Absorbance.

Anti-Xa: Activité inhibitrice dirigée contre le facteur x activé.

AVK: Anti-Vitamine K.

CaCl₂: Chlorure de calcium.

CHCl₃: Chloroforme.

CMI: Concentrations Minimales Inhibitrices.

CuSO₄: Sulfate de cuivre.

DMSO: Dimethylsulfoxyde.

DO: Densité optique.

DPPH: α , α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl.

E AG: Equivalence d'acide gallique.

EGCG: Epigallocatechinegallate.

ERN : Espèces Réactives d'azote.

ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène.

FCR: Folin- Ciocalteu reagent.

FeCl₃: Trichloride de fer.

FT: Facteur tissulaire.

GPx: Glutathion peroxydase.

H₂SO₄: Acide sulfurique.

HBMP: Héparines de bas poids moléculaire.

HNF: Héparine Non Fractionnée.

I: taux d'inhibition.

IC₅₀: Concentration inhibitrice à 50%.

Me: Masse de l'extrait après évaporation du solvant.

MH: Muller Hinton.

Mv: Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

Na₂CO₃: Bicarbonate sodium.

PAF: Facteur d'activation plaquettaire.

PC: Protéine C.

PDA: Potato Dextrose Agar.

pH: potentiel Hydrogène.

PI: Pourcentage d'inhibition.

PM: Plantes médicinales.

PPT: Dosage des polyphénols totaux.

PS: Protéine S.

R %: Rendement en %.

ROS: Reactive Oxygen Species.

Sec: Seconde.

SM: Solution mère.

SOD: Superoxyde dismutase.

T⁻: Témoin négatif.

T⁺: Témoin positif .

TCK: Temps du céphaline kaolin.

TIH: Thrombopénie Induite par l'Héparine.

TP: Taux de Prothrombine.

TQ: Temps de Quick.

UV-VI : Ultra-violet-visible.

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Listes des abréviations

Listes des figures

Listes des tableaux

Introduction générale

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Plantes médicinales et métabolites secondaires

1. Généralités sur les plantes médicinales	3
1.1 Définition d'une plante médicinale	3
1.2 Intérêt de l'étude des plantes médicinales	3
1.3 Les avantages et les inconvénients des plantes médicinales.....	3
1.4 Principe actif des plantes médicinales	4
2. Métabolites secondaires.....	4
2.1 Classifications des métabolites secondaires	5
2.1.1 Composés phénoliques.....	6
2.1.1.1 Acides phénoliques	6
2.1.1.2 Flavonoïdes	8

2.1.1.3	Tanins.....	10
2.1.1.4	Quinones	11
2.1.1.5	Coumarines.....	12
2.1.1.6	Lignanes	13
2.1.2	Composé terpénique.....	13
2.1.2.1	Terpénoides	13
2.1.2.2	Saponines (Saponosides).....	14
2.1.3	Composés azotés.....	15
2.1.3.1	Alcaloïdes.....	15
2.1.4	Activités biologiques des composés phénoliques.....	15

Chapitre II : Activités biologiques des plantes médicinales

1.	Activité antioxydant	16
1.1	Le stress oxydatif	16
1.2	Radicaux libres.....	17
1.3	Antioxydants	17
1.4	Mécanismes d'action des antioxydants	18
2.	Activité antimicrobienne	19
2.1	Principale substances antibactériennes.....	19
2.2	Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne	20
2.2.1	Aromatogramme (Méthode de diffusion)	20
2.2.2	Méthode de dilution	20
3.	Activité antifongique	21

3.1	Antifongiques.....	21
4.	Activité anticoagulante	22
4.1	Définition.....	22
4.2	Facteurs de coagulation	22
4.3	Déroulement de la coagulation	23
4.3.1	Voies de la coagulation	23
4.3.1.1	Voie endogène ou voie cellulaire	23
4.3.1.2	Voie exogène ou extrinsèque	23
4.4	Anticoagulants	24
4.4.1	Héparine	24
4.4.2	Anti vitamines K (AVK).....	25
4.4.3	Danaparoïde sodique (Orgaran®).....	25
4.4.4	Hirudine.....	25
4.4.5	Nouveaux anticoagulants	25

Chapitre III : présentation de la plante d'*Hibiscus sabdariffa* L.

1.	Plante <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	26
1.1	Famille des <i>Malvacées</i>	26
1.2	Genre <i>Hibiscus</i>	26
1.3	Espèce <i>Hibiscus sabdariffa</i> L	26
1.3.1	Description botaniques.....	26
1.3.2	Origine et Répartition géographique.....	29

1.3.3	Nom vernaculaire.....	30
1.3.4	Classification systématique	30
1.3.5	Ecologie.....	31
1.3.6	Culture de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	31
1.3.7	Croissance et développement	31
1.3.8	Récolte	32
1.3.9	Composition chimique	32
1.3.10	Principale utilisation d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	33
1.3.10.1	Utilisation thérapeutique	33
1.3.10.2	Utilisation alimentaire	34
1.3.10.3	Utilisation industrielle.....	35
1.3.10.4	Utilisation cosmétique	35

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

1.	Matériel et méthode	36
1.1	Extraction.....	36
1.2	Préparation de matériel végétal.....	37
1.3	Préparation des extraits végétaux.....	37
1.3.1	Extraction par macération	37
1.3.2	Extraction par infusion.....	38
2.	Rendement de l'extrait brut	39

3.	Analyse qualitative	40
3.1	Screening phytochimique.	40
4.	Analyse quantitative	42
4.1	Dosage des polyphénols totaux (PPT) par colorimétrie (méthode de Folin Ciocalteu)...	42
4.1.1	Mode opératoire.....	43
5.	Activités biologiques	45
5.1	Etude de l'activité anti-oxydante	45
5.1.1	Mode opératoire.....	46
5.2	Etude de l'activité antibactérienne	47
5.2.1	Microorganismes testées	47
5.3	Etude de L'activité antifongique.....	52
5.3.1	Matériel fongique.....	53
5.3.2	Mode opératoire.....	53
5.4	Etude de l'activité anticoagulante	57
5.4.1	Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène.....	58
5.4.2	Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène.....	59

Chapitre II : Résultats et discussion

1.	Screening phytochimique	61
1.2	Discussion des résultats.....	63
2.	Rendement des extractions	64
2.2	Discussion.....	64
3.	Taux des polyphénols totaux	65

3.2	Discussion.....	67
4.	Activité antiradicalaire par le test DPPH.....	68
4.2	Discussion.....	71
5.	Activité antibactérienne	72
5.2	Discussion.....	73
6.	Activité antifongique	74
6.2	Discussion.....	76
7.	Activité anticoagulante	77
7.1.1	Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.....	77
7.1.2	Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.....	78
7.2	Discussion.....	79

Conclusion et perspectives

Référence bibliographique

Annexes

Liste des figures

Figure 1: Principaux groupes des métabolismes secondaires des végétaux.	5
Figure 2: Structure chimique des polyphénols	6
Figure 3: Structure de base d'un flavonoïde	8
Figure 4: Exemple d'un tannins hydrolysable .structure de la «Gereniine».	11
Figure 5: Exemple d'un tannins condensés structure de la « Proanthocyanidine».....	11
Figure 6 : Structure chimique d'indole-5 -6-quinones.	12
Figure 7 : Structure des Coumarines.	12
Figure 8: Exemple d'un Lignane : Structure chimique de la« 4'-O- β -D-glucopyranosyl-nortrachelogenin ».	13
Figure 9: Molécule d'isoprène.	13
Figure 10: Exemples d'un terpène : Structure chimique de Pinène, Farnesol, Cayophyllène.	14
Figure 11: Exemple d'un Saponine : Structure chimique de la « Solanine».	14
Figure 12: Exemple d'un alcaloïde : structure de la « Morphine ».....	15
Figure 13: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.	16
Figure 14: Les principales causes du stress oxydatif.....	17
Figure 15: Les systèmes de défense contre les radicaux libres.....	18
Figure 16: Structures des antioxydants naturels les plus couramment utilisés.....	18
Figure 17: Cibles bactériennes et mécanisme de résistance aux antibiotiques.	19
Figure 18: Cibles des différents antifongiques	21
Figure 19: Schéma simplifié de la cascade de coagulation.	24
Figure 20: Répartition géographique de la famille des malvacées.....	26

Figure 21: <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	27
Figure 22: Tige ; feuille et calice de la plante <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	27
Figure 23: Fleur d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	28
Figure 24: Fruit d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	28
Figure 25: Les graines de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	29
Figure 26: Les racines de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	29
Figure 27: Répartition géographique de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	30
Figure 28 : Propriétés thérapeutiques et/ou pharmacologiques d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	34
Figure 29: Fleurs sèches d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	36
Figure 30: Broyage de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	37
.Figure 31: Protocole d'extraction par macération de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	38
Figure 32: Protocole d'extraction par infusion de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	39
Figure 33: Matériel de dosage des polyphénols totaux.	44
Figure 34 : Protocole de dosage des polyphénols totaux.....	44
Figure 35: Structure chimique du radical DPPH' et de sa forme réduite.	45
Figure 36: préparation de DPPH.	46
Figure 37: Schéma représentatif du protocole expérimental de l'activité antioxydante	46
Figure 38: Préparation de milieu MH (Mueller Hinton).	49
Figure 39: Préparation des disques d'aromatogramme.	49
Figure 40: Préparation de l'inoculum bactérien.	50
Figure 41: Coulage de milieux de culture MH.	51
Figure 42: Ensemencement bactérienne.	51

Figure 43 : Dépôts des disques et l'injection des extraits.....	52
Figure 44: Préparation du milieu de culture.	53
Figure 45: Le milieu de culture PDA	54
Figure 46: Le milieu de culture après stérilisation.....	54
Figure 47: L'addition de l'extrait au PDA et coulage dans les boites de pétri.	55
Figure 48: Solidification du milieu de culture mélangé à l'extrait sous la haute.....	56
Figure 49: Dépôt des disques de champignon.	56
Figure 50: L'incubation des boites.	56
Figure 51: préparation d'un pool de plasma.	58
Figure 52: Matériel préparé pour l'évaluation de TQ.	59
Figure 53: Rendement des extraits de <i>l'hibiscus sabdariffa</i> L	64
Figure 54: Résultat de dosage des polyphénols.	65
Figure 55: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour l'évaluation des teneurs en polyphénols.	66
Figure 56: Teneurs en polyphénols totaux des extraits étudiés	67
Figure 57: Résultats de l'activité antioxydant des deux extraits.	68
Figure 58: Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d' d'extrait hydro-méthanolique.....	69
Figure 59: Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration de l'extrait de l'infusion	70
Figure 60: la zone d'inhibition de l'extrait hydro-méthanolique de chaque concentration testée par la souche <i>Fusarium oxysporum f. splycopersici</i>	74
Figure 61: la zone d'inhibition de l'extrait de l'infusion de chaque concentration testée par la souche <i>Fusariumoxysporum f. splycopersici</i>	74

Figure 62: Activité antifongique des extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L., vis-à-vis des champignons phytopathogènes : <i>Fusarium oxysporium f. splycopersici</i>	76
Figure 63: Temps de coagulation par voie exogène.....	77
Figure 64: Temps de coagulation par voie endogène.	78

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux acides hydroxybenzoïque.	7
Tableau 2: Principaux acides hydroxycinnamique.	7
Tableau 3: Principaux classes des flavonoïdes	9
Tableau 4: Facteurs de la coagulation plasmatique	22
Tableau 5: Classification de l'espèce <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	30
Tableau 6: Compositions chimiques de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	32
Tableau 7: Caractéristiques générales des bactéries testées.	48
Tableau 8: Préparation des extraits	55
Tableau 9: Résultats de screening phytochimique.	61
Tableau 10: rendement des extraits de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	64
Tableau 11: valeur de (DO) de l'acide galique	65
Tableau 12: valeur de (DO) de chaque extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	66
Tableau 13: La quantité des PPT de chaque extrait de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	66
Tableau 14: Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait hydro-méthanolique d'extrait hydro-méthanolique.....	68
Tableau 15: Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait de l'infusion.....	70
Tableau 16: Diamètres de la zone d'inhibition de différentes souches sous l'action des extraits hydro-méthanolique et de l'infusion (en mm).....	72
Tableau 17: Diamètres des zones de développement du champignon de T ⁺ et T ⁻ (en mm). ...	75
Tableau 18: Diamètres des zones de développement du champignon des extraits hydro-méthanolique et de l'infusion (en mm).	75
Tableau 19: Résultats de l'activité inhibitrice des extraits hydro-méthanolique et de l'infusion	75

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, les humains utilisent les ressources naturelles qui les entourent pour se protéger, se nourrir et se soigner, c'est en consommant des fruits, des herbes et des feuilles et en observant leurs effets, où il a pu comprendre les relations, identifiant progressivement les propriétés curatives et toxiques des plantes sans obtenir d'abord une explication scientifique.

Il existe plus de 80 000 espèces de plantes médicinales sur notre planète, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent applications dans divers domaines en médecine, pharmacie, cosmétique et en agriculture (**Farombi, 2003**).

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 (**Buchanan et al., 2000**). 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**).

Parmi les plantes les plus utilisées l'*Hibiscus sabdariffa* L. qui appartient à la famille des *Malvacées*. Elle est principalement cultivée pour des raisons alimentaire et 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 et al., 2011**).

Dans cet optique l'objectif visé de ce travail est une étude comparative des résultats de deux techniques d'extraction des composés actif contenus dans la plante médicinale « *Hibiscus sabdariffa* L. »: l'extraction par macération dans le méthanol aqueux et l'extraction par infusion ou avec de l'eau bouillante. La comparaison porte plus précisément sur le rendement qualitatives et quantitatives d'extraction, et de l'évaluation de l'efficacité biologique (antioxydante, antibactérienne, antifongique et anticoagulante) des extraits obtenus de la plante. Il est reparti en deux parties, la première partie comprend trois chapitres:

- ❖ Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique: Généralités sur les plantes médicinales (définition, intérêt et principe actif) et la classification des métabolites secondaires (composés phénoliques, terpènes et alcaloïdes.....).
- ❖ Le deuxième chapitre: concerne les activités biologiques: l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne, antifongique et anticoagulante.

- ❖ Le troisième chapitre: la description botanique de la famille *malvacées* et du genre *Hibiscus sabdariffa* L. composition chimique, principale utilisation de l'*Hibiscus sabdariffa* L. (en thérapie, en agriculture, en cosmétique, en alimentation, et en industrie).

La deuxième partie comprend deux chapitres: le premier illustre: matériel et méthodes. Enfin le dernier chapitre présente les résultats obtenus et leur discussion, suivie d'une conclusion et perspective.

Partie I:

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I :

Plantes médicinales et métabolites secondaires

1. Généralités sur les plantes médicinales

1.1 Définition d'une plante médicinale

Une plante médicinale est une plante utilisée pour prévenir, traiter ou atténuer diverses maladies (**Lazli et al., 2018**). Les plantes médicinales sont des médicaments à base de plantes qui ont au moins certaines propriétés médicinales (**Sanago, 2006**).

Environ 35 000 espèces de plantes sont utilisées dans le monde à des fins médicinales, ce qui représente la plus grande collection de biodiversité utilisée par les êtres humains (**Elqaj et al., 2007**). Ces plantes aux vertus médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires, voire être utilisées pour préparer des boissons santé (**Debuigne, 1974**). En fait, ils sont utilisés de différentes manières, décoctions, macération et infusions.

1.2 Intérêt de l'étude des plantes médicinales

Les plantes médicinales comme toutes les plantes sont utilisées depuis des siècles comme remèdes aux maux humains et animaux car elles contiennent des composants à valeur thérapeutique. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires (**Chaachouay, 2020**), c'est pour ça les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et le développement de médicaments, non seulement lors de l'utilisation directe de composants végétaux comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les industries pharmaceutiques en tant que composés actifs (**Jayasuriya, 1998**).

1.3 Les avantages et les inconvénients des plantes médicinales

1.3.1 Avantages

Les plantes médicinales sont des composés naturels très précieux en raison de leurs activités biologiques (**Atar et Çölgeçen, 2020**), elles sont généralement connues et populaires pour un certain nombre d'avantages pour la santé tels que la diminution de la pression artérielle, la prévention des maladies cardiovasculaires ou la réduction du risque de cancer, également en raison de leurs activités antioxydants (**Škrovánková et al., 2012**).

1.3.2 Inconvénients

Si les plantes médicinales possèdent de nombreuses vertus, leur utilisation n'est cependant pas sans risque. Elles peuvent entraîner des effets secondaires indésirables,

désagréables, voire graves tels que: des vertiges, des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées), désintoxications (très fréquentes), des allergies, des interactions avec les médicaments classiques, cela est dû à plusieurs facteurs, notamment:

- ❖ Mauvaise identification botanique.
- ❖ Sélection d'une mauvaise partie de la plante.
- ❖ Stockage inapproprié.
- ❖ Contamination de la plante par divers agents chimiques, métaux lourds, microorganismes.
- ❖ Altération du produit végétal lors du conditionnement.

Donc les plantes peuvent être un bon moyen de soulager les maux du quotidien, mais elles ont certaines limites et ne peuvent pas tout soigner ! C'est une bonne solution complémentaire mais qui doit être prise avec précautions (**Atmakuri et al., 2010**).

1.4 Principe actif des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie (**Iserin, 2001**). Cela est dû au fait qu'il contient le principe actif : c'est une molécule contenue dans une drogue végétale ou dans une préparation à base d'une drogue végétale et qui est utilisée dans la fabrication des médicaments. Il présente un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animal (**Pelt, 1980**). Il est issu de des plantes fraîches ou des séchées. Ils se trouvent dans toutes les parties de la plante (les feuilles, fleurs, racines, écorces, sommités fleuries ou encore les graines) mais de manière inégale.

2. Métabolites secondaires

Les végétaux interagissent spécifiquement avec leur environnement en synthétisant des métabolites primaires issus directement de la photosynthèse. Ces métabolites, dits primaires, sont communs à tous les organismes et leur rôle est d'assurer les fonctions cellulaires de base pour la plante.

À côté de ces métabolites primaires classiques (glucides, lipides et protéines), la plupart des plantes ont la capacité de produire des substances naturelles très diverses connues sous le nom de métabolites dits secondaires. Ils sont utilisés 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 et participent à des réponses allélopathiques (**Glombitza et Gerstberger, 1985**). Aussi, ils interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement et la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux. Ils peuvent également s'utiliser pour se défendre contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (**Judd et al., 2002**). Ainsi qu'à résister aux chocs (rayons UV, insectes nuisibles, changement de température, etc.) (**Sarni-Manchado et Véronique, 2006**). Ils ont été découvertes au milieu du XXe siècle (**Foureau, 2016**) par Kossel en 1891, ou plus de 200.000 structures ont été définies (**Hartmann, 2007**).

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydants, anticancéreuses, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes (**Hanson, 2003**), ils présentent aussi une énorme valeur économique en particulier pour l'industrie pharmaceutique et en cosmétique (**West, 2010**).

2.1 Classifications des métabolites secondaires

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes: parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine. Quelques exemples représentatifs sont présentés ci-dessous (**Mahmoud et Croteau, 2002**).

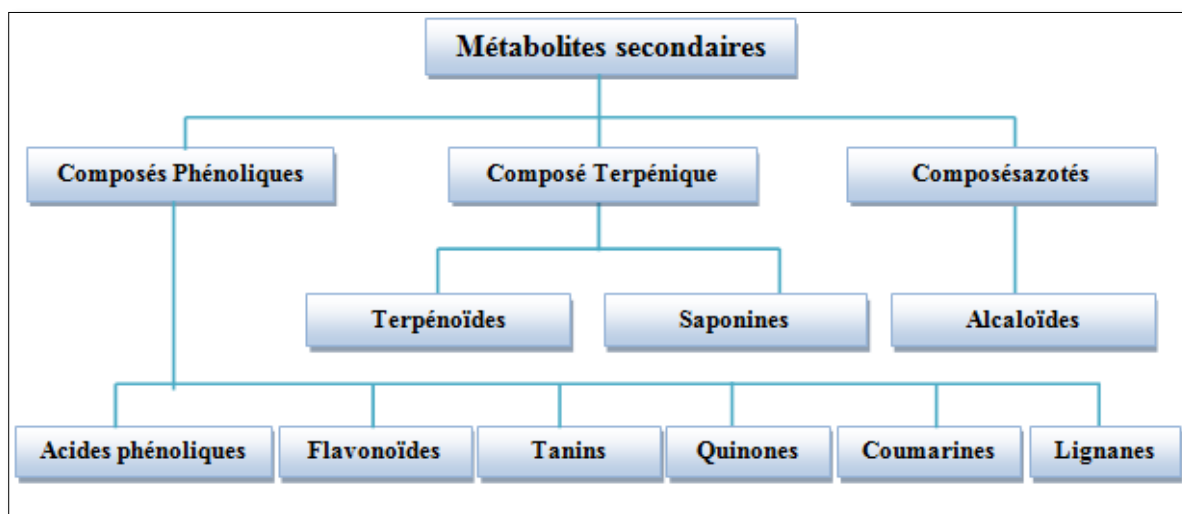


Figure 1: Principaux groupes des métabolismes secondaires des végétaux.

2.1.1 Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal. (**Waksmundzka-Hajnos et Sherma, 2011**). Il s'agit des dérivés non azotés connus par une grande variété structurale dont environ 8000 composés ont été identifiés (**Dai et Mumper, 2010**). Ils sont présents partout: dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux (**Macheix et al., 2005**).

Dans les plantes, les composés phénoliques sont principalement impliqués dans des mécanismes de défense mais aussi pour accélérer la pollinisation, comme agents de pigmentation ou comme antioxydants ou antimicrobiens (**Alasalvar et al., 2001**).

Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique (noyau benzénique) portant des groupements hydroxyles libres ou engagés engagé dans une autre fonction: éther, ester ou hétéroside (**Boizot et Charpentier, 2006**).

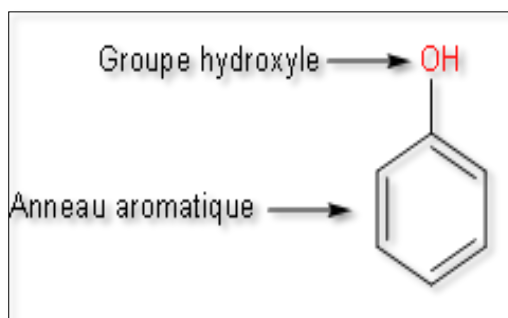


Figure 2: Structure chimique des polyphénols .

2.1.1.1 Acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (**Bruneton, 2009**). Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes: anti inflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques et immunostimulants. (**Bruneton, 1999**).

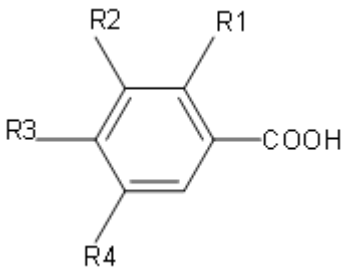
On distingue deux groupes:

- **Acides hydroxybenzoïques**

Sont les plus connus, ils sont très répandus dans la régne végétal (**Charnay et Tourmeau, 2006**), sont des dérivés de l'acide benzoïque dont la structure de base est C₆-C₁,

acide para-hydroxybenzoïque, acide salicylique, acide protocatéchique, acide gallique et acide vanillique.

Tableau 1: Principaux acides hydroxybenzoïque.

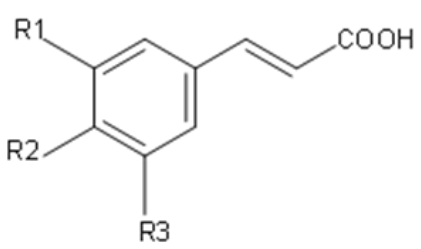
Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide <i>p</i> -hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatéchique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

- Acides hydroxycinnamiques**

Sont des dérivés de l'acide cinnamique, dont la structure de base est C₆-C₃ acide caféique, acide chlorogénique, acide paracoumarique, lequel peut donner des coumarines, qui sont des phénols issus de lactones hydroxylés (Élie, 2022).

Tableau 2: Principaux acides hydroxycinnamique.

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acides hydroxy cinnamiques
	H	OH	H	Acides <i>p</i> -coumarique

	OH	OH	H	Acides caféique
	OCH ₃	OH	H	Acides ferulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

2.1.1.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés naturels qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'être humain. ils représentent la sous-classe de composés phénoliques la plus répandue du règne végétal, ils constituent un groupe de plus 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (**Erlund, 2004**), En plus ils ont un rôle dans la pigmentation des végétaux, certains de ces composés présentent des activités biologiques d'intérêts, telles que des actions anti-radicalaires et antioxydants (**Havsteen, 2002**). Chimiquement, Les flavonoïdes sont formés de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par un noyau hétérocyclique de type pyranne (C) (**Courbat, 1972**) comme indiqué sur la **Figure 3**. Ils peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) (**Ghedira, 2005**).

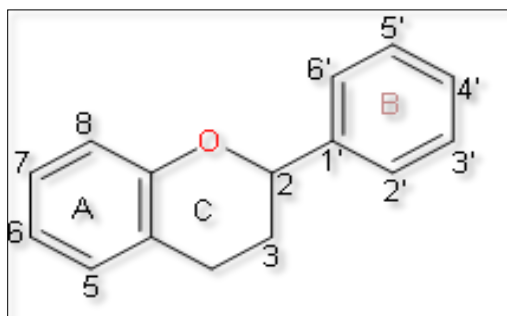


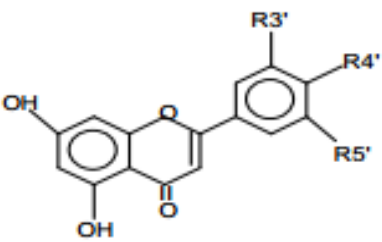
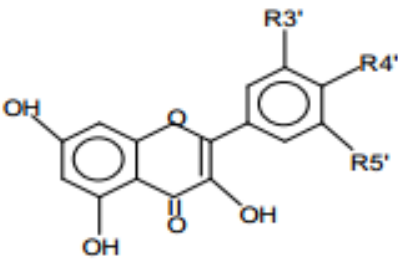
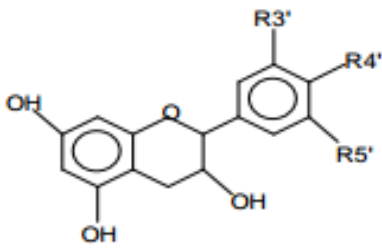
Figure 3: Structure de base d'un flavonoïde.

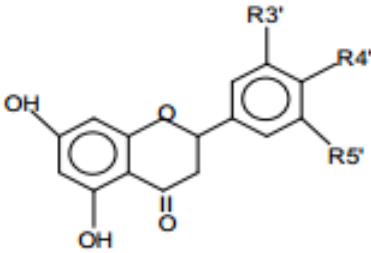
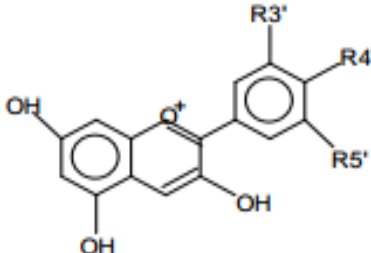
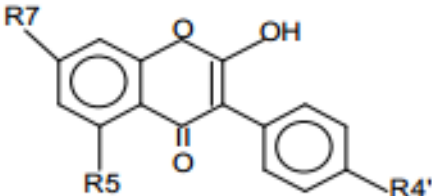
Selon le nombre, la position et la nature des substituants des deux cycles aromatique et le degré d'oxydation et de substitution du noyau pyranique central, on distingue six sous-groupes de flavonoïdes (**Tableau 3**):

- ❖ Les flavonols sont des 3-hydroxyflavones. Ce sont des pigments végétaux que l'on trouve souvent sous forme de glycosides, (kaempférol, quercétine), qui sont abondants dans les oignons, les poireaux et le brocoli.

- ❖ Les flavones sont des 2-phénylchromones, incolores (l'apigénine, l'lutéoline), que l'on trouve dans le persil et le céleri.
- ❖ Les isoflavones sont des 3-phénylchromones, beaucoup moins répandues que les flavones (la daidzéine, la génistéine), majoritaires dans les produits issus du soja.
- ❖ Les flavanones sont des 2,3-dihydroflavones (l'hespérétine, l'anaringénine), qui sont particulièrement abondantes dans les agrumes et les tomates.
- ❖ Les flavanols sont également des produits de réduction, au moins formellement, des flavonols (+) catéchine, (-) épicatechin, épigallocatechine, épigallocatechine gallate (EGCG), que l'on trouve dans le thé vert, le vin rouge, le chocolat.
- ❖ Les anthocyanes sont des dérivés réduits de flavonols avec formation d'oxonium (pélargonidine, cyanidine, malvidine), dont les sources incluent le vin rouge et les baies (Iserin *et al.*, 2001).

Tableau 3: Principaux classes des flavonoïdes (Zeghad, 2009).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine

Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Diadezine

2.1.1.3 Tanins

Les tanins sont des substances naturelles polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000, à saveur astringente, ayant en commun la propriété de précipiter les protéines, en s'y liant (**Bate-Smith, 1954; Haslam, 1989; Scalbert, 1991**). Ils forment une vaste famille de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau aromatique associé à un ou plusieurs groupements phénoliques hydroxylés.

On les trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...) (**Hemingway, 1992**). Ils jouent un rôle dans la protection contre la prédation, et peut-être aussi que les pesticides, et dans la régulation de la croissance des plante (**Thorington et al., 2006**). Après ses propriétés physico-chimiques les tanins montrent: des activité anti-oxydante (**Lim et al., 2007**), des effets antimicrobiens (**Song et al., 2006**), antifongiques (**Baba-Moussa et al., 1999**) ou antiviraux (**Song et al., 2005**), effets antiseptique (**Bruneton, 1999**).

Les tanins sont classés en 2 groupes: hydrolysables et condensés (**Seremeet et al., 2010**).

- **Tanins hydrolysables:**

Les tanins hydrolysables sont constitués de molécules phénoliques simples. Ce sont des esters d'acide gallique et de ses dimères (acide digallique, acide ellagique) et de monosaccharides, le plus souvent le glucose (**Hopkins, 2003**). (**Figure 4**).

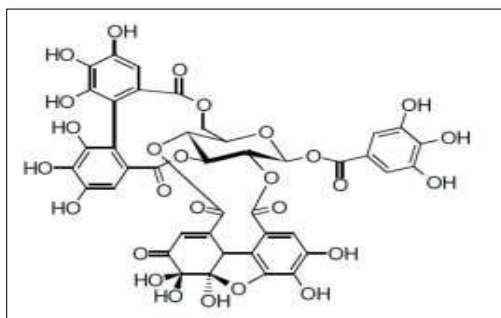


Figure 4: Exemple d'un tannins hydrolysable .structure de la «Geraniine».

- **Tanins condensés**

Les tanins condensés sont des polyphénols de masse molaire élevée, appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ce sont des polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons fortes de carbone, non hydrolysable mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines (**Hopkins, 2003**). (**Figure 5**).

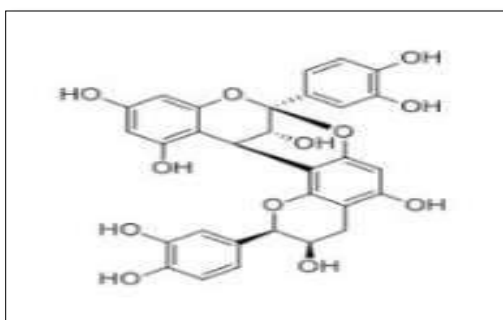


Figure 5: Exemple d'un tannins condensés structure de la « Proanthocyanidine».

2.1.1.4 Quinones

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques (**Figure 6**). Elles sont caractérisées par un motif 1,4-Dicéto cyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa 3,5-diénique (ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). On retrouve des motifs quinoniques dans différentes classes de composés secondaires (**Cowan, 1999**).

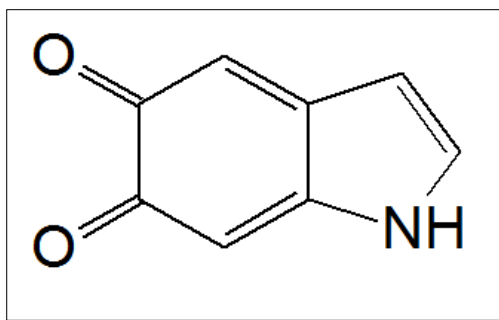


Figure 6: Structure chimique d'indole-5 -6-quinones.

2.1.1.5 Coumarines

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels. La structure de la coumarine se trouve dans environ 150 espèces, appartenant à 30 familles de plantes différentes. Ils tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de la fève tonka, d'où fut isolée pour la première fois par Vogel en 1820 de l'espèce *Coumarouna odorata*. (Bruneton, 1993). Ce sont des substances naturelles, organiques et aromatiques (Mpondo *et al.*, 2015), constituent d'un noyau coumarine simple (un cycle benzène et d'un noyau lactone) (benzo- α -pyrone) (Bakouan *et al.*, 2021). Les familles les plus riches en coumarines sont: les légumineuses, les rutacées, les apiécées et les thymeleacées. Elles sont présentes dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les graines (Deina *et al.*, 2003; Booth *et al.*, 2004).

Ce noyau entre dans la composition de nombreux produits naturels ou synthétiques rencontrés dans un certain nombre d'agents médicaux tels que: les antibactériens (Cravotto *et al.*, 2006), les anticancéreux (Qiang *et al.*, 2014), les anticoagulants (Abdelhafez *et al.*, 2010), les antioxydants (Bailly *et al.*, 2004), les anti-VIH (Muñoz *et al.*, 2012), les antimicrobiens, les antifongiques (Abdou, 2017), etc. C'est la présence du noyau de la coumarine qui confère à ces composés un intérêt pharmacologique et thérapeutique (Abdelhafez *et al.*, 2010).

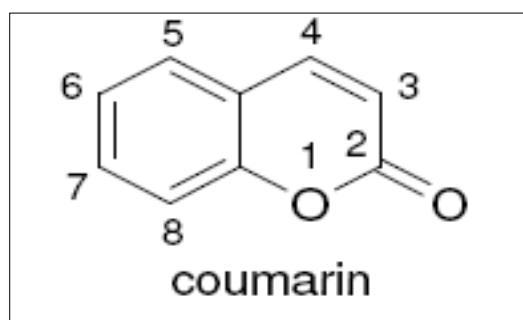


Figure 7 :Structure des Coumarines.

2.1.1.6 Lignanes

Les lignanes sont des polyphénols s'accumulant dans les tissus ligneux, les graines et les racines de nombreuses plantes. Ces molécules, vraisemblablement impliquées dans les mécanismes de défense chez la plante, sont également utiles pour l'homme. Ils sont issus de la condensation de deux unités phénylpropanoïques. (Pengelly, 2004) ils possèdent de nombreuses activités biologiques, qui leur confèrent une importance non négligeable en phytothérapie. Ils ont montré des propriétés: antibactérienne, antifongique, antioxydante, antitumorale, antivirale, antihépatotoxique, anti-PAF, insecticides et oestrogéniques (Ayres et Loike, 1990; Bruneton, 1999).

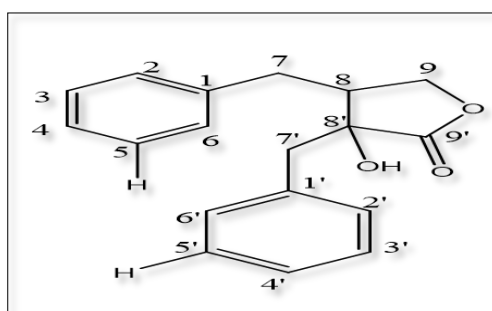


Figure 8: Exemple d'un Lignane: Structure chimique de la « 4'-O- β -D-glucopyranosyl-nortrachegenin » (Baatouche *et al.*, 2018).

2.1.2 Composé terpénique

2.1.2.1 Terpénoides

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. (Yazaki *et al.*, 2017), Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8) reconnue par Wallach dès 1887 (Lamarti *et al.*, 1994). Ils sont produits par une grande variété de plantes et par certains animaux. On les trouve également en abondance dans les fruits, les légumes et les fleurs (Dudareva *et al.*, 2005).

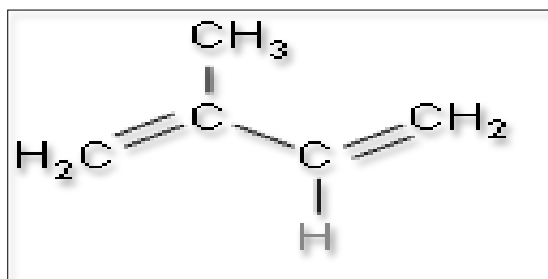


Figure 9: Molécule d'isoprène.

Les terpènes ont un large éventail de propriétés biologiques, notamment les effets chimiopréventifs du cancer, les activités antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, antihyperglycémiques, anti-inflammatoires et antiparasitaires. Les terpènes sont également présentés comme des agents améliorant la pénétration dans la peau et des agents impliqués dans la prévention et la thérapie de plusieurs maladies inflammatoires (**Paduch et al., 2007**).

Les terpènes aussi ont plusieurs effets sur l'être-humain. Connus comme des huiles essentielles, ils s'utilisent actuellement pour l'aromathérapie (**Carla de Carvalho et Manuela da Fonseca, 2006**).

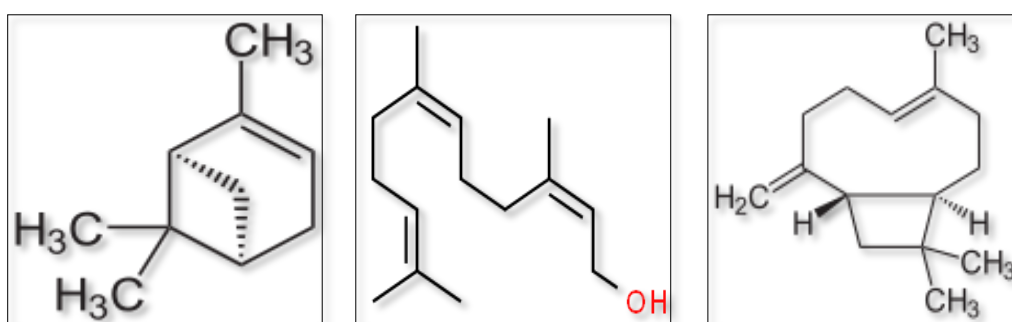


Figure 10: Exemples d'un terpène: Structure chimique de Pinène, Farnesol, Cayophyllène.

2.1.2.2 Saponines (Saponosides)

Les saponines sont des métabolites secondaires (**Hartmann, 2007**), qui sont généralement connus comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal (**Vincken et al., 2007**). Le nom « saponine » est dérivé du mot latin *sapo*, qui signifie « savon ». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante (**Bruneton, 2009**), en raison de cette propriété moussante, les saponines trouvent de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie cosmétique. Les applications des saponines s'étendent à l'agriculture, pour l'assainissement des sols ;et en tant que pesticides naturels(**Chen et al., 2007**).

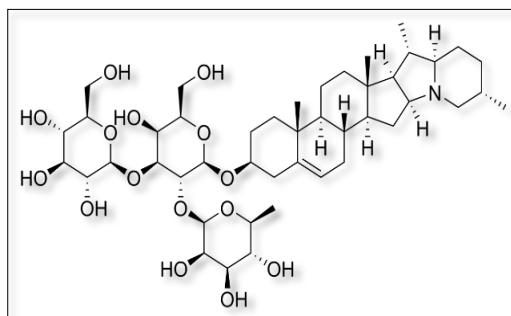


Figure 11: Exemple d'un Saponine: Structure chimique de la « Solanine» (**Garai, 2014**).

2.1.3 Composés azotés

2.1.3.1 Alcaloïdes

La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910: « Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doués de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose ». Ils ont, de plus, la propriété de réagir avec des sels de métaux lourds, ce qui permet leur caractérisation aisée (réactifs de Mayer, de Dragendorff, de Wasicky, de Bouchardat).

Les alcaloïdes jouent un rôle important pour la protection des plantes car ils confirment leur existence contre les microbes, les fongiques, et les insectes et les herbivores (**Jan et Abbas, 2018**). Ainsi certains alcaloïdes sont utilisés comme moyen de défense contre les infections microbiennes (nicotine, caféine, morphine, lupinine). Elle présente aussi des effets anticancéreux puissant (**Iserin et al., 2001**).

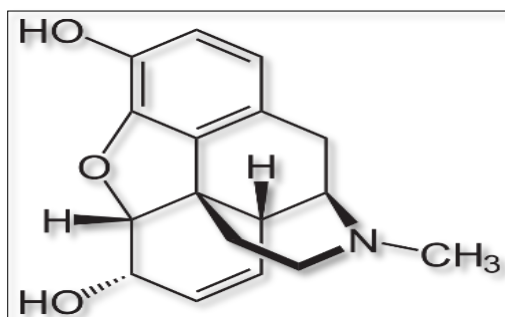


Figure 12: Exemple d'un alcaloïde: structure de la « Morphine ».

2.1.4 Activités biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques font actuellement l'objet de nombreuses études pour leurs différentes activités biologiques (**Trabelsi et al., 2010**) et ils ont été rapportés pour des propriétés pharmacologiques intéressantes et variées, à savoir, les propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuse, anti-athérosclérose (**Stahlhut et al., 2015**), anti allergique (**Bouhafoun et al., 2018**), antioxydantes (**Santos-Sánchez et al., 2019**), antivirale (**Cevallos-Casals et Cisneros-Zevallos, 2010**), antifongique (**Kamelé et al., 2019**) et antibactérienne (**Lin et al., 2016**).

CHAPITRE II :

Activités biologique des plantes médicinales

1. Activité antioxydant

1.1 Le stress oxydatif

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres (**figure13**).

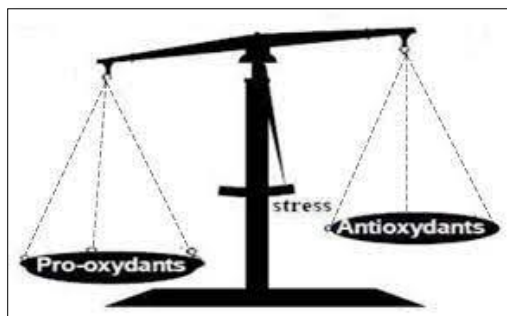


Figure 13: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.

Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant et pro-oxydant. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments.

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN, les lipides (peroxydation), les protéines...etc (**Cook et al., 2003**).

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies telles que le cancer, vieillissement accéléré, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 1997**).



Figure 14: Les principaux causes du stress oxydatif.

1.2 Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable: il va donc se réduire en oxydant un autre composé (**Martinez-Cayuela, 1995**).

1.3 Antioxydants

Vansant (**2004**) définit les antioxydants comme substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Ce système est divisé en deux grandes catégories: Les antioxydants enzymatiques ou non-enzymatiques.

- **Antioxydants enzymatiques**

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (**Avissar et al., 1989**). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'anion superoxyde O_2^- et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire.

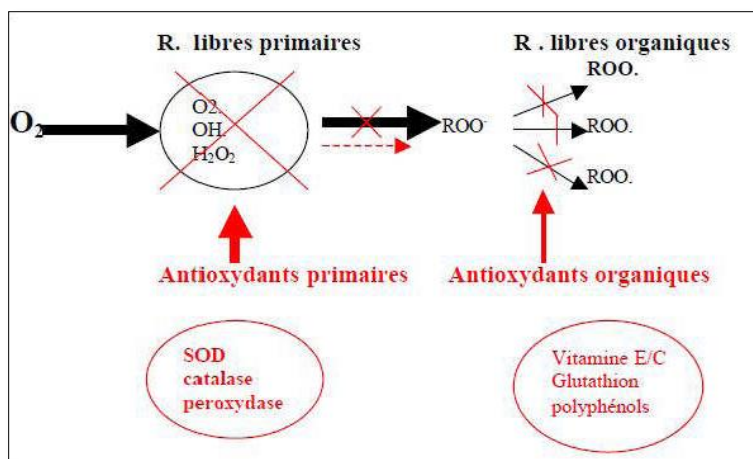


Figure 15: Les systèmes de défense contre les radicaux libres (Binov, 2001).

- **Antioxydants non enzymatiques**

La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et nécessitent être apportés par l'alimentation. Les principaux antioxydants non-enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et l'acide urique. Ces molécules vont interrompre la chaîne de réaction radicalaire (Cadenas, 1989).

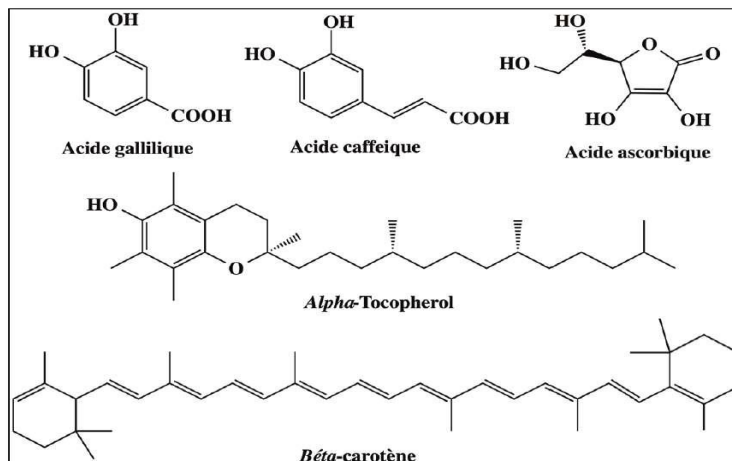


Figure 16: Structures des antioxydants naturels les plus couramment utilisés.

1.4 Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

2. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne correspond à l'activité d'une molécule ou composé présent au sein d'une végétale qui à très faible concentration inhibe le développement d'une bactérie ou la tue. La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérien face à un antibactérien. La sensibilité d'une bactérie peut être très différente selon la souche d'appartenance (Nicolas et Daniel, 1998).

2.1 Principales substances antibactériennes

- Antibiotiques

Un antibiotique (du grec anti, contre et bios, vie) (Sablonnière, 2006), est une substance antibactérienne d'origine naturelle produite par des micro-organismes (champignons et bactéries) ou synthétique chimiquement capable d'inhiber la multiplication ou détruire les micro-organismes. Les antibiotiques peuvent être classés selon l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action (Yala *et al.*, 2001).

Les antibiotiques perturbent des mécanismes essentiels de la vie cellulaire (réplication, transcription, traduction, synthèse de la paroi...) ce qui limite la croissance bactérienne (effet bactériostatique) ou tue les bactéries (effet bactéricide) (Figure 17). Comme les cibles moléculaires des antibiotiques sont présentes uniquement chez les bactéries, ces substances n'interfèrent pas avec la vie des cellules eucaryotes et n'ont pas d'effet sur les virus.

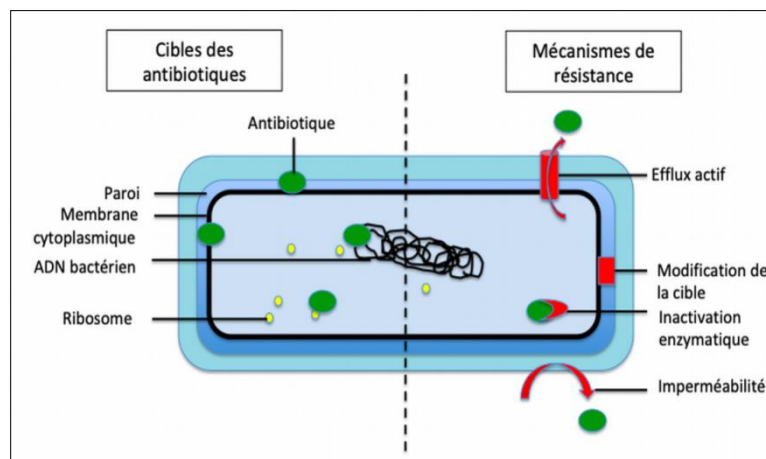


Figure 17: Cibles bactériennes et mécanisme de résistance aux antibiotiques.

- **Composés phénoliques**

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité. Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Cowan, 1999).

2.2 Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

Pour étudier l'effet bactériostatiques ou bactéricides d'un antibiotique, il existe deux grandes familles de tests tels que:

- **Tests par diffusion:** qui utilisent une méthode permettent de classer les bactéries en sensibles ou résistantes (Pibiri, 2006).
- **Tests par dilution:** qui utilisent une méthode quantitative aboutissent à un résultat chiffré correspondent à une CMI (Eloff, 1998).

2.2.1 Aromatogramme (Méthode de diffusion)

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. (Pibiri, 2006).

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencés avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones d'inhibition autour des disques (Biyiti *et al.*, 2004). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Pibiri, 2006).

2.2.2 Méthode de dilution

La méthode de dilution est généralement utilisée pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices. Dans le milieu de culture, des volumes d'extraits sont introduits pour des concentrations précises puis ce milieu est inoculé par les microorganismes par la suite. Après incubation, la CMI est déterminée (Eloff, 1998). La lecture peut être

visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Robert-Demuet, 1995).

3. Activité antifongique

3.1 Antifongiques

Les antifongiques sont des substances chimiques produites par des micro-organismes ou par synthèse chimique à partir de molécules dérivant de composés naturels. Ces médicaments sont utilisés dans la lutte contre les mycoses. Jusqu'en 1950, la recherche des antifongiques dans les plantes était pratiquement inexistante mais elle n'a pris de l'ampleur que vers les années 1990 (Cowan, 1999; Iwu *et al.*, 1999). Les principaux antifongiques sont: les polyènes (amphotéricine B et amphotéricine B liposomale), les triazolés (fluconazole, voriconazole et isavuconazole), les échinocandines (caspofungine, micafungine et anidulafungine), la flucytosine. Les mécanismes d'action cellulaire de ces différents antifongiques sont exposés dans la figure ci-dessous, et se résument comme suit:

- ❖ Altération de la structure de la paroi fongique (Candines).
- ❖ Troubles de la perméabilité membranaire (Amphotéricine B).
- ❖ Inhibition des synthèses protéiques (Azolés).
- ❖ Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN) (5-fluorocytosine).

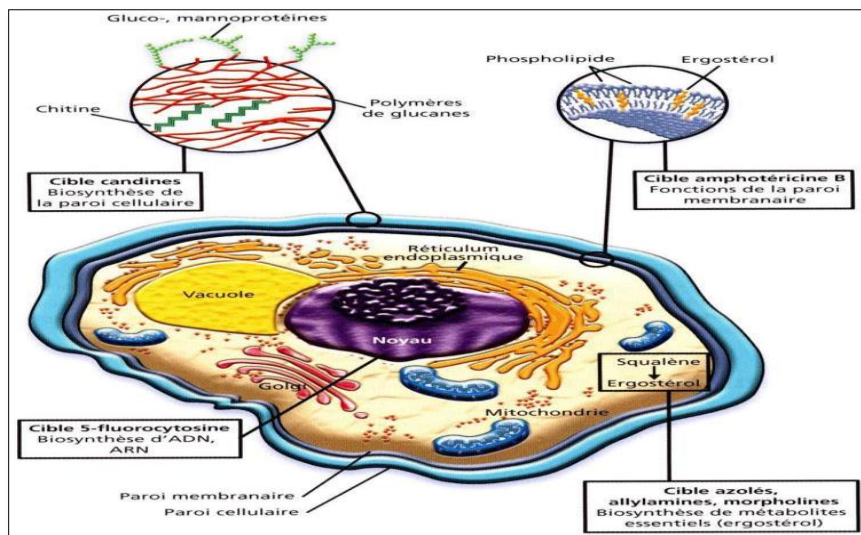


Figure 18: Cibles des différents antifongiques (Lortholary, 2004).

4. Activité anticoagulante

4.1 Définition

La coagulation est l'aboutissement d'une cascade de réaction protéolytiques entraînant l'activité en chaîne de facteurs plasmatiques de la coagulation, circulant sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes) (Ajjan et Grant, 2006). C'est un phénomène par lequel le sang fluide et circulant se transforme en une masse insoluble et immobile (caillot). Il est lié à la transformation de fibrinogène en fibrine. Cette transformation a lieu après une série de réactions enzymatiques faisant intervenir de nombreux facteurs tant plasmatiques que plaquettaires (Ekoumou, 2003).

4.2 Facteurs de coagulation

Les facteurs de la coagulation sont désignés par des numéros allant de I à XIII (Tableau 4) à l'exception du facteur XIII qui intervient dans la dernière étape de la coagulation, les autres facteurs interviennent dans l'ordre inverse de leur numérotation (Fressinaude et Meyer, 1994).

Tableau 4: Facteurs de la coagulation plasmatique (Boisseau, 1996).

N° de facteurs	Nom de facteurs	Rôle	Lieu de synthèse
I	Fibrinogène	Substrat	Foie
II	Prothrombine	Zymogène	Foie
III	Facteur tissulaire	Cofacteur	Sous-Endothélium Cellules sanguines
V	Proéaccélérine	Cofacteur	Foie
VII	Proconvertine	Zymogène	Foie
VIII	Facteur antihémophilique A	Cofacteur	Foie
IX	Facteur antihémophilique B	Zymogène	Foie
X	Facteur STUART	Zymogène	Foie

XI	Facteur de Rosenthal	Zymogène	Foie
XII	Facteur de Rosenthal	Zymogène	Foie

4.3 Dérroulement de la coagulation

La coagulation peut être initiée de deux façons différentes. La première dite « voie extrinsèque » de la coagulation, est l'exposition du sang au contact du FT qui semble prépondérant et essentielle in vivo. La seconde, connue sous le nom de « voie intrinsèque » est l'exposition du sang au contact d'une surface chargée négativement (Said, 2012).

4.3.1 Voies de la coagulation

La coagulation peut suivre deux voie (Vogler et Siedlecki, 2009).

4.3.1.1 Voie endogène ou voie cellulaire

Dans cette voie de coagulation tous les éléments nécessaires de la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII (Hageman) lors de ce contact aux structures électronégatives de la matrice sous-endothéliale (collagène, sulfatides, glycosaminoglycanes) (Vogler et Siedlecki, 2009), une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-kallikréine en kalikriène qui à son tour peut activer le F XII.

Le F XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX. Ce dernier se lie à la surface des phospholipides anionique des plaquettes (F3P) par l'intermédiaire des ions de calcium et forme en présence de son cofacteur, le facteur VIII le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X (Colvin, 2004; Vogler et Siedlecki, 2009).

4.3.1.2 Voie exogène ou extrinsèque

La voie exogène est la voie la plus simple et la plus rapide que la voie endogène, car elle fait intervenir un nombre limité de facteurs (Caen et al., 1975). Cette voie est activée par un facteur non plasmatique qui est le facteur tissulaire, une glycoprotéine membranaire exprimée sur la surface des cellules endothéliales et les cellules de la matrice sou endothéliale. Lors d'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire devient en contact avec le plasma ce qui permet l'interaction avec le facteur VII (pro-convertine) pour former un complexe

enzymatique réactif (Facteur tissulaire-FVII). Ce complexe est responsable de l'activation de facteur X et aussi de facteur IX et par conséquent de prothrombine en thrombine (Colvin, 2004).

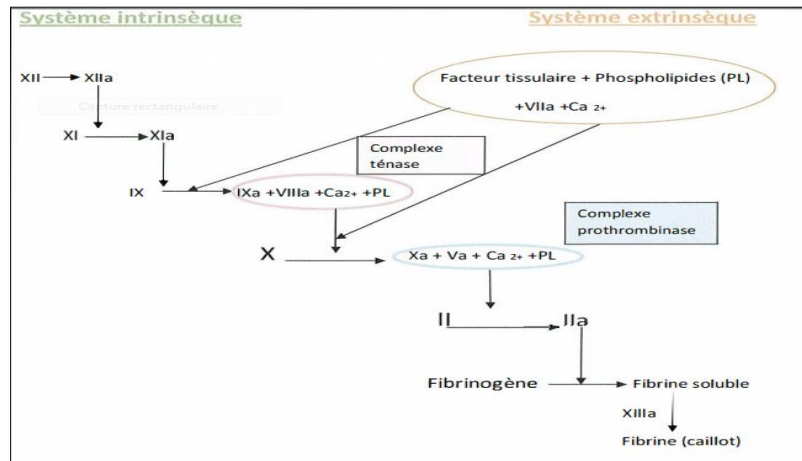


Figure 19: Schéma simplifié de la cascade de coagulation(Vogler et Siedlecki, 2009).

4.4 Anticoagulants

Un anticoagulant est une substance ayant la propriété d'inhiber ou de retarder la coagulabilité naturelle du sang afin de prévenir la formation de caillots. Quatre catégories des médicaments anticoagulants sont disponibles:

4.4.1 Héparine

Famille de médicaments anticoagulants qui agissent en stimulant un anticoagulant physiologique présent dans la circulation de chacun d'entre nous: l'antithrombine.

L'héparine est un polysaccharide présent dans divers tissus, notamment le poumon et l'intestin. Il existe deux catégories des héparines utilisables et administrées par voie intraveineuse ou sous cutanée, l'héparine non fractionnée ou standard (HNF) et les héparines de bas poids moléculaire (HBMP) (Barouti *et al.*, 2013).

L'héparine standard est composée d'un mélange hétérogène de chaînes polysaccharidiques sulfatées de structures et de taille différentes, alors que les héparines de bas poids moléculaire obtenues par fragmentation des chaînes polysaccharidiques de l'héparine standard. L'HNF et les HBPM (exp: Lovenox) forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III potentialisant son effet sur l'inactivation de divers facteurs de coagulation (Batty et Smith, 2010).

4.4.2 Anti vitamines K (AVK)

Les facteurs vitamine K-dépendants (II, VII, X, IX, PC et PS) deviennent actifs dans le foie. grâce à l'activité d'une carboxylase qui les rend efficaces pour agir sur la cascade de la coagulation. Cette enzyme a pour cofacteur la vitamine K réduite. Les AVK donc inhibent l'action de cette enzyme (**Niksic et al., 2006**).

4.4.3 Danaparoïde sodique (Orgaran®)

Est un mélange glycosaminoglycanes de faible poids moléculaire (Héparane-sulfate, dermatane-sulfate, chondroïtine-sulfate). Comme les héparines, il a besoin pour agir d'un cofacteur, l'antithrombine, mais il présente une activité anti-Xa beaucoup plus sélective que les HBPM. Il est utilisé essentiellement en cas de TIH ou d'antécédents de TIH, bien que des réactions croisées aient été décrites (<10%) (**Ortel et Chong, 1998**).

4.4.4 Hirudine

L'hirudine est une petite protéine présente dans la salive des anguilles et dont l'affinité pour la thrombine est très forte (**Gachet, 2013**). Il va inhiber la thrombine afin de prévenir l'étape de coagulation du sang (22). (**Abdullah et al., 2012**). Elle est produite par génie génétique et commercialisée sous le nom de lépirudine (Refludan®) (**Greinacher et al., 1999**).

4.4.5 Nouveaux anticoagulants

Actuellement utilisés à côté des anticoagulants classiques, deux nouveaux type des anticoagulants sont subdivisés selon leur mode d'action:

- ❖ Les inhibiteurs indirects qui agissent en potentialisant l'activité de l'antithrombine III comme le fondaparinux et l'idraparinux.
- ❖ Les inhibiteurs directs qui agissent directement sur le facteur Xa ou la thrombine, comme, l'hirudine, l'argatroban...etc (**Girardelet Samama, 2006**).

Chapitre III :
Présentation la plante Hibiscus
sabdariffa L.

1. Plante *Hibiscus sabdariffa* L.

1.1 Famille des *Malvacées*

Les *Malvaceae* représentent une grande famille de plantes à fleurs qui contient 244 genres et 4225 espèces différentes, dont font partie l'*Hibiscus*. On les retrouve partout dans le monde, à l'exception des régions froides, mais surtout dans les régions tropicales d'Amérique du Sud, le nom de la famille dérive du genre *Malva* qui désigne les mauves, ce nom provient du grec « *malacos* » qui signifie « mou », en référence aux propriétés des mauves (émollientes) (Marine et al., 2009).

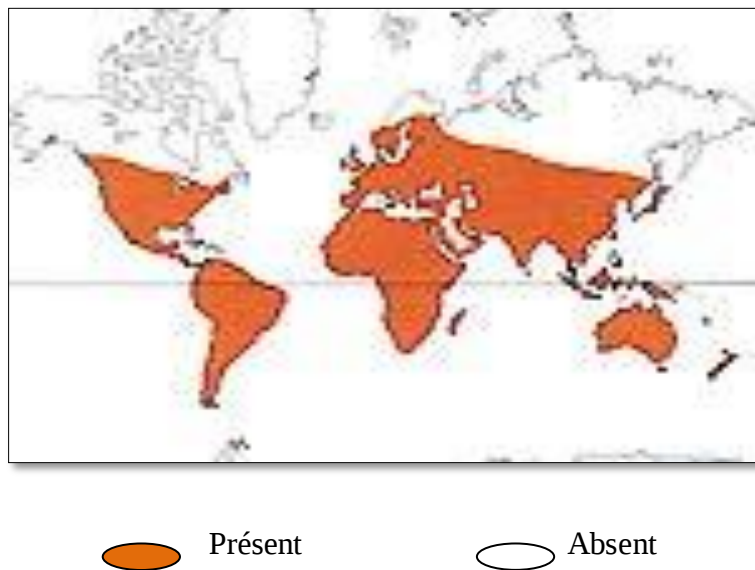


Figure 20: Répartition géographique de la famille des malvacées.

1.2 Genre *Hibiscus*

Le genre *Hibiscus* est un petit arbuste fleuri qui mesure entre 40 et 70 cm de la famille des *Malvacées* comprend de 200 à 300 espèces, le nombre d'espèces estimé varie car les opinions divergent quant à l'inclusion de plusieurs groupes d'espèces apparentés au sein du genre. Les espèces du genre *Hibiscus* sont natives des régions tropicales et subtropicales, et nombre d'entre elles sont cultivées comme plantes ornementales (Tela Botanica, 2014).

1.3 Espèce *Hibiscus sabdariffa* Linné.

1.3.1 Description botaniques

Hibiscus sabdariffa L. est une plante qui se développe à partir d'un système racinaire profond pouvant atteindre une hauteur de plus de 3,5 mètre, vigoureuse, peu ramifiée et très

fibreuse avec des tiges cylindriques lisses rouges ouvertes et un calice rouge ou jaune pâle comestible et possède une racine pivotante à pénétration profonde, plantule à germination épigée, cotylédons arrondis, atteignant 2,5 cm × 3 cm foliacés (Shruthi, 2016).



Figure 21: *Hibiscus sabdariffa* L.

- **Tiges:** Les tiges sont ligneuses, cylindriques et typiquement rouges à violettes (Lavanya et al., 2019).
- **Feuilles:** Les feuilles supérieures d'*Hibiscus sabdariffa* L. sont simples et les feuilles inférieures sont profondément 3 à 5 ou même à 7 lobes et les marges sont étouffées, généralement les feuilles sont disposées de manière alterne sur la tige avec une longueur de 7,5 à 12,5 cm de couleur verte rouge, rouge violet, avec des nervures rougeâtres (Shruthi, 2016) .
- **Calices:** Le calice typiquement rouge, composé de 5 grands sépales avec un collier qui s'appelle epicalyx de 8-12 bractées minces et pointues autour de la base, il commence à s'élargir à la fin de la journée, Il est de 3,2 à 5,7 cm de long et entour complètement le fruit, il est rouge ou blanc (Shruthi, 2016).



Figure 22: Tige, feuille et calice de la plante *Hibiscus sabdariffa* L. (Cisse et al., 2009).

- **Fleurs:** La fleur prend naissance sur les rameaux à l'aisselle des feuilles, peuvent atteindre 12,5 cm de large, avec une couleur jaune et un œil rose ou marron et deviennent rose à la fin de la journée, elle s'ouvre tard dans la matinée et se referme tôt l'après-midi (Shruthi, 2016).



Figure 23: Fleur d'*Hibiscus sabdariffa* L. (Qi et al., 2005).

- **Fruit:** C'est une capsule ovoïde à 5 loges composées chacune de 3 lames minces, lisses à l'intérieur et hérissées à l'extérieur de poils fins et piquants. La capsule contient les graines (Paul, 1995).



Figure 24: Fruit d'*Hibiscus sabdariffa* L. (Cisse et al., 2008).

- **Graines:** Le calice rouge persistant de l'*hibiscus sabdariffa* L. abrite le fruit rond dans lequel il y a un grand nombre de petites graines (Figure 25) ovoïdes, de teinte brune. À maturité, qu'ils sont réniformes, de 3 à 5 mm de longue et couverte de poils minuscules, épais et étoilés (Mahadevan et al., 2009).

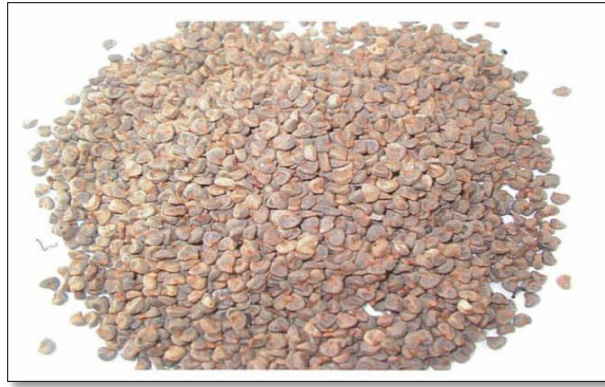


Figure 25: Les graines de l'*Hibiscus sabdariffa* L. (Endrias, 2006).

- **Racines:** La roselle possède un système racinaire prolifique avec une longue racine pivotante et des racines latérales étendues, ce qui lui permet d'être plus sensible aux changements d'humidité du sol et à l'absorption de l'eau en profondeur (Lavanya *et al.*, 2019).



Figure 26: Les racines de l'*Hibiscus sabdariffa* L.

1.3.2 Origine et Répartition géographique

Hibiscus sabdariffa L. est une plante herbacée de la famille des *Malvaceae*, largement répandue dans les régions tropicales et subtropicales des deux hémisphères (Cisse *et al.*, 2008), également présente dans de nombreuses régions d'Amérique centrale et d'Asie. Mais il est originaire d'Afrique, où les graines auraient été apportées en Amérique par les esclaves africains. Il était largement répandu en Asie, où l'espèce s'est adaptée. *Hibiscus sabdariffa* L. est également présent en Thaïlande, au Vietnam, en Malaisie, en Chine, au Soudan et au Mexique. Il est également présent dans d'autres pays comme l'Egypte, le Sénégal, Ghana, Niger, Nigeria, Angola (Grubben, 2004), la Tanzanie, le Mali, le Tchad et la Jamaïque qui le produisent en petite quantité (Morton, 1987).

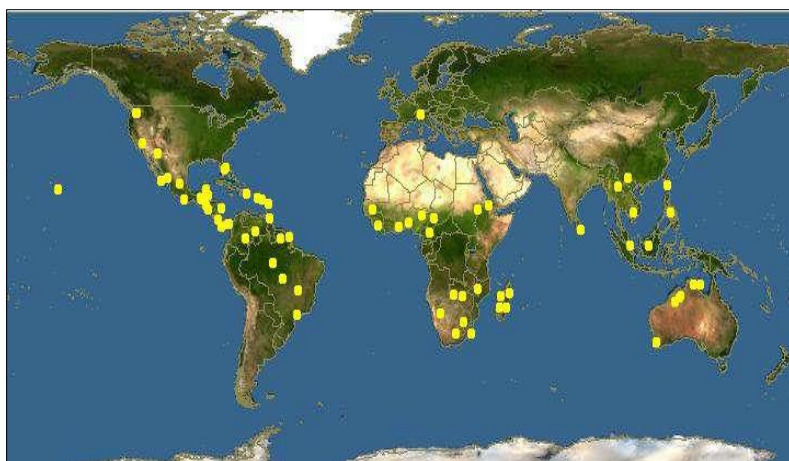


Figure 27: Répartition géographique de l' *Hibiscus sabdariffa* L.

1.3.3 Nom vernaculaire

- ❖ Arabe: Karkade.
- ❖ Anglaise: Rosell.
- ❖ Française: Oseille de Guinée.
- ❖ Africaine: Bissap au Sénégal ; Da bilenni au Mali, en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso.
- ❖ Mexique: La flore de Jamaïque.
- ❖ Allemagne: Rosellahanf.

1.3.4 Classification systématique

Tableau 5: Classification de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L.

Domaine	Eucaryote
Règne	plantea
Embranchement	Spermaphyte
Sous- embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédone
Sous-classe	Dialypétale

Ordre	Malvale
Famille	<i>Malvaceae</i>
Genre	<i>Hibiscus</i>
Espèce	<i>Hibiscus sabdariffa</i> Linné.

1.3.5 Ecologie

La plante *Hibiscus sabdariffa* L., plante des régions tropicales et subtropicales, est cultivée entre 20° de latitude Nord et 30° de latitude Sud. Cependant, elle a des besoins de températures situées entre 18 et 35 °C. 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 (Grubben, 2004).

1.3.6 Culture de *Hibiscus sabdariffa* L.

Hibiscus sabdariffa L. est relativement robuste et se développe bien dans la plupart des sols mais peut tolérer les sols pauvres (Da-Costa-Rocha, 2014). *Hibiscus sabdariffa* L. aime les climats tropicaux humides (Morton, 1987). 5 à 8 kg de graines sont nécessaires pour ensemercer environ 1 hectare, en fonction de la densité choisie. Les graines ont besoin d'une température minimale de 20°C pour germer mais la température optimale pour le développement de la plante se situe entre 20 et 35°C, avec des précipitations mensuelles de 130 à 250 mm pendant les 3 à 4 premiers mois de croissance (Da-Costa-Rocha, 2014). Le pH optimum du sol, pour un bon développement, est de 5-6, et les meilleurs sols sont sablonneux ou de type terreux (Morton, 1987).

La floraison d'*Hibiscus sabdariffa* L. est favorisée par des journées courtes (octobre février). Il lui faut 120 à 180 jours pour étaler ses calices d'un rouge vif (Mohamed et al., 2012).

1.3.7 Croissance et développement

La période de croissance végétative dure entre 4 et 6 mois. La taille de la plante 30 jours après la levée est d'environ 30 cm. La récolte de feuilles peut débuter 6 semaines après le semis, elle stimule la ramification et en conséquence augmente la production de feuilles. La

floraison démarre lorsque la longueur du jour diminue, au plus tôt 2 mois après le semis, et au plus tard 7 mois. La fleur est généralement auto fécondée. Les fruits commencent à murir deux ou trois mois après la fécondation (Grubben, 2004).

1.3.8 Récolte

La première récolte comprend les plantes récoltées au cours de l'éclaircissage. Lorsque la plante atteint 6-8 semaines, on récolte les rameaux qui font à peu près 50 cm, 2 ou 3 fois pendant la période de croissance végétative. Les calices se récoltent à la main, 2-3 semaines après la floraison, habituellement 4-6 mois après le semis avant que le fruit ne se dessèche et s'ouvre. Des cueillettes régulières prolongent la floraison. (Cisse et al., 2009). On fait sécher les calices à l'ombre. En culture de fibre, on coupe les tiges avant la floraison, 4-5 mois après la plantation. Après le début de la floraison, la qualité des fibres baisse rapidement (Grubben, 2004).

1.3.9 Composition chimique

Beaucoup d'études ont été menées en vue de déterminer la composition chimique des feuilles, des calices, des graines et des racines de *Hibiscus sabdariffa* L. Le tableau suivant les résume:

Tableau 6: Compositions chimiques de l'*Hibiscus sabdariffa* L. (Mahadevan et al., 2009).

Partie de la plante	Composition chimique
Graine	Protéine, lipides, fibre, glucides (saccharose, glucose, amidon, Acides gras (oléique, palmitique, linoléique, arachidique...), acide aminé (acide glutamique, aspartique, leucine, arginine ...)
Calice	Protéine, vitamine, polyphénol, pectine, carotène, fibre, minéraux, anthocyène (delphinidine -3sambubioside, cyanitine-3sambubioside, acide organique oligo-éléments (chrome, cuivre, plomb), élément essentiels (Ca, Cu, Fe, k, Me, Zn), eau
Feuille	Calcium, fer, zinc, phosphore, fibre, cendre, protéine, lipide,

	glucides, thiamine, riboflavine, β -carotène, acide ascorbique
Fleur	Protéine, lipide, glucides (arabinase, saccharose, manose, xylose), thiamine, fibre (brute, diététique), minéraux, cendre, résine, β -carotène, acide ascorbique
Fruit	Oxalate de Calcium, pectine, acide acétique

1.3.10 Principale utilisation d'*Hibiscus sabdariffa* L.

1.3.10.1 Utilisation thérapeutique

L'espèce *Hibiscus sabdariffa* L. aurait de nombreuses propriétés thérapeutiques, qui sont attribuées aux concentrations élevées en acides organiques, notamment en acide malique, ascorbique et acide citrique (**Kohen et Downing, 1992**). D'autres activités biologiques seraient liées aux composés anthocyaniques qui sont dotés d'activités antioxydantes importantes (**Sarni Manchad et Cheymier, 2006**). Les études, ont mis en évidence que la consommation journalière d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L. diminuerait de manière significative la tension artérielle chez les sujets hypertendus, montrent également une grande efficacité contre le froid, les douleurs cardiaques (**Ojeda et al., 2010**), des voies respiratoires supérieures, les maladies nerveuses (**Panizza, 1997**), la perte d'appétit, le gonflement (inflammation), l'irritation de l'estomac, la rétention d'eau, les troubles de la circulation et pour dissoudre les mucosités.

D'autres études chez les personnes diabétiques montrent qu'un verre une fois par jour de l'infusion d'*Hibiscus sabdariffa* L. 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 sabdariffa* L. 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 bioflavonoïdes qui se trouvent dans la fleur d'*Hibiscus sabdariffa* L. (**Endrias, 2006**).

Les graines sont utilisées comme complément alimentaire contre l'anémie et la poudre de feuilles sert de farine enrichie en nutriments (**El-Sherif et Sarwat, 2007**).

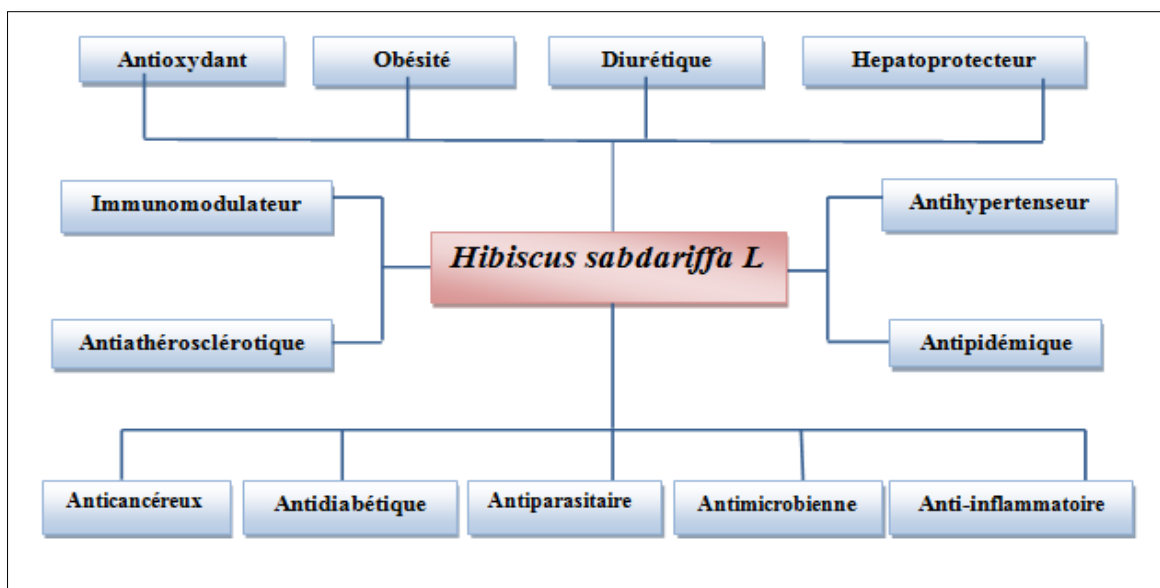


Figure 28: Propriétés thérapeutiques et/ou pharmacologiques d' *Hibiscus sabdariffa* L.
(Izquierdo-Vega *et al.*, 2020).

1.3.10.2 Utilisation alimentaire

L'espèce *Hibiscus sabdariffa* L. est utilisée dans l'alimentation humaine et dans l'industrie agroalimentaire. La plante est exploitée pour ses calices, feuilles et graines.

Les calices, du fait de leur concentration élevée en acides, pectine, vitamine C et surtout en anthocyanes, constituent la partie de la plante la plus valorisée. Ils sont surtout utilisés pour la production de boissons désaltérantes et tonifiantes sans alcool.

Ils sont aussi utilisés dans la préparation de confitures, de marmelades et de l'infusion (tisane) (Cisse *et al.*, 2008). Les extraits de calices, sous forme de concentré ou de poudre séchée, sont utilisés comme colorant naturel dans les industries alimentaires (pâtisserie, jus de fruits, boissons, etc) (Cisse *et al.*, 2009). Ils sont utilisés également pour fabriquer une boisson fermentée alcoolisée qui s'apparenterait à du vin (Mounigan *et al.*, 2007).

Les calices détrempés, de même que les graines de bissap (*hibiscus sabdariffa* L.) sont donnés aux animaux domestiques. Ces dernières sont souvent mélangées à d'autres produits pour donner un aliment riche en cellulose et en oligo-élément.

Les graines d'*Hibiscus sabdariffa* L. sont riches en protéines, sont-elles utilisées pour la fabrication de condiments traditionnels par cuisson puis fermentation. (Cisse *et al.*, 2008).

Les feuilles d'*Hibiscus sabdariffa* L. sont également propices à leur utilisation dans l'alimentation humaine. Au Sénégal, ces feuilles sont utilisées pour fabriquer une sauce aigre, épaisse, appelée « békëj », servie avec le riz au poisson.

1.3.10.3 Utilisation industrielle

L'*Hibiscus sabdariffa* L. a des applications très variées dans le domaine industriel, notamment celui des arômes, des colorants alimentaires et de la génération des nouvelles boissons. Il est un candidat, par ses graines, à être une nouvelle source d'huile végétale (Endrias, 2006).

1.3.10.4 Utilisation cosmétique

Grâce à ses propriétés anti-oxydantes et colorantes, la poudre de bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) peut entrer dans la composition de produits cosmétiques comme les maquillages, les crèmes, les shampooings, les soins anti-âge, adoucissants et hydratants, etc. ainsi leur l'huile utilisée pour produire les gommages et savons (Ismail *et al.*, 2008).

Partie II :

Etude expérimental

Chapitre I :
Matériels et méthodes

1. Matériel et méthode

1.1 Extraction

L'extraction a été réalisée au niveau des laboratoires de biologie de centre universitaire Abdalhafide Bouassouf (Mila) à partir des fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* L.

- **Principe**

L'étape d'extraction est considéré comme une étape primordiale d'analyse et d'identification des molécules bioactives. L'extraction de produits naturels est généralement de type solide-liquide. Des méthodes dites traditionnelles, comme la macération, l'infusion, et la décoction étaient jusqu'ici utilisées et considérées comme techniques de choix pour extraire les composés naturels (Mendiola, 2007).

Dans notre étude, nous avons utilisé deux méthodes d'extractions qui sont:

- ❖ Extraction par macération dans le méthanol aqueux.
- ❖ Extraction par infusion dans l'eau distillée bouillante.

- **Echantillonnage**

L'objectif de notre travail est porté sur l'étude phytochimique et les activités biologiques: antioxydante, antibactérienne, antifongique et anticoagulantes des extraits du *Hibiscus sabdariffa* L. (**figure 29**) une plante médicinale qui s'appellent « karkadeh ». L'échantillon a été acheté sous forme des fleurs sèches telle qu'elle est vendue par l'herboriste de Constantine (nouvelle ville) en janvier 2023.



Figure 29: Fleurs sèches d'*Hibiscus sabdariffa* L. (Photo personnelle, 2023).

1.2 Préparation de matériel végétal

- **Broyage et tamisage**

Nous avons utilisé échantillons des fleurs séchées d'*Hibiscus sabdariffa* L. pour mettre au point notre méthodologie d'analyse. Les échantillons sont soumis à un broyage à l'aide d'un mortier le résultat est passé au tamis afin d'obtenir une poudre fine.

Enfin, la poudre (**Figure 30**) est conservée dans des flacons en verre à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'utilisation.



Figure 30: Broyage de l'*Hibiscus sabdariffa* L. (Photo personnelle, 2023).

1.3 Préparation des extraits végétaux

1.3.1 Extraction par macération

C'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 (**Llaneza Coalla et al., 2009**). Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par (**Adil et al., 2012**), avec quelques modifications : d'où une quantité de 25 g de la poudre végétale (fleurs) de l'*Hibiscus sabdariffa* L. ont été macérées de manière exhaustive dans 250 ml d'une solution hydro-méthanolique (Méthanol: Eau) (80%) pendant 72 h à température ambiante. Après filtration par papier filtre type Wattman, le filtrat a été combiné et évaporés sous pression dans un évaporateur rotatif (BUCHI, R-215) à 40 °C pour obtenir l'extraît brut (Ext 1), qui est conservé dans un flacon en verre fermé hermétiquement et stocké à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation. (**Figure 31**).

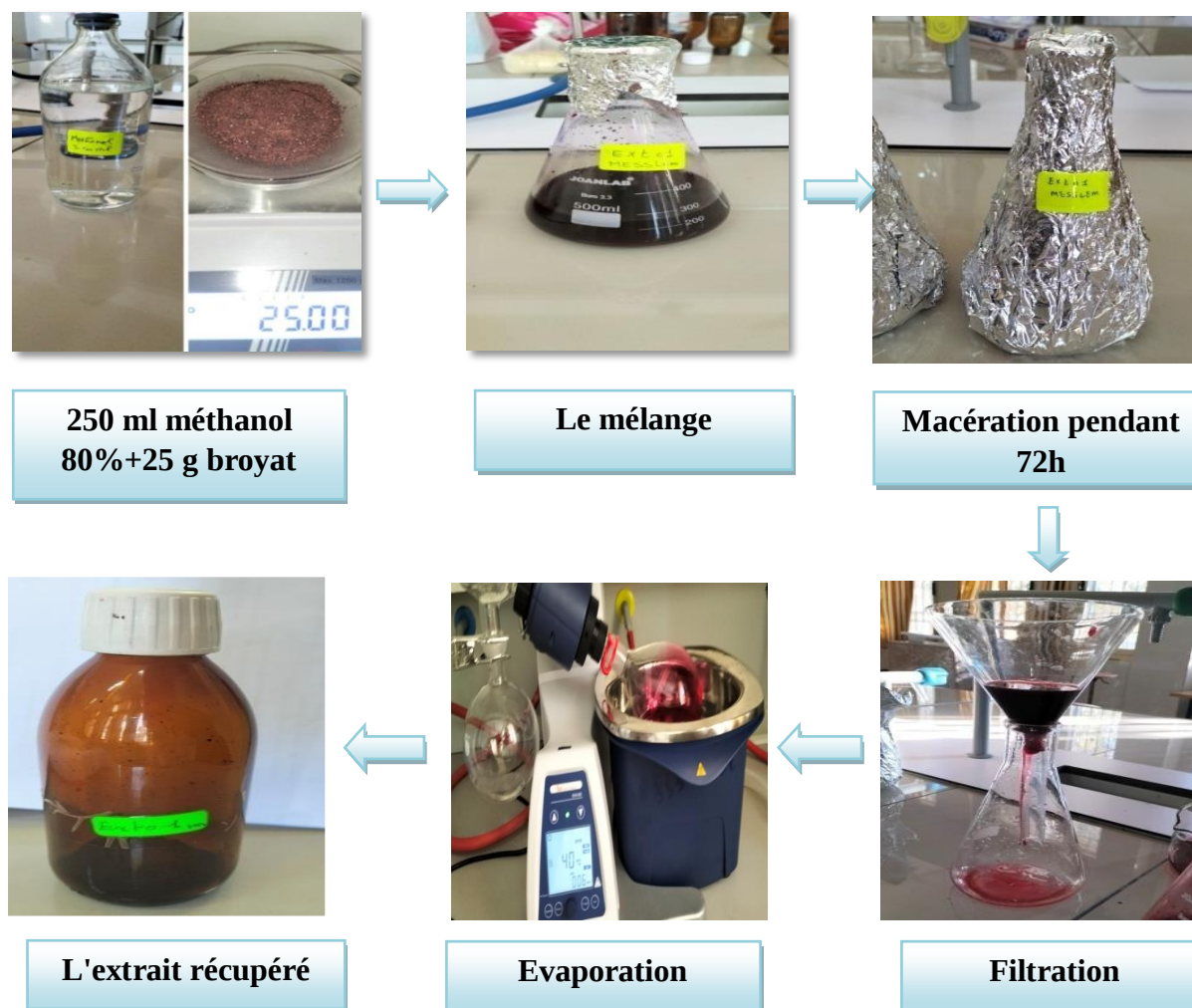


Figure 31: Protocole d'extraction par macération de l'*Hibiscus sabdariffa* L. (Photos personnelle, 2023).

1.3.2 Extraction par infusion

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale, et ceci par dissolution de cette matière végétale par dissolution dans un solvant approprié généralement l'eau bouillante. Elle est utilisée pour les parties tendres ou fragiles des plantes: fleurs, sommités fleuries, feuilles tendres, plantes aromatiques (qui contiennent des huiles essentielles), certains fruits (Sophie et Eherhart, 2003).

L'extraction des fleurs de l'*Hibiscus sabdariffa* L. par infusion a été effectuée selon le protocole décrit par (Chavan *et al.*, 2001): où on a mis 10 g de la plante sèche dans l'eau distillée (100 ml) bouillant à 100 °C, puis laisser macérer entre 10 à 20 min. Le résidu est filtré par papier filtre type Wattman, le filtrat a été séché dans l'étuve à 45°C. Enfin, le produit final est stocké dans une boîte en verre fermée hermétiquement à l'abri de la lumière à 4°C et jusqu'à utilisation (Figure 32) (Zahoui *et al.*, 2010; Bourgou, 2016).

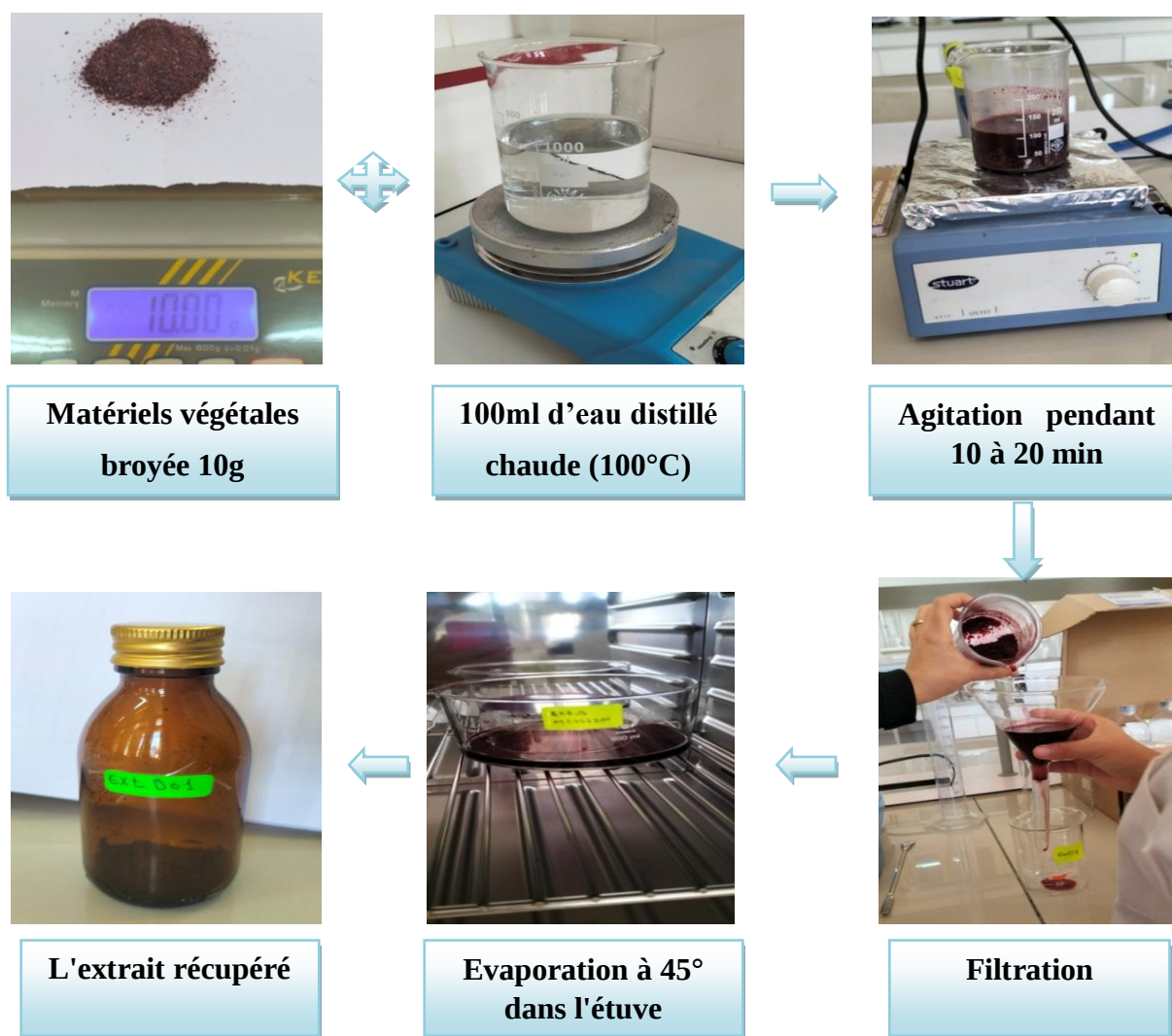


Figure 32: Protocole d'extraction par infusion de l'*Hibiscus sabdariffa* L. (Photos personnelle, 2023).

2. Rendement de l'extrait brut

Le rendement de l'extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé via l'équation:

$$R \% = (Me/Mv) \times 100$$

- ❖ **R%**: Rendement en %.
- ❖ **Me**: Masse de l'extrait après évaporation du solvant.
- ❖ **Mv**: Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

3. Analyse qualitative

Les tests de l'analyse qualitative de notre plante sont réalisés au sein du laboratoire du centre universitaire Abdalhafide bouassouf (Mila).

3.1 Screening phytochimique

Il s'agit d'une analyse quantitative basée sur des réactions de coloration et de précipitation. Cette technique permet de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans l'extrait végétal.

- **Détection des Alcaloïdes**

Le test a été réalisé par des réactions de précipitation avec le réactif de Wagner, 2 ml de l'extrait sont mis dans un tube à essai puis, on y ajoute quelques gouttes de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité rouge-orangé ou brun rougeâtre indique un test positif (Vijay *et al.*, 2013).

- **Détection des Flavonoïdes**

Dix gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium sont ajoutés à 0,5 ml de chaque extrait. La coloration rose-rouge ou jaune, après trois minutes d'incubation à température ambiante, indique la présence des flavonoïdes (Bentab et lasgaa, 2015).

- **Détection des Substances phénoliques**

La caractérisation des polyphénols est basée sur une réaction effectuée entre les substances phénoliques et le réactif de chlorure ferrique (FeCl_3). A 2 ml de l'extrait végétal, une goutte de solution de chlorure ferrique à 2% est ajoutée. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence des polyphénols (Békro *et al.*, 2007).

- **Détection des Terpénoïdes**

La présence des terpènes a été mise en évidence à l'aide de H_2SO_4 concentré. A 2,5 ml d'extrait est ajouté 1 ml de chloroforme. Après homogénéisation, 1,5 ml d' H_2SO_4 concentré sont additionnés au mélange. La formation d'une couleur brun-rouge à l'interface indique leur présence (Diallo, 2000; Azam *et al.*, 2013).

- **Détection des saponines**

Les saponines ont été mises en évidence par le test de la mousse. Dans un tube à essai, 5 ml de l'extrait ont été mis. Ensuite, le tube est agité pendant 1 min, puis laissé au repos pendant 20 min. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm indique la présence des saponines (Karumi *et al.*, 2004; Ayoola *et al.*, 2008).

- **Détection des Coumarines**

Les coumarines ont été mises en évidence par la réaction du cycle lactonique. 2 ml de l'extrait végétal ont été mis dans un tube à essai. Ensuite, 3 ml de NaOH (10%) sont ajoutés. Après l'agitation du mélange, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence de coumarine (Diallo, 2000; Daira *et al.*, 2016).

- **Détection des Quinones libres**

Un volume de 2 ml de l'extrait est mis dans un tube à essai, puis y sont ajoutés quelques gouttes de NaOH à 1%. L'apparition d'une couleur jaune, rouge ou violette indique la présence des quinones libres (Dohou, 2004; Oloyede, 2005).

- **Détection des Protéines**

Les protéines ont été mises en évidence par la réaction du Biuret. 2 ml de l'extrait ont été mis dans un tube à essai, puis 1 ml de NaOH à 2 % y a été ajouté. Après homogénéisation, 2 à 3 gouttes d'une solution aqueuse de CuSO_4 ont été ajoutées au mélange. L'apparition d'une coloration violette, quelque fois avec une teinte rougeâtre, indique une réaction positive (Békroet *et al.*, 2007).

- **Détection des Tannins condensés**

Les tannins (tannins non hydrolysables ou condensés) sont des polymères de polyphénols. Ces derniers ont été mis en évidence par leur réaction avec chlorure de fer. À 2 ml d'extrait brut ont été additionnées quelques gouttes d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 2 %. L'apparition d'une coloration bleu-noir indique la présence des tannins condensés (Daira *et al.*, 2016).

- **Détection des sucres réducteurs**

Les sucres réducteurs ont été mis en évidence par le réactif de Fehling. Pour réaliser le test de Fehling, 5 ml d'extrait brut ont été additionnés à 5 ml de la liqueur de Fehling. Après

agitation pour homogénéiser le milieu et chauffage pendant 2-3 minutes au bain marie à 70°C, la formation d'un précipité rouge brique indique une réaction positive (**Békro et al., 2007**).

- **Détection des Stérols et Triterpènes**

Les Stérols et Triterpène ont été mis en évidence par l'ajout de 1 ml de CHCl_3 à 10 ml de l'extrait. La solution obtenue est partagée dans deux tubes à essais, puis 1 à 2 ml de H_2SO_4 concentré ont ajoutés à l'un des tubes, l'autre servira comme témoin. La formation d'un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact révèle leur présence (**Mamadou, 2012**).

- **Détection des Stéroïdes**

Dans un tube à essai, 5 ml d'anhydride acétique ont été mélangés avec 5 ml de l'extrait végétal. Ensuite, 0,5 ml de H_2SO_4 concentré y sont ajoutés. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (**Daira et al., 2016**).

4. Analyse quantitative

4.1 Dosage des polyphénols totaux (PPT) par colorimétrie (méthode de Folin Ciocalteu)

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé au sein du laboratoire pédagogique du centre universitaire Abdalhafide bouassouf (Mila).

La teneur en polyphénols totaux des extraits (hydro-méthanolique et de l'infusion) de *Hibiscus Sabdariffa* L., est déterminée par le dosage spectrophotométrie selon la méthode du Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**).

- **Principe**

L'ensemble des composée phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, est de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et phosphomolibdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$), il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}) (**Ribereau-Gayon et al., 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Ojeil et al., 2010**).

Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique.

4.1.1 Mode opératoire

- **Préparation de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 %**

7,5 grammes de Na_2CO_3 et sont dissouts dans 100 ml d'eau distillé.

- **Préparation de Folin- Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois**

1 ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10 ml avec l'eau distillée (9 ml).

- **Préparation de tube blanc**

Constitué de 5 ml FCR, de 3,75 ml Na_2CO_3 (7,5%) et 1 ml méthanol.

- **Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique**

La gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique à des concentrations variables de 0.05, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175 mg/ml. Les dilutions ont été préparées dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. C'est à dire 1 ml de chaque dilution sont transférés dans une tube avec 5 ml FCR et 3,75 ml de Na_2CO_3 (7,5%), le blanc est préparé en parallèle de la même manière remplaçant l'acide gallique par le solvant utilisé, après une incubation de 2 heures l'absorbance est mesurée à $\lambda=765$ nm par spectrophotomètre.

- **Préparation de l'extrait de plante**

Une masse de 1 mg d'extrait sec est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol. 1 ml de chaque extrait ont été pipetés dans un tube à essai, mélange avec 5 ml de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois dans l'eau distillée. Puis laisser 15 min avant d'ajouter 3,75 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5%), agit le mélange à l'aide d'un vortex.

Après une incubation du mélange réactionnel pendant 2 heures de temps à température ambiante et à l'obscurité, puis l'absorbance est mesurée à 765 nm par un spectrophotomètre UV-VIS (JENWAY 7305). Le blanc est préparé en parallèle de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (constitué de (FCR), de Na_2CO_3 (7,5%) et méthanol) (Singleton *et al.*, 1965 ; Muller *et al.*, 2010).

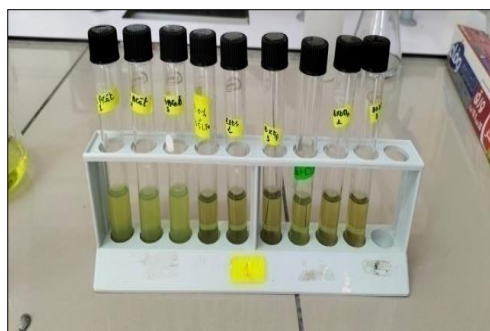


Figure 33: Matériel de dosage des polyphénols totaux (Photo personnelle, 2023).

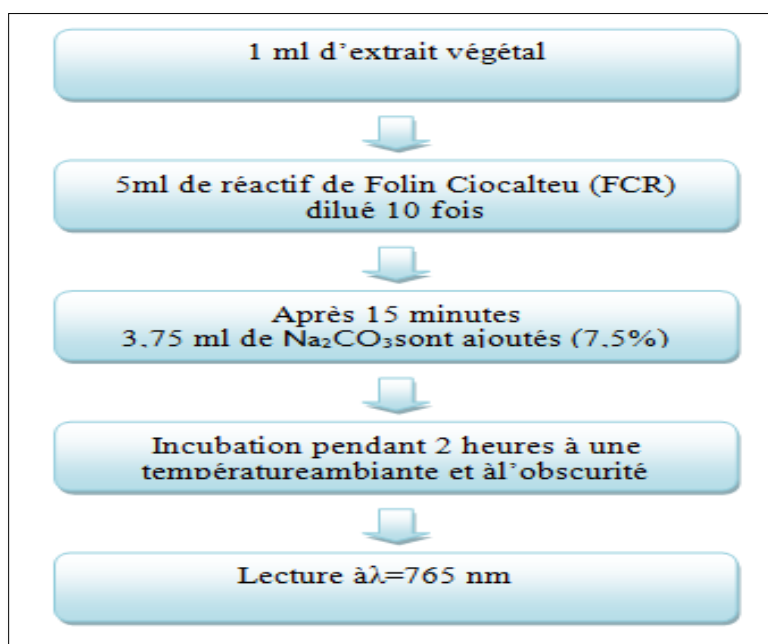


Figure 34: Protocole de dosage des polyphénols totaux.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif (Juntachote *et al.*, 2006).

- **Expression des résultats**

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (mg/ml) et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

5. Activités biologiques

5.1 Etude de l'activité anti-oxydante

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante, *in vitro* et *in vivo* des composés phénoliques purs ou d'extrait. Dans notre étude nous avons utilisé des tests chimiques qui mesurent la réduction du radical stable le DPPH (2,2-Diphényl1-picrylhydrazyl) (Sharma *et al.*, 2009; Bourkhiss *et al.*, 2010).

L'activité anti-oxydante des extraits de *Hibiscus sabdariffa* L. a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie de centre universitaire Abdalhafide Bouassouf (Mila).

- **Principe**

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à $\lambda = 517$ nm provoquée par la présence des extraits (Wu, 2007). Quand une solution de DPPH[•] est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydant, il y'a formation de la forme réduite (Figure 35). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à $\lambda = 517$ nm (Brand-Williams, 1995).

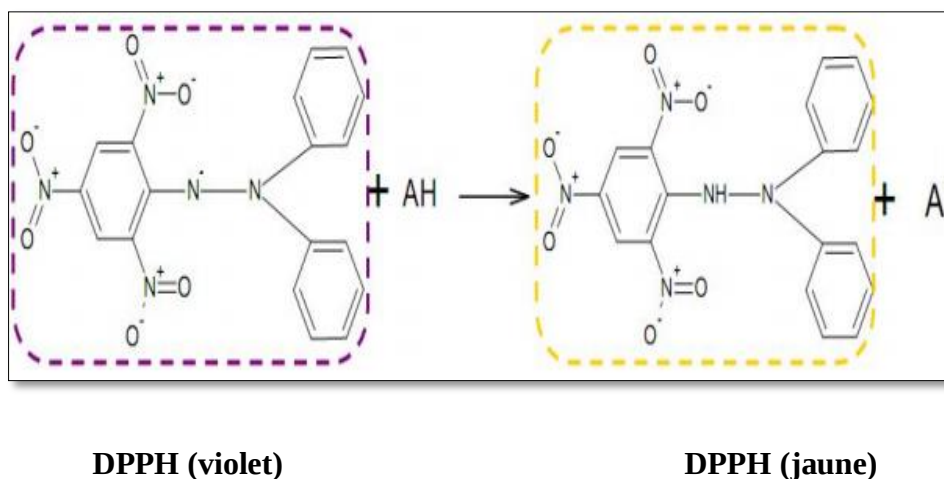


Figure 35: Structure chimique du radical DPPH[•] et de sa forme réduite.

- **Préparation de DPPH**

0.004g de DPPH (C₁₈H₁₂ N₅ O₆; M = 394.33 g/mol), est solubilisé dans 100 ml de MeOH pour avoir la concentration de 0.1 mmol/l.



Figure 36: préparation de DPPH (Photo personnelle, 2023).

- **Préparation des solutions mères de concentration 5 mg/ml**

On mélange 50 mg de chaque extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L. avec 10 ml de MeOH absolu dans un tube à essai.

5.1.1 Mode opératoire

La mesure de l'activité anti-radicalaire des extraits hydro-méthanolique et de l'infusion a été effectuée par le test de 2, 2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) en suivant la méthode décrite par (Govindarajan, *et al* 2003) avec quelques modifications (Figure 37).

Un volume de 1.5 ml de la solution DPPH (4%) est ajouté à 0.5 ml d'une série de concentrations déférentes (5, 3, 2, 1 mg/ml) des extraits testés.

Après homogénéisation, le mélange est incubé à la température ambiante (25 °C) et à l'abri de la lumière. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 517 nm contre un blanc qui ne contient que 0.5 ml de méthanol et 1.5 ml de la solution DPPH.

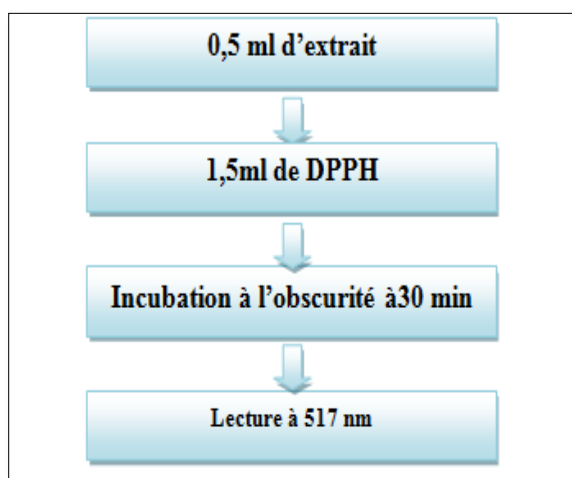


Figure 37: Schéma représentatif du protocole expérimental de l'activité antioxydante .

La valeur IC₅₀ ou concentration d'inhibition 50 est la concentration du substrat qui assure la réduction de 50% de l'activité du DPPH déterminée graphiquement par une régression linéaire.

La détermination de la capacité réduire le radicale DPPH de chaque extrait de la plante pour réaliser l'activité antioxydant s'exprimée en pourcentage d'inhibition.

L'IC₅₀ est inversement proportionnel à la capacité antioxydant d'un composé, parce qu'il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est faible (valeur élevée de pourcentages d'inhibition), plus l'activité antioxydant d'un composé est forte (**Alain et al., 2011**).

Le pouvoir d'inhibition est exprimé en % et déterminé en appliquant la formule suivante :

$$I\% = ((\text{blanc} - \text{extrait}) / \text{blanc}) \times 100$$

- ❖ **I %**: pourcentage d'inhibition.
- ❖ **Extrait**: la densité optique du DPPH en présence de l'extrait à tester.
- ❖ **Blanc**: la densité optique de DPPH dans la solution méthanolique.

5.2 Etude de l'activité antibactérienne

Les tests d'évaluation de l'activité antimicrobienne sont réalisés au niveau du laboratoire d'analyses médicales Mirouh Ferdjiwa Mila, laboratoire bactériologie du CRBt (Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine), laboratoires de biologie de centre universitaire Abdalhafide bouassouf (Mila).

Ce test nécessite un travail dans des conditions d'asepsie rigoureuses afin d'éviter les problèmes de contamination. En outre, le matériel, les solutions et les milieux de cultures doivent être stérilisés par autoclavage.

5.2.1 Microorganismes testées

Quatre souches bactériennes de références ont été testé: *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aereuginasa* et *Bacillus Subtilis*.

Tableau 7: Caractéristiques générales des bactéries testées.

Nom de la souche	Gram	Famille	Référence
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	Enterobacteriaceae	ATCC25922
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Positif	Micrococcaceae	ATCC19111
<i>Bacillus Subtilis</i>	Positif	Bacillaceae	ATCC6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	pseudomonadaceae	ATCC27853

- **Principe**

L'activité antibactérienne des extraits est déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé standardisée (antibiogramme) (**Treki et al., 2009**). Cette technique repose sur l'apparition d'une zone d'inhibition dans le milieu de culture. Le test a porté sur deux extraits de la plante d'*Hibiscus sabdariffa* L. préparés précédemment et s'est déroulé selon les étapes suivantes:

A. Préparation des milieux

- **Préparation de milieu MH**

La gélose Mueller-Hinton a été préparé pour le but du repiquage des souches bactériennes et d'évaluation de l'activité antibactérienne. On introduit 38g de MH avec 1 L d'eau distillée, le mélange obtenu est semé à une agitation continue, à une température élevée sur une plaque chauffante jusqu'à le bouillage, puis le milieu sera divisé dans des flacons en verre puis stériliser par autoclave à une pression de 15 lb (121 °C) pendant 15 min, après l'autoclave, laisser refroidir à 45-50 °C (**Bauer et al., 1966**).



Figure 38: Préparation de milieu MH (Mueller Hinton) (Photo personnelle, 2023).

- **Préparation de l'eau physiologique**

L'eau physiologique est préparée pour l'ensemencement des souches. Elle est réalisée par solubilisation de 0.9 g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée avec agitation pendant quelques minutes et divisée dans des tubes en verre à vesse (**Bauer *et al.*, 1966**).

- **Préparation des disques d'aromatogramme**

Les disques sont fabriqués à partir de papier Wattman n° 3 avec un diamètre de 6 mm par l'emporte-pièce. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante jusqu'à l'utilisation.

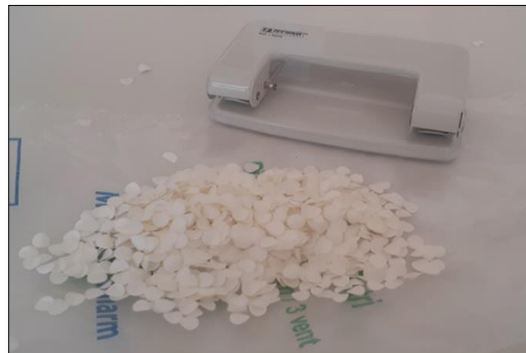


Figure 39: Préparation des disques d'aromatogramme (Photo personnelle, 2023).

B. Repiquage des souches bactériennes

Afin d'obtenir une culture jeune, et des colonies isolées les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries sur gélose nutritive en boîte de pétri. A l'aide d'une anse de platine stérile, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 h, qui ont servi à préparer l'inoculum bactérien.

C. Dilution d'extraits

Les extraits ont été repris avec le Dimethylsulfoxyde (DMSO) (le solvant préférable pour la majorité des auteurs, qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antimicrobien puissant).

On prépare une concentration de (200 mg/ml), pour chaque extraits utilisés (hydro-méthanolique, de l'infusion).

Les dilutions des extraits sont réalisées à analyses selon les méthodes suivantes:

- ❖ **SM:** 200 mg d'extrait avec 1 ml de DMSO [100%].
- ❖ **T^{1/2}:** 0,5 ml d'extrait de SM avec 0.5 ml de DMSO [50%].
- ❖ **T^{1/4}:** 0.5 ml d'extrait de T^{1/2} avec 0.5 ml de DMSO [25%].
- ❖ **T^{1/8}:** 0.5 ml d'extrait de T^{1/4} avec 0.5 ml de DMSO [12.5%].

D. Préparation de l'inoculum bactérien

- ❖ Après la stérilisation de zone de travail avec l'eau de javel.
- ❖ A l'aide d'une anse de platine, quelques colonies bien isolées et identiques de chaque souche bactérienne à tester sont alors raclées, déchargées dans un tube contenant 3 ml de l'eau physiologique stérile à 0.9% puis homogénéisées à l'aide d'un vortex.
- ❖ Nous avons fait la lecture de la suspension bactérienne à une densité optique de (0.08 à 0.10), à la longueur d'onde $\lambda = 625$ nm.
- ❖ L'ensemencement doit se faire au moins en quelques minutes qui suivent la préparation de l'inoculum (**Figure 40**).

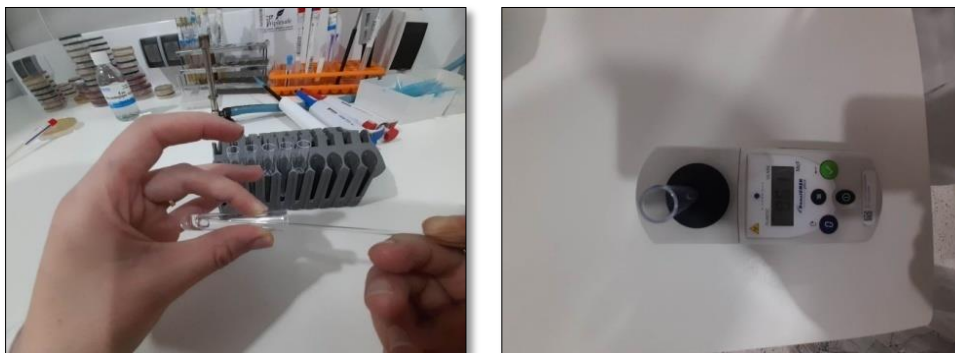


Figure 40: Préparation de l'inoculum bactérien (Photos personnelle, 2023).

E. Coulage de milieux de culture MH

On verse le milieu de culture (MH) stérilisé par l'autoclave dans des boîtes de pétrie à 4 mm de hauteur près du bec benzène pour assurer une stérilisation parfaite jusqu'à la solidification (**Figure 41**).



Figure 41: Coulage de milieux de culture MH (Photo personnelle, 2023).

F. Ensemencement bactérienne

Après la préparation et l'identification des boîtes de pétri nous avons fait l'ensemencement des bactéries dans un milieu stérile en présence de bec benzène. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes de pétri.

- ❖ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne;
- ❖ L'essorer en le pressant fermement, sur la paroi interne du tube, en le tournant, afin de le décharger au maximum;
- ❖ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées;
- ❖ Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de Pétrie de 60° à chaque fois. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose;
- ❖ Recharger l'écouvillon à chaque fois dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche (**Figure 42**) (**Bendahou et al., 2007**).

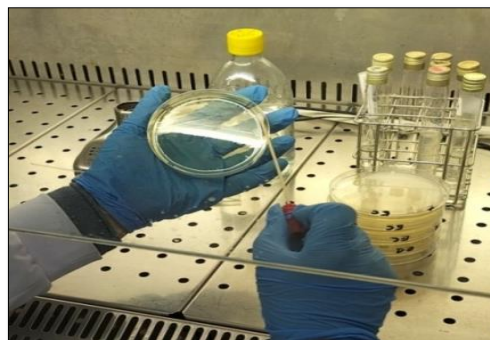


Figure 42: Ensemencement bactérienne (Photo personnelle, 2023).

G. Dépôts des disques et l'injection des extraits

- ❖ À l'aide d'une pince stérilisée au bec benzène les disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre sont placés délicatement sur la surface de la gélose MHensemencées par les souches testées (**Figure 43**);
- ❖ On a ajouté 10 µl de chaque dilution des extraits hydro-méthanoliques et extraits de l'infusion (SM / T $\frac{1}{2}$ / T $\frac{1}{4}$ / T $\frac{1}{8}$) sur les disques à l'aide d'une micro pipette (**Figure 43**);
- ❖ On réalise deux témoins: négatif (présence de DMSO), positif (un disque d'antibiotique (15µg) (céfotaxime, gentamicine);
- ❖ Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24 heures à 37°C.



Figure 43: Dépôts des disques et l'injection des extraits (**Photos personnelle, 2023**).

H. Lecture des antibiogrammes

Après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (**Choi et al., 2006**).

I. Expression des résultats

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, par les différentes concentrations de l'extrait autour des disques, la mesure est réalisée au verso des boîtes de Pétri.

5.3 Etude de L'activité antifongique

Cette étape du travail a été réalisée au niveau du laboratoire de Mycologie du CRBt (Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine).

5.3.1 Matériel fongique

Il s'agit de La souche fongique « *Fusarium oxysporum* » les souches de *lycopersici*, qui est la plus répandue dans le monde, il peut être retrouvée dans la plupart des sols, immobile (**Kommedahl et al., 1988**). Il peut également être dispersé par les insectes. Il responsable des maladies connues sous le terme de fusarioses telles que le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet (**Lepoivre, 2003**), mise à notre disposition par le laboratoire de mycologie du CRBt de Constantine.

- **Principe**

L'activité antifongique des extraits de l'*Hibiscus sabdariffa* L. ont été déterminées par la méthodes directe sur le milieu gélosé PDA pour déterminerles taux d'inhibition, en copmarant leur action à divers concentration sur la croissance de mycélienne (**Hussin et al., 2009**).

5.3.2 Mode opératoire

A. Préparation du milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar)

Le milieu de culture PDA est favorable pour la croissance des champignons phyto-pathogènes, ce milieu a été préparé à base de pomme de terre suivant les étapes suivantes:

- ❖ Sur une plaque chauffante en fait bouillir 220 grammes de la pomme de terre dans 800 ml d'eau distillée à 400 C° pendant 30 min. Une filtration est faite pour enlever la pomme de terre et récupérer l'eau;

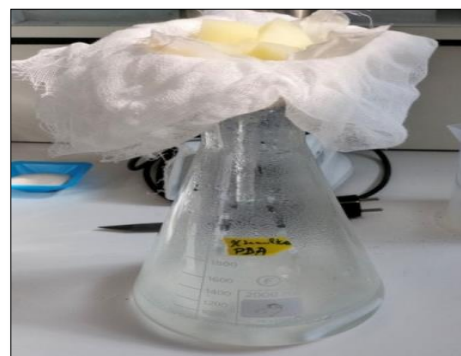
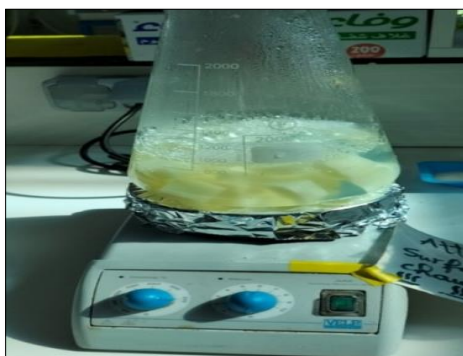


Figure 44: Préparation du milieu de culture (**Photos personnelle, 2023**).

- ❖ Dans un bécher on a ajouté 22 g de glucose sur l'eau de pommes de terre avec agitation;

- ❖ 16,5g d'agar sont ajoutées au mélange en petites quantités pour éviter la solidification en gardant l'agitation;
- ❖ On a ajusté avec la chaleur pour éviter les grumeaux et remplir avec le reste de 300 ml d'eau distillée et bien mélanger le tout;

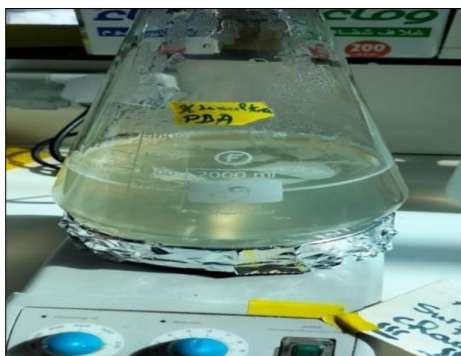


Figure 45: Le milieu de culture PDA (Photo personnelle, 2023).

- ❖ On a versé 100 ml de la solution obtenue dans des Erlenmeyer et mise dans l'autoclave à 121 C° pendant 2 heures à une pression de 1,2 bar pour la stérilisation;
- ❖ On a laissé refroidir jusqu'à 55 C° pour éviter la condensation de vapeur;
- ❖ On obtient donc 11 Erlenmeyers remplis de 100 ml de milieu de culture préparé est prêt pour être utilisé.



Figure 46: Le milieu de culture après stérilisation (Photo personnelle, 2023).

B. Préparation des extraits :

2 mg de chaque extrait (hydro-méthanolique, de l'infusion) sont mélangés avec 2 ml de DMSO (Diméthylsulfoxyde) dans des tubes eppendorf et homogénéisés à l'aide du vortex.

Tableau 8: Préparation des extraits .

Dilution	Concentration
1 ml d'extrait	100 mg/ml
0,5 ml d'extrait + 0,5 ml DMSO	50 mg/ml
0,25 ml d'extrait + 0,75 ml DMSO	25 mg/ml

C. Ajout des extraits végétaux

Un volume de 2 ml de solution de DMSO contenant 0,25; 0,5; 01 mg de l'extrait a été ajouté à 100 ml de milieu PDA à 60 C°, préalablement stérilisé puis réparti dans 4 boîtes de Pétri.

2 ml de DMSO a été ajouté à 100 ml de milieu PDA et a été considéré comme un contrôle positif. Le contrôle négatif contient le support PDA sans aucun autre produit (**Song et al., 2004**).

On a laissé refroidir le milieu de culture mélangé à l'extrait dans les boîtes pétries jusqu'au où il devient solide.



Figure 47: L'addition de l'extrait au PDA et coulage dans les boîtes de pétri (**Photo personnelle, 2023**).

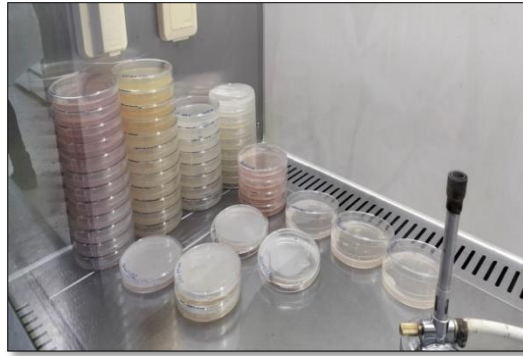


Figure 48: Solidification du milieu de culture mélangé à l'extrait sous la haute (Photo personnelle, 2023).

D. Culture de la souche fongique

- ❖ Un disque de 5 mm de diamètre provient d'une jeune culture fongique et est déposé de manière aseptique au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA et le complexe à tester (extrait hydro-méthanolique et extrait de l'infusion), L'expérience est répliquée 4 fois pour chaque traitement avec des concentrations de 100mg/ml, 50mg/ml, 25mg/ml;



Figure 49: Dépôt des disques de champignon (Photo personnelle, 2023).

- ❖ On a obtenu à la fin 44 boîtes de pétri fermer et protéger avec du papier film et mis dans l'étuve. Les boîtes ont été incubées 7 jours à 28 °C.



Figure 50: L'incubation des boîtes (Photo personnelle, 2023).

E. Lecture des résultats

La croissance mycélienne de l'agent phytopathogène est mesurée à l'échelle millimétrique à l'aide d'une règle. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance de chaque champignon pour chaque complexe, par rapport au diamètre moyen des colonies de chaque milieu cultivé sans contrôle. Ainsi, l'activité d'inhibition a été exprimée en pourcentage et a été calculée selon la formule suivante:

$$I\% = (C - T / T) \times 100$$

- ❖ **I%**: temps d'inhibition en pourcentage%
- ❖ **T**: croissance radicale de l'agent phytopathogène en mm sur milieu PDA contenant le complexe à tester.
- ❖ **C**: croissance radicale De l'agent phytopathogène en mm sur milieu PDA (témoin) (**Dennis et al., 1971**).

5.4 Etude de l'activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des extraits de la plante *Hibiscus sabdariffa* L. est réalisée au sein du laboratoire d'analyses médicales MIROUH Ferdjioua Mila.

Cette activité a été évaluée *in vitro* vis-à-vis les deux voies de coagulation, en l'occurrence, la voie endogène et la voie exogène sur un pool des plasmas normaux déplaquetté et à l'aide de deux tests globaux et chronométrique, le temps du céphaline kaolin (TCK) et le temps de Quick (TQ) (Taux de Prothrombine (TP)) (**Boukeria et al., 2019**).

- **Préparation du plasma pool déplaquettés**

Le pool plasmatique est un mélange de plasma déplaquettés des volontaires sains, adultes et non traités, dont les TCK et TP sont normaux et comparables.

Par ponction veineuse le sang de dix volontaires a été prélevé dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium (3.2 %), et à raison de 1 volume pour 3 volumes du sang. La centrifugation du sang est ensuite faite pendant 10 min à 2500 rpm pour obtenir un plasma dépourvu en plaquettes (**Bourahima et al., 2021**).

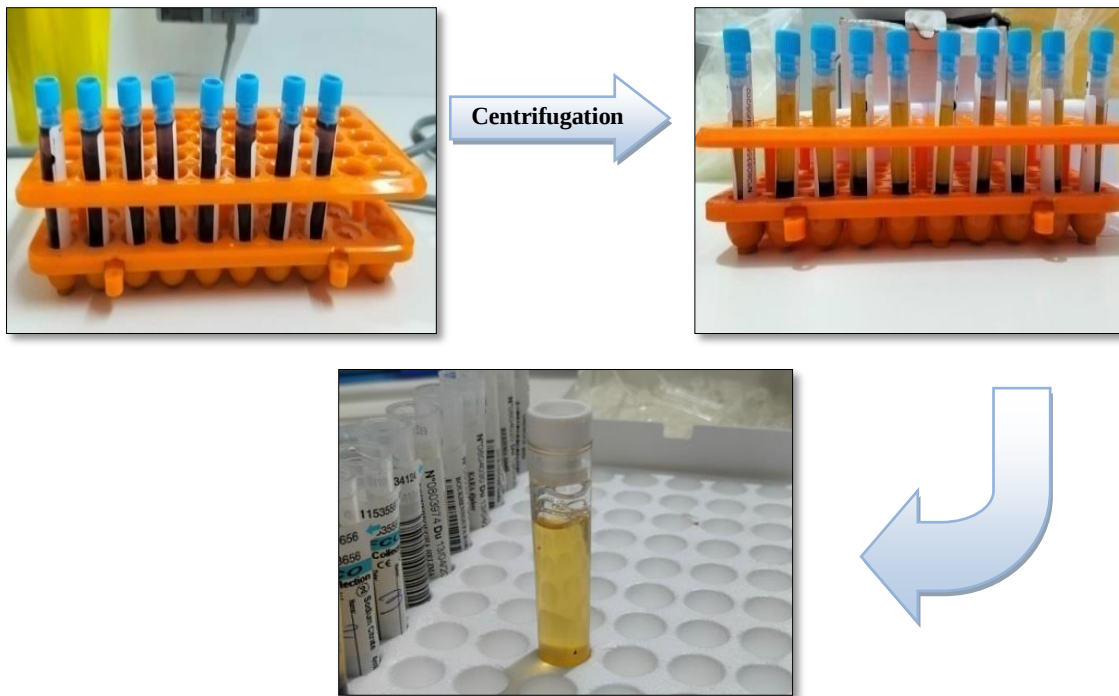


Figure 51: préparation d'un pool de plasma (Photo personnelle, 2023).

5.4.1 Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène(TQ)

- **Principe**

L'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation a été évaluée en utilisant un test de coagulation appelé le temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP) qui permet d'une exploration globale des facteurs de la voie exogène de la coagulation (La proconvertine VII, la prothrombine II, la proaccélélerine V, le facteur stuart X, et aussi le fibrinogène) (Caquet, 2004).

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37C° d'un plasma pauvre en plaquettes en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine) et de calcium. Les facteurs de la voie exogène donc sont activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré (Athukorala *et al.*, 2007).

Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'échantillon exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation (Athukorala *et al.*, 2007).

- **Mode opératoire**

Après la préparation du pool plasmatique déplaqué, L'effet des extraits sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon le protocole décrit par Athukorala et ses collaborateurs (2007), en utilisant le test de TP qui consiste à mesurer le temps de coagulation à 37°C d'un plasma déplaqué en présence de facteur tissulaire thromboplastine (Bourahima *et al.*, 2021).

5 µl de l'extrait préparé à différentes concentrations (10, 25, 50 et 100 mg/ml) est additionné à 45µl du plasma standard, Les mélanges sont centrifugés pendant 10 minutes puis sont incubés à 37°C durant 15 minutes. Après l'incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 100 µl de thromboplastine pré incubé à 37°C pendant 1 min (déclenchement du chronomètre), et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot fibrineux est calculé (arrêt du chronomètre).

Un standard (plasma normale) et un control négatif (DMSO) ont été réalisées pour comparer les résultats obtenus.

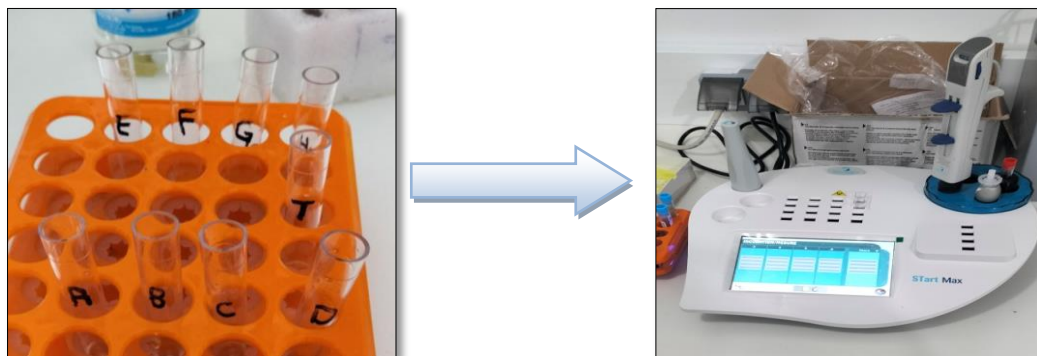


Figure 52: Matériel préparé pour l'évaluation de TQ (Photo personnelle, 2023).

5.4.2 Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène

- **Principe**

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été réalisée en utilisant le test du temps de céphaline-Kaolin (TCK), un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs plasmatiques de la voie endogène (intrinsèque) de la coagulation (Caquet, 2004).

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 C° d'un plasma déplaqué et citraté mis en présence de phospholipides (la céphaline) substitut du facteur 3 plaquettaire

(F3P) d'un activateur du système contact (Prékalikriène, Kininogène de haut poids moléculaire et le facteur XII) qui est généralement le Kaolin et de calcium comme un facteur déclenchant.

- **Mode opératoire**

5 µl de l'extrait préparé à différentes concentrations (10, 25, 50 et 100 mg/ml) est additionné à 45 µl du plasma standard, Les mélanges sont centrifugés pendant 10 minutes puis sont incubés à 37°C durant 15 minutes, 50 µl de solution de TCK préalablement incubé a été additionné, puis le mélange a été réincubé pendant 3 min sous agitation à 37°C. Le temps de la coagulation est alors déclenché par l'ajout de 50 µl de chlorure de calcium(CaCl_2) préchauffé (0.025 M), et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation d'un caillot est mesuré par la coagulomètre.

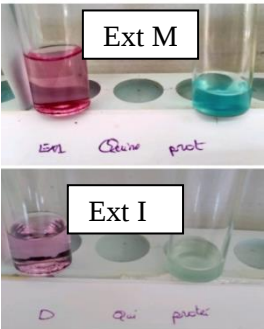
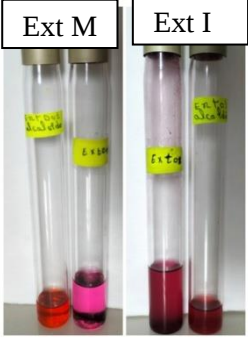
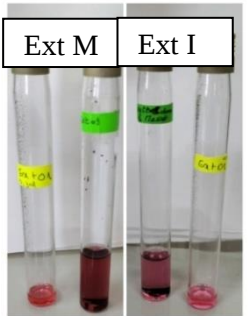
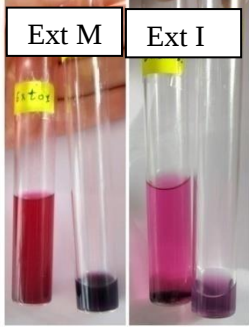
CHAPITRE II:

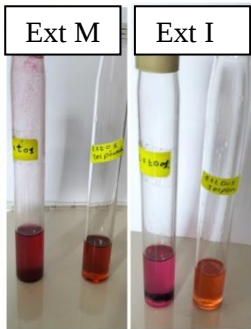
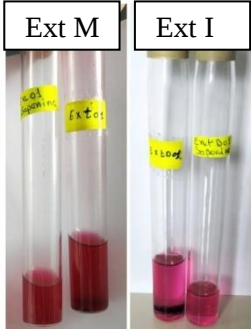
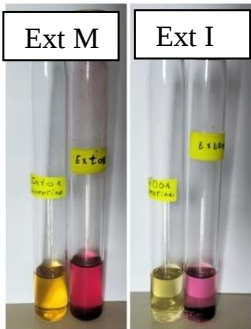
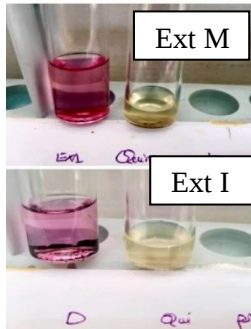
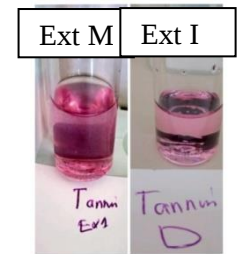
Résultat et discussion

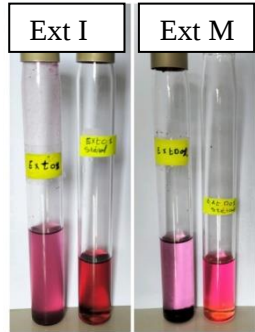
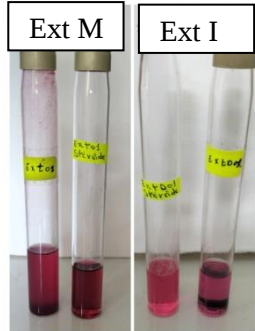
1. Screening phytochimique

Les tests de caractérisation phytochimique, effectués sur les deux extraits de l'*Hibiscus sabdariffa* L. sont présentés dans le tableau ci-dessous:

Tableau 9: Résultats de screening phytochimique.

Test phytochimique	Résultat	Description des résultat	Photo
Protéines	-	L'absence d'une teinte rougeâtre indique l'absence des protéines	
Alcaloïdes	++	Formation d'un précipité rouge -orangé, ce qui confirme l'existence des alcaloïdes dans cette plante	
Flavonoïdes	+++	La coloration rouge obtenue, confirme l'existence des flavonoïdes dans cette plante	
Substances phénoliques	+++	La coloration bleue noirâtre obtenue, confirme l'existence des substances phénoliques dans cette plante	

Terpénoïdes	+++	La coloration brun-rouge obtenue, confirme l'existence des terpénoïdes dans cette plante	
Saponines	-	L'absence d'une mousse persistante indique l'absence des saponines	
Coumarine	+++	La coloration jaune obtenue, indique la présence des coumarines dans nos extraits	
Quinones libres	+++	La coloration jaune obtenue, indique la présence des quinones	
Tanins condensés	-	L'absence d'une coloration bleu-noir indique l'absence des tanins	

Sucres réducteurs	+++	Formation d'un précipité rouge-brique, ce qui confirme l'existence des sucres dans nos extraits	
Stérols et Tri terpènes	+++	Le test positif des stérols et tri terpènes nous a montré leur présence dans nos extraits par l'apparition d'un anneau rouge-brunâtre	
Stéroïdes	++	L'apparition d'une coloration violette claire, vire au marron, indique la présence des stéroïdes dans nos extraits	

(-): test négatif, (+): test faiblement positif, (++) : test positif, (+++): test fortement positif

1.1 Discussion des résultats

Les résultats de l'analyse phytochimique effectuée sur les deux extraits: de l'infusion et hydro-méthanolique de l'*Hibiscus sabdariffa* L. ont montré la présence de plusieurs composés bioactifs: les alcaloïdes, les flavonoïdes, les substances phénoliques, les coumarines, les quinones libres, les sucres, les stérols, les terpénoïdes et les stéroïdes. Ces résultats sont similaires avec les résultats de (Raihan Sarkar *et al.*, 2012; Adamu et Ngwu., 2015; Maffo Tazoho *et al.*, 2016; Mohamed et al., 2016; Bedi *et al.*, 2020; Hermawan *et al.*, 2020; Samaké *et al.*, 2020) et de (Tuhami et Ibrahim., 2020). Par contre les tannins, les saponines et les protéines sont absents dans les deux extraits de notre plante ce qui corrobore aux résultats de (Olaleye, 2007 ; MaffoTazoho *et al.*, 2016; kaboré *et al.*, 2021; MaffoTazoho *et al.*, 2016) et de (Shafirany *et al.*, 2021).

2. Rendement des extractions

La préparation de nos extraits bruts a été effectuée par deux méthodes d'extraction : extraction à froid ou macération par une solution hydro-méthanolique (Méthanol: Eau) (80%) et extraction par infusion dans l'eau distillée bouillante.

Le rendement de ces extraits (hydro-méthanolique et de l'infusion) a été déterminé par rapport à la poudre sèche initiale. Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 54** et le **tableau 10**.

Tableau 10: rendement des extraits de l'*Hibiscus sabdariffa* L.

Extrait	Rendement (%)
Hydro-méthanolique	32,56
Infusion	36

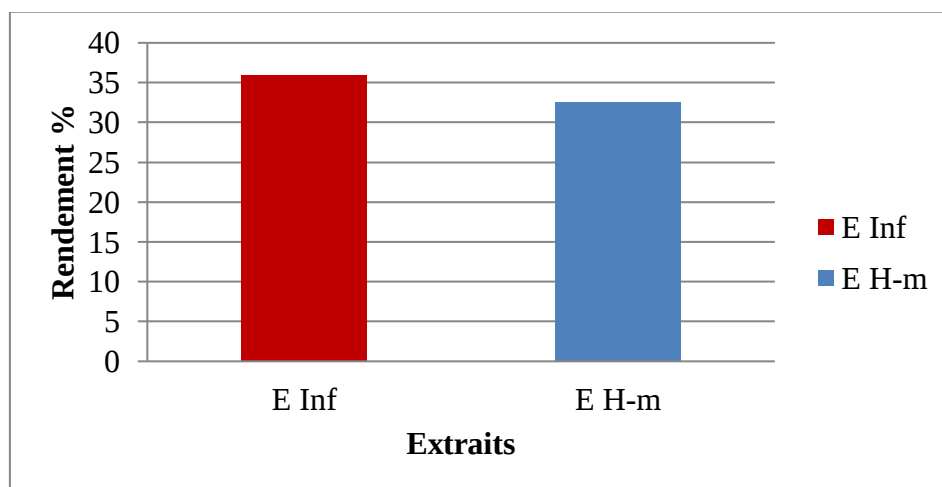


Figure 53: Rendement des extraits de l'*Hibiscus sabdariffa* L.

2.1 Discussion

Dans cette étude, nous avons constaté une convergence entre les teneurs enregistrées par les deux méthodes d'extraction (infusion 36% et macération hydro-méthanolique 32.56 %.) (**Figure 53 et tableau 10**). Cette affinité des résultats peut être attribuée à la polarité des deux solvants utilisée, car l'eau et le méthanol ont des indices de polarité élevés et proches l'un de l'autre (**Dhanani et al., 2017**).

3. Taux des polyphénols totaux

La détermination des teneurs en phénols totaux dans l'extrait hydro-méthanolique et l'extrait de l'infusion de l'*Hibiscus sabdariffa* L. a été faite en utilisant la méthode colorimétriques (Folin-Ciocalteux) (**Figure 54**). Cette teneur a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (standard), Les valeurs obtenues sont rapportées en milligrammes équivalents acide gallique par gramme de l'extrait sec (mg EAG/g Extrait sec) (**Wong et al., 2006**).

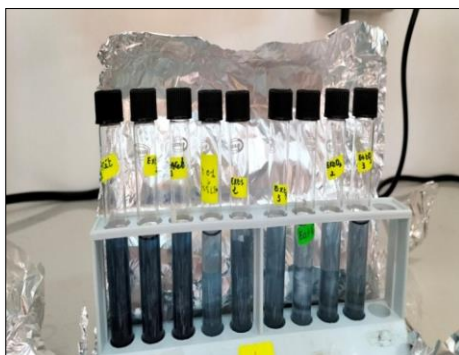


Figure 54: Résultat de dosage des polyphénols (**Photo personnelle, 2023**).

Les analyses quantitatives des phénols totaux, ont été déterminées à partir de la formule de la régression linéaire de cette courbe ($Y = 13.91X + 0.021$) avec un coefficient de corrélation ($R^2 = 0.996$) (prévenant la fiabilité de cette courbe dans la détermination des polyphénols).

Avec

- ❖ **Y:** Valeur d'absorbance.
- ❖ **X:** Concentration d'étalon en mg/ml.
- ❖ **R²:** Coefficient de corrélation.

La mesure de l'absorbance des extraits hydro-méthanolique, et de l'infusion de l'*Hibiscus sabdariffa* L. dissous dans le méthanol a été effectuée à une longueur d'onde $\lambda_{\max} = 765$ nm.

Tableau 11: valeur de (DO) de l'acide galique

Concentration (mg/ml)	0,025	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15	0,175	0,2
Absorbance	0,395	0,705	1,0611	1,423	1,724	2,145	2,354	2,884

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure suivante.

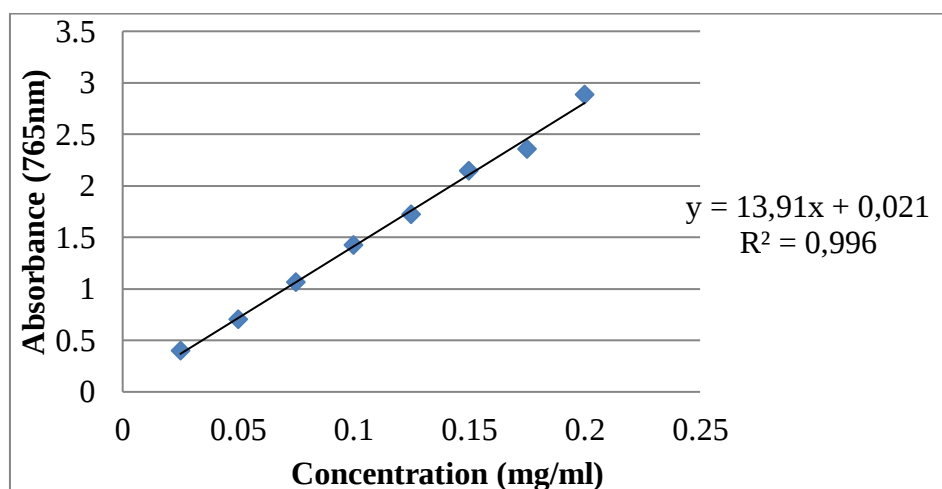


Figure 55: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour l'évaluation des teneurs en polyphénols.

La valeur de la densité optique (DO) mesurée de chaque échantillon de l'*Hibiscus sabdariffa* L. est mentionnée dans le tableau suivant:

Tableau 12: valeur de (DO) de chaque extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Extrait	DO
Hydro-méthanolique	0,542
infusion	0,503

La quantité des composés polyphénolique indiquée dans le tableau est calculée en mg EAG/mg selon la relation suivante, puis transformée en mg EAG/gE:

$$Y = 13.91X + 0.021$$

Tableau 13: La quantité des PPT de chaque extrait de l'*Hibiscus sabdariffa* L.

Extrait	Teneur mg/g
Hydro-méthanolique	37,45
infusion	34,65

L'ensemble des résultats obtenues sont présentées dans la figure ci-dessous (**figure 56**):

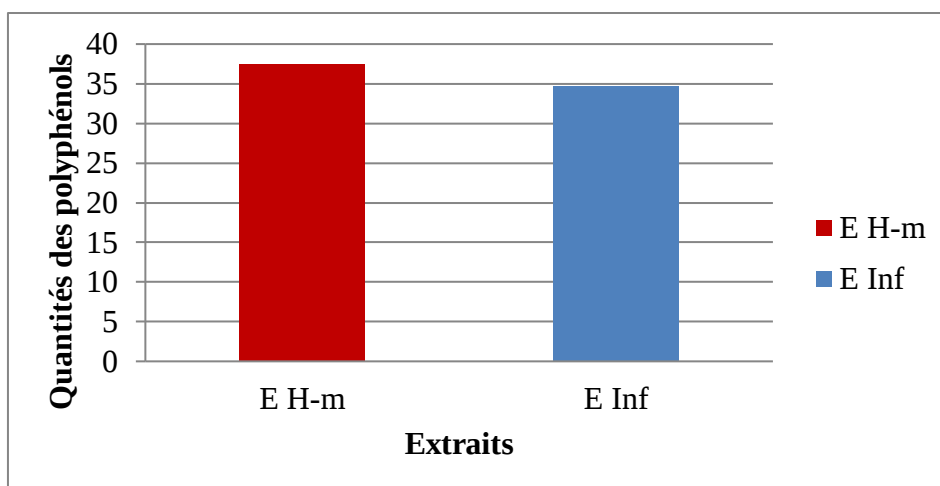


Figure 56: Teneurs en polyphénols totaux des extraits étudiés.

3.1 Discussion

Si on compare maintenant les teneurs enregistrées pour ces deux méthodes d'extraction, les résultats, montrent des convergences importantes dans les deux méthodes: infusion (34,65mg EAG/g) et macération hydro-méthanolique (37,45 mg EAG/g), ce qui confirme que la solubilité des composés phénoliques est régie par la nature de solvant utilisé (polarité). Car le type de solvant d'extraction doit avoir une grande capacité d'extraction de biomolécules de la plante. Plusieurs auteurs ont montré que le méthanol et l'eau sont parmi les meilleurs solvants pour l'extraction polyphénolique (**Zlotek et al., 2016**).

Les teneurs en phénols totaux trouvées par (**Hamrita et al., 2022**) dans leur étude sur les extraits hydro-méthanolique et de l'infusion sont nettement inférieures à nos résultats (19.58 mg EAG/g), (22.71 mg EAG/g) respectivement.

Par contre et d'après (**Chinedu et al., 2011**) l'extrait hydro-méthanolique et de l'infusion de l'*Hibiscus sabdariffa* L. possèdent des teneurs en phénols totaux proches en comparant à celles de nos résultats avec une valeur de (36.7 mg EAG/g), et (33.3 mg EAG/g) respectivement.

La variabilité des teneurs en polyphénols est due probablement à la composition phénolique des extraits (**Hayouni et al., 2007**), aux facteurs génotypiques (**El-Waziry, 2007**), les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques) (**Ksouri et al., 2008**), la nature du sol et le type du microclimat (**Atmani et al., 2009**) et aussi des étages bioclimatiques où poussent ces plantes.

4. Activité antiradicalaire par le test DPPH

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits obtenus, différentes méthodes chimiques sont utilisées, parmi eux: le test de DPPH (2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle). Le principe de cette dernière repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques (**Figure 57**).

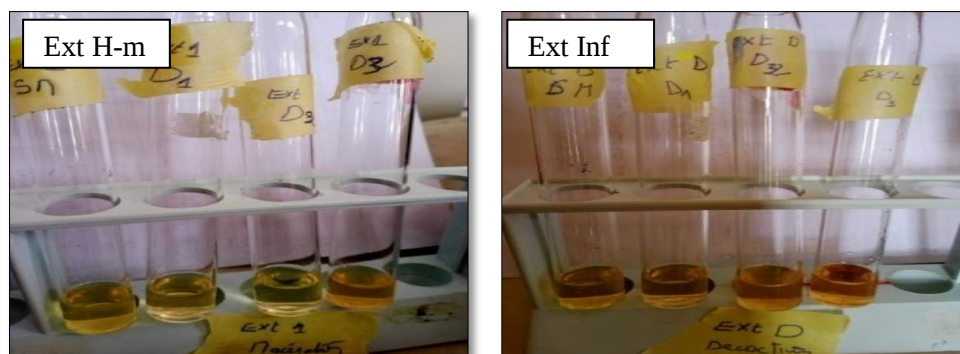


Figure 57: Résultats de l'activité antioxydante des deux extraits (**Photo personnelle, 2023**).

La capacité de piégeage du radical libre est calculée à travers le pourcentage d'inhibition:

$$PI\% = \frac{\text{Densité optique de blanc} - \text{Densité optique de l'extrait}}{\text{Densité optique de blanc}} \times 100$$

- ❖ **Abs:** Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.
- ❖ **Abs contrôle:** Absorbance de la solution DPPH.
- ❖ **Abs test:** Absorbance de produit.

En utilisant les valeurs obtenues de l'extrait hydro-méthanolique de *Hibiscus sabdariffa* L., nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule indiquée dans le chapitre précédent, les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 14**.

Tableau 14: Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait hydro-méthanolique d'extrait hydro-méthanolique.

Extrait hydro-méthanolique				
Concentration (mg/ml)	1	2	3	5
PI %	36,6	57,83	73,22	87,92

- Détermination de la valeur CI₅₀

Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer la courbe qui représente les variations de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait hydro-méthanolique, la détermination graphique d'IC₅₀ se fait à partir de la courbe.

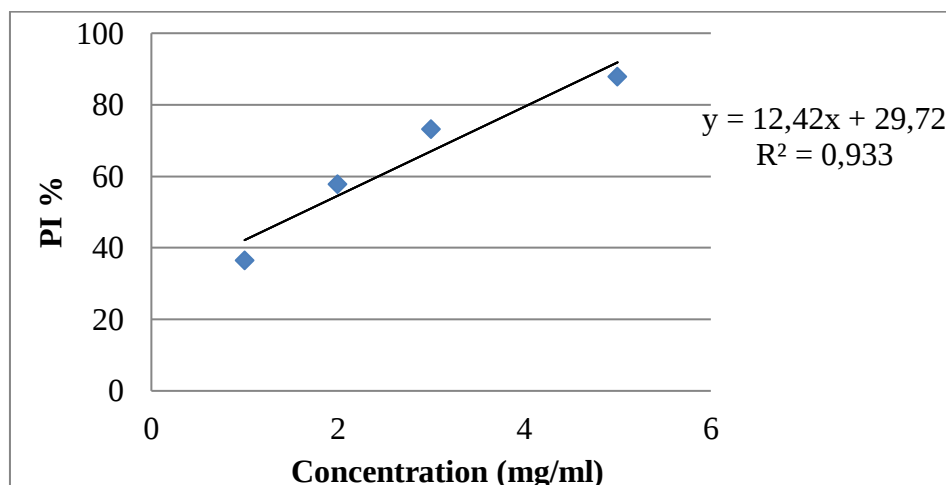


Figure 58: Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'extrait hydro-méthanolique.

La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés.

CI₅₀ de l'extrait de l'infusion calculée selon l'équation suivante:

$$Y = 12.423X + 29.729$$

Pour Y= 50%

$$X = (50 - 29.729) / 12.423 = 1.63 \text{ mg/ml}$$

$$\text{IC}_{50} = 1.63 \text{ mg/ml}$$

En utilisant les valeurs obtenues de l'extrait de l'infusion de *Hibiscus sabdariffa* L., nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule indiquée dans le chapitre précédent, les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 15**.

Tableau 15: Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait de l'infusion.

Extrait de l'infusion				
Concentration (mg/ ml)	1	2	3	5
PI %	36,09	53,77	64,86	82,32

- **Détermination de la valeur CI_{50}**

La détermination de la CI_{50} se fait à partir de la courbe ci-dessous (**figure59**).

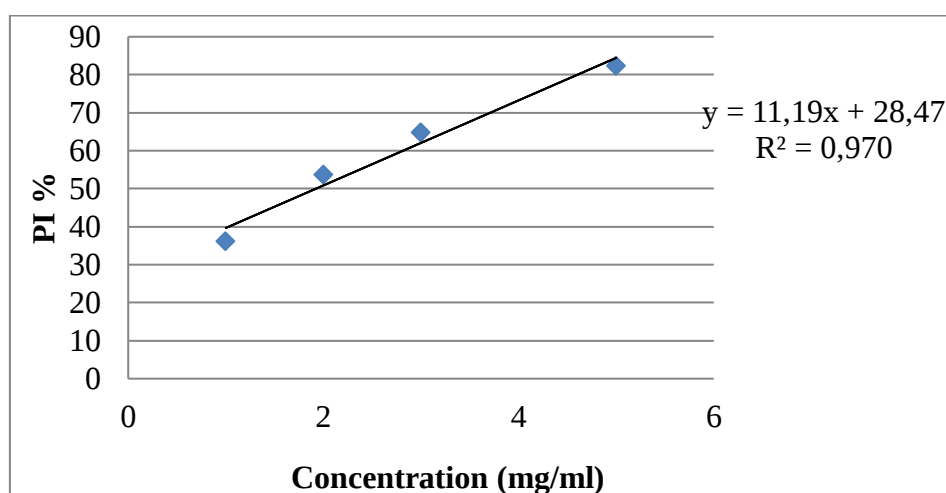


Figure 59: Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration de l'extrait de l'infusion.

La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés

CI_{50} de l'extrait de l'infusion calculée selon l'équation suivante:

$$Y = 11.194X + 28.476$$

Pour $Y = 50\%$

$$X = (50 - 28.476) / 11.194 = 1.92 \text{ mg/ml.}$$

$$IC_{50} = 1.92 \text{ mg/ml}$$

4.1 Discussion

L'évaluation de l'activité anti radicalaire des extraits d'*Hibiscus sabdariffa* L. a été réalisée par la technique du piégeage du radical libre DPPH.

D'après les résultats précédents, nous pouvons noter que les extraits issus des deux méthodes d'extraction (macération et infusion) ont dévoilé des activités antiradicalaires nettement convergente avec des valeurs d'IC₅₀ varient entre 1.63 et 1.92 mg/ml respectivement.

Nos résultats, trouvent leurs concordances avec certaines études ultérieures et parfois non.

D'après **samaki et al., (2020)** l'extrait de l'infusion de l'*Hibiscus sabdariffa* L. possède des propriétés antioxydants proche en comparaisant à celles de nos résultats avec une valeur de IC₅₀=1,312 mg /ml.

Les résultats de **Yang et al., (2012)** trouvent une similarité avec ceux obtenus dans la présente étude qui a enregistré une IC₅₀ = 1,051 mg/ml de l'extrait hydro-méthanolique. Par contre et d'après **Mensah et Golomeke, (2015)** l'extrait hydro-méthanolique de l'*Hibiscus sabdariffa* L. possède des propriétés antioxydants supérieur en comparaisant à celles de notre étude avec une IC₅₀ de 0,2003 mg/ml.

Hamrita et son équipe **(2022)** ont montré que les deux extraits: hydro-méthanolique et de l'infusion de l'*Hibiscus sabdariffa* L. possède une activité antiradicalaire moins puissante avec des valeurs d'IC₅₀ de 2.79 mg/ml, et de 2.47 mg/ml respectivement, et cela confirme nos résultats, mais reste inférieur à que nous avons obtenus.

A noter que l'activité antioxydant de l'*Hibiscus sabdariffa* L. varie considérablement d'une étude à l'autre, et ceci peut être dû au changement des solvants utilisés dans la préparation des extraits ainsi qu'aux concentrations des radicaux libres. Et aussi les mesures obtenues, ainsi que la différence dans l'appareil de mesure pour ces valeurs, en plus de cela, il peut y avoir une différence dans l'espèce de plante étudiée, les conditions de sa culture et de sa récolte ou du stockage, à la raison la plus importante, qui peut être la raison principale, le pourcentage et la qualité des différentes teneurs en polyphénols totaux présents dans la plante (**Popovici et al., 2010**).

5. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits: hydro-méthanolique et de l'infusion d'*Hibiscus sabdariffa* L. contre les bactéries testées (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Bacillus Subtilis* et *Staphylococcus Aureus*) est expérimentée par la méthode de diffusion sur disque. La lecture des résultats se fait après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, Elle est basée sur la mesure des diamètres des zones d'inhibition exprimée en mm (**tableau 15**).

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al., (2009)**. Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne en 5 classes:

- ❖ Non sensible: $D < 8$ mm.
- ❖ Sensible: $9 < D < 14$ mm.
- ❖ Très sensible: $15 < D < 19$ mm.
- ❖ Extrêmement sensible: $D > 20$ mm.

La variation de la sensibilité bactérienne vis-à-vis de l'extrait hydro-méthanolique, et de l'extrait de l'infusion de *Hibiscus sabdariffa* L. est confirmée par l'existence des différences dans les diamètres d'inhibition aux diverses concentrations d'extraits, les valeurs indiquées dans le (**tableau 16**).

Tableau 16: Diamètres de la zone d'inhibition de différentes souches sous l'action des extraits hydro-méthanolique et de l'infusion (en mm).

	Types d'extraits	Hydro-méthanolique				Infusion				Antibiotique
	Concentrations (mg/ml)	SM	D1	D2	D3	SM	D1	D2	D3	
Souche bactérienne	<i>S. Aureus</i>	10,5	R	R	R	11	R	R	R	25
	<i>P.aeruginosa</i>	9,84	R	R	R	R	R	R	R	/
	<i>B. Subtils</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	29,5
	<i>E. coli</i>	10,5	R	R	R	11,5	R	R	R	29

T⁺ = céfotaxime, gentamicine ; SM = solution mère ; D= dilution ; R = résistance

Les résultats obtenus sont présentés sur **(annexe 04)**.

Dans la présente étude, une variété de Gram positif (*S. aureus* et *B. Subtilis*) et Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) ont été utilisées pour le dépistage de l'activité antimicrobienne d'extraits de l'infusion et hydro-méthanolique de l'*Hibiscus sabdariffa* L. **(tableau 16)**.

D'après les résultats du tableau précédent, il a été observé que toutes les souches bactériennes utilisées dans cette étude ne présentaient aucune sensibilité à toutes les dilutions des deux extraits de *Hibiscus sabdariffa* L. étudiés sauf la solution mère avec des valeurs différentes.

- ❖ ***E. Coli***: est sensible aux l'extrait hydro-méthanolique et l'infusion avec un diamètre de zone d'inhibition égal à 10.5 mm et 11.5 mm respectivement juste pour solution mère et non sensible avec les autres dilutions.
- ❖ ***Staphylococcus Aureus***: est sensible aux l'extrait hydro-méthanolique et de l'infusion avec un diamètre de zone d'inhibition égal à 10.5 mm et 11 mm respectivement juste pour solution mère et non sensible avec les autres dilutions
- ❖ ***Bacillus subtilis***: est plus résistante, ne représente aucune sensibilité aux deux extraits étudiés de l'*Hibiscus sabdariffa* L.
- ❖ ***Pseudomonas aeruginosa***: est sensible aux l'extrait hydro-méthanolique avec un diamètre de zone d'inhibition égal à 9.84 mm, et elle ne représente aucune sensibilité aux l'extrait de l'infusion.

De ces résultats, on peut noter que les extraits issus des deux méthodes d'extraction (macération et infusion) ont révélé des activités antibactériennes nettement convergentes.

5.1 Discussion

Shan et al., (2003) ont trouvé que l'extrait hydro-méthanolique du l'*Hibiscus sabdariffa* L. a une activité contre *Escherichia coli* (20 mm). Ces résultats sont en accord avec celles de **(Olaleye. 2007)** et de **(Sanogo et al., 2006)** qui ont rapporté que l'extrait aqueux présente une activité antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli*. D'autre part, ces résultats sont en accord avec celles de **(Al-Hachimi, 2012)** qui ont montré que l'extrait de l'infusion de *H. sabdariffa* vont un effet inhibiteur contre *E. coli* et *S. aureus* (40 mm), et *P. aeruginosa* (27 mm), et que l'extrait hydro-méthanolique a montré une capacité d'inhibition plus élevée contre *E. coli* (47 mm) que contre *S. aureus* (20 mm) et *P. aeruginosa* (17 mm).

Nos résultats ne sont pas d'accord avec celle de la littérature, cela peuvent être attribuées aux plusieurs facteurs tels que les facteurs inhérents (variété, conditions ambiantes, facteurs écologiques, variations saisonnières), les méthodes d'extraction, préparation de l'extrait, solvant utilisé, la sensibilité des bactéries et finalement l'organe de la plante utilisé (Natarajan *et al.*, 2005).

6. Activité antifongique

La lecture des résultats a été effectuée après 6 jours d'incubation à 37° C par la mesure du diamètre de la zone de croissance du champignon. La croissance des souches fongiques observées est présentée dans les figures suivantes:

- Pour l'extrait hydro-méthanolique

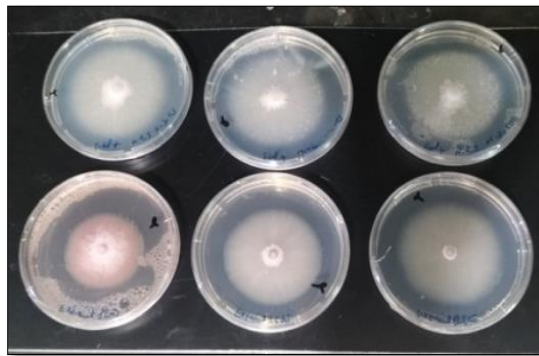


Figure 60: la zone d'inhibition de l'extrait hydro-méthanolique de chaque concentration testée par la souche *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Photo personnelle, 2023).

- Pour l'extrait de l'infusion

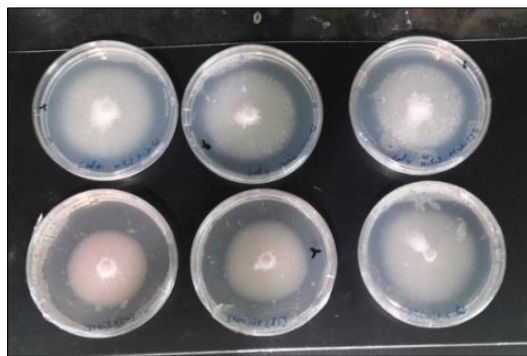


Figure 61: la zone d'inhibition de l'extrait de l'infusion de chaque concentration testée par la souche *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Photo personnelle, 2023).

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures séparés.

Tableau 17: Diamètres des zones de développement du champignon de T⁺ et T⁻ (en mm).

	Témoin positif (PDA +DMSO)	Témoin négatif (PDA)
La moyenne	61,5	66,75

Tableau 18: Diamètres des zones de développement du champignon des extraits hydro-méthanolique et de l'infusion (en mm).

Concentration	Extrait hydro-méthanolique	Extrait de l'infusion
100 mg /ml	40,5	42,5
50 mg /ml	50,25	46,75
25mg /ml	56,5	56,75

L'activité inhibitrice est exprimée en pourcentage et calculée selon la formule:

$$I = \frac{C-T}{C} \times 100 \text{ (Dennis et al., 1971).}$$

- ❖ **I** : taux d'inhibition en %.
- ❖ **C**: Croissance radiale du champignon en mm sur le PDA avec DMSO (témoin).
- ❖ **T**: Croissance radiale du champignon en mm sur le PDA contenant l'extrait.

Tableau 19: Résultats de l'activité inhibitrice des extraits hydro-méthanolique et de l'infusion .

Concentration	Extrait hydro- méthanolique	Extrait de l'infusion
100 mg/ml	34,14%	30,89%
50 mg/ml	18 ,29%	23,98%
25 mg/ml	8,13%	7,72%

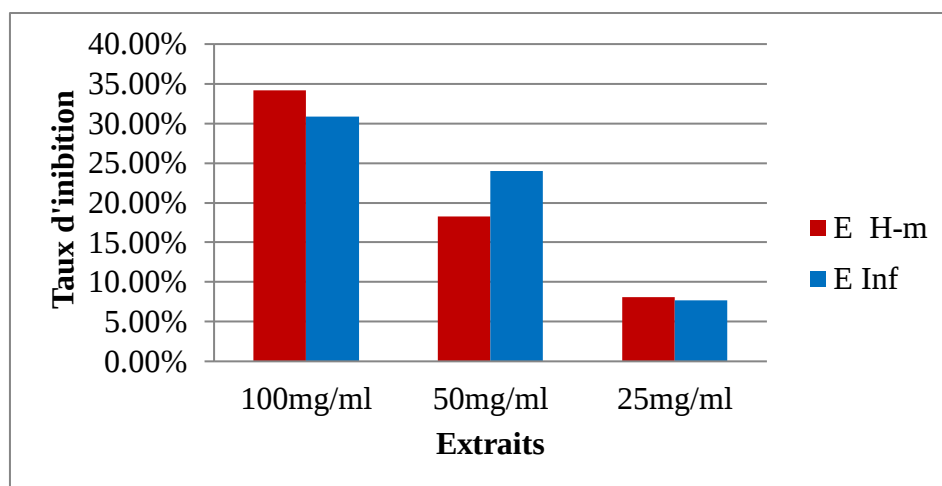


Figure 62: Activité antifongique des extrait d'*Hibiscus sabdariffa* L., vis-à-vis des champignons phytopathogènes: *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*

6.1 Discussion

Dans notre étude, l'expérience est faite avec 3 concentrations 100 mg/ml, 50 mg/ml et 25 mg/ml.

Il ressort des résultats des tests préliminaires de l'activité antifongique des extraits d'*Hibiscus sabdariffa* L. que La zone d'inhibition des extraits de la plante indique que l'efficacité diminue en fonction de la concentration (plus la concentration est faible, moins l'extrait est efficace) **tableau 18**.

Nous avons remarqué que les deux extraits: hydro-méthanolique et infusion d'*Hibiscus sabdariffa* L. ont exercé une activité moyennement inhibitrice sur *Fusarium oxysporum* f avec des pourcentages d'inhibition de 34,14% et 30,89 % respectivement à la concentration de 100 mg/ml. Cette observation pourrait être due à la présence de certaines substances ayant des capacités fongiques plus élevées. En revanche, aucune activité n'est par ailleurs notée par les concentrations (50 et 25 mg/ml) des deux extraits précédents sur la même souche fongique.

En effet, les différentes concentrations des deux extraits ont influencé de façon différente a la croissance de la moisissure, la concentration élevée était plus inhibitrice.

Par contre **Bessikri et al., 2022** ont trouvé que l'extrait hydro-méthanolique du *Hibiscus sabdariffa* L. exerce une activité importante (72.66%) sur *F. oxysporum* a la concentration 5 mg/ml.

En général, la capacité antifongique peut s'expliquer par sa richesse des composés naturels appelés métabolites secondaires que contiennent ces plantes. Par conséquent, l'activité biologique d'une plante naturelle est en relation directe avec sa composition chimique (Mohammedi, 2013).

7. Activité anticoagulante

Le pouvoir anticoagulant des extraits bruts de la plante étudiée a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TCK et le TQ respectivement.

7.1.1 Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

Les résultats obtenus de l'activité anticoagulante des extraits via la voie exogène en utilisant le test de TQ sont illustrés dans l'histogramme suivant:

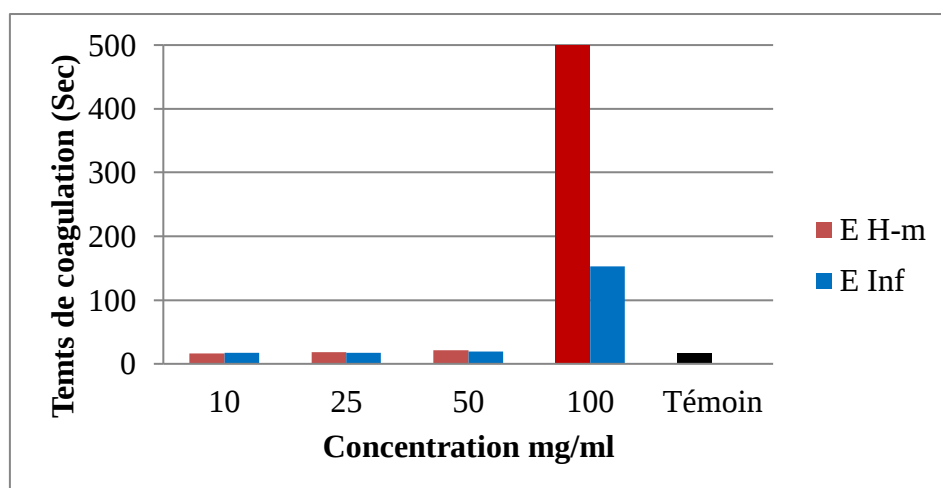


Figure 63: Temps de coagulation par voie exogène.

Le TQ normal est compris entre 12 et 14 secondes selon les réactifs utilisés allongement par rapport au contrôlet raduit une activité anticoagulante du matériel testé vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation. Un temps de coagulation (TQ ou TP) allongé par rapport à un témoin a un TQ de 16.8 sec, et tout un allongement par rapport au témoin montre une activité anticoagulante des extraits testé vis à- vis la voie exogène de la coagulation (Caquet , 2004).

L'histogramme (**Figure 63**), montre que le temps de coagulation des deux extraits augmente avec l'augmentation des concentrations.

Le meilleur TQ est constaté avec la grande concentration (100 mg/ml) des deux extraits d'*Hibiscus sabdariffa* L.: avec une valeur de 153 sec pour l'extrait de l'infusion et un temps maximal pour l'extrait hydro-méthanolique.

Cependant, les concentration (50; 25 mg/ml) des extraits: hydro-méthanolique et de l'infusion de *Hibiscus sabdariffa* L. ont une activité anticoagulante estimée par un TQ de (21.2; 18.4) sec par un allongement de (4.4; 1.6) sec, et un TQ de (19.2; 17.3) sec par un allongement de (2.4; 0.5) sec respectivement.

La concentration (10 mg/ml) de l'extraits de l'infusion d'*Hibiscus sabdariffa* L. capable d'allonger le temps de quick légèrement avec une valeur d'ordre de (0.1 sec) et avec un TQ de 16.9 sec, à l'exception cette concentration ne possède aucun effet anticoagulant pour l'extraits hydro-méthanolique vis-à-vis de la voie exogène avec des TQ de 15.9 sec avec un allongement négatif de -0.9 sec.

7.1.2 Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

Analyse statistique de Temps de céphaline-Kaolin (TCK) présenté dans les tableaux suivants:

Les résultats obtenus concernant l'exploration de la voie endogène de la coagulation en utilisant le test de TCK sont présentés dans la figure.

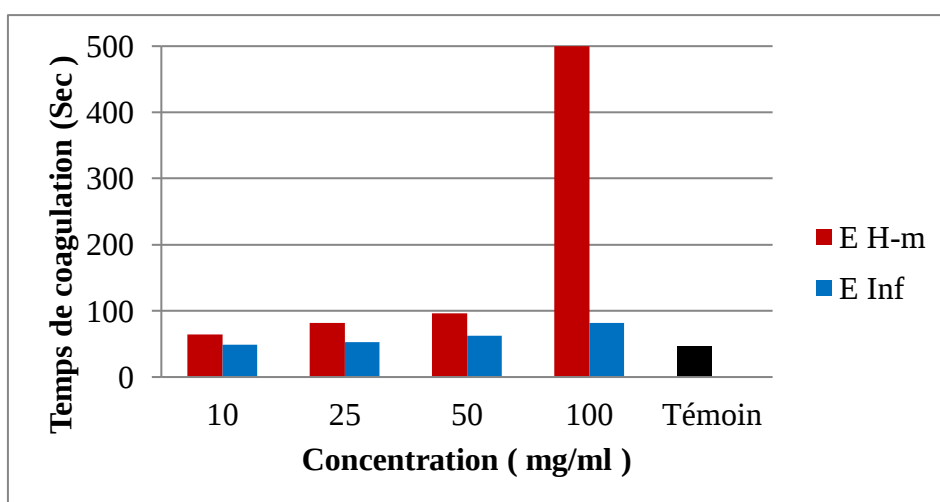


Figure 64: Temps de coagulation par voie endogène.

Les résultats de l'activité anticoagulante obtenus (**Figure 64**) révèlent que les deux extraits l'extrait hydro-méthanolique et de l'infusion des fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* L. possèdent une activité anticoagulante dose dépendante. Un temps de coagulation (TCK)

allongé par rapport à un témoin de TCK de 46.1sec, le TCK normal est compris entre 30 et 40 sec selon le réactif.

L'observation générale de l'histogramme révèle que tous les concentrations de l'extrait hydro-méthanolique exerce des TCK relativement plus importants que celle de l'infusion. Ces valeurs semblent plus élevées à celle de témoin, tandis que le TCK des deux extraits augmente avec l'augmentation des concentrations :

La concentration (100 mg/ml) présente une activité anticoagulante avec un TCK maximale (plus 500 sec) pour l'extrait hydro-méthanolique et un TCK de 82.0 sec avec un allongement de 35.9 sec pour l'infusion (**Figure 64**).

Par ailleurs, les concentrations (50 et 25 mg/ml) capables d'exercer un effet anticoagulant sur la voie endogène de la coagulation, estimé par un TCK de 96.6 et 81.3 sec par un allongement de 50.5 et 35.2 sec respectivement pour l'extrait hydro-méthanolique et un TCK de 62.6 et 53.2 sec par un allongement de 16.5 et 7.1 sec pour l'extrait de l'infusion respectivement (**Figure 64**).

Finalement, La concentration (10 mg/ml) a une capacité anticoagulante estimée par un TCK de 64.8 sec par allongement de 18.7 sec pour l'extrait hydro-méthanolique et un TCK de 48.7 sec par un allongement de 2.6 sec pour l'extrait de l'infusion (**Figure 64**).

Ces résultats indiquent que les grandes concentrations des deux extraits de la plante testée affectaient différents facteurs de coagulation par leurs effets sur le TQ et le TCK par rapport au témoin.

7.2 Discussion

Globalement, l'évaluation de la capacité anticoagulante des extraits: hydro-méthanolique et de l'infusion d'*Hibiscus sabdariffa* L. établi par les deux tests chronométriques d'exploration de la coagulation, le TCK et le TQ démontre que ces extraits exercent une activité anticoagulante très importante vis-à-vis les deux voies de la coagulation sur tout avec les grandes concentrations.

Nos résultats concordent avec les études rapportées par (**Fathy et al., 2022**) qui a trouvé que l'extrait hydro-méthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* L. à un effet significatif dans les deux test TQ et TCK a une concentration utilisée: (10 mg/ml) avec un allongement du

temps où le sang ne coagule pas, pour le TQ, et un allongement du temps de coagulation de 44.8 sec pour le TCK.

Les études réalisées sur l'activité anticoagulante de différentes plantes médicinales ont montré que l'allongement de temps de coagulation des extraits végétaux est du probablement à leurs richesses en métabolites secondaires (**Sakthipriya et Vidhya, 2015**). Cela est confirmé par le screening phytochimique qui a montré (**Tableau 9**) la présence de polyphénols, en particulier de flavonoïdes qui sont déjà associés à une altération de l'hémostase.

Notre étude *in vitro* de l'activité anticoagulante de d'*Hibiscus sabdariffa* L. a fourni une preuve supplémentaire de son activité connue pour la gestion des caillots sanguins, car elle a montré des résultats intéressants qui nécessitent une évaluation plus approfondie de leur activité anticoagulante, pour son effet sur le TP et TCK. par conséquent, elle est évitée chez les patients sous traitement anticoagulant.

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées pour leurs propriétés curatives. Cela signifie qu'au moins une partie de celle-ci (feuille, tige, racine, etc) peut être utilisée à des fins thérapeutiques. Ils sont utilisés par l'homme depuis au moins 7 000 ans, et sont à la base de la phytothérapie.

Au fait, nos recherches visent à mieux utiliser les ressources végétales et à trouver de nouveaux produits naturels pour remplacer les produits chimiques utilisés pour traiter diverses maladies. En effet, les extraits de plantes médicinales sont des solutions à la composition chimique complexe qui confèrent des propriétés phytothérapeutiques d'un grand intérêt pour la santé.

L'espèce végétale étudié dans ce travail appartient à la famille des *Malvacées* qui est largement cultivé dans de nombreux pays. L'extraction des substances bioactives des fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* L. a été effectuée par deux méthodes d'extractions: macération et infusion. C'est deux méthodes ont permis d'obtenir des rendements similaires et importants par rapport à la poudre utilisé en terme de quantité: où l'extrait hydro-méthanolique a fourni un rendement de 32,56%, alors que l'extrait de l'infusion a donnait un rendement de 36%.

L'analyse qualitative des extraits, réalisée à l'aide des tests phytochimiques, a révélé la présence de plusieurs familles de composés naturelles. En effet, les deux extraits étudiés ont été riche en alcaloïdes, flavonoïdes, substances phénoliques, coumarines, quinones libres, sucres réducteurs, stérols, terpénoïdes et stéroïdes. En revanche, les tannins, les saponines et les protéines sont complètement absents dans les deux extraits.

Concernant l'activité antioxydant, elle a été évaluée *in vitro* en employant le test de piégeage du radical libre DPPH qui a montré que les deux extraits étudiés présentent un pouvoir antiradicalaire similaires. Ce résultat est représenté par les valeurs d'IC₅₀ qui ont été 1.92 mg/ml pour l'extrait de l'infusion, et 1.63 mg/ml pour l'extrait hydro-méthanolique respectivement.

Les potentialités antibactériennes des extraits de d'*Hibiscus sabdariffa* L. sont évaluées par la méthode de diffusion sur disque sur gélose Muller Hinton en utilisant quatre souches bactériennes, il s'agit de *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Au vu de résultats obtenus, nous avons fait ressortir que l'extrait hydro-méthanolique a un effet inhibiteur contre les trois souches bactériennes *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, mais il n'a aucune activité vis-à-vis

Bacillus subtilis. D'autre par l'extract de l'infusion montre un effet inhibiteur just contre les deux souches bactériennes *staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli*, par contre il n'a aucune activité vis-à-vis les deux autres bactéries (*Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*). Ceci est dû à la nature de la composition chimique des extraits.

L'activité antifongique a été évaluée par une méthode directe sur gélose PDA avec le champignon *Fusarium oxysporum*. f. Les résultats obtenus indiquent queles deux extraits: hydro-méthanolique et de l'infusion de l'*Hibiscus sabdariffa* L. ont une activité inhibitrice modérée similaire avec des pourcentages d'inhibition de 34,14 % et 30,89 % respectivement à une concentration de 100 mg.

L'activité anticoagulante de nos extraits a été évaluée *in vitro* par les deux testes (TCK, TP), a permet d'asseoir que les deux extraits exercent un effet anticoagulant très important sur les deux voies de la coagulation, avec un effet plus marquée sur la voie endogène et surtout avec les grandes concentrations. A la lumière de ces résultats ont peut dire que l'*Hibiscus sabdariffa* L., peuvent être utilisé comme anticoagulant potentiel dans le traitement des maladies thrombotiques.

Les doses élevées de l'*Hibiscus sabdariffa* L. provoquer des effets secondaires et il est également déconseillé par les femmes enceinte, car il existe des données indiquant qu'il peut stimuler le fux sanguin menstruel chez les femmes enceintes.

Finalement, cette étude montre une concordance entre le contenu phénolique des extraits hydro-méthanolique et de l'infusion et leurs activités biologiques étudiés.Par conséquent, cette étude scientifique confirme la valeur thérapeutique de cette plante et justifie son utilisation en médecine traditionnelle.

Toutefois, les résultats obtenus ouvrent également d'autres perspectives pour compléter ce modeste travail par l'isolement, la purification et l'identification, des composés bioactifs de cette plante responsable de ces activités biologiques, et en essayant de comprendre les mécanismes fonctionnels impliqués et leurs utilisations thérapeutiques.

Références Bibliographique

A

Abdelhafez, O.M., Amin, K.M., Batran, R.Z., Maher, T.J., Nada, S.A., et Sethumadhavan, S. (2010). Synthesis, anticoagulant and PIVKA-II induced by new 4-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorganic Med. Chem*, vol. 18(10), p. 3371-3378.

Abdou, M.M. (2017). 3-Acetyl-4-hydroxycoumarin: Synthesis, reactions and applications. *Arab. J. Chem*, vol. 10, p. S3664– S3675.

Abdullah, S., Scholar M., Parasitology, D., Gbpuat, G., Pantnagar, P., Uttarakhand, U., et al. (2012). Hirudotherapy Leech therapy: Applications and Indications in Surgery. *Archives of Clinical and Experimental Surgery*, vol. 1, p. 172-180.

Adamu, H., et Ngwu, R.O. (2015). Phytochemical Screening and Antibacterial Activities of *Hibiscus sabdariffa* L. Leaf Extracts. *Nigerian Journal of Chemical Research*, vol. 20, p. 46 - 52.

Adil, M., Sultana, B., Babar, T., Bashir, A., Amjad, M., et Hassan, Q. (2012). Investigation on the antioxidant activity of leaves, fruit and stem bark of Dhraik (*Melia azedarach*). *European Journal Appl Sci*, vol. 4, p. 47-51.

Ajjan, R., et Grant, P.J. (2006). Coagulation and atherothrombotic disease. *Atherosclerosis*, vol. 186, p. 240–259.

Alain, P., Banga, B., Adou, F., Jean, D., et Allico, J. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Journal of Sciences and Nature*, vol. 8(1), p.1-11.

Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantick, P.C., et Shahidi, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem*, vol. 49(3), p.1410-1416.

Al-hashimi, Alaa, G.(2012). Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. Food Science and Biotechnology Department, Agriculture College, Basrah University, Iraq. *African Journal of Food Science*, vol. 621, p. 506-511.

Atar, H., et Çölgeçen, H. (2020). Bioactive Compounds of Oregano Seeds. In: Preedy.V.R., Watson. R. R(eds), Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. Unitesstates: Academic press, p. 73-77.

Athukorala, Y., Lee, K.W., Kim, S.K., et Jeon, Y.J. (2007). Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. Bioresource Technology, vol. 98, p. 1711-1716.

Atmakuri, L.R., et Dathi, S. (2010). Current Trends in Herbal Medicines. Journal of Pharmacy Research, vol. 3(1), p. 109-113.

Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., et Debbache, N. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. Food Chem, vol. 112, p. 303-309.

Avissar, N., Whitin, J.C., et Allen, P.Z. (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. J. Biol. Chem, vol. 2, p. 15850-15855.

Ayoola, G., Coker, H., Adesegun, S., Adepoju-Bello, A., et Obaweya, K. (2008). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal plants used for malaria therapy in southwestern nigeria. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, vol 7(3), p.1019 -1024.

Ayres, D.C., et Loike, J.D. (1990). Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties .1^{ère} Edition. Cambridge University Press (New York), p 402.

Azam, M., Mamun-Or, R.M., Towfique, N., Sen, M., et Nasrin, S. (2013). Pharmacological Potentials of *Melia azedarach* L. A review. American Journal of Bioscience, vol. 1(2), p. 44-49 .

B

Baatouche, S., Cheriet, T., Sarri, D., Mekkiou, R., Boumaza, O., Benayache, S., Benayache, F., Brouard, I., León, F., et Seghiri, R. (2018). *Centaurea microcarpa* Coss. & Dur. (Asteraceae) extracts : New cyanogenic glucoside and other constituents. Nat. Prod. Res, vol. 33, p. 3070-3076.

Baba-Moussa, F., Akpagana, K., et Bouchet, P. (1999). Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 66, p. 335-338.

Bailly, F., Maurin, C., Teissier, E., Vezin, H., et Cotellet, P.(2004). Antioxidant properties of 3-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorganic Med. Chem*, vol. 12(21), p. 5611-5618.

Bakouan, Y., Sessouma, B., Tarpaga, L., Yoda, J., Djandé, A., et Bayo, K. (2021). 3-benzoyl-4-hydroxy-coumarine: Synthèses et caractérisation d'une série de nouveaux composés. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*, vol. 050, p. 23-29.

Barouti, N., Masouyé, I., Boehncke, W.H., et Prins, C. (2013). Héparines et réactions cutanées : du diagnostic à la prise en charge, *Rev Med Suisse*, vol. 9, p. 705-11.

Bate-Smith, E.C. (1954). Leuco-anthocyanins.1. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochemical Journal*, vol. 58, p. 122-125.

Batty, P., et Smith, G. (2010). Anticoagulation. *Surgery*, vol. 28(6), p. 243-247.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sheris, J.C., et Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *AM. J. Clin. Pathol*, vol.45, P. 493-496.

Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., et von-Eiff, C. (2004). Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus species*. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42(11), p.4988-4995.

Bedi, P.S., Bekele, M., et Gure, G.(2020). Phyto-chemistry and Pharmacological Activities of *Hibiscus sabdariffa* Linn. -A Review, vol. 21(23), p. 41-54.

Békro, Y.A., Mamyrbekova, J.A., Boua, B.B., Tra Bi, F.H., et Ehilé, E.E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia Benthiana* (Baill). Herend et Zarucchi. *Journal of Sciences and Nature*, vol. 4(2), p. 217-225.

Benabed, K.H. (2018). Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles et extraits phénoliques de deux espèces de la famille des *Lamiaceae*. Doctoral dissertation, Université Kasdi Merbah- Ouargla, p. 126.

Bendahau, M., Benyoucef, M., Benkhada, D., Soussa Elisa, M. B. D., Galvao, E. L., Marques, M. M. O., Muselli, A., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F et costa, J. (2007). Influence of the processes extraction on essential oli of *origanum glandulosum* Desf. Journal of applied sciences, vol. 8, p. 1152-1157.

Benhamou, D., Carrié, A.S., et Lecomte, F. (2005). *Staphylococcus aureus* : place et impact dans la prise en charge des pneumopathies nosocomiales. Rev Mal Respir, vol. 22, p. 595-603.

Bentabet lasgaa, N. (2015). Étude phytochimique et évaluation des activités biologique de deux plantes *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare* de l'ouest algérien. Thèse de doctorat, Université Aboubekr Belkaid, p.20-21.

Bessikri, I., Benzeghda, Y., Boutrouf, R. (2022). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antifongique de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L. Mémoire de Master en Biologie et physiologie végétale. Université Frères Mentouri Constantine. Algérie, p. 88.

Binove, L. (2001). Oxydant /antioxydant: un équilibre important.

Biyiti, L.F., Meko'o, D.J.L., Tamze, V., et Amvam Zollo. P.H. (2004). Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. Traditional pharmacology and medicine in Africa, vol. 13,p. 11-20.

Boisseau, M. R. (1996). Données actuelles sur l'hémostase. Phlébologie, vol. 49(2), p.175-186.

Boizot, N., et Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'inra, numérospecial : Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, p. 79-82.

Booth, C. (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, p. 237.

Booth, N.L., Dejan, N., Richard, B., et Stoci, E. (2004). New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxycoumarin and their pharmacological activity. Clinical Pharmacology and Therapeutics, vol. 50, p. 120-123.

- Boudjouref, M. (2011).** Etude de l'activité antioxydant et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de Magister. Université Ferhat Abbès. Sétif, p. 51.
- Bouhafoun, A., Yilmaz, M.A., Boukeloua, A., Temel, H. et Harche, M.K. (2018).** Simultaneous quantification of phenolic acids and flavonoids in *Chamaerops humilis* L. using LC–ESI-MS/MS. Food Science and Technology, vol. 38, p. 242-247.
- Boukeria, S., Benbott, A., Kadi, K., Debbache, K., et Gueniche, A. (2019).** Etude phytochimique et evaluation de l'activité anticoagulante des composés phénoliques du *curcuma longa* L. Revue des BioRessources, vol. 9(2), p. 45-55.
- Bourahima, B., Donatien, B.C., Noël, D.D., Herman, W.B., Leslie, T.D., Romual, D.S., et Karamoko, O. (2021).** Comparative study of the anticoagulant powers of the aqueous macerate, ethanolic macerate and aqueous decoction of the leaves of *Uvaria chamae* P. Beauv. (Annonaceae). Journal of Drug Delivery and Therapeutics, vol. 11(2), p. 82-88.
- Bourgou, S., Serairibeji, R., Medini, F., Ksouri, R. (2016).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. Journal of new sciences, vol. 28(12), p.1649-1655.
- Bourkhiss, M.B., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., et Satrani, B. (2010).** propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetralinis articulata* (vahl) masters du maroc. Bulletin de la société royale des sciences de liège, vol. 79, p. 141-154.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., et Berset, C. (1995).** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm. -Wiss. u.-Technol, vol. 28, p. 25-30.
- Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes Médicinales. 4^{ème} Edition. Lavoisier/Tec et Doc(Paris), p. 1243.
- Bruneton, J.(1993).** Pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales. 2^{ème} Edition. Tec & Doc Lavoisier (Paris), p. 207-211-915.
- Bruneton, J.(1999).** Tannins. In: Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. TEC&DOC (Ed)(Paris), p. 369-404.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales .3^{ème} Edition Techniques et documentations (Paris), p. 227-310-312-313-314.494.1120.

Buchanan, B.B., Gruissem, W. et Jones, R.L. (2000). Biochemistry and molecular Biology of plants: American society of plant physiologists, p. 1367.

C

Cadenas, E. (1989) . Biochemistry of oxygen toxicity. Annu Rev Biochem, vol. 58, p.79-110.

Caen, J., Lrrieu, M., et Samama, M. (1975). L'Hémostase: Méthodes d'exploration et diagnostic pratique. 1^{ère} Edition Toray. Expansion Scientifique Française (Paris), p. 15-20

Caquet, R. (2004). 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation, 9^{ème} Edition, Masson (Paris), p.388-389.

Caquet, R. (2010). 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation .11^{ème} Edition. Elsevier Masson, p.384-340.

Carla, C.C.R. de Carvalho., et M. Manuela, R. da Fonseca. (2006). Biotransformation of terpenes. Biotechnology Advances, vol. 24(2), P.134-142.

Cevallos-Casals, B.A. et Cisneros-Zevallos, L. (2010). Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. Food Chemistry, vol. 119(4), p. 1485-1490.

Chaachouay ,N. (2020). Etude floristique et ethnomédicinale des plantes aromatiques et médicinales dans le Rif (Nord du Maroc). Thèse de Doctorat National. Université Ibn Tofail, Kénitra. Maroc, p. 17.

Charnay, P., et Tourmeau, J. (2006). Le Petit Futé Guide pratique de la Dégustation. Éditeur Nouvelles Editions de l'Université, p. 287-203

Chavan, U.D., Shahidi, F., et Naczk, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L) as affected by different solvents. Journal Food Chem, Vol. 75(4), p. 509-512.

Chen, H., Wang, G., Wang, N., Yang, M., Wang, Z., Wang, X., et Yao, X. (2007). New furostanol saponins from the bulbs of *Allium macrostemon* Bunge and their cytotoxic activity. Pharmazie, vol. 62(7), p. 544-548.

Chinedu, P.A., Ijeoma, E., Olusola, A., et Ayobami, O.A. (2011). Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of *Hibiscus sabdariffa* Calyx. Research Journal of Medicinal Plant, vol. 5(5), p.557-566.

Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., et Kim J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. LWT, vol. 39, p.756-761.

Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Mar Diop, C., Reynes, M. et Sock, O., (2009). La production de bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) au Sénégal, Fruits, vol. 64 (2), p.111-124.

Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, M., et Sock, O. (2008). Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : composition et principales utilisations. Fruits, vol. 64(3), p.179-193.

Colvin, T. (2004). Physiology of Haemostasis Vox Sanguinis. Journal of Food Chemistry, vol.87(1), p.43-46.

Cook, J.W., Taylor, L.M., Orloff, S.L., Landry, G.J., Moneta, G.L., et Porter, J.M. (2003). Homocysteine and arterial disease. Experimental mechanisms. Vascular Pharmacology, vol. 38, p. 293-300.

Courbat, P. (1972). Quelques généralités sur les composés flavonoïdes. Angiologica, vol. 9, p. 135-161.

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, vol.12(4), p. 564-582.

Cravotto, G., Tagliapietra, S., Cappello, R., Palmisano, G., Curini, M., et Boccalini, M. (2006). Long-chain 3-acyl-4- hydroxycoumarins: Structure and antibacterial activity. Arch. Pharm. (Weinheim), vol. 339 (3), p.129-132.

D

Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., et Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L., A phytochemical and pharmacological review, Food Chemistry, vol. 165, p. 424-443.

Dai, J., et Mumper, R.J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. Molecules, vol. 15(10), p. 7313-52.

Daira, N., Cherif Maazi, M., et Cherfrou, A. (2016). Contribution à L'Etude Phytochimique d'une Plante Médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, vol. 85, p. 276-290.

Debuigne, G. (1974). Larousse des plantes qui guérissent. Edition. Larousse, p. 254.

Deina, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., et Bonsignore, L., 2003. Natural product: their chemistry and biological significance. Journal of the American Oil Chemistry Society, vol. 80, p. 65-70.

Dennis, C., et Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. Trans Brit Mycol Soc, vol. 57, p. 41-48.

Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N.A., et Kumar, S. (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. Arabian Journal of Chemistry, vol. 10, p. 1193-1199.

Diallo, D. (2000). Ethno Pharmacological Survey of Medicinal Plants in Mali and Phytochemical Study of Four of Them: *Glinus oppositifolius* (Azoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada Africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae). Thèse de Doctorat. Université de Lausanne, Suisse, p. 65-70.

Dohou, N. (2004). Approche Floristique, Ethnobotanique, Phytochimique et Etude de l'Activité Biologique de *Thymelea elythroides*. Thèse de Doctorat. Université de Maroc, p. 59.

Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D., Boland, W., et Gershenzon, J. (2005). The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 102, p. 933-938.

E

Ekoumou, C. (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de traditionnelles utilisées 5 recettes dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie. Université de Bamako, Mali, p.36.

Élie, F. (2022). Les phénols et les polyphénols, p. 2.

Eloff, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria, vol. 64(8), p. 711-3.

Elqaj, M., Ahami, A. et Belghyti, D. (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

El-Sharif, M.H., Sarwat, M.I. (2007). Physiological and chemical variation in producing Roselle plant (*Hibiscus sabdariffa* L.) by using some organic farmyard manure. World Journal of Agriculture Sciences., vol. 3(5), p. 609-616.

El-Waziry, A.M. (2007). Nutritive value assessment of ensiling or mixing *Acacia* and *Atriplex* using in vitro gas production technique. Res. J. Agric. Biol. Sci, vol. 3(6), p. 605-614.

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. 10-41-50.

Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. Nutrition Research, vol. 24(10), p. 851-874.

F

Farombi.D. (2003). African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. African Journal of Biotechnology, vol. 2 (12), p. 662-671.

Fathy, H.M., Rahma, S.R. Mahrous, R.M., Abu EL-Khair, R.M, Abdallah, A. Omar, A.A., Ibrahim, R.S. (2022). Investigation of the effect of selected edible and medicinal plants on *in-vitro* blood coagulation profile. Kuwait Journal of Science, vol. 49. (4), p. 1-12.

Favier, A. (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. Ann Biol Clin, vol. 55, p. 9-16.

Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr, vol. 64, p. 390-396.

Foureau, E. (2016). Elucidation de la voie de biosynthèse des alcaloïdes de *Catharanthus roseus* et ingénierie métabolique dans la levure. Thèse de Doctorat. Université François – Rabelais de Tours. France, p. 14.

Fressinaude, E., et Meyer, D.(1994). Maladie de Willebrand, Editions techniques, Encyclopédie Medico-chirurgicale. Hématologie Française (Paris), p. 9-50.

G

Gachet, C.(2013). Les mécanismes moléculaires de l'activation plaquettaire Bull. Acad. Natle Méd, vol. 197(2), p. 361-373.

Garai, S. (2014). Triterpenoid Saponins. Natural Products Chemistry and Research, vol. 148(2), p. 5- 6-7-8-9-10.

Garbi, M.I., Saleh, M.S., Badri, A.M., Ibrahim, I.T., Mohammed, S.F., Alhassan, M.S., Elshikh, A.A., et Kabbashi, A.S. (2016). Antibacterial activity, phytochemical screening and cytotoxicity of *Hibiscus sabdariffa* (calyx). Advancement in Medicinal Plant Research, vol. 4(4), p. 116-121.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie, vol. 3(4), p. 162-169.

Girardel, J.M., et Samama, C.M. (2006). Les nouveaux antithrombotiques: une thérapeutique en mutation, des perspectives d'avenir. Réanimation, vol. 15(2), p.117-123.

Glombitza, K.W., et Gerstberger, G. (1985). Phytochemistry (Elsevier), p. 24- 543- 551.

Greinacher, A., Volpel, H., Janssens, U., Hach-wunderle, V., Kemkesmatthes, B., Eichler, P., Mueller-velten, H.G. et Potzsch, B. (1999). Recombinant hirudin (lepirudin) provides safe and effective anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study. Circulation, vol. 99, p. 73-80.

Grubben, G.J.H., et Denton, O.A. (2004). Ressources végétales de l'Afrique tropicale 2. Légumes(Traduction de : Plant Resources of Tropical Africa 2. Vegetables 2004). Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas (Barkhuys Publishers Ltd. Pays-Bas/CTA. Wageningen. Pays-Bas, p. 737.

H

Hagr, T.E., et Adam, I.A. (2020). Phytochemical Analysis, Antibacterial and antioxidant Activities of Essential Oil from *Hibiscus sabdariffa* Seeds, (Sudanese Karkadi). progress in chemical and biochemical Research, vol. 3(3), p. 194-201.

Hamrita, B., Emira, N., Papetti, A., Badraoui, R., Bouslama, L., Ben Tekfa, M.I., Hamdi, A., Patel, M., Elasbali, A.M., Adnan, M., Ashraf, S.A., et Snoussi, M. (2022). Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Swarming Properties of *Hibiscus sabdariffa* L. Calyx Extracts: *In vitro* and *In Silico* Modelling Approaches Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Vol., P. 14.

Hanson, J.R. (2003). Natural products: the secondary metabolites. Royal Society of Chemistry (cambridge), p. 147.

Hartman, T. (2007). From waste products to ecochemicals, Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry, vol. 68, p. 2831-2846.

Haslam, E. (1989). Plant Polyphenols - Vegetables and Tannins Revisited. 9^{ème}ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 230.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Therap, vol. 96, p. 67-202.

Hayouni, E., Abedrabba, M., Bouix, M., et Hamdi, M. (2007). The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quecus coccifera*.L and *Juniperus phoenicea*.L fruit extracts. Food Chem, vol. 105, p. 1126-1134.

Hemingway, R.W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lplant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York, p . 2.

Hermawan, P., Helen, A.S., et Rianti, S.(2020). Phytochemical screening of bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) and antimicrobial activity test. Jurnal Pendidikan Kimia, vol. 12(2), p. 70 - 78.

Hopkins, W.G. (2003). Physiologie végétale. De Boeck Supérieur. 2^{ème}Edition, p. 514-280.

Hussin, N.M., Muse, R., Ahmed, S., Ramli, J., Mahmoud, M., Suleiman, M.R., Shukor. M.A.Y., Rahman, M.F.A., et Aziz, K.N.K. (2009). Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemose*. L (Lecythidaceae). African Journal of Biotechnology, vol. 8(12), p. 2835-2842.

I

Iserin, P. (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins. 2^{ème} Edition Larousse (London).

Iserin, P., Masson, M., Restellini, J., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., Zha, E., De la Roque, R., De la Roque, O., et Vican, P. (2001). Larousse des plantes médicinales identification, préparation, soins. Editions Larousse, Paris, p. 15.

Ismail, A., Ikram, E.H.K., et Nazri, H.S.M. (2008). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds nutritional composition protein quality and health benefits. food, vol. 2(1), p. 1-16.

Iwu, M.W., Duncan, A.R., et Okunji, C.O. (1999). New antimicrobials of plant origin. In Perspectives on New Crops and New Uses; Janick, J. Edition ASHS Press(Alexandria), (VA),(USA), p. 457-462.

Izquierdo-Vega, J.A., Arteaga-Badillo, D.A., Sánchez-Gutiérrez, M., José, A., Morales-González, Y.A., Vargas-Mendoza, N., Gómez-Aldapa, C.A., Castro-Rosas, J., Luis Delgado-Olivares, L., et Madrigal-Bujaidar, E.(2020). Organic Acids from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)A Brief Review of Its Pharmacological Effects. Biomedicines, vol. 8(100), p. 2-16.

J

Jan, S., et Abbas, N. (2018). Chemistry of Himalayan Phytochemicals. In : Jan, S., and Abbas, N (Eds). Himalayan Phytochemicals. India, p. 121-166.

Jayasuriya, D.C.(1998). The regulation of medicinal plants - a preliminary review of selected aspects of national legislation. Unpublished Report.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., et Stevens, P. (2002). Botanique Systématique : une perspective phylogénétique. 1^{ère} Edition . DEBOECK, p. 84-336.

Juntachote, T., Berchofer, E., Siebenandl, S., et Bauer, F. (2006). The antioxydative properties of holy basil and galangal in cooked ground pork. *meat science*, vol. 72(3), p. 446-456.

K

Kaboré, S., Touré, A., Kouamé, B.K.F.P., Bamba, A.E., Kabran, A.F., Kadio, B.D., Konan, D.J., Attioua, K.B., Coulibaly, W.K., Kablan, A.L.C., Soro, Y.R., et Coulibaly, A.(2021). Phytochemical screening and antioxidant activity of leaves of *Amaranthushybridus L.*, *Corchorusolitorius L* and *Hibiscus sabdariffa L*. grown in northern of Côte d'Ivoire. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, vol.16(02), p. 182-189.

Kamelé, K.Y., Clémentine, K.K.A., Carole, K.A., Mesmin, K.Y., Bi Fézan Honora, T. et Kablan, T. (2019). Antifungal in vitro Activity of Five Plants from Local Traditional Medicine of Côte d'Ivoire on *Colletotrichum Higginsianum*, *Fusarium Oxysporum* and *Rhizopus Stolonifer*, Pathogens of Pawpaw (*Carica Papaya L*) and Tomatoes (*Solanum Lycopersicum L*). *European Scientific Journal*, vol. 15(9), p. 304-321.

Karumi, Y., Onyeyili, P., et Ogugbuaja, V. (2004). Identification of Active Principals of *Momordica balsamina* (Balsam apple) Leaf Extract. *Journal of Medical Sciences*, vol. 4(3), p. 179-182.

King, L.A., Loukiadis, E.P., Mariani-Kurkdjian, S., Haeghebaert, F.X., Weill, C., Baliere, S., Ganet, M., Gouali, V., Vaillant, N., Pihier, H., Callon, R., Novo, O., Gaillot, D., Thevenot-Sergentet, E., Bingen, P., et Chaud, H. de Valk. (2014). Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 20(12), p. 1136-1144.

Kluytmans, J., van Belkum, A., et Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 10(3), p. 505-520.

Kohen, J.L., Downing, A.J. (1992). Aboriginal use of plants on the western Cumberland Plain Sydney Basin. *Naturalist*, vol. 1, p.1-6.

Kommedahl, T., Abbas H.K., Bumés, P.M et Mirocha, C.J. (1988). Prevalence and toxigenicity of *Fusarium species* from soils of Norway near the Arctic Circle. *Mycologia*, vol. 80, p. 790-794.

Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., et Abdely, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. C. R. Biol, vol. 331,p. 865- 873.

L

Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G. et Carde, J .P. (1994). Biogénèse des monoterpènes I-localisation et sécrétion. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, vol. 133 , p . 69-78 .

Lavanya Vasavi, C., Siva Jyothi, A., Sravani, P., Pranav Chand, T., SK Adil, S.K., Ramasubramania, R., et Harinadha Baba, k. (2019). *Hibiscus cannabinus* and *Hibiscus sabdariffa* Phyto Phamacognostical review Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, vol .8(1), p. 313-318.

Lazli, A., Moncef, B., Leila, G ., et Nouri, N. (2019). Étude ethnobotanique et inventaire des plantes médicinales dans la région de Bougous (Parc National d'El Kala, Nord-est algérien). Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, vol. 88, p .22-43.

Le Loir, Y., Baron, F., et Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research: GMR, vol. 2(1), p. 63-76.

Lepengue., Alexis., André., Muluway., Kalenda., George., et 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, vol. 11 (2), p. 1-9.

Lepoivre, P. (2003). Phytopathologie : bases moleculaires de biologiques des pathsystemes et fondement des strategies de lutte. De Boeck et Presses Agronomiques de Gembloux (Eds.), Brussels, Belgium, p. 432.

Lim, Y.Y., Lim, T.T., et Tee, J.J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. Food Chemistry, vol. 103, p. 1003-1008.

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X, Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H. et Chen, H. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. Molecules, vol. 21, p. 1-19.

Llaneza Coalla, H., Blanco Fernández, J.M., Morís Morán, M., et López Bobo, M. R. (2009). Biogas generation apple pulp. *Bioresource technology*, vol. 100 (17), p. 3843-3847.

Lortholary, O. (2004). Associations d'antifongiques. Conférence de consensus commune SFAR, SPILF, SRLF. *Ann Fr Anesth Reanim* numéro spécial, vol.60(5), p. 60-70.

M

Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR Presses polytechniques*, p. 192.

MaffoTazoho, G., Gouado, I., Ndomou, M., Tchuandom Bonsi, S., Mbaduet Wamba, Y., et Agbor, E.E. (2016). Clinical, Hematological and Biochemical Health Benefit Effects of *Hibiscus sabdariffa* Lin Dried Calyces Beverage in Human. *Food and Nutrition Sciences*, vol. 7(5), p. 383-395.

Mahadevan, N., Shivali., et Kamboj, P. (2009). *Hibiscus subdariffa* Linn. An overview. *Nat. Prod. Radiance*, vol. 8(1), p. 77-83.

Mahmoud, S.S et Croteau, R.B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, vol. 7(8), p. 366-373.

Mamadou, B. (2012). Étude Ethnobotanique, Phytochimique et Activités Biologiques de *Nauclea latifolia* Smith. Une Plante Médicinale Africaine Récoltée au Mali. Thèse de Doctorat. Université de Bamako. Mali, p. 92.

Martínez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and humandisease. *Biochimie*, vol.77, p. 147-161.

Mendiola, J.A., Herrero, M., Cifuentes, A. et Ibañez, E. (2007). Use of Compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A*, vol, 1152(1-2), p. 234-246.

Mensah, J.K., Golomeke, D. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of the extracts of the Calyx of *Hibiscus Sabdariffa* Linn. *Current Science Perspectives*, vol. 1(2), p. 69-76.

Mohamed, B.B., Sulaiman, A.A., et Dahab, A.A. (2012). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Sudan, Cultivation and Their Uses , *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci*, vol.1(6), p.48-54 .

Mohamed, I., Garbi, M.S., Saleh, A.M., Badri, I.T., Ibrahim, S.F., Mohammed, M.S., Alhassan, A.A., Elshikh., et Ahmed, S.K. (2016). Antibacterial activity, phytochemical screening and cytotoxicity of *Hibiscus sabdariffa* (calyx), *Advancement in Medicinal Plant Research*, vol. 4(4), p.116-121.

Mohammedi, Z. (2013). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud-ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. Université aboubekr Belkaid. Algérie, p. 170.

Morton, j.F. (1987). Roselle In *Fruits of Warm Climates*. Ed. CF. Dowding Ir. Media Inc. Greensboro, NC USA, p. 281-286.

Mostafa, B., Khalifa, M., Güney, K. (2018). GC-MS analysis of *Cedrus atlantica* var. *Pendula* (Carrière) Carrière, *International Journal of Trend in Research and Development*, vol. 5(4), p. 2394-9333.

Mounigan, P., et Badrie, N., (2007). Physicochemical and sensory quality of wines from red sorrel/ roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces: effects of pretreatments of pectolase and temperature/time, *Int. J. Food Sci. Technol*, vol. 2, p. 469-475.

Mpondo, E.M., Yinyang, J., et Dibong, S.D. (2015). Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, vol. 85(1), p. 7804-7823.

Muller, L., Gnoyke, S., Poopken,A.M., et Bohm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulation. *LWT- Food science Technology*, vol, 43(6), p. 992-999.

Muñoz, E., Alcamí, J., Gupta, M.P., et Feliciano, A.S. (2012). 3- Phenylcoumarins as Inhibitors of HIV-1 Replication, vol. 17(8), p. 9245– 9257.

Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D., Roussis, V. (2009). Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupanetriterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 123(1), p. 143-148.

Natarajan, A., Xiong, C.Y., Albrecht, H., Denardo, S.G., Sally, J., Deardo, G.L. (2005). Characterization of site-specific ScFv PEGylation for tumor-targeting pharmaceuticals. *Bioconjugate Chemistry*, vol. 16(1), p.113-121.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement. Wayne, Pennsylvania : NCCLS ; : document M100-S9, vol. 19. (1), Table 21.

Nicolas, M., et Daniel, C. (1998). Activités technologique en microbiologie – Technique de base et méthodologie. Editeurs CRDP d'aquitaine (Bordeaux), p. 152.

Niksic, L., Saudan, P., et Boeh, F.(2006). Anticoagulation chez l'insuffisant rénal, *Rev Med Suisse*, vol. 2, p. 586-92.

O

Ojeda, D., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., et Alvarez, I. (2010). Inhibition of angiotensin convert inenzyme (ACE) activity by the Anthocyanins delphinidin and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus Sabdariffa*. *Ethnopharmacol*, vol. 127, p. 7-10.

Ojeil, A., El Darra, N., El Hajj, Y., Mouncef, P.B., Rizk, T.J., et Maroun, R.G. (2010). Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin château KSARA. *Lebanese science journal*, vol. 11(2), p. 117-131.

Olaleye, M.T. (2007). Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 1(1), p. 9-13.

Oloyede, O. (2005). Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition* , vol. 4(6), p. 379-381.

Ortel, T.L., et Chong, B.H. (1998). New treatment options for heparin-induced thrombocytopenia. *Semin Hematol*, vol. 35, p. 26-34.

P

Paduch, M., Martyna, K.S., et Mariusz, NT.G.F. N (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, vol. 55(5), p.315-327.

Panizza, S. (1997). Plantas que curam: cheiro de mato.18. ed. São Paulo (IBRASA, IBRASA), p. 69-70.

Paul, H. (1995). *Hibiscus sabdariffa* L. Thèse de Doctorat de département de Pharmacie. Université rene Descartes paris. France.

Pelt, J.M. (1980). Les drogues, leur histoire et leurs effets. Edition Doin (Paris), p. 221.

Pengelly,A. (2004). The constituents of Medicinal Plants: An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. 2^{ème}Edition. CABI publishing, p. 184.

Pibiri, M.(2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. École polytechnique fédérale de Lausanne,Vaud (Switzerland), p. 161.

Popovici, C., Saykova, I., et Tylkowskib. (2010). Evaluation de l'activité antioxydantes composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de Génie Industriel, vol (4), P. 1- 8.

Q

Qi, Y., Chin, K.L., Malekian, F., Berhane, M., et Gager, J. (2005). Biological Characteristics, Nutritional and Medicinal Value of Roselle, *Hibiscus Sabdariffa*. CIRCULAR – Urban Forestry Natural Resources and Environment, No. 604 ,p. 604.

Qiang, D.Z., Shi, J.B., Song, B.A., et Liu, X.H. (2014). Novel 2H-chromen derivatives: Design, synthesis and anticancer activity, RSC Adv, vol. 4(11), p. 5607–5617.

R

Ribéreau-Gayon, P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris, p. 254.

Robert-Demuet, S. (1995). Méthodes de dilutions. In Antibiotiques et antibiogrammes, Montréal-Canada, p. 131-137.

S

Sablonnière, B. (2006). Réussir le BEP biologie microbiologie. Éditeur Ellipses.

Said, R. (2012). Caractérisation des propriétés pro-et anticoagulantes associées aux cellules musculaires lisses vasculaires. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine.

Samaké, E.S., Togola, I., Tounkara, F. (2020). Activité antioxydante *in vitro* des extraits des graines de *Hibiscus sabdariffa* L. récoltées dans quatre localités du Mali. International Journal of Applied Research, vol. 6(10), p. 557-560.

Sanogo, R. 2006. Le Rôle des Plantes Médicinales en Médecine Traditionnelle. Développement, Environnement et Santé. 10^{ème} école d'été de l'IEPF et SIFEE du 06 au 10 juin, p. 53.

Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B. et Villanueva-Cañongo, C. (2019). Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds, p. 1-15.

Sarkar, R., Hossen,M, Howlader, S.I, Rahman, A., et Dey, A.(2012). Anti-diarrheal, Analgesic and Anti-microbial activities of the plant Lalmesta (*Hibiscus sabdariffa* L.):A review .International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences,vol. 1(3), p. 1-11 .

Sarni-manchado, P., et Veronique,C. (2006). Les polyphénols en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Edition TEC et DOC. Paris (France),p .398.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, vol. 30(12), p. 3875-3883.

Sereme, A., Millogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., et Nacro, M. (2010). Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina Faso. Journal des sciences, vol. 10, p.24 -32.

Shafirany, M.Z., Indawati, I., Sulastri, L., Sadino, A., Kusumawati, A.H., et Alkandahri, M.Y. (2021). Antioxidant Activity of Red and Purple Rosella Flower Petals Extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). Journal of Pharmaceutical Research International, vol. 33(46), p. 186-192.

Sharma, O.P., et Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry, vol.113(4), p. 1202-1205.

Shruthi, V.H., Ramachandra, C.T., Nidoni, U., Sharanagouda, H., Nagaraj, N., et Kurubar, A.R. (2016). Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) As a source of natural colour, vol .16(2), p. 515-522.

Singleton, V.L., Orthofer, R., et Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent, Methods Enzymologie, vol. 299, p. 152.

Singleton, V.L., et Rossi, J.A.J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic –Phosphothungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, vol. 16, p. 144-158.

Škrovánková, S., Mišurcová, L., et Machů, L. (2012). Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. In: Henry. J(ed). Advances in Food and Nutrition Research. Academic press, vol. 67, p. 75-139.

Song, J.H., Kim, S.K., Chang, K.W., Han, S.K., Yi, H.K., et Jeon, J.G. (2006). In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Archives of Oral Biology, vol. 51(12), p. 1131-1140.

Song, J.M., Lee, K.H., et Seong, B.L. (2005). Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. Antiviral Research, vol. 68(2), p. 66-74.

Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., et Liu, X. (2004). Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. Crop. Protect, vol. 23(3), p. 243-247.

Sophie, A., et Eherhart, N. (2003), La phytothérapie se soigner par les plantes. Edition. Eyrolles, p. 192.

Stahlhut, S.G., Siedler, S., Malla, S., Harrison, S.J., Maury, J., Neves, A.R. et Forster, J. (2015). Assembly of a novel biosynthetic pathway for production of the plant flavonoid fisetin in *Escherichia coli*. Metabolic engineering, vol. 3, p. 84-93.

Suman, D. (2014). In vitro evaluation of phytochemical, antimicrobial and antioxidant activity of calyces of roselle (*hibiscus sabdariffa* L.). India. International journal of pharmaceutical sciences and research, vol. 5(8), p. 3364-3369.

T

Tela Botanica. (2014). Benoît Bock & al. Référentiel des trachéophytes de France métropolitaine, p. 11.

Thorington, R.W., Jr, et K.E. Ferrell. (2006). Squirrels: the animal answer guide. Johns Hopkins University press. Baltimore. Maryland, p.183.

Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., Hajlaoui, H. et Abdelly, C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. LWT - Food Science and Technology, vol. 43(4), p. 632-639.

Treki, A.S., Merghem, R., et Dehimat, L. (2009). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée: *Thymus hirtus*. Sciences et Technologie, vol. 29, p. 25-29.

Tuhami, E.H., et Ibrahim, A.A. (2020). Phytochemical Analysis, Antibacterial and antioxidant Activities of Essential Oil from *Hibiscus sabdariffa* (L) Seeds, (Sudanese Karkadi). progress in chemical and biochemical Research, vol. 3(3), p. 194-201.

V

Vansant, G. (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base. In Symposium « Antioxydants et alimentation ». Ed Institut Danone.

Vijay, P., Nivedita, B., Bellundagi, A. (2013). Ethanobotany and Qualitative Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants. International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, vol. 4, p. 59-63.

Vincken, J.P., Heng, L., de groot, A., et Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry, vol. 68(3), p. 275-297.

Vogler, A.E., Siedlecki, A.C. (2009). Contact activation of blood-plasma coagulation. Biomaterials, vol. 30, p. 1857-1869.

W

Waksmundzka-Hajnos, M., et Sherma, J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical science. Chromatographic Science Series, vol. 102, p. 477-478.

Wang, J.G., Anderson, R.A., Graham, G.M., Chu, M.C., Sauer, M.V., Guarnaccia, M.M., et Lobo, R.A. (2007). The effect of cinnamon extract on insulin resistance parameter in polycystic ovary syndrome: a pilot study. Fertil Steril, vol. 88, p. 240-243.

West, C. (2010). Caractérisation et classification de systèmes chromatographiques. Habilitation à Diriger des Recherches –Orléans : Université d'Orléans.

Wu, H. (2007). Isolation and characterization of natural products from ginger and *Allium ursinum*. Proquest Edition, p. 28.

Y

Yala, D., Merad, A.S., Mohamedi, D., et OuarKorich, M.N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb, vol. 91, p. 5.

Yang, L., Gou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zhang, B., et Wu, X. 2012. Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) African Journal of Biotechnology, vol. 11(17), p. 4063-4068.

Yazaki, K., Arimura, G., Ohnishi, I., et Hidden, T. (2017). Terpenoids in Plants: Their Biosynthesis, Localization and Ecological Roles. Plant Cell Physiol, vol. 58(10), p. 1615-1621.

Z

Zahoui, S., Zirihi, N., Soro, Y., Traore, F. (2010). Effet hypotenseur d'un extrait infusé de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Waterman (Rutaceae). Phytothérapie, vol. 8, p. 359-369.

Zeghad, N. (2009). Étude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister (Ecole doctorale). Université Mentouri Constantine, p. 18.

Zhu, B., et Stülke, J. (2018). SubtiWiki in 2018: From genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, vol. 46, p.743- 748.

Zlotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M.,et Świeca, M. (2016). The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi journal of biological sciences*, vol. 23(5), p. 628-633.

Annexes

Annexe 01 : Matériel de laboratoire

Appareillage



Spectrophotomètre



Vortex



Balance



Rotavapeur



Etuve



Balance de précision



Plaque chauffante



Coagulomètre



Centrifugeuse



Micro-onde



Bec Benzène



Autoclave



Agitateur mécanique

Matériel et Verreries

Flacons, béchers, erlenmeyers, entonnoirs, tubes à essai, Papier filtre, barreau magnétique, spatules, pipettes, Portoirs, verres de montre, micros pipettes, boîtes de Pétri en verre, boîtes de Pétri en plastique, pipettes graduées, parafilme, papier aluminium.

Produits chimique et réactifs

Méthanol, Ethanol, Acide gallique, Folin Ciocalteu, Iodure de potassium, Iode, Acide chlorhydrique (HCl), Hydroxyde d'ammonium, acétate d'éthyle, Alcool chlorhydrique, Copeaux de magnésium, Chlorure ferrique (FeCl_3), liqueur de Fehling, KOH, NaOH, NH_4OH , H_2SO_4 , , Anhydride acétique, Chloroforme, Carbonate de sodium, DPPH, Céphaline kaolin, Chlorure de calcium, Thromboplastine calcique.

Annexe 02 : Préparation des réactifs

- **Réactif de MAYER**

Chlorure de mercure 1,36 g.

Iodure de potassium..... 5 g.

Eau distillée qsp 100 ml.

- **Réactif de WAGNER**

Chlorure de mercure 1,36 g.

Iodure de potassium..... 5 g.

Eau distillée qsp 100 ml.

- **Chlorure ferrique FeCl₃ (1%)**

Chlorure ferrique 1g.

Eau distillée 100 ml.

- **Chlorure ferrique FeCl₃ (2%)**

Chlorure ferrique 2 g.

Eau distillée 100 ml.

- **Hydroxyde de sodium NaOH (1%)**

Hydroxyde de sodium 0,5g.

Eau distillée 50 ml.

- **Hydroxyde de sodium NaOH (2%)**

Hydroxyde de sodium 0,1g.

Eau distillée 5ml.

- **Hydroxyde de sodium NaOH (10%)**

Hydroxyde de sodium 0,5g.

Eau distillée 5ml.

Annexe 03 : Quelques données sur les bactéries et champignon étudiées

Escherichia coli : est un bacille à Gram négatif aérobie-anaérobie facultatif appartenant à la famille des *entérobactéries* (*Enterobacteriaceae*) qui colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (**King et al., 2014**).

Bacillus subtilis : une bactérie à Gram positif ubiquitaire du sol. Cette bactérie possède l'avantage d'avoir un génome entièrement séquencé, et est facile à manipuler génétiquement, ce qui favorise la compréhension des gènes impliqués dans la formation de biofilm (**Zhu et Stülke, 2018**).

Pseudomonas aeruginosa : Bacille aérobie, Gram négatif et très mobile grâce à un flagelle polaire. Il est de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales (germe ubiquitaire). C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement.

Staphylococcus aureus : est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae* (Becker *et al*, 2004). Il a un diamètre d'environ (0,5 à 1,5 μm), est immobile, asporulé et facultativement anaérobique il est habituellement disposé en grappes. De nombreuses souches produisent des entérotoxines staphylococciques, et font partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau (Kluytmans *et al*, 1997; Le Loir, 2003; Benhamou *et al*, 2005).

Souches bactériennes



Figure 1: *staphylococcus aureus*

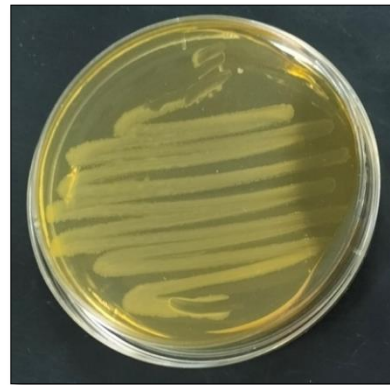


Figure 2: *Escherichia coli*

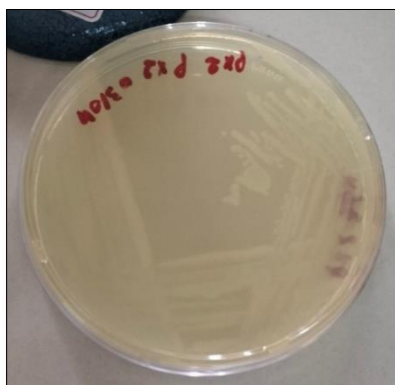


Figure 3 : *Pseudomonas aeruginos*



Figure 4: *Bacillus Subtilis*

Fusarium Oxysporum

Fusarium oxysporum est une espèce de champignons ascomycètes de la famille des *Nectriaceae*. Comme c'est le cas de tous les *Fusarium*, il s'agit de la forme de reproduction asexuée d'un ascomycète, mais son téléomorphe est inconnu.

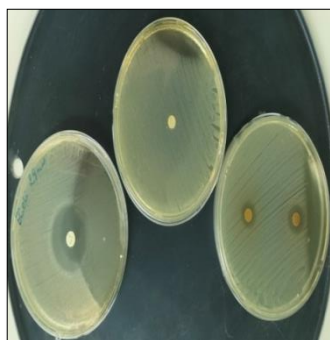
L'espèce *Fusarium oxysporum* existe sous de nombreuses formes spéciales. Selon Bouth (1971), cette espèce posséderait 77 formes parasites attaquant aussi bien des plantes annuelles (cotonnier, lin, tomate, pois, melon), que des plantes pérennes comme le bananier, le palmier à huile et le palmier dattier.



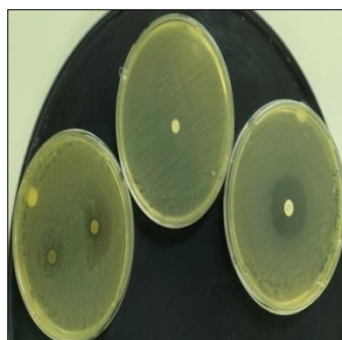
Figure 5: *Fusarium Oxysporum*

Annexe 04 : Résultats

- Résultats d'activité antimicrobienne



A



B

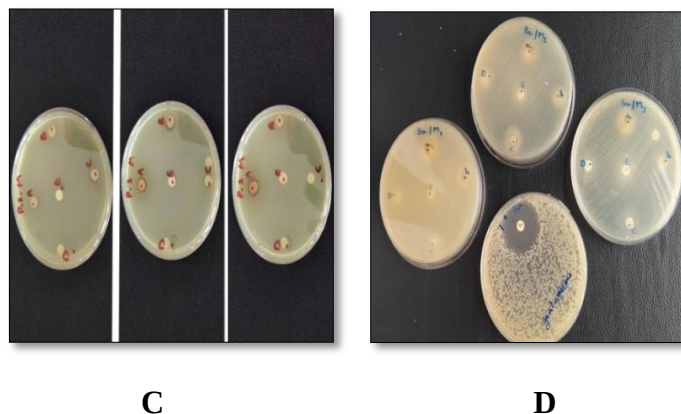


Figure 6 : Effet antibactérien exercé par les différentes dilutions de l'extrait hydro-méthanolique sur les quatre souches étudiées: **A :** *Escherichia coli*, **B:** *Staphylococcus aureus*, **C:** *Pseudomonas aeruginosa*, **D:** *Bacillus Subtilis* .

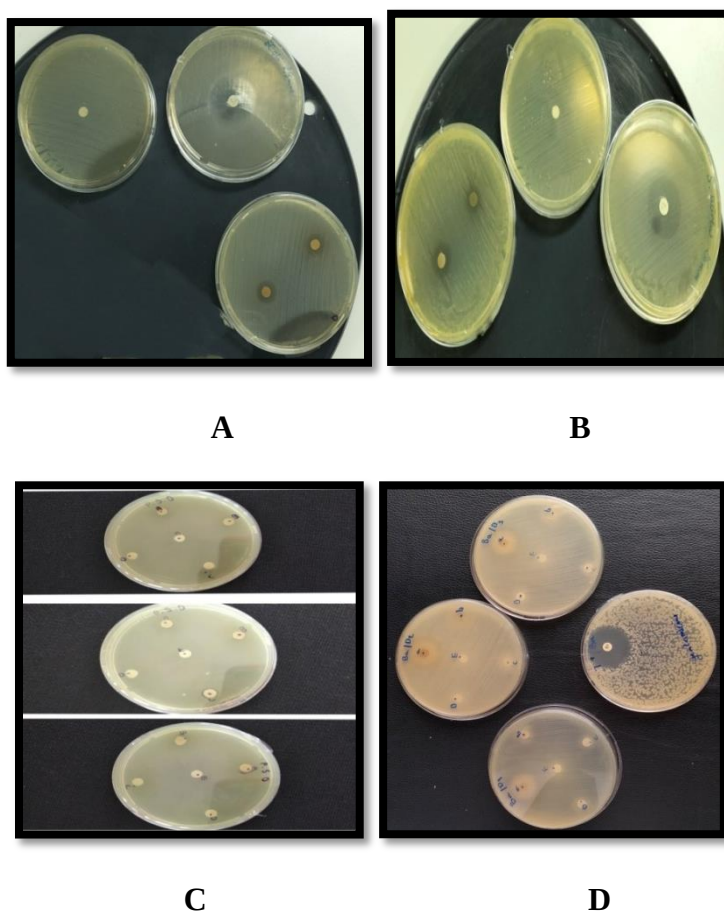


Figure 7 : Effet antibactérien exercé par les différentes dilutions de l'extrait de l'infusion sur les quatre souches étudiées: **A:** *Escherichia coli*, **B:** *Staphylococcus aureus*, **C:** *Pseudomonas aeruginosa*, **D:** *Bacillus Subtilis*.