



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2023

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV **Filière : Sciences Biologiques**

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

GRAZEM Soumia & BELHOUT Kahina

Thème

Etude des activités biologiques de la karkadé (*Hibiscus sabdariffa*)

Soutenu le : 02 /07/2023

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>IMESSAOUADENE Ali</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>CHERGUI Achour</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>LEBDIRI Farid</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciement

*Nos remerciements les plus profonds et inexprimables, s'adressent avant tout à ALLAH le tout puissant, de nous avoir accordé la force, la santé et le courage afin de pouvoir accomplir ce modeste travail. Nous tenons à adresser nos très sincères remerciements à l'encadreur Mr. **CHERGUI Achour** pour son encouragement, sa disponibilité, sa patience, son soutien tout au long de l'élaboration de ce mémoire.*

*Nous remercions aussi Mr. **IMESSAOUADENE Ali** qui m'a fait l'honneur de présider le jury de mémoire ainsi que Mr. **LEBDIRI Farid** d'avoir accepté d'examiner le contenu du présent mémoire.*

Nous remercions également le chef de département de biologie et tous les enseignants du département pour tout le savoir qu'ils nous ont donné durant notre cursus universitaire.

Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près, ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à Tous...

Dédicace

Ce projet de fin d'étude est dédié à ma chère mère qui m'a arrosé de tendresse depuis ma naissance et qui m'a nourrit d'espoirs. À mon père qui n'a jamais cessé de me guider vers tous ce qui bon dans la vie, m'a appris à supporter les épreuves en m'encourageant et en me soutenant sans cesse.

C'est avec un grand plaisir que je dédie cet œuvre à mes chers frères et mes belles sœurs pour leur appui moral et pour leur amour fraternelle à mon égard.

Je dédie cet accomplissement à mes proches pour leurs encouragements permanents et leurs aides précieuses, et pour leur gentillesse.

Je dédie ce modeste travail à mes amis que j'ai connus depuis mon parcours scolaire jusqu'à ce jour et qui m'ont toujours motivée.

Que mes professeurs et mes camarades de la promotion de master II (2023) en biochimie trouvent tous ici l'expression de ma reconnaissance.

*Je ne saurais oublier mon binôme **Kahina**, qui m'a accompagné durant les périples et pendant les bons et les mauvais moments de ces derniers mois.*

Soumia

Dédicace

Quoi que de plus que de pouvoir partager les bons moments de sa vie avec les êtres qu'on aime. Arrivé au terme de mes études, C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail :

A mon très cher grand père je vous souhaite une longue vie et une bonne santé.

*À l'amour de mon cœur et à la fontaine de tendresse, ma deuxième maman **Zohra**, pour ses sacrifices et sa prière pour moi et qu'elle était le secret de mon succès. Ma très chère mère **Leila** et ma tante **Cherifa**, Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous mérites pour tous les sacrifices que vous n'as cessé de me donner depuis ma naissance, vous présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*Mon cher père **Said**, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que ce travail traduit ma gratitude, je ne te remercierai jamais assez.*

Je dédie aussi ce travail à mes chères sœurs et frères.

À mes chères amies qui m'a soutenu dans mes jours les plus difficiles et n'a jamais quitté ma main qui m'a toujours donné la force, la confiance et l'amour merci d'être là.

*À mon cher binôme **Soumia**, ainsi que sa famille.*

Kahina

Sommaire

Titre	page
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Partie bibliographique	
<i>Chapitre I : Etude botanique</i>	
I. La plante <i>Hibiscus sabdariffa</i>	2
I.1.La famille des malvacées.....	2
I.2.L'espèce <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	2
I.2.1.Généralités	2
I.2.2.Dénomination.....	3
I.2.3.Caractéristiques botaniques de la plante.....	3
I.2.3.1.Tiges	3
I.2.3.2.Feuilles.....	4
I.2.3.3.Calices.....	4
I.2.3.4.Graines.....	4
I.2.3.5.Fruits	5
I.2.3.6.Fleurs.....	5
I.2.4.L'écologie.....	6
I.2.5.Origine et répartition géographique.....	6
I.2.6.Culture.....	6
I.2.7.Classification.....	7
<i>Chapitre II : Composition et principales utilisations</i>	
I. Composition nutritionnelle des différentes parties de la plantes d' <i>H. sabdariffa</i>	
L.....	9
I.1.Les calices.....	9
I.2.Les graines.....	9
I.3.Les feuilles.....	10
II. Phytochimie d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	11
III. Domaines d'utilisation d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	13
III.1.Utilisation alimentaire.....	13

III.1.1.Calices.....	13
III.1.2.Graines.....	14
III.1.3.Feuilles.....	15
III.2. Utilisation médicinale.....	15
III.3.Utilisation traditionnelle.....	16

Chapitre III : Les activités biologiques d’Hibiscus sabdariffa

I. Les activités biologiques d’Hibiscus sabdariffa.....	17
I.1.Activité antimicrobienne.....	17
I.2.Activité anticancéreuse.....	17
I.3.Activité anti obésité.....	18
I.4.Activité anti anémique.....	18

Partie pratique

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal.....	19
I.1.Collection du matériel végétal	19
II. Broyage et tamisage.....	19
III. Préparation de l’extrait.....	19
III.1.Objectif	20
III.2.Macération	20
III.2.a. Principe	20
III.2.b. Protocole.....	20
IV. Etude phytochimique d’ <i>Hibiscus sabdariffa</i>	21
IV.1.Analyse quantitative des composés phénoliques.....	21
IV.1.1.Dosage des polyphénols totaux (PPT) par colorimétrie.....	21
IV.1.1.a.Principe.....	21
IV.1.1.b.Mode opératoire	22
IV.1.2.Dosage des Flavonoïdes (FV) par le trichlorure d’aluminium.....	22
IV.2.Dosage des protéines.....	23
IV.2.1.Principe.....	23
IV.2.2.Protocole.....	23
V. Méthodes de dosage de l’activité antioxydante <i>in vitro</i>	24
V.1.Le test de piégeage du radical DPPH.....	24
V.1.a. Principe	24

	V.1.b.Protocole.....	25
VI.	Activité inhibitrice des protéases digestives (trypsine).....	25
	VI.1.Principe.....	25
	VI.2.Solution de trypsine.....	25
	VI.3.Solution de substrat.....	26
	VI.4.Procédure	26
VII.	Evaluation de l'activité hypoglycémiante <i>in vitro</i> de la plante d' <i>Hibiscus</i> <i>sabdariffa</i>	26
	VII.1.Effet d'extrait sur l'absorption du glucose par la levure.....	26
	VII.1.1.Préparation de la suspension de levure.....	26
	VII.1.2.Absorption et dosage de glucose.....	26
VIII.	Application d'extrait naturel d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> (décoction) dans la conservation des aliments et évaluation de qualités organoleptiques.....	27
	VIII.1.Préparation de l'extrait	27
	VIII.2.Echantillonnage	27
	VIII.3.Préparation des échantillons	28
	VIII.4.Analyse physico-chimique	28
	VIII.4.1. Mesure du potentiel d'hydrogène (pH)	28
	VIII.4.1.a.Mode opératoire.....	28
Résultats et discussion		
I.	Etude phytochimique d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	29
	I.1.Analyse quantitative des composés phénoliques.....	29
	I.2.Dosage des protéines.....	30
II.	Evaluation de l'activité antioxydante.....	31
	II.1.Activité antiradicalaire DPPH.....	31
	II.2.Détermination des IC50.....	33
III.	Activité inhibitrice de trypsine.....	35
IV.	Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antidiabétique de l'extrait d' <i>Hs</i>	38
	IV.1.Effet d'extrait d' <i>H. sabdariffa</i> sur l'absorption du glucose par la levure.....	38
V.	Application d'extrait naturel d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> (décoction) dans conservation des aliments et évaluation de qualités organoleptiques.....	41
	V.1.pH	41
	V.2.Qualités organoleptiques	42

Conclusion 44

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

Akt	: Protéin kinase B ou PKB
BBC	: Coomassie brillant bleu ou bleu de Coomassie brillant
BSA	: Bovine serum albumin
CEI	: Cellules Epithéliales Intestinales
DO	: Densité optique
DPPH	: 2,2-DiPhenyl-1-Picryl Hydrazyl
EAEC	: <i>E. coli</i> Entéroagrégate
EAG	: Equivalent en acide gallique
EHS	: Extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>
EQ	: Equivalent en quercétine
EOR	: Espèces réactives de l'oxygène
ERK	: Extracellular signal-regulated Kinase
FCR	: Folin-Ciocalteu reagent
FV	: Flavonoïdes
GR	: Globules rouges
HDL	: High density lipoproteins
Hs	: <i>Hibiscus sabdariffa</i>
IC50	: Concentration inhibitrice 50
IFNγ	: Interféron γ
IP	: inhibiteurs de protéases
LDL	: Low density lipoprotein
MICI	: Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
pH	: Potentiel hydrogène
PI	: Pourcentage d'inhibition
PI3-K	: Phosphoinositide 3-kinase
Pic	: Protease Involved in colonisation
PPT	: Polyphénols totaux
SCI	: Syndrome du Côlon Irritable
SGLT1 et GLUT2	: Transporteurs de glucose
TG	: Triglycérides
TNFα	: Tumor Necrosis Factor α
UV-VIS	: Ultraviolet-Visible

Liste des figures

N° de figure	Page
Figure 1 : La plante d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L	3
Figure 2 : Différentes sections de la plante <i>Hibiscus sabdariffa</i>	4
Figure 3 : Les graines d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> obtenue manuellement	5
Figure 4 : Partie calice et fruit	5
Figure 5 : La fleur d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	6
Figure 6 : Les fleurs d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> (Mars 2023)	19
Figure 7 : Différentes étapes de préparation de l'extrait éthanolique d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	21
Figure 8 : Différentes étapes du dosage des polyphénols totaux (PPT) d'extrait éthanolique	22
Figure 9 : Différentes étapes du dosage des flavonoïdes (FV) d'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	23
Figure 10 : Différentes étapes du dosage des protéines d'extrait d' <i>Hs</i> par la méthode de Bradford	24
Figure 11 : Réaction chimique de transformation du radical DPPH* en DPPH	24
Figure 12 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes d'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> (les valeurs représentent la moyenne \pm écart-types)	29
Figure 13 : Dosage des protéines d'extrait éthanolique d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	31
Figure 14 : Graphique d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration EHS	32
Figure 15 : Graphique d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration d'Acide ascorbique	32
Figure 16 : Histogramme des IC50 de EHS et standard obtenu par test DPPH	34
Figure 17 : Effet d'EHS sur l'activité inhibitrice de trypsine	36
Figure 18 : Effet de l'extrait éthanolique d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> à 1,5mg/ml sur l'absorption de glucose par les cellules de levure	39
Figure 19 : Courbes représentant la variation du pH du jus dans différentes conditions pendant le temps de conservation	41

Liste des tableaux

N° de tableau		Page
Tableau I	: Classification d'espèce <i>Hs</i> selon (APG III)	7
Tableau II	: Classification de l'espèce <i>Hibiscus sabdariffa</i> selon Vasavi et al, 2019	8
Tableau III	: La valeur nutritionnelle des feuilles d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	10
Tableau IV	: La composition de l'extrait aqueux de calice d' <i>H. sabdariffa</i>	12
Tableau V	: Teneurs polyphénoliques de certains extraits d' <i>Hs</i>	13
Tableau VI	: Concentration des protéines dans le milieu réactionnel à différentes concentrations d'extrait éthanolique d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> pour l'évaluation de l'activité inhibitrice de trypsine	35
Tableau VII	: L'absorption du glucose par les cellules de levure en présence d'extrait	38
Tableau VIII	: Tableau résumant les résultats de l'analyse du pH de jus en présence et en absence d'extrait végétaux d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	41
Tableau IX	: Résultats de l'analyse organoleptiques préliminaire de jus	42
Tableau X	: Tableau résumant les résultats de l'analyse de la couleur du jus en présence d'extrait d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	43

Introduction

Introduction

Les thérapies qui exploitent le pouvoir extraordinaire des plantes pour traiter les maladies humaines existent depuis de nombreuses années et ont évolué au cours de l'histoire humaine. Le criblage de sources naturelles pour de nouveaux agents pharmacologiques actifs a permis de découvrir un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle important dans le traitement de nombreuses maladies humaines (Gurib-Fakim, 2006).

L'utilisation du règne végétal est profondément ancrée dans notre culture, car l'Algérie est connue pour sa riche flore médicinale, qui comprend des centaines d'espèces végétales (Ait youcef, 2006). De plus, il possède le savoir-faire éprouvé depuis longtemps par nos ancêtres. Dans le même temps, toutes les cultures et civilisations de l'Antiquité à nos jours se sont entièrement ou partiellement appuyées sur les plantes médicinales en raison de leur efficacité, de leur accessibilité, de leur disponibilité, de leur faible toxicité et de leur acceptabilité (Akharaiyi et Boboye, 2010).

Les métabolites secondaires des plantes sont définis comme des molécules indirectement importantes pour la vie végétale. Autrement, les plantes médicinales sont basées sur ces molécules actives pour leur rôle pharmacologique, couplées à la difficulté de leur production. Chez l'être humain, ces oligo-éléments créent un rôle important en affectant directement sur la qualité nutritionnelle des légumes et même des fruits et ensuite sur la santé de consommateur (action antimicrobienne, protection contre le développement de certain type de cancers, antioxydant etc.) (Herzi, 2013 ; Cowan, 1999).

L'objectif de la présente étude consiste à doser les composés phénoliques de plante médicinale largement utilisée à savoir *Hibiscus sabdariffa* et évaluer leurs activités biologiques *in vitro*.

Notre travail est structuré en deux parties : La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur l'espèce d'*Hibiscus sabdariffa*. La deuxième partie est réservée à une étude expérimentale *in vitro* qui consiste à une analyse phytochimique quantitative d'extrait, tester l'effet d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* sur l'activité antioxydant, l'inhibition des protéases digestives, évaluer le pouvoir d'augmentation d'assimilation du glucose par les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et tester l'efficacité de l'extrait sur la conservation du jus naturel.

Partie

bibliographique

Chapitre I

Etude

botanique

I. La plante *Hibiscus sabdariffa*

I.1. La famille des malvacées

Les Malvacées sont des plantes dicotylédones, dialypétales thalamiflores, méristémones. C'est une famille cosmopolite mais présente surtout dans les régions tropicales chaudes, bien que des représentants des Malvacées se trouvent dans les régions tempérées. Par conséquent, le nombre de Malvacées diminue progressivement au fur et à mesure que l'on va vers le nord. Les Malvacées peuvent être des plantes herbacées ou des arbustes. Les feuilles sont déposées de manière alternative et possèdent des organes foliaires appelés stipules. Les fleurs se composent de 5 pétales fusionnés, sont généralement solitaires, unisexuées ou bisexuelles. Le fruit est une capsule ou une noix. Les tiges contiennent des conduits muqueux. La famille des Malvacées constitue une vaste variété de plantes à fleurs qui compte un peu plus de 240 genres et plus de 4200 espèces distinctes, parmi lesquelles on peut citer l'*Hibiscus*, *Guimauve*, *Tilleul*, *Baobabs*, cacao et le coton (Flores, 2011).

I.2. L'espèce *Hibiscus sabdariffa* L

I.2.1. Généralités

Il existe une grande variété d'espèces d'*Hibiscus*, elle décompte plus de 300 espèces qui sont présentes dans les zones subtropicales et tropicales à travers le monde. L'espèce d'*Hibiscus sabdariffa* est très utilisée dont on peut exploiter différentes parties : les fleurs, les feuilles, les racines, les calices (la partie la plus importante de la plante, utilisée pour la nourriture, la teinture et les boissons) et les tiges. Certaines variétés de cette plante sont cultivées pour leur beauté ornementale (Shruthi et al, 2016).

Ainsi, recommandé contre les maladies cardiovasculaires, mais aussi comme un antiseptique urinaire. Les fleurs et les calices sont également connus pour des propriétés antiseptiques, la toux est soulagée par les racines, ainsi dans les aliments, généralement les calices épais rouges sont utilisés pour préparer des confitures, boisson, thé, bien que dans les pâtisseries... (Al-Hashimi, 2012).



Figure 1 : La plante d'*H. sabdariffa* L (Chikhoun, 2019).

I.2.2. Appellation

▪ Nom Scientifique	:	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L
▪ Arabe	:	الكردية
▪ Française	:	Oseille de Guinée
▪ Anglaise	:	Roselle
▪ Mexiquaine	:	La flore de Jamaïque
▪ Africaine	:	Karkadé, Bissap
▪ Thaïlandaise	:	Kra-chiap
▪ Allemande	:	Rosellahan
▪ Autres appellations	:	Thé rose, ou de l'Empire (Vasavi et al, 2019)

I.2.3. Caractéristique botanique de la plante

La plante *H. sabdariffa* L pousse grâce à un système racinaire profond, qui peut mesurer entre 0,5 à 3 mètres de hauteur (Ismail et al, 2008), robuste, très filamenteux, ramifiée rarement avec de tiges cylindriques rouges de type lisse ouvertes et des calices comestibles de couleur rougeâtre ou jaunâtre clair. De plus, elle possède une racine pivotante qui pénètre profondément dans le sol (Shruthi et al, 2016).

I.2.3.1. Tiges

Les tiges peuvent être uniformément lisses ou presque lisses, de forme cylindrique, glabres ou légèrement pubescentes, et parsemées de petites épines en peu de fois. Ils sont de couleur variant du verdâtre foncé au rougeâtre (Vasavi et al, 2019).

I.2.3.2. Feuilles

Les feuilles supérieures d'*Hibiscus sabdariffa* sont simples alors que celles inférieures sont profondément lobées, pouvant atteindre 3 à 5, voire 7 lobes avec des bords étouffés avec des rouges nervures. Les feuilles sont habituellement disposées en alternance sur la tige, mesurant entre 7,5 et 12,5cm de long et arborant une teinte vert rougeâtre ou rouge-violet (Clydesdale et al, 1979).

I.2.3.3. Calices

Les calices sont la partie florale qui subsiste après la chute des pétales, il peut être rouge ou blanc composé de 5 sépales de grand taille avec un collier appelé epicalyx formée de 8 à 12 bractées fines et aiguës autour de la base, en fin de journée il commence à se dilater. Pouvant atteindre une longueur de 3,2 à 5,7cm et enveloppe intégralement le fruit (Omobuwajo et al, 2000 ; Clydesdale et al, 1979).



Figure 2 : Différentes sections de la plante *Hibiscus sabdariffa* (Endrias et al, 2006 ; Cisse et al, 2009).

I.2.3.4. Graines

Les graines sont en forme de rein, recouvertes de petits poils étoilés et résistants, mesurant de 3 à 5mm de longueur et pouvant atteindre jusqu'à 7mm, généralement de couleur brun clair et sont ovoïdes (Marschner, 1995 ; Shruthi et al, 2016 ; Omobuwajo et al, 2000).



Figure 3 : Les graines d'*Hibiscus sabdariffa* obtenue manuellement (Ismail et al, 2008).

I.2.3.5.Fruits

Le fruit est une capsule veloutée ovoïde de 1,25 à 2cm de long, verte à l'état immature (Shruthi et al, 2016), composé de 5 valves, chacun constituée de 3 fines couches, dans la partie interne ils sont lisses, par contre dans la partie externe ils sont hérissées avec poils fins et pointus. Les graines sont contenues dans la capsule, chaque valve contenant 3 à 4 graines (Paul, 1995).



Figure 4 : Partie calice et fruit (Cisse et al, 2009 ; Chikhoun, 2019).

I.2.3.6.Fleurs

L'éclosion de la fleur se produit sur les branches qui se trouvent en dessous des feuilles. Elle peut mesurer jusqu'à 12,5 cm de diamètre, est dotée d'une teinte jaunâtre et d'un centre de couleur rose ou marron et devient rose avec le coucher de soleil. La floraison se produit tard le matin et se termine tôt l'après-midi (Vasavi et al, 2019).



Figure 5 : La fleur d'*Hibiscus sabdariffa* (Cisse et al, 2009 ; Mohamed et al, 2012).

I.2.4.L'écologie

La cueillette de la roselle nécessite de trois à quatre mois pour atteindre la phase de maturation, elle apprécie un environnement tropical avec une pluviométrie variant de 1500 à 2000 mm par an. Cette espèce peut supporter des conditions climatiques plus chaudes et humides avec une température nocturne minimale de 21°C. De plus, elle nécessite 13 heures d'ensoleillement pendant les premiers mois de croissance pour éviter une floraison prématurée (Brouk, 1975).

I.2.5.Origine et répartition géographique

La roselle est réponde dans la plupart des pays chauds comme la Malaisie, l'Arabie saoudite, l'Inde, Thaïlande, Philippines, Vietnam, le Soudan et le Mexique. Actuellement, elle se pousse dans les régions surtout humides. Elle est courante notamment dans les zones d'Afrique centrale et occidentale surtout la savane en Afrique tropicale. L'origine de la roselle est incertaine, bien que certains pensent que son pays d'origine est l'Inde et le royaume saoudite. Elle est fréquemment observée comme une plante qui a échappé des cultures. Toutefois, des échantillons d'*Hibiscus sabdariffa* L qui semblent véritablement sauvages qui sont collectés aux régions de l'Afrique central (Ghana, Niger, Nigeria et Angola) (Clydesdale et al, 1979 ; Abu-Tarboush et al, 1997 ; Ismail et al, 2008).

I.2.6.Culture

L'*Hibiscus* est relativement rustique et pousse bien dans la plupart des sols. Les climats tropicaux humides sont les climats favorables d'*Hibiscus Sabdariffa*. Pour ensemer 1 hectares, environ 5 à 8kg de graines sont nécessaires. La germination des graines nécessite un

minimum de température de 10°C, mais l'idéale température pour le développement des plantes varié entre 20 et 35°C avec 130 à 260 mm de précipitations pendant les 3 à 4 premiers mois de croissance. Le pH du sol optimal pour une bonne croissance varie entre 5 et 6, les sols sableux ou terreux sont les meilleurs pour la culture. La floraison d'*Hibiscus* est mieux pendant les jours courts (octobre et février). Il faut 120 à 180 jours pour que le calice rouge vif se révèle. Après la chute des fleurs les calices rouges charnus sont récoltés (Schoeneberger, 1998 ; Endrias, 2006).

I.2.7. Classification

Le tableau suivant montre le classement phylogénétique APG III d'*H. sabdariffa* : (APG III, 2009)

Tableau I : Classification d'espèce *Hs* selon (APG III).

Règne	Archéplastides
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédonesvraies
Clade	Noyau des Dicotylédonesvraies
Clade	Rosidées
Clade	Malvidées
Ordre	Malvales
Famille	Malvacées
Sous-famille	Malvoïdées
Genre	<i>Hibiscus</i>
Espèce	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L

Et selon Vasavi et al (2019), l'espèce *Hibiscus sabdariffa* est arrangée selon le tableau ci-dessus :

Tableau II : Classification de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* selon Vasavi et al, 2019.

Domaine	Eucaryotes
Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédones
Ordre	Malvales
Famille	Malvacées
Genre	<i>Hibiscus</i>
Espèce	<i>Hibiscus sabdariffa</i>

Chapitre II

Composition
et principales
utilisations

I. Composition nutritionnelle des différentes parties de la plantes d'*H. sabdariffa* L

Les calices et les graines sont les parties les plus importantes et les plus exploitées et comestibles dans la plante d'*Hibiscus sabdariffa*. La composition nutritionnelle d'*Hibiscus sabdariffa* frais varie d'une étude à l'autre, probablement en raison des différentes variétés génétiques, environnementales, écologiques et même des conditions de récolte de la plante (Da-Costa-Rocha et al, 2014).

I.1.Les calices

Les calices d'*Hibiscus sabdariffa* sont riches en acides organiques comme l'acide oxalique, succinique (les deux acides représentent des proportions de 76% des acides organiques en total), l'acide malique, tartrique et une concentration dominante d'acide ascorbique. Il est noté que chaque 100g de calices frais contiennent : 2.85µg de vitamine D, 0.04mg de thiamine et 0.6mg de vitamine B2 (Wong et al, 2002).

Le glucose, le fructose et le saccharose sont les sucres les plus abondants dans la partie calice d'*His*. Le glucose, est le sucre essentiel, occupe 40% des sucres totaux. L'analyse des composants minéraux de calice d'*His* montre une grande variabilité par rapport aux teneurs maximales autorisées dans l'alimentation humaine, selon la zone géographique de production. Ces calices contiennent des oligoéléments, comme le chrome et le cuivre, ainsi d'autres composants à savoir : pectines, polyphénols, carotènes et même de fibres (Wong et al, 2002).

I.2.Les graines

Les éléments contenus dans les calices d'*His* sont également présents dans les graines, bien que les teneurs soient généralement élevées dans les graines que dans les calices. Les graines d'*H. sabdariffa* contiennent de très fortes concentrations de protéines (26%), de lipides (20%) et de sucres totaux (40%). Les glucides sont constitués de saccharose, glucose et d'amidon en quantité moyenne de (17,6 ; 4 et 16,1) g/100g respectivement de graines entières fraîches. Ils sont donc une excellente source de protéines et de lipides (El-Adawy et al, 1994).

Les principaux acides aminés présents dans les graines sont : 22% d'acide glutamique, 18% de glycine et 11% d'acide aspartique. Il contient de façon minoritaire d'autres acides aminés à savoir : 7% de leucine, 5% de phénylalanine et 4% de thréonine (El-Adawy et al, 1994).

Les graines d'*Hs* sont riches en huile avec une concentration de 20%. L'huile de graines brute à un couleur jaune verdâtre connue pour sa composition idéale en matières grasses représente plus de 70% d'acide gras insaturés. L'acide linoléique est le plus courant (39%), ensuite 31% d'acide oléique. 21% d'acide palmitique est également l'acide gras saturé le plus fréquent, et enfin 6% d'acide stéarique ainsi que l'acide arachidonique (El-Adawy et al, 1994).

I.3. Les feuilles

Les feuilles d'*H. sabdariffa* sont riches en lipides, protéines, une quantité d'eau et certains éléments minéraux connus comme source important de magnésium, calcium, zinc et de (Endrias, 2006 ; Cisse et al, 2009).

La plante de roselle est très riche en minéraux tels que le potassium et le magnésium ainsi que certaines vitamines comme la vitamine B3, vitamine B6 et la vitamine C (Shruthi et al, 2016).

Tableau III : La valeur nutritionnelle des feuilles d'*Hibiscus sabdariffa* (Da-Costa-Rocha et al, 2014).

<i>Composant</i>	<i>Feuilles (100g)</i>
Protéines	3,3g
Matières grasses	0,3g
Glucides	9,2g
Phosphore	214mg
Fer	4,8mg
La thiamine	0,45mg
Acide ascorbique	54mg

II. Phytochimie d'*Hibiscus sabdariffa* L

Les propriétés chimiques d'*H. sabdariffa* montre des niveaux assez élevées en acide 3,4-dihydroxybenzoïque et en anthocyanes. Les calices séchés sont riches en flavonoïdes, gossypétine (flavonols), hibiscétine, sabdarétine, des petites quantité de delphinidine, chrysanthénine et myrtilline. Le lycopène et la β -carotène occupent aussi des teneurs non négligeables de matière fraîche de calice d'*Hs* de 164,3 μ g par 100g et 1,9mg par 100g respectivement, également des mucilages et des pectines. L'acide citrique, tartrique et l'acide malique représentent des quantités importantes en acides organiques. La concentration de ces dernières diminue quand la plante se mature (Shruthi et al, 2016).

Les calices rouges d'*Hs* est également riches en anthocyanes, la teneur atteint jusqu'à 1,5g d'anthocyanes pour 100kg de calice sec, ce qui est comparable à la mûre et plus que la majorité des autres plantes consommable. Le tocophérol présent dans les graines d'*Hs* et représente une excellente source des antioxydants. La delphinidine 3-sambubioside et la cyanidine 3-sambubioside sont les anthocyanes qui ont été identifiés dans les différents cultivars d'*Hs*. L'anthocyane responsable de la teinte rougeâtre ou violâtre de calices est l'hibiscine. Les principaux constituants d'*H. sabdariffa* pertinents dans le cadre de sa pharmacologie sont les acides organiques, les anthocyanes, les polysaccharides et les flavonoïdes, ainsi que les extraits d'*H. sabdariffa* contiennent un pourcentage élevé d'acides organiques (Da-Costa-Rocha et al, 2014).

Tableau IV : La composition de l'extrait aqueux de calice d'*H. sabdariffa* (Da-Costa-Rocha et al, 2014).

<i>Classe</i>	<i>Composé</i>
Acide organique	Acide hydroxycitrique Acide d' <i>Hibiscus</i> Glucoside d'acide d' <i>Hibiscus</i> Ester 6-méthylique de l'acide d' <i>Hibiscus</i>
Anthocyanes	Delphinidine-3-sambubioside Cyanidine-3-sambubioside
Flavonoïdes et acide phénolique	Acide gallique Isomère de l'acide chlorogénique I L'acide chlorogénique Isomère d'acide chlorogénique II 5-Hydroxyméthylfurfural Gallate de méthyle Acide 2-O-trans-caféoyl-hydroxycitrique Acide 5-caféoylquinique Acide 3-caféoylquinique Acide protocatéchuique Glucoside d'acide protocatéchuique Acide coumaroylquinique Quercétine-3-sambioside Quercétine-3-rutinoside Acide 5-O-caféoylshikimique Leucoside (kaempférol-3-O-sambubioside) Quercétine-3-glucoside Kaempférol-3-O-rutinoside Méthyle (AS dans la méthylépigallocatechine) Myricétine Acide 4-caféoylquinique Kaempférol-3-p-coumarylglucoside Quercétine Tilioside

Tableau V : Teneurs polyphénolique de certains extraits d'*Hs* (Mourtzinou et al, 2008).

<i>Composé</i>	<i>Extrait d'H.sabdariffaL (mg.g⁻¹)</i>
Acide chlorogénique	46
Quercétine	8,71
Myricétine	5,21
Acide caféique	1,79
Acide syringique	1,61
Kampférol	1,44
Acide gallique	0,71
Acide sinapique	0,49
Acide protocatéchique	0,14
Acide férulique	0,19
Acide p-coumarique	0,16
Epicatéchine	0,13

III. Domaines d'utilisation d'*Hibiscus sabdariffa L*

Différentes fractions d'*H. sabdariffa L* (tige, feuille et calice) sont appliquées dans plusieurs domaines que ce soit l'alimentation humaine, l'industrie agroalimentaire, la médecine grâce à ses propriétés pharmacologiques, ou dans l'industrie de textile (Cisse et al, 2009).

V.1.Utilisation alimentaire

V.1.1.Calices

Les calices, est la partie la plus fréquemment utilisée de la plante en raison de son forte concentration en acides, en pectine, en vitamine C et surtout en anthocyanes. Ils sont impliqués dans la fabrication de boissons non alcoolisées désaltérantes et tonifiantes. Les calices sont trempés dans de l'eau que ce soit chaude ou bien à température ambiante pour obtenir un extrait aqueux, qui est utilisé pour fabriquer ces boissons. Des sucres peuvent être ajoutés après filtration dans certaines pays pour préparer la boisson finale, ainsi que d'autres composants à savoir : jus ou morceaux de fruits (ananas, fraise, gingembre) et des arômes etc. Très courant et connue sous multiples dénominations en Asie et en régions africaines. Elle est

très populaire au Sénégal sous le nom de « bissap » surtout pendant le mois de ramadan. La boisson s'appelle « da bilenni » au Afrique subsaharienne. Elle est plus connue en Égypte sous la dénomination de « boisson des pharaons ». Le « thé de karkadé » est la boisson courante au Soudan, qui est consommée chaude ou froide ça dépend la période. La boisson traditionnelle préparée à partir du gingembre, calice d'*Hs*, sucre et de l'eau bouillante appelé « Noël » en Jamaïque. Ensuite le liquide est tamisé et accompagné de crème glacé et couramment avec du rhum. Toutes les couches sociales de la population au Nigéria apprécient la boisson, connue sous le nom « zobo ». En raison des propriétés médicinales des calices le prix de différentes boissons non alcoolisées importées est augmenté dans ce pays. La boisson est très consommée en Thaïlande en infusion ou en boisson fraîche, mais elle a attiré l'attention de plusieurs producteurs de jus en Malaisie (Cisse et al, 2009).

Les calices est également coutante pour la préparation des pâtisseries et des dessert. Les purées d'*Hs* sont populaires au Amérique, au Sénégal, au pays australienne et asiatiques dans l'espace caraïbe. Une boisson alcoolisée fermentée semblable au vin est également fabriquée à partir du calice (Mounigan et Badrie, 2007).

L'industrie pharmaceutique et alimentaire utilise des extraits concentré ou séchée de calice manière qu'un colorant naturel. Aujourd'hui, en raison des pigments instables au cours de la conservation du produit, leur utilisation est reste problématique et limitée (Pouget et al, 1999).

V.1.2.Graines

À la république du Bénin les semences cuites et fermentés d'*H. sabdariffa* sont adopter pour la production des épices traditionnels à cause de leur richesse en protéines. La durée de fermentation détermine la production de divers produit nommé « iru », « afitin », « sonru » ou « yanyanku ». Le « dawadawa » au Ghana, le « dadawabasso » et le « dadawakalwa » au Nigéria, le « soubala » au Burkina Faso, le « nététu » au Sénégal, le « natto » au Japon et le « kinema » au Népal sont des produits identiques. Le « mungzantusa » est un aliment fabriqué à partir des graines fermentées avec des épices, au nord du Nigéria. Ils sont utilisés de façon traditionnel par fermentation de germes auparavant cuites pour préparer la viande d'oseille également connue sous le nom « furundu », pendant 9 jours (Cisse et al, 2009).

V.1.3. Feuilles

Les constituants des feuilles d'*H. sabdariffa* convient aussi à l'alimentation humaines. Ces organes sont consacrées pour faire le « békëj », c'est une sauce épaisse et acide, qui est accompagné avec du riz au poisson et aussi utilisées pour produire des sauces servies avec autre plats de tubercules (Cisse et al, 2009).

V.2. Utilisation médicinale

La plante d'*Hs* possède de nombreux pouvoirs thérapeutiques. Dans les pays du sud elle est utilisée dans la médecine traditionnelle. Cependant quelques caractéristiques médicinales ont été menées, principalement sur des animaux (Cisse et al, 2009).

Elle reconnue aussi par leur effet antimicrobienne, analgésique, protège le système cardiovasculaires, abaisse la tension artérielle, réduit les maladies diabétiques, diurétique, lutter contre certaines types de cancers, désinfectant (D'Heureux et al, 2004).

Dont la consommation journalière d'extrait d'*H. sabdariffa* diminuerait de manière significative la tension artérielle chez les sujets hypertendus. Cependant, en dépit de l'utilisation populaire de cette plante dans le domaine de la pharmacologie, peu ou pas d'informations ont été fournies jusqu'à présent sur sa toxicité. Des travaux complémentaires seraient donc nécessaires dans ce domaine. L'extrait d'*Hs* est un médicament naturel impeccable pour l'organisme qui préserve un excellent taux de cholestérol et de TG dans le sang. Il aide les personnes atteintes d'une hyperlipidémie en réduisant le LDL et TG et en augmentant le bon cholestérol (HDL) (Hirunpanich et al, 2006).

Les calices infusés employées pour traiter les inflammations des voies respiratoires, douleurs dentaires, les anémies ainsi que la rougeole. En outre, les feuilles est adopté pour soigner les brûlures, les blessures et la conjonctivite (Endrias, 2006).

V.3.Utilisations traditionnelles

Voici-ci quelques autres utilisations et/ou caractères médicaux traditionnels de l'extrait d'*Hs* : (Cisse et al, 2009)

- Purificateur du sang et fortifiant ;
- Inhibe la formation de caillots sanguins dans les reins ;
- Remèdes contre le cancer, les abcès ;
- Désordres du foie, lutte contre les maladies cardiovasculaires et hépatiques ;
- Antispasmodique, antimicrobienne et antifongique ;
- Les feuilles soignent les plaies et les ulcères.

Chapitre III
Les activités
biologiques
d' *Hibiscus*
sabdariffa

I. Les activités biologiques d'*Hibiscus sabdariffa*

A cause de leur richesse en métabolites secondaires comme les composés phénoliques, les alcaloïdes ainsi que les terpènes, les plantes médicinales sont une excellente source des activités biologiques telles que l'activité antioxydante, anti-Alzheimer, anti-inflammatoire et antifongique...etc. (Shakya, 2016). Si pour cela, dans ce chapitre on focalise juste de façon générale et récapitulative de certaines activités biologiques et en particulier sur la karkadé.

I.1. Activité antimicrobienne

L'extrait d'*Hibiscus* a démontré une efficacité antibactérienne contre *Streptococcus mutans*, bactéries cariogènes de la cavité buccale, avec une concentration inhibitrice minimale de 2,5 mg/ml et même à des espèces de *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* et *Campylobacter fetus*) qui contaminent la viande comme la volaille, le bœuf à une concentration de 96 à 152 µg/ml. Cette fois, l'extrait aqueux et méthanolique d'*Hs* séché a également montré un effet inhibiteur *in vitro* contre plusieurs souches bactériennes, telle que *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *K. pneumonia*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas fluorescens*, mais n'ont pas affecté la croissance du champignon *Candida albicans* (Abdallah, 2010).

Les extraits bruts de graines de *Hs* (200mg/l) ont également montré un effet antimicrobien contre trois types de bactéries Gram-négatives. L'extrait a montré une activité plus élevée contre *Salmonella*, suivie de *Shigella* et *Enterobacter*. Les composés bioactifs connus par leur effet antimicrobien peuvent expliquer cette activité antibactérienne d'*Hs* (Da-Costa-Rocha et al, 2014).

I.2.L'activité anticancéreuse

Depuis longtemps, les phytothérapeutes ont accès à des données d'observation sur l'effet anticancéreux de diverses plantes, retranscrites dans des textes traditionnels (Li et al, 2004). La présence de produits photochimiques comme les composés phénoliques (catéchines, flavonoïdes et curculionidés), les terpènes et les composés sulfurés qui contribuent à cette action anticancéreuse. Les polyphénols ont des propriétés anticancéreuses importantes qui combattent un vaste éventail de cancers, y compris le cancer du sein, du colorectal, du pancréas, de la prostate, du poumon, le fibrosarcome colorectal ainsi que la leucémie (Dorai et al, 2004).

Récemment, l'activité anticancéreuse d'extrait des feuilles d'*Hs* a été évaluée *in vitro* et *in vivo* sur des cellules cancéreuses de la prostate humaines. L'étude a montré que l'effet anti-apoptotique était médié par les voies intrinsèques (caspase 9 médiée par Bax / cytochrome c) et extrinsèques (caspase 8/t - bidmédiée par Fas), ainsi que bloqué la croissance de la xénogreffe de tumeur de la prostate chez la souris nudeathymique. Donc l'extrait des feuilles au lieu de calices représentait une source possible des composés polyphénoliques plus importants (Lin et al, 2005).

I.3. Activité anti-obésité

Un rapport a montré qu'un extrait aqueux standardisé (33,64mg d'anthocyanes totaux pour chaque 120mg) de *Hs* était capable de réduire le gain de poids chez les souris obèses tout en augmentant l'apport en liquide chez les souris saines et obèses. Cet effet est probablement obtenu grâce à la modulation des voies PI3-K/Akt et ERK, qui jouent un rôle central au cours de l'adipogenèse. Des autres expériences ont révélé *in vitro* et *in vivo* que l'extrait d'*Hibiscus* (ou thé) inhibait l'activité de l' α -amylase, bloquant l'absorption des sucres et de l'amidon, ce qui peut contribuer à la perte de poids. Une autre étude menée au Mexique à l'aide d'un extrait éthanolique de *Hs* a conclu que l'extrait pouvait être envisagé comme un agent anti-obésité possible à cause de ses effets sur l'absorption et l'excrétion des graisses et sur le poids corporel des rats (Da-Costa-Rocha et al, 2014).

I.4. Activité anti-anémique

Actuellement l'anémie est très répandue. Elle est diagnostiquée au fil de nombreuses maladies notamment les cancers, des troubles digestives et rénaux et des maladies infectieuses. Les anémies peuvent être causées par une plusieurs facteurs, dont les anémies causées par une carence en fer (anémie ferriprive) qui est la plus fréquentes. Pour fournir un bon traitement, les causes doit être systématiquement recherchée et nécessaires (Boulin et Fagnoni, 2018). Une étude préliminaire sur l'utilisation des décoctions de *Hs* comme foyer de fer pour traiter l'anémie et certaines autres pathologies de carence minérale a été menée et a montré que les calices fermentés secs d'*Hibiscus* présentaient une valeur de pH très faible qui améliorait la disponibilité des minéraux (fer, zinc, calcium et magnésium), et avait aussi un effet bénéfiques sur les GR (Falade et al, 2005).

Partie Pratique

Materiels & Méthodes

I. Matériel végétal

I.1. Collection du matériel végétal

La sélection de la plante médicinale à savoir l'*Hibiscus sabdariffa* objet de notre étude, faite sur la base de sa large présence et utilisation traditionnelle. La plante de karkadé sèche a été achetée durant la période de mars 2023 de la Wilaya d'Alger dans la région d'El-Harrach. Nous avons identifié cette plante grâce à des recherches bibliographiques approfondies ainsi qu'à l'aide du Dr. CHERGUI Achour, maître de conférence, à la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre, université de Bouira.



Figure 6 : Les fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* (Mars 2023).

II. Broyage et tamisage

Afin d'obtenir sa poudre, un échantillon de fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* susmentionné, a été nettoyée et broyée par un broyeur électrique. Après broyage, la poudre obtenue a été tamisée à l'aide d'un tamis dont le diamètre des pores est de 100 μ m afin d'obtenir des particules très fines de karkadé. Enfin, la poudre a été conservée dans un flacon en verre opaque et couvert pour éviter l'oxydation de leurs différents composés jusqu'à l'utilisation.

III. Préparation de l'extrait

III.1.Objectif

Par l'utilisation des solvants organiques accélérant et augmentant le rendement d'extraction, nous avons consisté d'atteindre notre objectif, qui est d'extraire le maximum des molécules chimiques contenues dans les fleurs d'*H. sabdariffa*.

L'éthanol est le solvant utilisé pour l'extraction des composés phénoliques car il possède l'avantage d'être plus facile à éliminer. L'extraction des composés phénoliques a été réalisée par une méthode solide-liquide selon la procédure d'Owen et Johns (1999).

III.2.Macération

III.2.a. Principe

Le principe suivi dans cette étude est "la macération", cette dernière permet de laisser la poudre d'un matériel végétal dans un solvant en contact prolongé, pour but d'extraire les principaux actifs. Pour conserver l'intégrité des molécules, l'opération doit se dérouler à une température ambiante (Lagnika, 2005).

III.2.b. Protocole

8g de poudre de plante ont été macérées dans 200ml d'éthanol (96%) sous agitation, à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 6h à une température ambiante et à l'abri de la lumière. Après macération, le macérât obtenu a été filtré à l'aide de papier Whatman N°3. Le filtrat obtenu a subi une évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis a été séché à l'étuve 40°C jusqu'à l'évaporation complète et l'obtention d'un extrait sec. L'extrait sec constitué a été conservé dans un flacon stérile, propre et sec au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation (Ben Moussa et al, 2022).

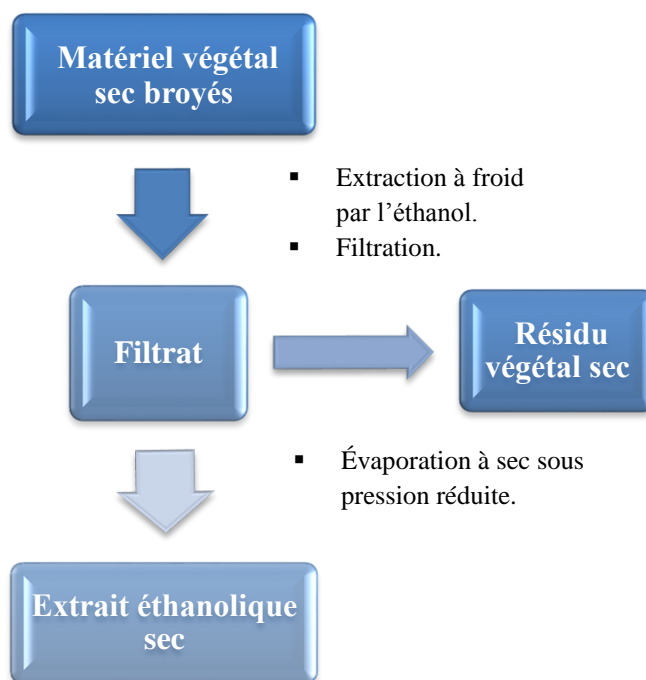


Figure 7 : Différentes étapes de préparation de l'extrait éthanolique de *Hibiscus sabdariffa*.

IV. Etude phytochimique d'*Hibiscus sabdariffa*

IV.1. Analyse quantitative des composés phénoliques

IV.1.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT) par colorimétrie

Pour le but de caractériser l'extrait préparé à partir des fleurs de *Hibiscus sabdariffa*, un dosage des polyphénols totaux a été fait.

IV.1.1.a. Principe

Selon la méthode colorimétrique du Folin-Ciocalteu, les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie (Ragae et al, 2006 ; Wong et al, 2006 ; Anthony, 2010). Le mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) constitue une couleur jaune d'acide de Folin-Ciocalteu. Lors de l'oxydation des polyphénols, le réactif est réduit en un complexe bleu constituant l'oxyde de tungstène W_8O_{23} et de molybdène Mo_8O_3 (Ribéreau, 1968). La couleur obtenue avec une absorption maximale à 765nm, représente proportionnellement la quantité de polyphénols présents dans l'extrait (Boizot et Charpentier, 2006).

IV.1.1.b.Mode opératoire

Selon le protocole démontré par Normala et Mardhiah en 2010 légèrement modifié, les polyphénols totaux (PPT) sont déterminés : 1ml de FCR dilué 10 fois mélangé dans un tube à essai avec 200 μ l d'extrait éthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* (20mg/ml). 800 μ l de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% sont ajoutés après 4 minutes. L'absorbance est mesurée à 765nm après une incubation du mélange réactionnel pendant 1 heure à l'obscurité et à une température ambiante.

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations, dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par un gramme poids sec (mg EAG/g d'extrait) (Normala et Mardhiah, 2010).

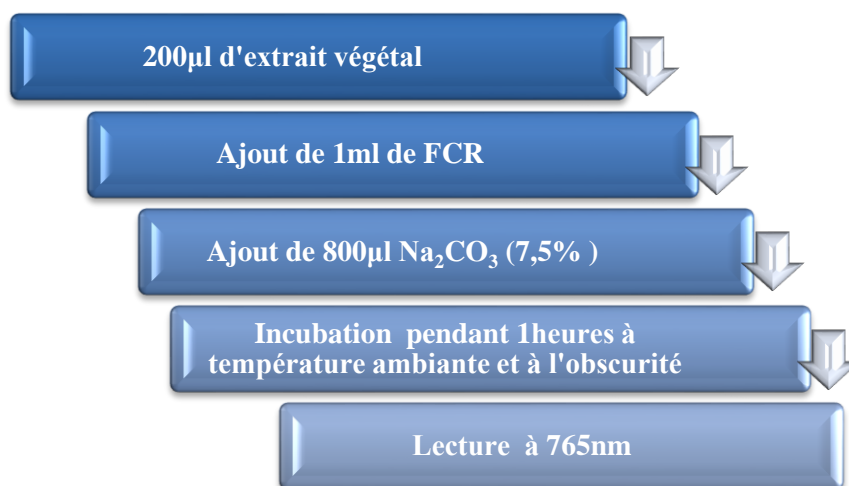


Figure 8 : Différentes étapes du dosage des polyphénols totaux (PPT) d'extrait éthanolique.

IV.1.2.Dosage des Flavonoïdes (FV) par le trichlorure d'aluminium

La teneur en flavonoïdes d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* a été déterminée en utilisant la méthode de trichlorure d'aluminium AlCl_3 peu modifiée : un complexe jaunâtre a été obtenu par les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium (Mbaebie, 2012).

En bref, 1ml d' AlCl_3 à 2% a été mélangé avec 1ml d'extrait d'*Hs* dilué dans le solvant d'origine. L'absorbance est mesuré à 430nm après 10 minutes d'incubation à l'obscurité.

Les teneurs en flavonoïdes sont présentées en milligramme d'équivalent de quercétine par un gramme d'extrait sec (mg EQ/g d'extrait) en utilisant la courbe d'étalonnage obtenue par la quercitrine comme standard, dans les mêmes conditions du dosage.

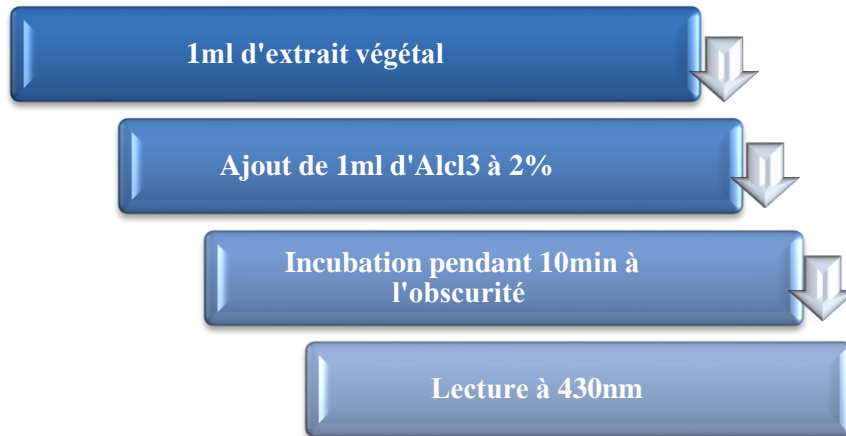


Figure 9 : Différentes étapes du dosage des flavonoïdes (FV) d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*.

IV.2.Dosage des protéines

IV.2.a.Principe

Le principe de cette méthode développée par Bradford (1976) repose sur l'utilisation du bleu brillant de Coomassie G250 (BBC) et l'albumine de sérum de bœuf (1mg/ml) comme standard. En milieu acide, ce colorant se lie aux protéines par liaisons ioniques avec des acides aminés basiques (arginine, histidine et lysine), et interactions hydrophobes avec les acides aminés hydrophobes, ces liaisons entraînent un déplacement du pic d'absorption de 465nm à 595nm: changement de la teinte du milieu qui passe du brun orangée au bleu(en solution le réactif a une forme cationique brun orangé qui absorbe à 465nm, une fois liée aux protéines il donne une forme anionique bleue qui absorbe à 595nm). Ainsi, plus il y a des protéines dans la solution, plus la coloration bleue est intense, c'est à dire que l'absorption à 595nm est élevée.

IV.2.b.Protocole

L'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* dont on veut déterminer la concentration protéique a été dilué. 3ml de réactif de Bradford a été ajouté à 100µl de l'extrait. Après homogénéisation et repos de 10 à 15min dans l'obscurité, la densité optique (DO) est mesurée à 595nm contre le blanc. Les concentrations en protéines sont déterminées sur la base du courbe étalon préparées par la BSA.

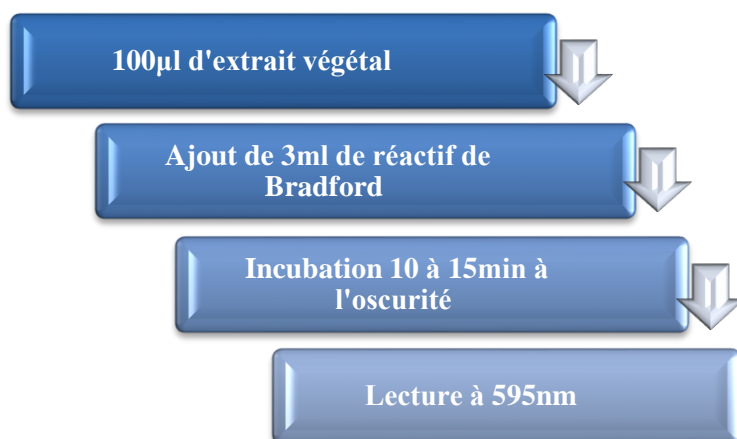


Figure 10 : Différentes étapes du dosage des protéines d'extrait d'*Hs* par la méthode de Bradford.

V. Méthodes de dosage de l'activité antioxydante *in vitro*

V.1. Le test de piégeage du radical DPPH

V.1.1. Principe

La molécule de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH*) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517nm. Quand une solution de DPPH* est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydante, il y'a formation de la forme réduite (Figure 11). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517nm (Brand-Williams, 1995).

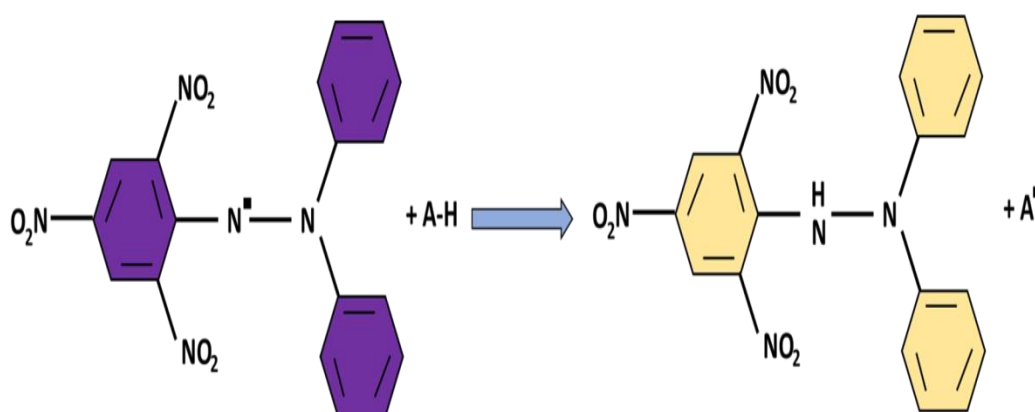


Figure 11 : Réaction chimique de transformation du radical DPPH* en DPPH (Talbi et al, 2015).

Il est noté que la solubilité du DPPH dans les milieux organique rend cette méthode très adéquate aux dosages effectués aux milieux alcooliques soit méthanolique ou éthanolique.

V.1.2. Protocole

La détermination de l'activité antiradicalaire par le test de DPPH a été effectuée en utilisant la méthode décrite par Dieng et al (2017). Une solution éthanolique de DPPH a été préparée en dissolvant 2,4mg de ce produit dans 100ml d'éthanol. Ensuite, 50µl d'extrait à une concentration donnée sont ajoutés à 950µl de la solution DPPH. L'extrait ainsi que la référence (acide ascorbique) sont testés à différentes concentrations, puis les absorbances ont été mesurées à 517nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité. Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produit testé.

L'activité antioxydante liée à l'effet de piégeage du radical DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = (A_{b0} - A_{b1} / A_{b1}) * 100$$

Où : **A0** : absorbance de DPPH.

A1 : absorbance de l'échantillon.

VI. Activité inhibitrice des protéases digestives (trypsine)

VI.1. Principe

Selon la méthode d'Anson, (1938) légèrement modifiée, la détermination de l'activité inhibitrice de trypsine faite à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine. Cette méthode se base sur la quantité estimative des acides aminés libres ainsi que des peptides simples résultants de la dégradation de protéine (substrat) sous l'action des protéases.

L'acide acétique est utilisé pour arrêter la réaction enzymatique et précipiter les protéines non attaquées.

VI.2. Solution de trypsine

4mg de trypsine pesée avec précision ont été préparés dans un volume de 200ml d'HCL à 0,001M. Cette solution peut être conservée au réfrigérateur pendant 2 à 3 semaines sans perte notable d'activité (Kakade et al, 1969).

VI.3.Solution de substrat

2g de poudre de caséine ont été dissous dans 100ml de tampon tris à 0,5M, suivi d'une agitation jusqu'à la dissolution de caséine et la solution devient claire et homogène (Kakade et al, 1969).

VI.4.Protocole de l'activité antitrypsine

Selon la méthode de Nair et Sandhu, (2013) légèrement modifié, différentes concentrations d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* sont rajoutées à 2ml de solution de trypsine, les tubes ont été placés dans un bain-marie à 37°C pendant 10min. Pour chaque tube, 5ml de solution de caséine, préalablement réchauffée à 37°C était ajouté, pendant 10 min. Plus tard, après l'ajout de 1ml d'acide acétique à 30% la réaction s'est arrêté. Un blanc d'échantillon peut être préparé par le mélange de 5ml de solution de caséine et 2ml de trypsine, le mélange a été incubé à 37°C durant 10 min. Enfin 1ml d'acide acétique à 30% est rajouté pour stopper la réaction.

VII. Evaluation de l'activité hypoglycémiant *in vitro* de la plante d'*Hs*

VI.1.Effet d'extrait sur l'absorption de glucose par la levure

La levure est caractérisée par un système de transport des sucres fait l'objet d'une attention considérable de la part de plusieurs laboratoires. La levure peut utiliser un ou plusieurs sucres comme principale source de carbone et d'énergie. L'éthanol s'est produit par la conversion de sucre par la levure. Cette dernière absorbe le glucose pour évaluer l'activité antidiabétique des composés bioactifs de plante ou synthétiques (Sinha et al, 2013).

VI.2.Préparation de la suspension de levure

Selon la méthode légèrement modifiée de Cirillo, (1961), nous avons préparé les cellules de levure. La levure boulangère commerciale (1g) a été lavée par centrifugation répétée (4200 t/min, 5 min) dans de l'eau distillée (5ml) jusqu'au ce que le liquide surnageant fût clair et 10% (v/v) d'une suspension a été mélangée avec de l'eau distillée.

VI.3.Absorption et dosage de glucose

Plusieurs concentrations d'extrait de plante d'*Hs* (1,5 ; 2,1 ; 2,7mg/ml) ont été rajoutées à 1ml de solution de glucose (10 et 15 mg/ml) pendant 10 minutes d'incubation à 37°C. En ajoutant 100µL de la suspension de levure pour l'initier. Ensuite on fait agiter le mélange par un vortex puis l'incuber pendant 60 minutes à 37°C.

La réaction a été initiée en ajoutant 100µL de la suspension de levure. Le mélange est ensuite agité avec un vortex et incubé à 37°C pendant 60 minutes. La centrifugation des tubes (2500 t/min, 5 min) a été faite après 1 heure, et la quantité de glucose a été estimée dans le surnageant et l'absorbance mesurée à 650nm (Sinha et al, 2013).

Le calcul du pourcentage d'augmentation d'absorption du glucose par les cellules de levure se fait par la formule ci-dessous : (Cirillo, 1961)

$$\% \text{ d' Augmentation d'absorption} = (\text{Abc} - \text{Abt} / \text{Abc}) * 100$$

Où : **Abt** : absorbance du standard ou de l'extrait.

Abc : absorbance du contrôle.

VIII. Application d'extrait naturel d'*Hibiscus sabdariffa* (décoction) dans la conservation des aliments

Cette étude a pour but de chercher l'effet de conservation d'un aliment par l'action d'un extrait naturel de plante, en perspectives de remplacer les additifs chimiques, souvent nuisibles pour la santé du consommateur.

La partie expérimentale de cette étude est réalisée comme suit :

- Préparation d'extrait par décoction ;
- Application des différents volumes d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* sur l'aliment ;
- Analyses sensorielles, physico-chimiques de l'aliment, au cours de leur période de conservation.

VIII.1.Préparation de l'extrait

Pour obtenir l'extrait de karkadé, nous avons utilisé une méthode de préparation par décoction, nous avons porté à ébullition pendant 5 min, 5 fleurs de karkadé dans 100ml d'eau ensuite laisser refroidir et filtrer.

VIII.2.Echantillonnage

Les fruits destinés à la production de jus sont disponibles sur le marché et largement vendus. Les fruits achetés, sont acheminés vers le laboratoire de biochimie de la faculté SNVST-Bouira pour des analyses ultérieures.

VIII.3. Préparation des échantillons

Après un bon lavage sous l'eau. Les fruits sont broyés par un mixeur électrique. Par la suite le jus obtenu a ensuite été dilué avec des volumes d'eau. L'échantillon de jus a été distingué en huit portions de volume égal (environ 20 ml) et conservé dans une bouteille stérile et soit transparente, opaque et conservé à une température de réfrigération (kaddumukasa et al, 2017).

Différents volumes d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* (1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4ml) était ajoutés dans chaque flacon de jus d'orange naturel. Les mélanges conservés à 4°C subiront l'analyse sensorielle, au quotidien, pendant toute la période de l'essai de conservation.

Un jus d'orange industrielle (avec conservateur) de même teneur en fruit avec le jus naturelle déjà préparé (15%) a été utilisé comme un témoin positif.

La conservation a été vérifiée par l'évaluation de certains paramètres physico-chimiques et organoleptiques.

VIII.4. Analyse physico-chimique

D'une manière générale, tous les aliments se gâtent durant la période de stockage, essentiellement les jus de fruits contenant des composants périssables. Les facteurs physico-chimiques peuvent être des causes importantes à la détérioration de la qualité du produit.

VIII.4.1. Mesure du potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH est une grandeur quantitative sans unité de l'acidité ou de basicité d'une solution, considéré comme un paramètre permettant de déterminer la concentration en ions H^+ dans une solution (Ayad, 2017).

VIII.4.1.a. Mode opératoire

- Allumer le pH-mètre, l'attendre de quelques minutes pour se stabilise ;
- Ensuite rincer l'électrode avec de l'eau distillée ;
- Plonger l'électrode dans l'échantillon à analyser et lire la valeur de pH directement ;
- Après chaque détermination du pH, on retire l'électrode, et on la rince.

Résultats & Discussion

I. Etude phytochimique d'*Hibiscus sabdariffa*

I.1. Analyse quantitative des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu et chlorure d'aluminium respectivement. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait brut et mg équivalent de quercétine par g d'extrait brut, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée à l'aide de l'acide gallique et de la quercétine (Annexe 01 et 02).

Les résultats des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes sont présentés dans la figure 12.

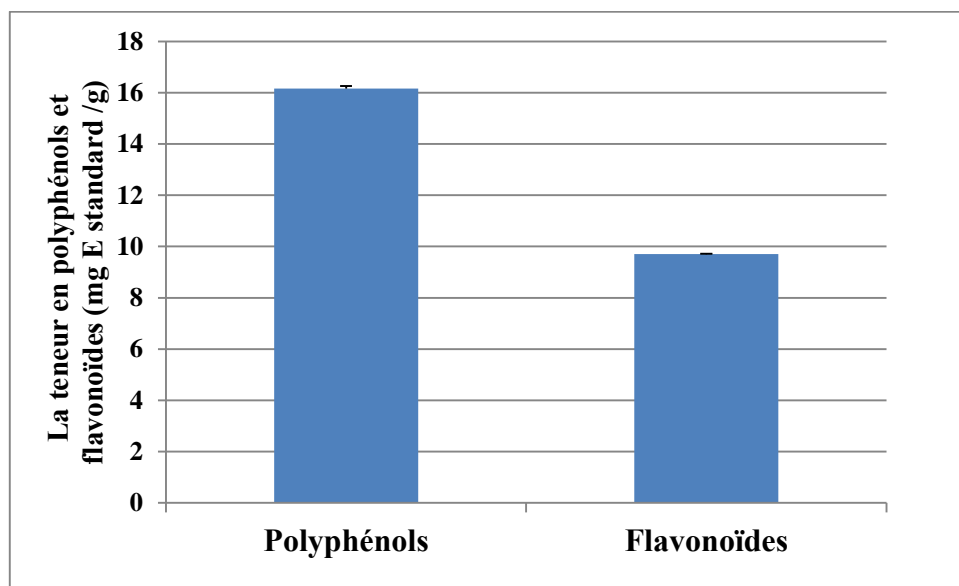


Figure 12 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* (les valeurs représentent la moyenne ± écart-types).

Sur la base des résultats obtenus, l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* renferme des concentrations plus ou moins importantes en polyphénols totaux et en flavonoïdes. La teneur la plus élevée est celle des polyphénols avec des concentrations de $16,163 \pm 0,099$ mg EAG/g et avec des concentrations de $9,711 \pm 0,013$ mg EQ/g en flavonoïdes.

Ces résultats sont largement inférieurs à ceux de Formagio et al, (2015) qui représente une teneur en polyphénols et flavonoïdes de 453.43 ± 3.78 mg EAG/g et 97.43 ± 2.51 mg EQ/g respectivement. Formagio et al, (2015) ils ont utilisés un extrait méthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* avec une très longue période de macération qui sont capable d'augmenter le rendement et même la teneur de différents composés phytochimiques.

Cela peut être attribué à plusieurs facteurs aussi dont nous citons : la distribution des métabolites secondaires qui peut varier durant le développement de la plante, de plus peut être lié aux conditions climatiques extrêmes (température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité...etc.), ces paramètres stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les flavonoïdes (Park et Cha, 2003).

Ces variations peuvent s'expliquer aussi par le fait que la quantité des composés phénoliques d'extrait de la plante étudiée dépend essentiellement : de son origine, de la variété, de la saison de culture, de la saison de récolte, des conditions climatiques et environnementales, de la localisation géographique, des différentes maladies qui peuvent affecter la plante, de la maturité de la plante, la taille des particules et de la durée de conservation. La méthode d'extraction de composés bioactives joue aussi un rôle important (Conde et al, 2009 ; Ebrahimzadeh et al, 2008).

I.2.Dosage des protéines

La méthode colorimétrique de Bradford est utilisée pour quantifier les protéines. La courbe d'étalonnage avec son équation linéaire qui met en relation : l'absorbance (595nm)= f(concentrations en BSA) est nécessaire pour doser les protéines des différentes fractions.

Cette courbe d'étalonnage réalisée à partir de la solution de BSA à 1mg/ml nous a permis de déduire l'équation de la droite à partir de laquelle la concentration protéique de notre échantillon a été calculée (voir annexe 02).

Les résultats du dosage des protéines d'extrait éthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* sont illustrés par la figure 13.

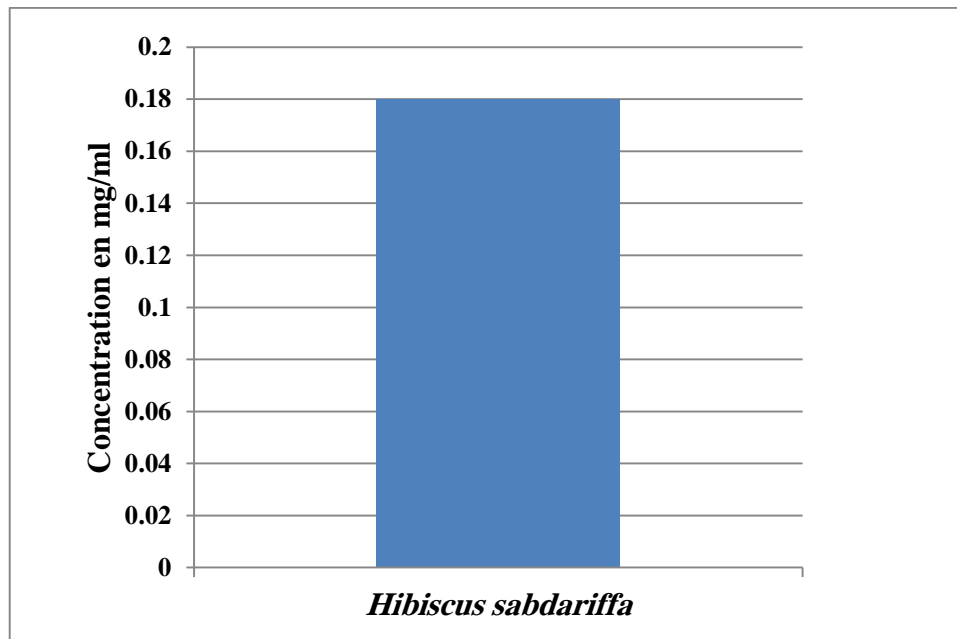


Figure 13 : Dosage des protéines d'extrait éthanolique d'*Hibiscus sabdariffa*.

L'analyse spectrophotométrique a montré la présence des protéines dans l'extrait d'*Hs* étudié. La concentration des protéines de l'extrait est de 0,180mg/ml. Ces résultats sont moindres à ceux mentionnés par Ismail et al, 2008. Cette composition nutritionnelle des variées d'une étude à l'autre, probablement en raison des différentes variétés, génétiques, environnementales, écologiques et des conditions de récolte de la plante (Ismail et al, 2008).

II. Evaluation de l'activité antioxydante

Les composants chimiques naturels responsables de l'activité antioxydante peuvent être trouvés dans divers extraits végétales. Plusieurs auteurs ont mené de diverses d'études qui ont été objet d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits. A cet effet nous avons pris le même acheminement afin d'apprécier l'activité antioxydante de l'extrait d'*Hs* par la méthode de DPPH.

L'acide ascorbique, est connu par sa propriété antioxydante, à cet égard nous l'avons utilisé entant que standard (témoin positif).

II.1.Activité antiradicalaire DPPH

Les chiffres obtenus nous ont permis de dessiner la courbe qui me en relation : variation du pourcentage d'inhibition = f (concentrations de l'extrait/standard), représentés sur les figures 14 et 15 respectivement.

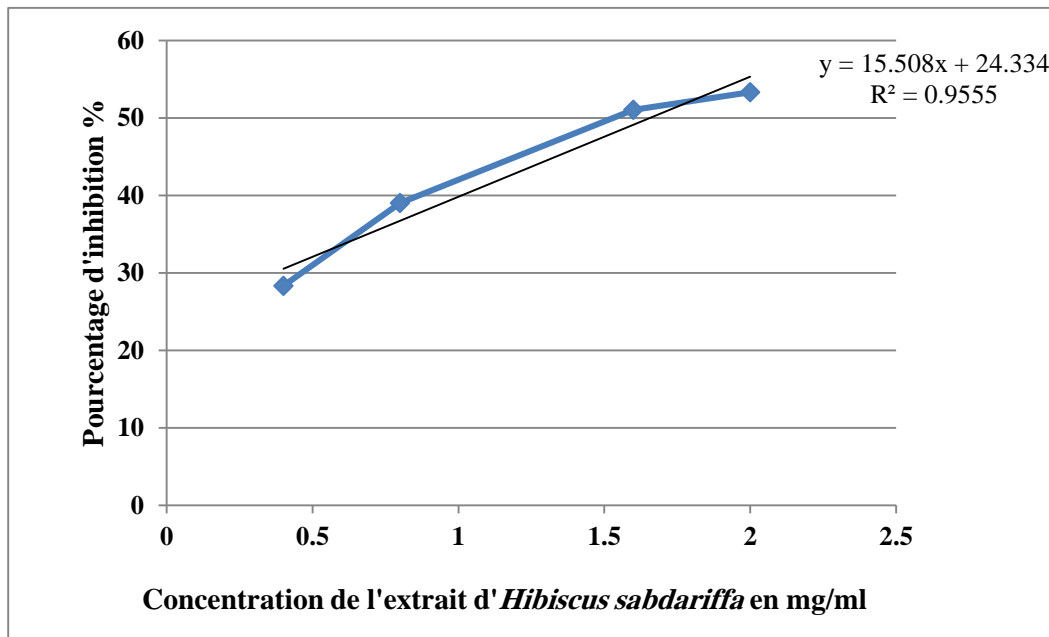


Figure 14 : Graphique d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration EHS.

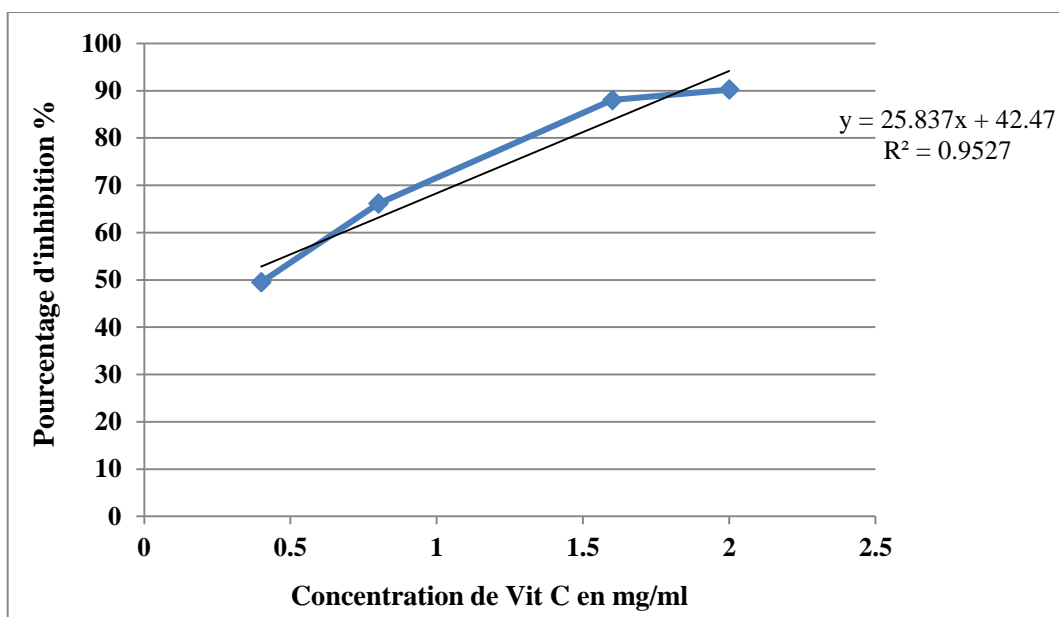


Figure 15 : Graphique d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration d'Acide ascorbique.

Les résultats (figures 14 et 15) montrent que l'extrait éthanolique d'*Hs*, représente une activité antioxydante modérée. Le constat ci-après suivant est abouti après une analyse comparative :

Vitamine C > Extrait éthanolique d'*Hibiscus sabdariffa*.

La vitamine C a une activité puissante que l'extrait d'*Hs*, ces résultats sont cohérents avec les essais d'Alothman et al, en 2009, qui ont révélé que les composés phénoliques essentiellement les flavonoïdes, agissent comme des antioxydants efficaces.

La comparaison de l'activité scavenger du radical DPPH de l'extrait et du standard (L'acide ascorbique) montre une activité antiradicalaire dose-dépendante vis-à-vis du radical DPPH, c'est-à-dire le piégeage des radicaux libres DPPH et donc l'activité antiradicalaire est en parfaite corrélation avec la concentration en extrait d'*Hibiscus sabdariffa*. Cette activité antiradicalaire joue un rôle important contre le stress oxydatif causé par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) de même joue un rôle dans de multiples mécanismes importants pour la santé humaine : réactions immunitaires, oxydation cellulaire, cancer, hypertension, risques cardiovasculaires et cataracte (Naidu, 2003).

Les résultats obtenus pour les tests phytochimiques réalisés sur les fleurs d'*H. sabdariffa* montrent leurs richesses en plusieurs composés bioactifs pouvant être lié avec son activité antiradicalaire étudiée.

L'activité antioxydante augmente avec l'augmentation de la concentration d'*Hs*. Cela veut dire que l'activité antioxydante de l'extrait d'*Hs* est considérablement liée à la concentration en anthocyanes, que l'on pense être un donneur d'électrons, qui réagit avec les radicaux libres et les transforme en produits plus stables, ce qui stoppe la réaction radicalaire en chaîne (Naidu, 2003).

Le pouvoir réducteur d'extrait éthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyles dans les composés phénoliques qui agissent tant que donneurs d'électrons. En revanche, les antioxydants sont donc considérés comme des désactivateurs des oxydants (Siddhuraju et Becker, 2007).

II.2.Détermination des IC50

Pour mieux comprendre le potentiel antioxydant de notre extrait, les valeurs d'IC50 ont été déterminées en mg/ml. Elle est définie comme la concentration d'extrait antioxydant nécessaire pour inhiber et réduire les radicaux DPPH de 50%. Afin d'évaluer et de comparer l'efficacité de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*, les valeurs d'IC50 ont été calculées. Plus la valeur d'IC50 est faible, plus l'activité de piégeage des radicaux libres est élevée. Les valeurs d'IC50 représentés dans la figure 16.

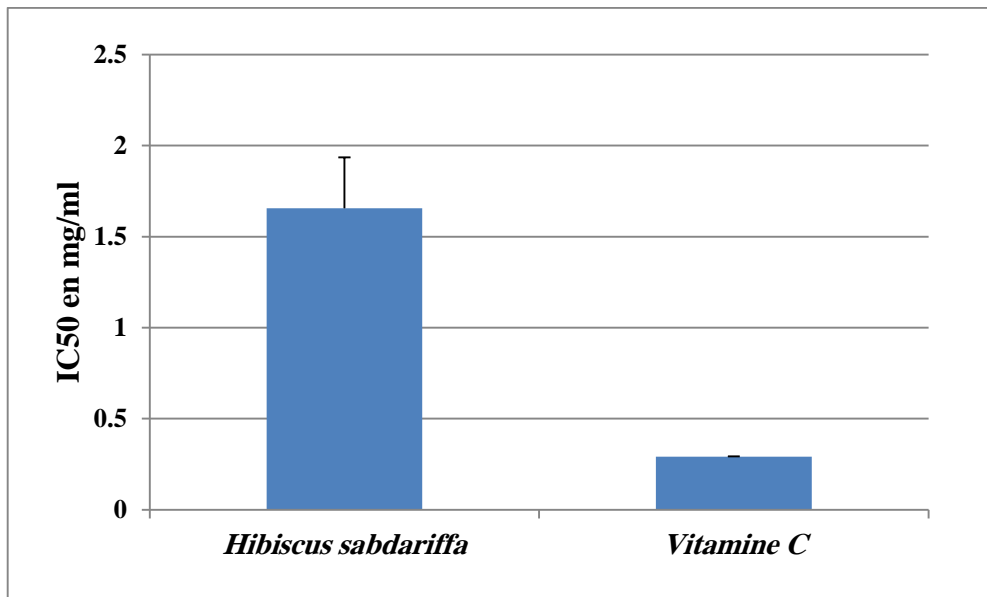


Figure 16 : Histogramme des IC50 de EHS et standard obtenu par test DPPH.

Selon les résultats montrés dans la figure 16, nous constatons que l'extrait éthanolique d'*H. sabdariffa*, avait une activité antioxydante modérée avec une IC50 (1,656 ± 0,279mg/ml) et cette activité antiradicalaire est inversement proportionnelle à la IC50 et vu que celle de l'extrait est supérieure à celle de la vitamine C, l'activité reste inférieure à celle de l'acide ascorbique (0,291± 0,0007mg/ml) mais proche, ce qui est intéressant.

Nous pouvons donc classer l'activité DPPH de l'extrait d'*Hs* :

L'acide ascorbique > Extrait éthanolique d'*Hibiscus sabdariffa*. C'est-à-dire l'échantillon ayant une faible valeur d'IC50 possède une meilleure activité antioxydante.

Falade et al, (2005) ont indiqué que l'extrait de roselle était très riche en acide ascorbique ou ascorbate, qui est un antioxydant naturel bien connu et un excellent agent réducteur. Le pouvoir réducteur a été utilisé comme l'un des indicateurs de la capacité antioxydante des herbes médicinales.

Donc, la forte activité antioxydante est due principalement aux composés majoritaires d'*Hibiscus sabdariffa*. Cependant une interaction synergique ou antagoniste peut créer de puissants systèmes anti radicaux libres par les composés minoritaires (Lu et al, 2001 ; Sing et al, 2006).

De plus, le pouvoir antioxydant peuvent être fortement influencée non seulement par la composition chimique, mais également par les conditions de l'essai (température de réaction,

rapport antioxydant/DPPH, type de solvant, pH, concentration en échantillon) (Popovici et al, 2009 ; Noipa et al, 2011 et Costa et al, 2012).

III. Activité inhibitrice de trypsine

Le taux des protéines sont estimés dans chaque tube par la méthode de Bradford, (1976). Après un mélange intime, l'absorbance a été mesurée à 595nm contre un blanc réactif. Dans cette étape on a utilisé une solution de référence BSA préparée précédemment dont on a tracé le graphique standard.

Les résultats de l'évaluation de l'activité inhibitrice de trypsine de notre extrait d'*Hibiscus sabdariffa* (moyenne \pm écart type) sont figurés dans le tableau VI et la figure 17.

Tableau VI : Concentration des protéines dans le milieu réactionnel à différentes concentrations d'extrait éthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* pour l'évaluation de l'activité inhibitrice de trypsine.

Tube	Blanc	1	2	3	4	Témoin -
Concentration de l'extrait dans le mélange réactionnel (mg/ml)	0	0,6	1	1,4	1,8	0
Concentration des protéines (mg/ml)	0,076 \pm 0,03	0,096 \pm 0,005	0,168 \pm 0,05	0,215 \pm 0,02	0,192 \pm 0,05	0,292 \pm 0,03

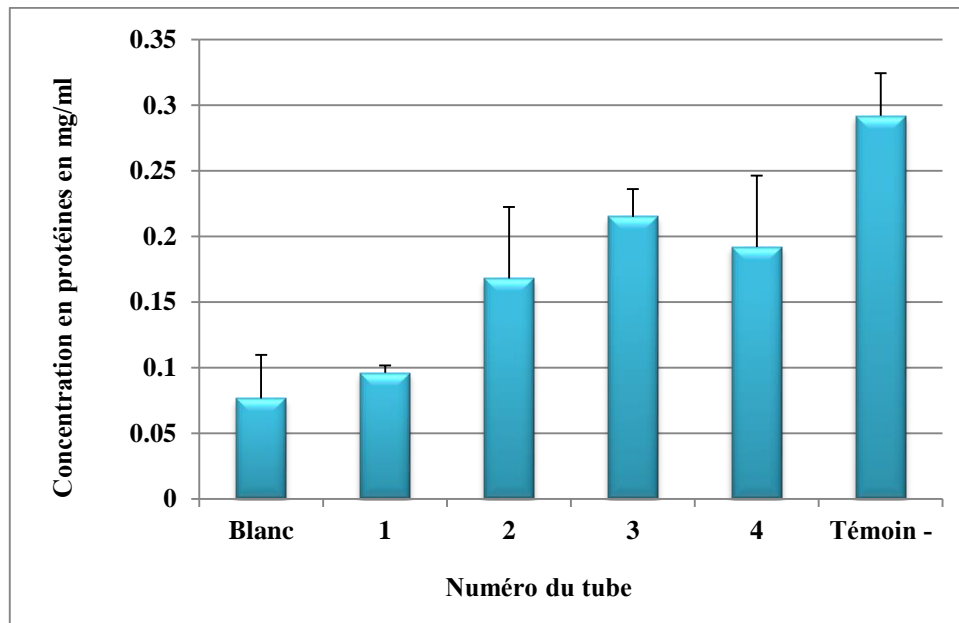


Figure 17 : Effet d'EHS sur l'activité inhibitrice de trypsine.

Les inhibiteurs protéasiques (IP) sont des protéines dominantes dans la nature, présentes chez les animaux, les plantes et les micro-organismes. La fonction d'IP est essentielle pour toutes sortes d'organisme vivant : (Deraison, 2002)

- d'une part, ils empêchent l'activité protéolytique incontrôlée, limitant ainsi leur activité catalytique aux seuls processus physiologiques et compartiments où cela est nécessaire (Rawlings, 1998) ;
- d'autre part, ils protègent l'organisme des activités protéolytiques exogènes, telles que les prédateurs et les microorganismes pathogènes (Schellenberger, 1991).

Les protéases ne sont pas synthétisées seulement par les cellules de l'hôte lors de pathologies intestinales. Le rôle majeur de microbiote dans des conditions telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) est le syndrome du côlon irritable (SCI) sécrète des protéases et peut également être impliquer dans la dérégulation des protéines (Fourcade, 2017).

Par exemple, *E. coli* enteroagrégative (EAEC) produit la protéase Pic impliquée dans les premiers stades de l'infection, et favorise la colonisation dans l'intestin. La protéase contribue à l'entrée bactérienne dans la barrière de mucus et à l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales (CEI). *Pseudomonas aeruginosa* synthétise de plusieurs enzymes extracellulaires qui contribuent à sa virulence. L'un d'eux et l'élastase. C'est un facteur de virulence qui contribue aux développements des maladies infectieuses et la dégradation de diverses

molécules telles que les immunoglobulines, le collagène et les fibrines. Il peut également inactiver des cytokines à savoir TNF α ou l'IFN γ (Fourcade, 2017).

Pour cette raison qui montre l'ampleur des enzymes protéolytiques, qu'une partie de notre travail a été consacrée pour la recherche et la mise en exergue des inhibiteurs de protéases dans notre extrait d'*Hs* où nous avons testé l'activité anti-trypsinique.

Les résultats obtenus montrent que l'activité inhibitrice de trypsine augmente avec l'augmentation de la concentration d'extrait d'une manière significative, *Hibiscus sabdariffa* a montré une activité très importante observée dans le tube 3 à une concentration de 1,4mg/ml correspondant à une valeur totale de protéines dans le milieu réactionnel de $0,215 \pm 0,02$ mg/ml qui est comparable à celui du tube du blanc sans extrait (trypsine + caséine + incubation au bain marie = réaction enzymatique) dont le taux des protéines est $0,0765 \pm 0,03$ mg/ml, au même temps proche à celle du tube témoin négatif (trypsine + caséine = sans réaction enzymatique) qui est de $0,292 \pm 0,03$ mg/ml.

Tel qu'il est montré dans la figure 1, l'extrait préparé à partir de plante médicinale semblent exercer *in vitro* un effet inhibiteur variable dose-dépendant significatif sur l'activité inhibitrice de trypsine.

L'augmentation du taux de protéines par rapport à la situation d'absence de l'extrait et la présence de la trypsine, veut dire que l'activité protéolytique est bloquée (ou ralenti) d'où la dégradation des protéines qui est moins important.

Les inhibiteurs des protéases avaient une boucle réactive très mobile. Lorsqu'ils sont situés dans le site actif, cette boucle est clivée comme un substrat, ce qui entraîne un changement conformationnel de l'inhibiteur, le rendant plus stable, obstruant le site actif de l'enzyme et empêche d'avantage d'autre clivage. En fait, l'inhibiteur est placé sur le site actif de l'enzyme ainsi qu'il bloque par la suite la fixation de substrat, c'est le cas de notre extrait d'*Hibiscus sabdariffa* qui empêche la fixation et la dégradation des caséines utilisées comme substrat protéique dans notre protocole et ensuite l'inhibition de trypsine (Fourcade, 2017).

IV. Evaluation *in vitro* de l'activité antidiabétique de l'extrait d'Hs

IV.1. Effet d'extrait d'*H. sabdariffa* sur l'absorption du glucose par la levure

Le diabète sucré est le résultat d'un déséquilibre dans le métabolisme des glucides, des lipides et même des protéines. Actuellement, la recherche est orientée vers l'exploration des extraits végétaux dans l'optique de trouver des bonnes formulations (chimiques ou alimentaires) permettant de bien maîtriser l'hyperglycémie dans les cas de diabète, sa gestion par extrait végétal est devenue une tendance, et plusieurs extraits végétaux sont dotés de propriétés hypoglycémiques considérables (Diniz et al, 2016 ; Helal et al, 2015).

Les résultats de l'évaluation de l'activité d'absorption du glucose par la levure en présence de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* sont présentés dans la figure 18 et le tableau VII. Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne \pm écart type.

Tableau VII : L'absorption du glucose par les cellules de levure en présence d'extrait.

Concentration du glucose en mg/ml	10			15		
Concentration de l'extrait d' <i>Hs</i> dans le mélange en mg/ml	1,5	2,1	2,7	1,5	2,1	2,7
Pourcentage d'absorption du glucose par les cellules de levure (%)	15,12 \pm 0,006	AA	AA	6,82 \pm 0,007	AA	AA

AA : absence d'absorption.

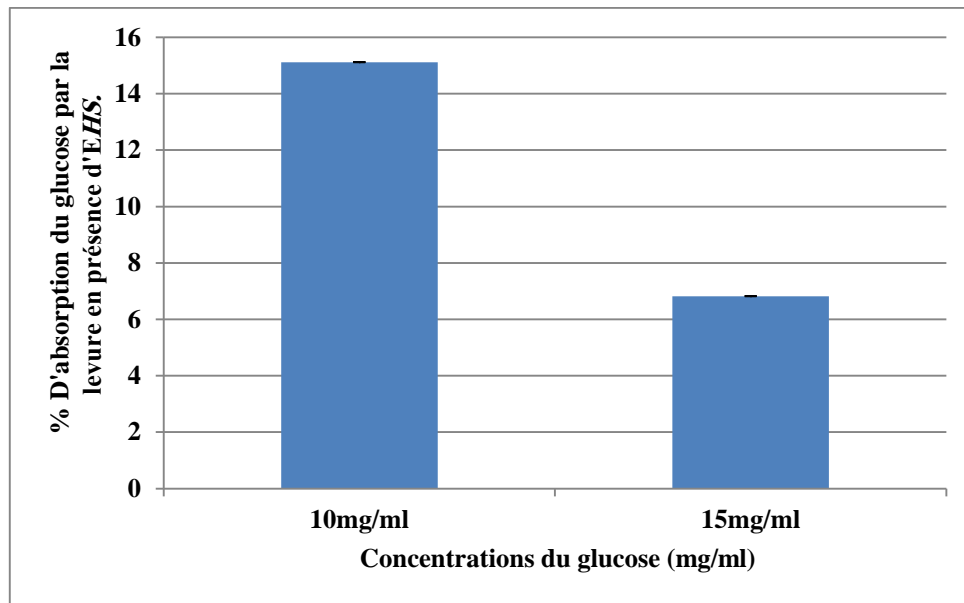


Figure 18 : Effet de l'extrait éthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* à 1,5mg/ml sur l'absorption du glucose par les cellules de levure.

➤ **Effet des extraits sur l'absorption de glucose par les cellules de levure à 10 mg/ml**

En présence d'une concentration du glucose de 10 mg/ml, nos résultats montrent que l'extrait a augmenté le degré d'absorption par les cellules de levure dans une concentration de 1,5mg/ml d'extrait éthanolique d'*Hibiscus sabdariffa* avec pourcentage d'absorption de $15,12 \pm 0,006\%$.

➤ **Effet des extraits sur l'absorption du glucose par les cellules de levure à 15 mg/ml**

En présence d'une concentration de glucose de 15 mg/ml, le pourcentage d'absorption de glucose par les cellules de levure exercé par l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* est observé dans une concentration de 1,5mg/ml avec un pourcentage d'absorption de $6,82 \pm 0,007\%$.

Ce travail est fondé sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité hypoglycémiant de l'extrait éthanolique des fleurs de la plante médicinale *Hibiscus sabdariffa*. Cette plante est très utilisée dans la médecine traditionnelle pour valoriser cette utilisation traditionnelle nous avons effectué l'extraction à partir des poudres des fleurs de la plante par macération dans l'éthanol. Nous avons évalué la propriété hypoglycémiant de notre extrait en suivant la méthode d'absorption de glucose par la levure boulangère.

L'étude de l'activité antidiabétique de notre échantillon, a montré que l'extrait possède une activité hypoglycémiant avec des degrés différents.

Le taux de transport du glucose à travers la membrane cellulaire a été étudié dans un système *in vitro* comprenant des cellules de levure suspendues dans une solution de glucose de concentration variable (10 et 15mg/ml) avec la présence d'extrait à différentes concentrations. La quantité de glucose restant dans le milieu après un temps de contact avec les cellules de levures sert d'indicateur de l'absorption du glucose par les cellules. Les résultats obtenus montrent que l'absorption du glucose par les cellules de levure à un meilleur pourcentage d'absorption avec une concentration 10mg/ml du glucose (Cirillo, 1961).

Le transport de glucose à travers la membrane cellulaire de levure se produit par diffusion facilitée, un mécanisme passif sans apport d'énergie, qui continue de se dérouler si le glucose intracellulaire est efficacement réduit ou utilisé (Abirami et al, 2014).

Certains travaux scientifiques montrent que le GLUT 2 apical ou luminale, la voie majoritaire de l'absorption intestinale du glucose, est une cible attrayante pour certains agents inhibiteurs d'origine végétale (Oran et al, 2006).

En plus, la plupart des études ont indiqué que les polyphénols pouvaient inhiber l'absorption de glucose des cellules intestinales par l'inhibition potentielle de transporteurs de glucose, y compris SGLT1 et GLUT2 (Manzano et Williamson, 2010 ; Farrell et al, 2013 ; Muller et al, 2018).

Les tubes qui ne montrent aucune absorption sont dus à cause la croissance des concentrations d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* et donc la croissance des composés phytochimiques dans le milieu. Ces composés peuvent être inhibés ou empêche la fixation du glucose sur les transporteurs et enfin aucune absorption a été effectué. Certaines substances végétales agissent selon un mécanisme compétitif à cause de leur analogie structurale avec le glucose (Oran et al, 2006). Mais cette explication reste une hypothèse et qu'une première étape dans la recherche de substances et sources naturelles biologiquement actives (Helliwell et al, 2000).

Donc, il est biologiquement plausible de dire que la consommation des flavonoïdes ou des aliments riches en flavonoïdes peut réduire le risque de diabète en modulant l'absorption de glucose pour prévenir du diabète.

D'autres essais complémentaires plus approfondis et nécessaires *in vivo* pour dire que cette plante elle a un effet antidiabétique.

IV. Application d'extrait naturel d'*Hibiscus sabdariffa* (décoction) dans la conservation des aliments et évaluation de qualités organoleptiques

V.1.pH

La mesure du pH est l'un des paramètres les plus importants dans le contrôle de la qualité de tous produits alimentaires.

La mesure du pH est très importante dans le cas des jus, car la multiplication microbienne et certaines réactions enzymatiques en dépendent. Les résultats de suivi des valeurs du pH du jus étudié, sans extrait et en présence d'extrait au cours de la période de conservation (15 jour) sont montrés dans le tableau VIII et la figure 19.

Tableau VIII : Tableau résumant les résultats de l'analyse du pH de jus en présence et en absence d'extrait végétaux d'*Hibiscus sabdariffa*.

Volume d'extrait	Jus sans extrait	Jus industriel	Variations des volumes utilisés						
			1ml	1,5ml	2ml	2,5ml	3ml	3,5ml	4ml
pH (1 ^{er} jour)	5,12	3,02	5,24	5,30	5,33	5,42	5,44	5,54	5,55
pH (7 ^{eme} jour)	4,60	3,02	4,66	4,85	4,78	4,86	4,76	4,92	5,13
pH (15 ^{eme} jour)	4,24	2,95	3,68	4,01	3,85	3,91	4,27	3,97	3,90

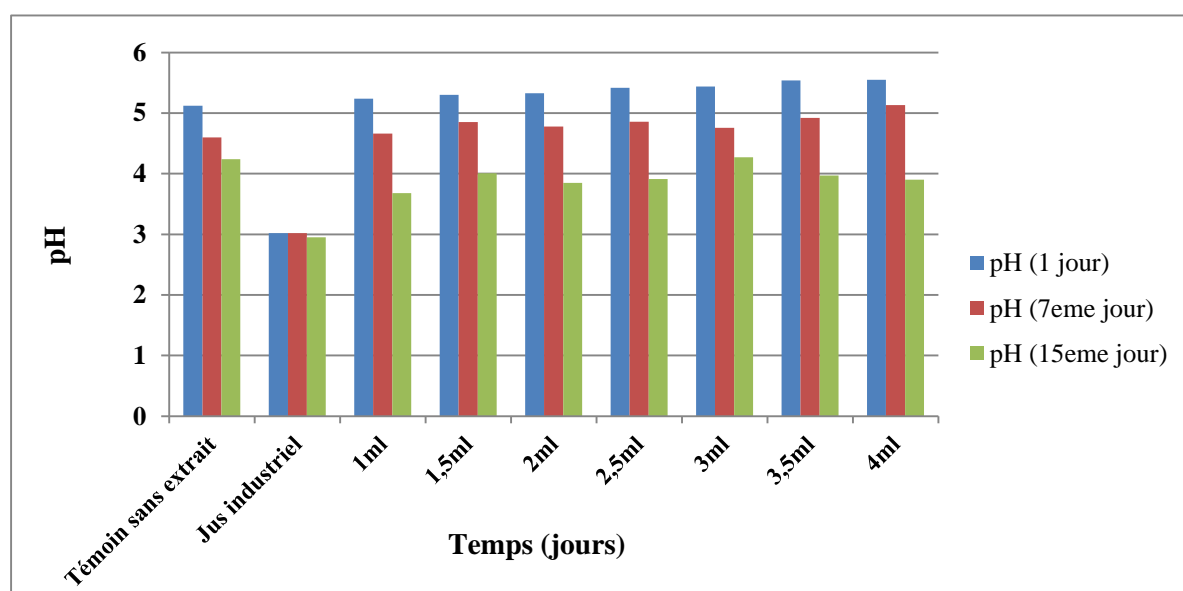


Figure 19 : Courbes représentant la variation du pH du jus dans différentes conditions pendant le temps de conservation.

Selon cette figure, on constate que le jus d'orange naturel a un pH initial de 5,12 (1^{er} jour) qui diminue rapidement jusqu'à 4,24 au dernier jour de conservation. Cette diminution est probablement due à la formation des acides organiques dont l'acide lactique, les plus abondants, par les bactéries mésophiles qui agissaient sur les nutriments comme les sucres présents dans tous les échantillons. Après l'ajout d'extrait végétal étudié, on remarque une acidification lente comparativement au jus témoin (sans extrait), dont le meilleur résultat est observé avec un volume de 3ml d'extrait avec une diminution de pH allant de 5,44 à 4,27. On peut suggérer que ce ralentissement est dû à l'effet antimicrobien des composés phénoliques de ces plantes (Fleuriet et al, 2005).

Le pH influence aussi sur le type des micro-organismes qui vont se développer et survivre dans le jus et ensuite la stabilité de cette denrée. Selon Chia et al (2012) le pH influence également la stabilité des composés bioactifs présents dans les jus de fruits.

Les valeurs de pH du jus industriel (témoin) sont comprises entre 3,02 à 2,65. Il est plus acide que le jus naturel, car il contient des stabilisants et même des régulateurs d'acidité. Ces valeurs oscillent au tour de la norme (AFNOR, 1970).

V.2. Qualités organoleptiques

Le tableau IX regroupe les résultats de l'analyse organoleptique du jus témoin négatif (naturel), jus avec des différents volumes de l'extrait et jus témoin positif (industriel).

Tableau IX : Résultats de l'analyse organoleptique préliminaire du jus de fruit naturel étudié.

Qualités organoleptiques	Tous les tubes	Trouble	Odeur	Texture
1 ^{er} jour		-	-	-
7 ^{eme} jour		-	-	-
15 ^{eme} jour		+	+	+

+ : présence de trouble/mauvaise odeur/changement de texture.

- : absence de trouble/odeur agréable/texture inchangé.

Les résultats obtenus (tableau IX) montrent une absence totale de trouble dans le cas du jus industriel. Alors qu'une apparition de trouble, mauvaise odeur et changement de texture sont remarqués pour le jus naturel sans extrait et le jus naturel avec extrait à partir de la 2^{ème} semaine. Cela est probablement dû à une prolifération bactérienne, en raison d'une possible contamination microbienne et à la présence des levures. Tandis que pour la désagréable odeur

qui apparaisse peut s'expliquer par la fermentation alcoolique et l'apparition des composés volatiles odorant au cours de la période de stockage (Varoquax et wiley, 1994).

Tableau X : Tableau résumant les résultats de l'analyse de la couleur du jus en présence d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*.

Volume d'extrait rajouté	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	Jus industriel	Jus sans extrait
1 ^{er} jour	MC	MC	MC	MC	MC	MF	MF	ORG	ORG
7 ^{eme} jour	MC	MC	MC	MC	MC	MF	MF	ORG	ORG
15 ^{eme} jour	MC	MC	MC	MC	MC	MF	MF	ORG	ORG

ORG : jaune orangé ; **MC :** marron claire ; **MF :** marron peu foncé

Concernant la couleur, les résultats mentionnés dans le tableau X représentent que le jus industriel révèle une couleur jaune orangé claire qui est préservé tout au long de la période de conservation. La puissance de ce changement de couleur est due à l'apparence des colorants dans le jus (AFNOR, 1970).

Par ailleurs, on remarque que le jus traité par l'extrait étudiée durant la période de conservation, un changement de couleur vers le marron peu foncé est constaté. Cela peut être expliqué par la couleur caractéristique de l'extrait en présence des pigments (anthocyanes) de la plante utilisée d'*Hibiscus sabdariffa* (Cisse et al, 2009).

Pour cela, on peut dire que cette étude reste toujours préliminaire et insuffisante pour dire que cet extrait a un effet de conservation, c'est pour cela que cette étude nécessite d'autres étapes d'optimisation et même d'analyser plus des propriétés physico-chimiques et microbiologiques du jus, pour affirmer les résultats obtenus. Aussi c'est par faute de temps et manque de moyens au laboratoire que vous n'avez pas l'occasion de poursuivre les manipulations nécessaires, dont l'analyse microbiologique, entre autres.

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. Chacune de ces plantes peut contenir des centaines voire des milliers de métabolites secondaires, ou de principes actifs qui peuvent produire différentes actions physiologiques sur le corps humain.

Dans ce contexte, on s'est intéressé à doser les composés phénoliques et les flavonoïdes de la plante médicinale *Hibiscus sabdariffa*, et évaluer leur activité biologique *in vitro*.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux révèle que notre extrait contient essentiellement de polyphénol à des teneurs majeures. De même nous avons quantifié les flavonoïdes, ce qui nous amène à noter la présence de ces derniers dans l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*.

Nous avons utilisé la méthode de DPPH pour étudier l'activité antioxydante, ce qui permet de révéler que l'extrait à une activité antiradicalaire comparable à celle d'acide ascorbique, ce qui est confirmé par les recherches bibliographiques qui ont démontré que les composés phénoliques sont des donneurs puissants de proton dans les légumes et les fruits.

L'extrait de plante médicinale traitée dans ce travail, présentent des propriétés inhibitrices des protéases digestives (trypsine) ainsi que hypoglycémiantes non négligeables.

Pour la conservation du jus d'orange, selon les résultats des paramètres physico-chimiques on a observé une acidification lente pour le jus qui contient l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* (décoction) par rapport au témoin négatif (jus naturel). La stabilité de ce paramètre peut être due à la propriété antioxydante de cette plante limitant l'apparition de pigments bruns.

Nos résultats restent préliminaires et des études plus approfondies *in vivo* seraient nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme d'action des molécules bioactives, leur dose thérapeutique ainsi que leur site d'action au niveau de la cellule. Cela permettrait de préparer des produits pharmaceutiques/alimentaires de grand intérêt thérapeutique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdallah, EE. (2010). Efficacité antibactérienne de la Roselle soudanaise (*Hibiscus sabdariffa* L.), une célèbre boisson de la médecine populaire soudanaise, *Journal of Intercultural Ethno-Pharmacology*, vol. 5, non. 2, p. 186.
- Abirami, A., Nagarani, G., & Siddhuraju, P. (2014). Measurement of functional properties and health promoting aspects-glucose retardation index of peel, pulp and peel fiber from *Citrus hystrix* and *Citrus maxima*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 4(1), 16-26.
- Abu-Tarboush HM, Ahmed SAB, Al kahtani HA. (1997). Some nutritional proprieties of karkadé (*Hibiscus sabdariffa*) seed products. *Cereal Chemistry*.74, 352-355.
- AFNOR (Association Française de Normalisation). (1970). Détermination de degré de Brix.
- Ait youcef M. (2006). Plantes médicinales de kabylie. Édition Ibis press .349p.
- Akharaiyi, F.C. and Boboye, B. (2010). Antibacterial and phytochemical evaluation of three medicinal plants. *Journal of Natural Products* 3 : 27-34.
- 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.6 (21), p. 506-511.
- Alothman M., Bhat R., et Karim A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115: 785- 788.
- Anson M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. GenPhysiol.*, 19: 446-459.
- Anthony O., Nada E., Youssef E., Paulette B. M, Toufic J. R., et Richard G. M. (2010). Identification et Caractérisation de Composes Phénoliques extraits du Raisin *Château ksara*. *Lebanese Science Journal*, 11 (2) : 119-122.
- APG III, (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 105–121.
- Ayad, Wissem. (2017). Évaluation de la qualité physico-chimique et bactériologique des eaux souterraines : cas des puits de la région d'El-Harrouch (wilaya de Skikda). Thèse de doctorat en

Microbiologie Appliquée .Université d'Annaba 110 p.

Ben Moussa M. T, Cherif R.A, Lekhal S, Bounab A, Hadeif Y. (2022). Dosage des composés phénoliques et détermination de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Brocchia cinerea* VIS de l'Algérie (Sud-Est). Algerian journal of pharmacy, 4(1) : 2602–975.

Boizot N., et Charpontier 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. p 79-82.

Boulin M et Fagnoni P. (2018). Chapitre 24 - Traitement des anémies. Pharmacie Clinique et Thérapeutique (5e édition), pages 379-395, 395.e1.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E et Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 28: 25-30.

Brouk B (1975). Plant consumed by men, Academic Press Inc., 137pp.

Chia, S. L.; Rosnah, S.; Noranizan, M. A. and Ramli, W. (2012).The effect of storage on the quality attributes of ultraviolet-irradiated and thermally pasteurised pineapple juices. International Food Research Journal, 19: 1001–1010.

Chikhoun. A. (2019). Effets des antioxydants naturels issus de *Pituranthos scoparius* et *Hibiscus sabdariffa* sur la stabilité oxydative d'émulsions à base de lactosérum et la cristallisation des lipides. Thèse de Doctorat en Sciences. Université freres Mentouri Constantine 1.

Cirillo, V.P. (1961). Sugar transport in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 15 :197-218.

Cisse. M, Dornier. M, Sakho. M, Ndiaye. A, Reynes M., & Sock .O. (2009). Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : Composition et principales utilisations, Fruits, vol. 64, p. 179–193.

Clydesdale, F. M., Francis, F. J. & Main, J. H. (1979). Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Anthocyanins colorants for beverages and gelatin desert. Food protection, 42(3), 204-207.

Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., Dominguez, H. (2009). Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. Journal of Food Chemistry, 114: 806-812.

- Costa P, Goncalves S, Valentao P, Andrade PB, Coelho N et Anabela R. (2012). Thymus lotocephalus wild plants and in vitro culture produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. Food Chemistry, 135, 1253-1260.
- Cowan N.M. (1999). Plant products as antimicrobial agent. Clinical Microbiology Reviews. 12(4) : 564-582.
- Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Journal Revue de génie industriel, 4, 25-39.
- D'Heureux-Calix F., Badrie N. (2004). Consumer acceptance and physicochemical quality of processed red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) sauces from enzymatic extracted calyces, Food Serv. Technol. 4, 141– 148.
- Da-Costa-Rocha. I, Bonnlander B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L. Une revue phytochimique et pharmacologique. Chimie alimentaire. 165, 424–443.
- Deraison, C. (2002). Isolement, caractérisation et cibles de nouveaux Inhibiteurs de protéases pour la création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons. Thèse de doctorat. Université Paris XI UFR Scientifique d'Orsay.
- Dieng I M, Fall D A , Badji K D , Sarr A , Sene M , Mbaye A , Diatta W et Bassene E. (2017). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-ethanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumach. Int. J. Biol. Chem. Sci. 11(2) : 768-776.
- Diniz, G., Coelho, P., Martins, V.S., Vieira, L., Novaes, R.D., Sarandy, M.M., Gonçalves, R.V. (2016). Applicability of Isolates and Fractions of Plant Extracts in Murine Models in Type II Diabetes: A Systematic Review. Hindawi publisher. Corp.
- Dorai T., Aggarwal B. B. (2004). Role of chemo-preventive agents in cancer therapy. Cancer : 215(2) :129-140.
- Ebrahimzadeh M. A., Pourmmorad F., et Hafezi S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish journal of biology, 32: 43-49.
- El-Adawy T.A., Khalil A.H. (1994). Characteristics of roselle seeds as a new source of protein and lipid, J. Agric. Food Chem 42, 1896– 1900.
- Endrias Abraham., (2006). Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'*Hibiscus sabdariffa* L. et à l'*Artemisia annua*. Thèse de doctorat : Science des Procédés,

Sciences des Agro-ressources. Toulouse : Institut National Polytechniques, p. 41-50.

Falade OS , Otemuyiwa IO, Oladipo A , Oyedapo OO , Akinpelu BA , Adewusi SR .(2005).La composition chimique et l'activité de stabilité membranaire de certaines herbes utilisées dans le traitement local de l'anémie. *Journal of Ethnopharmacology*, 102 (1), p. 15 – 22.

Farrell, T. L., S. L. Ellam, T. Forrelli, and G. Williamson. (2013). Attenuation of glucose transport across caco-2 cell monolayers by a polyphenol-rich herbal extract: Interactions with SGLT1 and GLUT2 transporters. *Biofactors* 39 (4):448–456

Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., & Macheix, J. J. (2005). Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, 121, 216.

Flores M. (2011). *Malva sylvestris* L. et autres mauves de France, Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de NANTES Faculté de pharmacie, Nantes.197p.

Formagio, ASN., Ramos, DD. , Vieira, MC., Ramalho, SR., Silva, MM., Zárata, NAH. , Foglio, MA and Carvalho, JE. (2015). Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. *Braz. J. Biol.*, vol. 75, no. 1, p. 69-76.

Fourcade, C. R. (2017). Les protéases et leurs inhibiteurs sécrétés par la cellule épithéliale : acteurs de l'inflammation et de la douleur. Thèse de doctorat. Université Toulouse 3 Paul Sabatier.

Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1) :1-93.

Helal, E.G.E., Abou-Aouf, N., Khattab, A.S.M. (2015). A Possible Hypoglycemic and Antioxidant Effect of Herbal Mixture Extraction in Diabetic Rats. *Egypt. Journal of Hospital Medicine*. 58, 109–119.

Helliwell, P.A., Richardson, M., Affleck, J., Kellett, G.L. (2000). Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brushborder fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. *Biochemical Journal*. 350, 163–169.

Herzi, N. (2013). Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de doctorat,

L'université de Toulouse.

Hirunpanich V., Utaipat A., Morales N.P., Bunyapraphatsara N., Sato H., Herunsale A., Suthisisang C. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats, *J. Ethnopharmacol.* 103, 252–260.

Ismail, Amin, et al. (2008). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Seeds Nutritional Composition, Protein Quality and Health Benefits. Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Medicine and Health Sciences. Université Putra Malaysia, 43400 Serdang Selangor. Globescienc books, p. 1-16.

Kaddumukasa, P.P. ; Imathiu, S.M. ; Mathara, J.M. and Nakavuma, J.L. (2017). Influence of physicochemical parameters on storage stability: Microbiological quality of fresh unpasteurized fruit juices. *Food SciNutr*, 5:1098– 1105.

Kakade, M. L., Simons, N. & Liener, I. E. (1969). An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chem.*, 49, 518-26.

Lagnika L. (2005).  tude Phytochimique et Activité Antipaludique de Substances Naturelles issues de Plantes B ninoises. Thèse de Doctorat Université Louis Pasteur de Strasbourg/Université d'Abomey-calavi, Bénin.

Li L, Aggarwal BB, Shishodia S, et al. (2004). Nuclear factor-kappa Band I kappa B kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. *Cancer*, 101(10) : 2351-2362.

Lin .H.H, Huang. H.P, Huang. C.C, Chen. J.H. et Wang. C.J. (2005). L'extrait riche en polyphénols d'hibiscus induit l'apoptose dans les cellules de carcinome gastrique humain via la phosphorylation de p53 et la voie en cascade p38 MAPK/FasL. *Molecular Carcinogenesis*, vol. 43, non. 2, p. 86–99.

Lu F, Foo LY. (2001). Antioxidant activity of polyphenols from sagz (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75, 197-202.

Manzano, S., and G. Williamson. (2010). Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinalcaco-2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research* 54:1773–1780

- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Second Edition, Academic Press Inc, 889 pages.
- Mbaebie B. O., Edeoga H. O., et Afolayan A. J. (2012). Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia Jacq.* Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, p 118-124.
- Mohamed BB, Sulaiman AA and Dahab AA. (2012). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Sudan, Cultivation and Their Uses. National Centre for Research (NCR), Dept. Of Crop Production and Biodiversity, Khartoum, Sudan. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences, vol.1, p. 48-59 (Online ISSN 2277 – 1808).
- Mounigan P., 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. 42, 469–475.
- Mourtzinos, I., Makris, D. P., Yannakopoulou, K., Kalogeropoulos, N., Michali, I. & Karathanos, V. T. (2008). Thermal stability of anthocyanin extract of *Hibiscus sabdariffa* L. In the presence of β -cyclodextrin. Agric. Food Chem, 56, 10303–10310.
- Muller, U., F. St ubl, B. Schwarzinger, G. Sandner, M. Iken, M. Himmelsbach, C. Schwarzinger, N. Ollinger, V. Stadlbauer, and O. Hoglinger. (2018). In vitro and in vivo inhibition of intestinal glucose transport by guava (*Psidium guajava*) extracts. Molecular Nutrition & Food Research 62:1701012.
- Naidu K.A. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery .An overview. Nutr. J.21 : 2-7.
- Nair M, Sandhu S S. (2013). A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts an antimicrobial effect on *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris*. Agricultural Sciences. Vol.4, No.11, 585-594.
- Noipa T, Supalax S, Thawatchai T et Wittaya N. (2011). New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. Food search International, 44, 798-806.
- Normala H., et Mardhiah-Hayati A. H. (2010). Determination and Evaluation of Antioxidative Activity in Red Dragon Fruit (*Hylocereus undatus*) and Green Kiwi Fruit (*Actinidia deliciosa*). American Journal of Applied Sciences, 7 (11) : 1432-1438.

- Omobuwajo T.O., Sanni L.A., Balami Y.A. (2000). Physical properties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) seeds, J. Food Eng. 45, 37–4.
- Oran, K., Peter, E., Shenglin, C., Christopher, P., Michael, K. et Mark, L. (2006). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids, The FASEB Journal. 21(2) :366-77.
- Owen P. L. et Johns T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern north American plant remedies used for gout. Journal of Ethnopharmacology, 64, 149 – 160.
- Park H. J., et Cha H. C. (2003). Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. Korean journal of biological society, 7 : 327-330.
- Paul, H. (1995). *Hibiscus sabdariffa* L. Département de Pharmacie. Paris, Université RENE DESCARTES PARIS V.
- Popovici C, Saykova I et Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des copposés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de Génie industriel, 4, 25-39.
- Pouget M.P., Vennat B., Lejeune B., Pourrat A. (1990). Extraction analysis and study of the stability of *Hibiscus anthocyanins*, Lebensm.-Wiss. Technol, 23, 103–105.
- Ragae S., Abdel-Hal E. S. M., et Noaman K. (2006). Antioxydant activity and nutrient composition of selected cereals for food use, Science direct, Food chem, 98: 32-38.
- Rawlings N.D., Barrett A.J. and Woessner J.F. (1998). Handbook of Proteolytic Enzymes. Eds. Academic press, 1665 p.
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P., et Ribéreau-Gayon P. (1968). Sciences et techniques du vin. Tome 1. Edition. Dunod, Paris. p 671.
- Schoeneberger, P.J., Wysocki, D.A., Benham, E.C, (1998). Field book for describing and sampling soils. Natural resources conservation services, USDA, National Soil Survey Center, Lincoln, NE USA.
- Schellenberger V., Braune K., Hofmann H. J. and Jakubke H. D. (1991). The specificity of chymotrypsin. Eur. J. Biochem. 199: 623-636
- Shakya, A.K. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. International Journal of Herbal Medicine. 4, 59-64.
- Shruthi V. H., et al. (2016). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) As a Source of Natural Colour, vol

16, N°2, p. 515-522 (ISSN 0972-5210).

Siddhuraju P et Becker K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* L.) seed extracts. Food Chem. 101, 10-19.

Singh N, Ma LQ, Srivastava M et Rathinasabapathi B. (2006). Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. Plant Science 170, 274–282.

Sinha, S.K., Ahmad, I., Gayathri, M. (2013). Antidiabetic effect of Ethanol extracts of *Syzygium jambolanum* seed (In Vitro). International Journal of Drug Development and Research. 5 (3): 187-191.

Talbi H., Boumaza A., El-Mostafa K., Talbi J., Hilali A., (2015). Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L., Mater. Environ. Sci, 6 (4) : 1111-1117.

Varoquaux, P., & Wiley, R. C. (1994). Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In Minimally processed refrigerated fruits & vegetables (pp. 226-268). Springer, Boston, MA.

Vasavi C L, Jyothi AS, Sravani P, Chand TP, Adil SK, Ramasubramania RR and Harinadha KB. (2019). *Hibiscus cannabinus* and *Hibiscus sabdariffa* Phyto Pharmacognostical review. Journal of pharmacognosy and Phytochemistry.8 (1): 313-318.

Wong P.K., Yusof S., Ghazali H.M., Che Man Y.B. (2002). Physicochemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), Nutr. Food Sci. 32, 68–73.

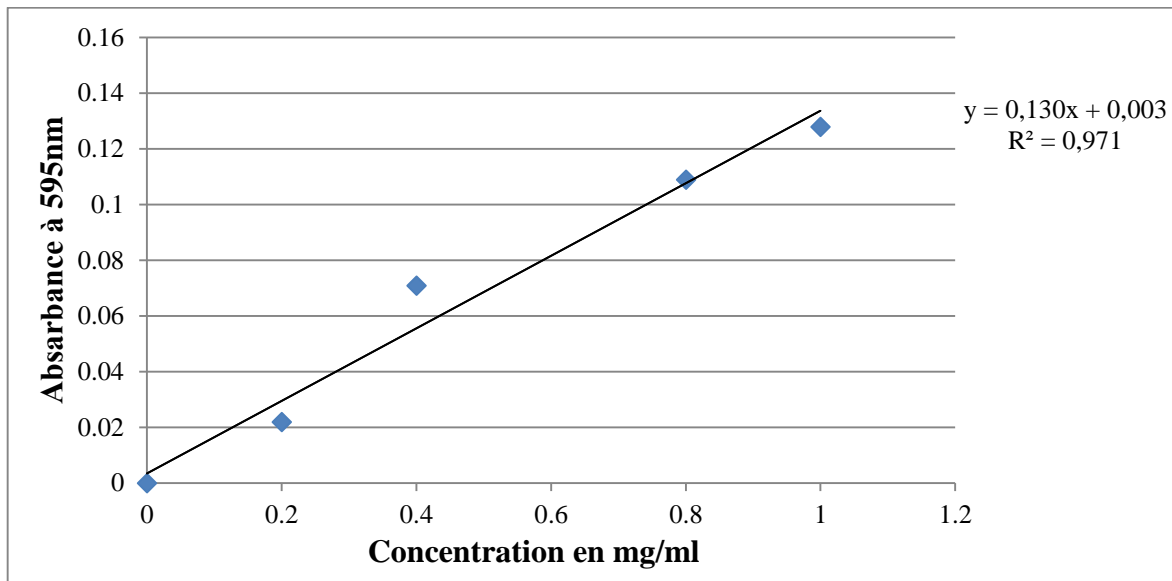
Wong S. P., Leong L. P., et William Koh J. H. (2006). Antioxidant activities of extracts of selected plants. Food chemistry, 99 :775-783.

Annexes

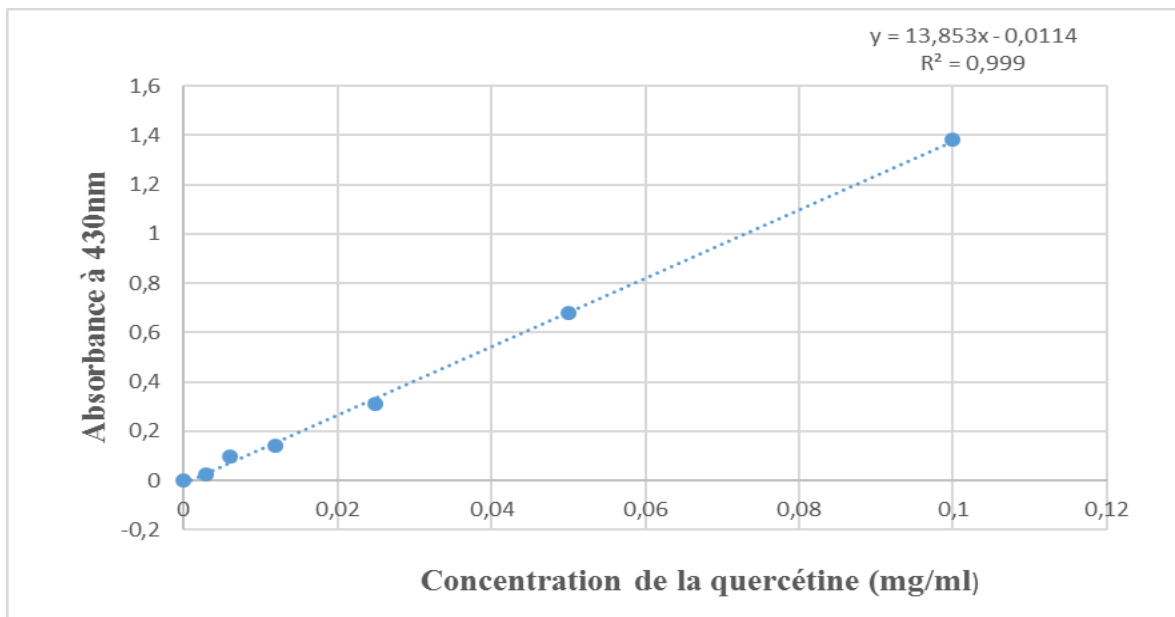
Annexe 1 : Les Solutions

- **Préparation du tampon Tris de 0,005M**
 - 1,21g de Tris
 - 0,65g de CaCl_2
 - Qsp 200ml d'eau distillée
- **Préparation de solution de caséine à 0,5M**
 - 2g de caséine
 - Qsp 100ml de tampon Tris
- **Préparation d'acide acétique à 30%**
 - 30ml d'acide acétique
 - Qsp 100ml d'eau distillée
- **Préparation de HCL à 1N**
 - 16,6ml de HCL à 12N
 - Qsp 200ml d'eau distillée
- **Préparation de HCL à 0,001M**
 - 1ml d'HCL à 1N
 - Qsp 1000ml d'eau distillée
- **Préparation de NaOH à 1N**
 - 8mg de NaOH
 - Qsp 200ml d'eau distillée avec une agitation
- **Préparation de Bradford**
 - Ethanol absolu 10ml
 - Acide phosphorique 85% 20ml
 - BBC 20mg
 - Qsp 200ml d'eau distillée 200ml
- **Préparation de BSA à une concentration de 1mg/ml**
 - 10mg de BSA
 - Qsp 10ml d'eau distillée

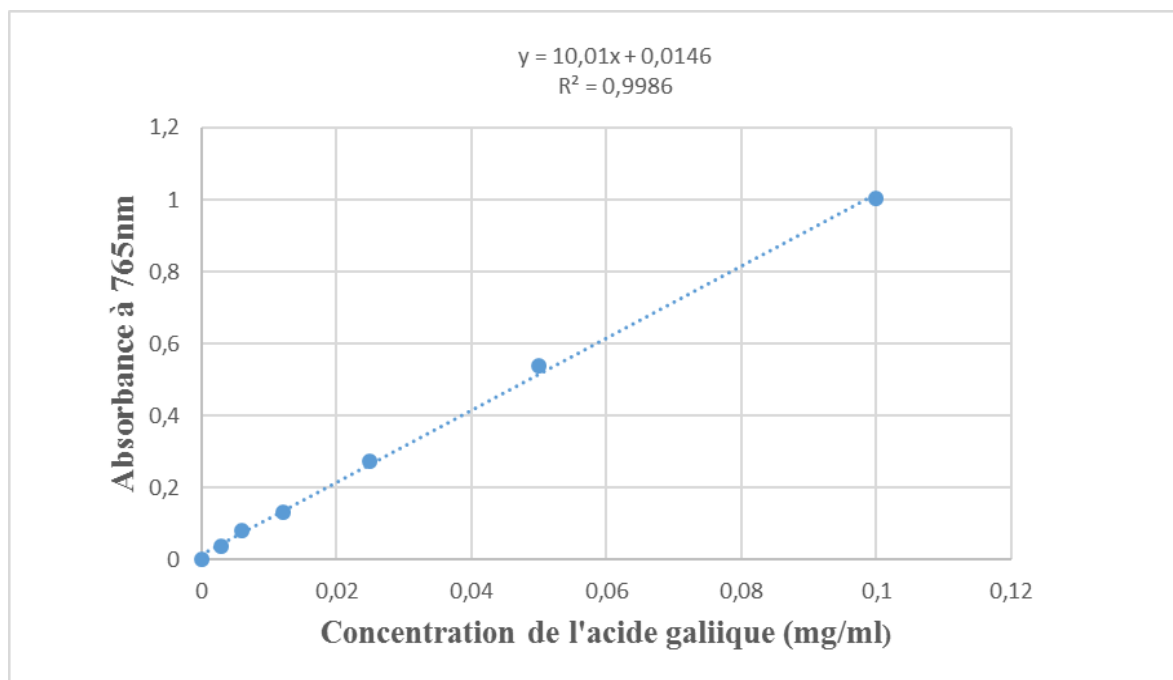
Annexe 2 : Les courbes d'étalonnages



Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines.



Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.



Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.

Annexe 3 : Appareillages et verrerie utilisés dans la pratique.

Appareillages	Verrerie
<ul style="list-style-type: none"> ▪ PH mètre (OHAUS STATER 2100) ▪ Bain marie (PRECISDIG) ▪ Réfrigérateur (MAXIPOWER) ▪ Plaque chauffante (IKA C-MAG) ▪ Balance de précision (OHAUS PRseries) ▪ Centrifugeuse ▪ Agitateur magnétique (LabTech LMS-1003/STUART) ▪ Spectrophotomètre (OPTIZEN POP) ▪ Vortex de type VELP SCIENTIFICA ▪ Etuve (MMMERT) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Béchers 100ml, 200ml, 500ml ▪ Fiole jaugée de 500ml ▪ Entonnoir ▪ Tubes à essais ▪ Micropipettes 20ul-1000ul ▪ Flacons de 200ml stériles ▪ Spatule ▪ Epruvettes graduées de 100ml, 10ml

Résumé

Réalisé par :
Grazem Soumia
BELHOUT Kahina

Jury :
Président : IMESSAOUADENE Ali
Promoteur : CHERGUI Achour
Examineur : LEBDIRI Farid

Thème : Etude des activités biologiques de la karkadé (*Hibiscus sabdariffa*)

Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante, inhibitrice de trypsine, antidiabétique et la conservation du jus naturelle par l'extrait préparé à partir des fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* L. L'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* a été obtenu par macération dans un solvant polaire : l'éthanol. L'analyse quantitative de cette extrait a révélé la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes dont les valeurs sont : pour les composés phénoliques ($16,163 \pm 0,099$ mg EAG/g d'extrait), les flavonoïdes ($9,711 \pm 0,013$ mg EQ/g d'extrait). L'activité antioxydante a été établie par la méthode de DPPH *in vitro*, les résultats obtenus démontrent la présence des principes actifs antioxydants dans l'extrait avec des proportions différentes. L'évaluation de l'activité inhibitrice de trypsine a révélé une puissante activité inhibitrice-concentration dépendante significative d'extrait étudié. Concernant l'activité antidiabétique augmentant la prise de glucose par les cellules de levure dans une concentration de 1,5mg/ml d'extrait. Les résultats obtenus pour la conservation du jus montrent qu'il y a une acidification du milieu qui due à une propriété antioxydante de plante.

Mots clés : *Hibiscus sabdariffa* L, Extraction, Polyphénols, Flavonoïdes, Activités biologiques.

Abstract

Natural plant extracts contain a variety of biologically active molecules. In this context, we attempt to evaluate the antioxidant, trypsin inhibitor, antidiabetic and natural juice preservation activity of the extract prepared from the flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. The extract of *Hibiscus sabdariffa* was obtained by maceration in a polar solvent: ethanol. Quantitative analysis of this extract revealed the presence of phenolic compounds and flavonoids, the values of which are: for phenolic compounds (16.163 ± 0.099 mg EAG/g of extract), flavonoids (9.711 ± 0.013 mg EQ/g of extract). The antioxidant activity was established by the *in vitro* DPPH method, the results demonstrate the presence of antioxidant active ingredients in the extract with different proportions. Evaluation of trypsin inhibitory activity reveals a significant concentration-dependent potent inhibitory activity. Regarding the antidiabetic activity increasing glucose uptake by yeast cells in a concentration of 1.5mg/ml of extract. The results obtain for the preservation of the juice show that there is an acidification of the environment, which is due to an antioxidant property of the plant.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L, Extraction, Polyphenols, Flavonoids, Biological activities.

ملخص

تحتوي المستخلصات النباتية الطبيعية على مجموعة متنوعة من الجزيئات النشطة بيولوجيًا. في هذا السياق حاولنا تقييم النشاط المضاد للأكسدة ومثبط الترسين ومضاد السكر والحفاظ على العصير الطبيعي بالمستخلص المحضر من أزهار الكركديه. تم الحصول على مستخلص الكركديه عن طريق النقع في مذيب قطبي: الإيثانول. أظهر التحليل الكمي لهذا المستخلص وجود مركبات فينولية وفلافونيدات، وقيمها هي: للمركبات الفينولية (16.163 ± 0.099 ملجم EAG / جم من المستخلص)، الفلافونويد (9.711 ± 0.013 ملجم EQ / جم من المستخلص). تم تحديد نشاط مضادات الأكسدة بواسطة طريقة DPPH في المختبر، وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وجود مكونات نشطة مضادة للأكسدة في المستخلص بنسب مختلفة. أظهر تقييم النشاط المثبط للترسين وجود نشاط مثبط قوي يعتمد على التركيز في المستخلص المدروس. فيما يتعلق بالنشاط المضاد لمرض السكر، زيادة امتصاص الجلوكوز بواسطة خلايا الخميرة بتركيز 1.5 ملغ/مل من المستخلص. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها لحفظ العصير أن هناك تحمضًا في الوسط يرجع إلى خاصية مضادات الأكسدة للنبات.

الكلمات المفتاحية: الكركديه، الاستخلاص، البوليفينول، الفلافونويد، الأنشطة البيولوجية.