



# THÈSE DE DOCTORAT

ANNÉE UNIVERSITAIRE :

2025- 2026

N° D'ORDRE : 160

FORMATION DOCTORALE

AGRICULTURE ET ENVIRONNEMENT TROPICAL

Mention : Biologie- Santé

Spécialité : Biochimie / Pharmacologie des substances  
Naturelles

THÈME :

Innocuité et évaluation de quelques propriétés biologiques d'un THE formulé à partir de *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* ; trois plantes aromatiques récoltées en Côte d'Ivoire

Prénoms : Quesnelle Epiphanie

NOM: N'DRI

JURY

Président : Mme. YEBOUE N'Guessan Lucie, Professeur Titulaire, Université Jean LOROUGNON GUÉDÉ

Directeur : M. KPOROU Kouassi Elisée, Professeur Titulaire, Université Jean LOROUGNON GUÉDÉ

Rapporteur : M. KIPRE Gueyraud Rolland, Maître de Recherche, Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Examineur 1 : M. M'BOH Gervais Méline, Maître de Recherche, Institut Pasteur, Abidjan, Côte d'Ivoire

Examineur 2 : M. OKOU Obou Constantin, Maître de Conférences, Université Jean LOROUGNON GUÉDÉ

Soutenue le  
20/12/2025

---

---

**TABLE DES MATIERES**

DEDICACE..... vii

AVANT-PROPOS ..... viii

REMERCIEMENTS ..... ix

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS ..... xii

LISTE DES TABLEAUX..... xiv

LISTE DES FIGURES..... xv

INTRODUCTION..... 1

PREMIERE PARTIE : GENERALITES ..... 5

    1. Plantes médicinales et plantes aromatiques et leur utilisation en phytothérapie ..... 6

        1.1 Plantes Médicinales ..... 6

        1.2 Plantes aromatiques ..... 6

        1.3 Tisanes et thés à base de plantes médicinales ..... 7

            1.3.1 Définitions ..... 7

            1.3.2 Classification des thés et tisanes ..... 7

                1.3.2.1 Thés fermentés..... 8

                1.3.2.2 Thés non fermentés..... 8

                1.3.2.3 Thés ou tisanes à base de plusieurs espèces végétales ..... 9

                    1.3.2.3.1 Tisanes et thés à activité antioxydante..... 9

                    1.3.2.3.2 Tisanes et thés à activité antihyperglycémique et antihyperlipédémique10

                    1.3.2.3.3 Tisanes et thés à activité immunostimulante ..... 11

    2. Métabolites secondaires d'intérêt dans les thés ..... 11

        2.1 Polyphénols..... 12

        2.2 Flavonoïdes ..... 13

        2.3 Terpènes ..... 14

        2.4 Composés volatiles des plantes aromatiques ..... 16

        2.5 Alcaloïdes ..... 17

    3. Activités biologiques des thés ou tisanes ..... 17

        3.1 Activité antioxydante ..... 17

        3.2 Activité anti-inflammatoire..... 18

        3.3 Activité antibactérienne ..... 19

3.4	Activité antidiabétique .....	20
3.5	Activité anticancéreuse .....	21
3.6	Activité immunostimulante.....	22
4.	Plantes aromatiques de l'étude .....	24
4.1	<i>Lippia multiflora</i> Moldenke (Verbenaceae).....	24
4.1.1	Description botanique .....	24
4.1.2	Position Systématique .....	25
4.1.3	Origine et distribution géographique.....	26
4.1.4	Utilisations traditionnelles et propriétés pharmacologiques .....	26
4.1.5	Innocuité de <i>Lippia multiflora</i> .....	27
4.1.6	Composition chimique .....	28
4.2	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Zingiberaceae).....	29
4.2.1	Description botanique .....	29
4.2.2	Position systématique.....	29
4.2.3	Origine et répartition géographique .....	30
4.2.4	Utilisations traditionnelles et propriétés pharmacologiques .....	30
4.2.5	Innocuité.....	31
4.2.6	Composition chimique .....	31
4.3	<i>Mentha piperita</i> (Lamiaceae).....	32
4.3.1	Description botanique .....	32
4.3.2	Position systématique.....	33
4.3.3	Origine et répartition géographique .....	33
4.3.4	Utilisations traditionnelles et propriétés pharmacologiques .....	34
4.3.5	Innocuité de <i>Mentha piperita</i> .....	35
4.3.6	Composition chimique .....	35
5.	Innocuité des plantes médicinales et évaluation toxicologique.....	35
5.1	Notions d'innocuité et de toxicité en phytothérapie .....	35
5.2	Méthodes d'évaluation de l'innocuité.....	36
5.2.1	Approches expérimentales .....	36
5.2.2	Toxicité aiguë.....	36
5.2.3	Toxicité subaiguë .....	37
5.2.4	Toxicité chronique.....	37
6.	Généralités sur les paramètres biochimiques et hématologiques .....	37

---

---

6.1 Généralités sur les paramètres biochimiques .....	37
6.1.1 Principes de dosage de l'ALAT et l'ASAT .....	37
6.1.2 Principe de dosage de la créatinine .....	38
6.1.3 Principe de dosage de l'urée.....	38
6.1.4 Principe de dosage du glucose .....	39
6.2 Généralités sur les paramètres hématologiques .....	39
7. Activité antiradicalaire .....	40
7.1 Test de 2,2-diphényl-1-1-picryl-hydrazyl (DPPH).....	40
7.1.1 Principe DPPH .....	40
7.2 Test de l'ABTS .....	40
7.2.1 Principe ABTS .....	40
8. Caractérisation phytochimique .....	41
8.1 Screening phytochimique.....	41
8.1.1 Principe de la recherche des alcaloïdes .....	41
8.1.2 Principe de la recherche des Polyphénols .....	41
8.1.3 Principe de la recherche des tanins.....	41
8.1.4 Principe de la recherche des flavonoïdes .....	42
8.1.5 Principe de la recherche des saponosides.....	42
8.1.6 Principe recherche des quinones .....	42
8.1.7 Principe recherche des stérols et polyterpènes.....	42
8.1.8 Principe recherche des mucilages .....	43
8.2 Etude quantitative des quelques métabolites secondaires.....	43
8.2.1 Principe de la détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	43
8.2.2 Principe de dosage de la teneur en flavonoïdes totaux.....	43
8.2.3 Principe de dosage des tanins condensés .....	44
9. Analyse sensorielle .....	44
9.1 Définition .....	44
9.2 Méthodologie classique.....	44
10. Défis et perspectives pour le développement d'un thé phyto-thérapeutique .....	45
10.1 Standardisation et formulation des tisanes thérapeutiques .....	45
10.2 Statut du thé : Complément alimentaire ou médicament .....	46
10.3 Développement d'une filière économique locale.....	46

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES .....	47
II.1 Matériel.....	48
II.1.1 Matériel végétal.....	48
II.1.2 Matériel animal .....	49
II.1.3 Matériel chimique .....	50
Divers produits chimiques et réactifs ont été utilisés au cours des différentes phases expérimentales : .....	50
II.1.4. Matériel technique.....	50
II.2. Méthodes.....	51
II.2.1 Méthode dePréparation des poudres végétales.....	51
II.2.2 Formulation de thés.....	52
II.2.3 Évaluation sensorielle : Test hédonique.....	52
II.2.4 Préparation de l'extrait sec de la formulation 4 pour les tests.....	52
II.2.5 Evaluation de la toxicité aiguë et subaiguë de la formulation 4.....	53
II.2.5.1 Test de toxicité aigüe.....	53
II.2.5.2 Évaluation de la toxicité subaiguë.....	54
II.2.5.2.1 Dosage des paramètres biochimiques et hématologiques.....	55
II.2.5.2.1.1 Prélèvement du sang.....	55
II.2.5.2.1.2 Détermination paramètres hématologiques.....	55
II.2.5.2.1.3 Détermination des paramètres biochimiques .....	56
II.2.5.2.1.4 Dosage des ions calcium (Ca <sup>2+</sup> ), sodium (Na <sup>+</sup> ) et potassium (K <sup>+</sup> ) .....	57
II.2.5.2.2 Prélèvement des organes.....	59
II.2.5.2.2.1 Réalisation des coupes histologiques .....	59
II.2.6 Determination de quelques propriétés biologiques .....	60
II.2.6.1 Étude de l'effet antidiabétique de l'extrait de THE 4.....	60
II.2.6.1.1 Test de tolérance au glucose .....	60
II.2.6.1.2 Activité antihyperglycémiant de l'extrait de THE 4 formulé chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine .....	61
II.2.6.2 Activité immunostimulante .....	62
II.2.6.2.1 Mesure de la viabilité cellulaire et évaluation de la production de NO.....	62
II.2.6.2.1.1 Préparation des cellules.....	62
II.2.6.2.2 Traitement des cellules RAW par le THE4 et la LPS.....	63

II.2.6.2.3 Evaluation de la production de monoxyde d'azote (NO) par la méthode de Griess .....	63
II.2.7 Activité antiradicalaire .....	64
II.2.7.1 Test de 2,2-diphényl-1-1-picryl-hydrazyl (DPPH).....	64
II.2.7.2 Test de l'ABTS .....	65
II.2.8 Caractérisation phytochimique.....	66
II.2.8.1- Screening phytochimique .....	66
II.2.8.1.1 Recherche des alcaloïdes .....	66
II.2.8.1.2 Recherche des Polyphénols.....	67
II.2.8.1.3 Recherche des tanins.....	67
II.2.8.1.4 Recherche des flavonoïdes.....	67
II.2.8.1.5 Recherche des saponosides. ....	67
II.2.8.1.6 Recherche des quinones .....	68
II.2.8.1.7 Recherche des stérols et polyterpènes.....	68
II.2.8.1.8 Recherche des mucilages .....	68
II.2.8.2 Etude quantitative des quelques métabolites secondaires .....	69
II.2.8.2.1 Détermination de la teneur en polyphénols totaux .....	69
II.2.8.2.2 Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux .....	69
II.2.8.2.3 Dosage des tanins condensés .....	70
II.9 Analyses statistiques .....	70
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION .....	71
III.1 Résultats.....	72
III.1.1 Acceptabilité des formulations.....	72
III.1.2 Innocuité .....	72
III.1.2.1 Toxicité aiguë.....	72
III.1.2.1.1 Signes cliniques d'intolérance .....	72
III.1.2.1.2. Tendance du poids corporel des animaux lors du test de toxicité aiguë..	73
III.1.2.2 Toxicité subaiguë .....	73
III.1.2.2.1 Tendance du poids corporel des animaux lors du test de toxicité subaiguë .....	73
III.1.2.2.2. Profil des paramètres hématologiques .....	74
III.1.2.2.3 Profil des paramètres biochimiques.....	75

---

---

III.1.2.2.3 Concentrations des minéraux (Ca <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ) mesurées dans les différents groupes expérimentaux.....	77
III.1.2.2.4 Effet du THE 4 sur le poids relatif des organes foie, reins et cœur des rats .....	79
III.1.2.2.5 Analyses histologiques .....	80
III.1.3 Potentiel antiradicalaire.....	83
III.1.3.1 Potentiel d'inhibition du DPPH.....	83
III.1.3.2 Potentiel d'inhibition du radical ABTS.....	84
III.1.4 Propriétés biologiques du THE 4 .....	86
III.1.4.1 Tolérance au glucose .....	86
III.1.4.2. Potentiel antihyperglycémiant du THE 4 .....	87
III.1.5. Production de monoxyde d'azote (NO) .....	88
III.1.6 Profils phytochimiques du THE4.....	89
III.1.6.1 Profil qualitatif des phytoconstitués .....	89
III.1.6.2 Profil quantitatif en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés du THE 4	90
III.2 Discussion.....	89
CONCLUSION .....	102
REFERENCES.....	105
ANNEXES .....	132

**DEDICACE**

*Je dédie cette thèse :*

*A mon père N'DRI FRANCOIS et à ma mère N'DOLI Epse N'DRI MARIE LOUISE, pour leurs encouragements, et leurs soutiens tant financiers que spirituels. Votre disponibilité à m'accompagner m'a permis de mener à bien ce travail que j'espère fera votre fierté.*

*A mes adorable sœurs chéries N'DRI France Marine, N'DRI Rebecca, YAGO Melissa Marie Laurence pour leur amour, leurs encouragements constants, et leurs prières quotidiennes qui m'ont été d'une très grande aide.*

*A mes frères N'DRI Ange Désiré et N'DRI Eymard, pour leurs soutiens durant tout mon cursus scolaire et universitaire.*

*À ma fille bien-aimée AYE Cassandre Marie- Oria, Tu es ma plus belle source de motivation et d'inspiration. Chaque jour, tu me rappelles pourquoi il est important de persévérer et de toujours viser l'excellence. Ce travail est aussi pour toi, pour te montrer qu'avec de la détermination, tout est possible.*

*À mon compagnon AYE Guy Roger, Merci pour ton soutien constant, ta patience et ton amour. Ta présence à mes côtés a été une force précieuse, m'aidant à surmonter les moments de doute et de fatigue. Cette réussite est aussi la tienne.*

*A toute ma famille et à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à ma formation.*

*Que le bon DIEU vous protège et vous bénisse pour tous vos biens faits.*

## AVANT-PROPOS

En Côte d'Ivoire, les plantes médicinales et aromatiques constituent une composante essentielle du patrimoine culturel et thérapeutique des populations. Leur usage sous formes d'infusions demeure profondément ancré dans les pratiques de soins et les habitudes nutritionnelles. Parmi ces plantes, *Lippia multiflora* (Verveine citronnelle), *Zingiber officinale* (gingembre) et *Mentha piperita* (menthe poivrée) sont traditionnellement reconnues pour leurs effets bénéfiques sur le bien-être digestif, tonique et préventif. Cependant, la généralisation de leur consommation, souvent en dehors de tout cadre scientifique validé, suscite des interrogations de leur innocuité, de même que celle de leurs propriétés biologiques réelles lorsqu'elles sont combinées sous forme de thé.

C'est dans cette perspective que s'inscrit le présent travail de thèse de Doctorat réalisé au sein des locaux du Groupe d'Excellence de Recherche sur les Produits de la Pharmacopée Traditionnelle (GeRProPhaT) de l'Université Jean Lorougnon Guédé (Daloa), un pôle scientifique engagé dans la valorisation raisonnée des ressources végétales locales à visée thérapeutique.

Ainsi, cette recherche s'est donnée pour objectif d'évaluer, selon des approches expérimentales modernes et rigoureuses, la sécurité d'emploi d'une formulation de Thé à partir des essences végétales ci-dessus citées, ainsi que certaines de ses activités biologiques d'intérêt (antiradicalaire, immunostimulant et antihyperglycémiant).

Ce travail vise à concilier savoirs traditionnels et exigence scientifique, dans une approche intégrée qui contribue à la sécurisation du consommateur, à la valorisation du patrimoine végétal local, et au développement de produits naturels sûrs, efficaces et économiquement viables, en cohérence avec les objectifs de santé durable et de souveraineté sanitaire.

### REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes qui, par leur soutien, leurs conseils et leur engagement, ont contribué à la réalisation de cette thèse de Doctorat.

Madame ADOHI KROU Viviane, Professeur Titulaire de Physiques et Présidente de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE pour son leadership inspirant et son engagement en faveur de l'excellence académique et de la recherche scientifique. Grâce à sa vision, l'Université continue de briller comme un pôle de savoir et d'innovation ;

Monsieur SORO Dogniméton, Professeur Titulaire d'Agropédologie et Vice-Président de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE en charge de la Pédagogie et de la Vie Universitaire pour son engagement dans le respect du calendrier académique ;

Monsieur KONE Issiaka, Professeur Titulaire de Sociologie des Organisations et Vice-Président de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE en charge de la Planification, de la Programmation et des Relations Extérieures pour son soutien constant ;

Monsieur KOUASSI Kouassi Clement, Maître de Conférences de Microbiologie et Sécurité Alimentaire et Directeur de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) Agroforesterie pour ses efforts inlassables visant à garantir une formation de qualité au sein de l'UFR ;

Monsieur BEUGRÉ Grah Avit Maxwell de l'UJLoG, Professeur Titulaire de Biochimie-Nutrition et Directeur du Laboratoire d'Agrovalorisation pour son expertise et son engagement pour la recherche appliquée qui ont constitué une source d'inspiration précieuse pour la conduite de nos travaux ;

Monsieur KPOROU Kouassi Élisée, Professeur Titulaire de Pharmacologie-Biochimie et Directeur de cette thèse de Doctorat pour avoir accepté d'en assurer la direction scientifique. Son dynamisme, ses conseils avisés, sa disponibilité sans faille, ainsi que son exigence académique et ses encouragements constants ont été des atouts majeurs dans l'aboutissement de ce travail. La confiance qu'il m'a témoignée a renforcé ma rigueur et nourri ma passion pour la recherche. Grâce à son engagement et à la qualité de son encadrement, ce manuscrit a pu être considérablement enrichi. Que Dieu Tout-Puissant vous accorde sa grâce et comble ses aspirations ;

Madame YEBOUE N'Guessan Lucie, Professeur Titulaire d'Entomologie Générale pour avoir accepté de présider ce jury de thèse malgré ses nombreuses occupations ;

Monsieur OKOU Obou Constantin, Maître de Conférences de Biochimie-Pharmacologie pour sa disponibilité en tant qu'examineur à évaluer ce travail ;

Monsieur M'BOH Gervais Mélaïne, Maître de Recherche de Biochimie-Nutrition à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) qui a accepté de participer au jury de cette thèse en tant qu'examinateur ;

Monsieur KIPRE Gueyraud Rolland, Maître de Recherche de Biochimie-Parasitologie à l'Université Félix Houphouët-Boigny (UFHB) qui a contribué à améliorer la qualité du document à travers ses suggestions en sa qualité de rapporteur dans ce jury ;

Madame KOUAKOU Siransy-Gisèle, Professeur Titulaire de Pharmacologie à l'UFR des Sciences Pharmaceutique et Biologique (SPB) de Université Félix Houphouët-Boigny (UFHB) pour m'avoir accueilli et permis de faire mes premiers pas en expérimentation animale. Je voudrais vous témoigner l'expression de ma profonde gratitude pour vos conseils avisés et votre hospitalité ;

Monsieur AYOLIÉ Koutoua Constant, Professeur Titulaire d'Agro-physiologie dont les encouragements et la bienveillance ont été d'un grand réconfort tout au long de mon parcours universitaire ;

Monsieur ACKAH Jacques Auguste Alfred Bognan, Professeur Titulaire de Biochimie-Pharmacologie et Directeur adjoint à l'UFR Agroforesterie chargé de la recherche pour ses conseils et sa disponibilité face aux préoccupations des étudiants

Monsieur OBOUAYEBA Abba Pacôme, Maître de Conférences de Biochimie-Pharmacologie et Responsable du Niveau Master 2 de Biologie-Santé à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa pour son soutien et son accompagnement tout au long de ce parcours ;

Monsieur KOFFI Allali Eugène, Maître de Conférences de Biochimie-Microbiologie et Responsable du Niveau Master 1 de Biologie-Santé à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa pour son sens de paternité envers les étudiants ;

Messieurs les Enseignants Chercheurs : Dr GBOGBO Moussa, Dr AKRÉ Djako Sosthène Thierry, Dr OUATTARA Abou, Dr KOUAKOU Valère, Dr YAO René, Dr SOUMAHORO Ibrahim Aimé pour la qualité de leurs enseignements et la pertinence de leurs conseils qui ont grandement contribué à renforcer mes compétences scientifiques ;

Monsieur NIABA Koffi Pierre Valery, Maître de Conférences de Biochimie-Nutrition pour avoir contribué à l'amélioration de ce manuscrit à travers ses observations en sa qualité de rapporteur ;

Madame EKISSI Alice Christine Epse Kouamé, Maître-de Conférences de Biochimie-Sciences des aliments, pour son soutien et ses conseils ;

Monsieur Clément Ouople, Technicien au Laboratoire de Pharmacologie de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques pour la formation sur l'expérimentation animale ;

A vous, mes cher (e)s ami (e) s, Dr ABOLI Tano-Bla Félicité, Dr CHOHO Frederic, Dr YAO Jean Jaurès, Dr SIBRI Jean François, TANOH Aya Honorine, KABORE Ramata et IPOU Konan qui ont partagé avec moi cette belle aventure scientifique et humaine. Merci pour votre soutien, votre entraide et les nombreux échanges enrichissants qui ont rythmé nos journées de travail. Votre disponibilité, votre esprit d'équipe et votre bienveillance ont rendu cette expérience plus agréable et motivante.

Toute la grande famille N'DRI et N'DOLI pour leur soutien matériel, moral et spirituel ainsi qu'à toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à l'amélioration de ce travail.

**LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS**

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique)

ADA : American Diabetes Association

AFNOR : Association Française de Normalisation

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AOAC : Association of Official Analytical Chemists

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CI<sub>50</sub> : Concentration Inhibitrice à 50%

DL<sub>50</sub> : Dose Létale 50

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl

FAO : Organisation des Nation Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

g : gramme

GeRProPhaT : Groupe d'Excellence et de Recherche sur les produits de la Pharmacopée Traditionnel

Glu : Glucose

Gly : Glybenclamide

HCL : : Acide chlorhydrique

LPS : Lipopolysaccharide

Met : Metformine

mL : Millilitre

MT : Médicament Traditionnel

NO : Monoxyde d'Azote

OGTT : Oral Glucose Tolerance Test

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OMS : Organisation Mondial de la Santé

pc : Poids Corporel

pH : potentiel Hydrogène

SFB : Sérum Fœtal bovin

STZ : : Streptozotocine

TTG : Test de tolérance au glucose

UFHB : Université Félix Houphouët-Boigny

UFR : Unité de Formation et de Recherche

UJLoG : Université Jean LOROUGNON GUEDE

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I:</b> Paramètres hématologiques .....	75
<b>Tableau II :</b> Influence du THE 4 sur poids relatifs des organes vitaux .....	79
<b>Tableau III:</b> Métabolites secondaires du THE 4.....	89

**LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> : Structures des polyphénols majoritaires dans les thés et tisanes .....	13
<b>Figure 2</b> : Structures chimiques des flavonoïdes majoritaires dans les thés ou tisanes .....	14
<b>Figure 3</b> : Structures des terpènes majoritaires dans les thés et tisanes .....	15
<b>Figure 4</b> : Structures de quelques composés volatiles dans les thés ou tisanes .....	16
<b>Figure 5</b> : Structures de quelques alcaloïdes dans les thés ou tisanes .....	17
<b>Figure 6</b> : Photo des Cellules RAW 264.7 TIB-71, American Type Collection (ATCC).....	24
<b>Figure 7</b> : Feuille de <i>Lippia multiflora</i> .....	25
<b>Figure 8</b> : Exemples de quelques sesquiterpènes .....	28
<b>Figure 9</b> : Exemples de quelques monoterpènes .....	28
<b>Figure 10</b> : A : <i>Zingiber officinale</i> Roscoe ; B: Rhizome du gingembre .....	29
<b>Figure 11</b> : Structures de quelques composés phénoliques du gingembre.....	32
<b>Figure 12</b> : Feuilles de <i>Mentha piperita</i> .....	33
<b>Figure 13</b> : Plantes et organes végétaux utilisés.....	48
<b>Figure 14</b> : Rats Wistar .....	49
<b>Figure 15</b> : production des poudres.....	51
<b>Figure 16</b> : Préparation de l'extraits sec de THE 4 .....	53
<b>Figure 17</b> : Histogrammes des valeurs d'appréciation des différents THES.....	72
<b>Figure 18</b> : Evolution du poids des rats après administration du THE 4 .....	73
<b>Figure 19</b> : Evolution du poids des rats après administration du THE 4 .....	74
<b>Figure 20</b> : Histogrammes de la concentration en ALAT (20a) et ASAT (20b) après administration de THE 4 .....	75
<b>Figure 21</b> : Histogrammes de la glycémie (21a) et de la créatinine (21b) après administration de THE 4 .....	76
<b>Figure 22</b> : Histogrammes de l'Urée après administration de THE 4.....	77
<b>Figure 23</b> : Teneurs en ions $Ca^{2+}$ , $Na^{+}$ et $K^{+}$ dans les sérums des différents groupes des rats témoins et traités.....	78
<b>Figure 24</b> : Photos des coupes histologiques du rein .....	81
<b>Figure 25</b> : Photos des coupes histologiques du foie .....	82
<b>Figure 26</b> : Photos coupes histologiques du cœur.....	83
<b>Figure 27</b> : Evolution des pourcentages d'inhibition du radical DPPH par le THE 4 et la vitamine C .....	84
<b>Figure 28</b> : Histogrammes des valeurs CI50 de la vitamine C et du THE 4.....	84

<b>Figure 29 :</b> Evolution des pourcentages d'inhibition de l'ABTS par le THE 4 et l'acide .....	85
<b>Figure 30:</b> Histogrammes des valeurs CI50 de l'acide gallique et du THE 4.....	85
<b>Figure 31:</b> Courbes de l'évolution de la glycémie en fonction du temps chez des rats .....	87
<b>Figure 32 :</b> Courbes de l'effet antihyperglycémique du THE 4 chez des rats .....	88
<b>Figure 33 :</b> Dose-réponse des concentrations du THE 4 sur la production des NO.....	89
<b>Figure 34:</b> Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés.....	90

# **INTRODUCTION**

Les plantes jouent un rôle essentiel dans la pharmacopée traditionnelle, où elles sont couramment utilisées pour répondre aux besoins d'alimentation, de santé et de bien-être des populations (Heinrich & Jäger, 2015). En Afrique, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que plus de 80 % des populations ont recours aux plantes médicinales comme alternatives thérapeutiques (OMS, 2003). En Côte d'Ivoire, l'usage des plantes dans les pratiques thérapeutiques locales est profondément ancré, en raison de leur accessibilité, de leur coût relativement faible et de leur perception comme étant naturelles et sans danger. Cette réalité s'inscrit dans un contexte mondial où environ 80 000 espèces végétales sont reconnues pour leurs potentialités médicinales (Benkhniq et al., 2010).

Parmi ces espèces, les plantes aromatiques occupent une place de choix grâce à leurs usages diversifiés en cosmétique, en cuisine et en phytothérapie (Kofinas et al., 2018). Ces plantes riches en huiles essentielles constituent une opportunité économique significative pour les pays en développement, notamment à travers la production de produits transformés et prêts à l'emploi, tels que les tisanes et les thés.

Le thé est consommé depuis des millénaires notamment en Asie, où il est considéré comme une boisson aux nombreuses vertus pour la santé (EFSA, 2018). *Camellia sinensis*, l'une des plantes les plus prisées dans la formulation des thés, est reconnue pour ses propriétés antioxydantes, amincissantes, stimulantes et diurétiques (Sharangi, 2009). En 2016, la consommation mondiale de thé était estimée à 4,1 milliards de tonnes, enregistrant une augmentation de 10 % en 2018 (FAO, 2018). Ce marché en pleine expansion s'observe dans plusieurs régions du monde : aux États-Unis, il représentait 12 milliards de dollars en 2022, avec une croissance de 13 % entre 2017 et 2021 (Peter, 2016) ; en Europe, il était évalué à 15 milliards d'euros en 2022, avec le Royaume-Uni, la Turquie et l'Allemagne parmi les plus grands consommateurs (Euromonitor International, 2021). L'Asie demeure le plus grand consommateur mondial, représentant environ 70 % de la consommation totale, avec un marché chinois estimé à plus de 65 milliards de dollars en 2021 (Statista, 2021).

En Côte d'Ivoire, la consommation de thé reste relativement faible mais connaît une croissance progressive. En 2022, elle était estimée à environ 2 millions de dollars, avec une dépendance majeure aux importations, couvrant environ 80 % des besoins nationaux (BAD, 2022). Cette forte dépendance entraîne un déficit commercial estimé à 1,1 millions de dollars par an (FAO, 2021 ; MCI, 2021), impactant la balance commerciale et la souveraineté économique du pays. Pourtant, la Côte d'Ivoire dispose d'une biodiversité riche en plantes aromatiques aux propriétés médicinales et économiques avérées. La valorisation de ces ressources à travers la production locale de thés pourrait non seulement réduire la dépendance

aux importations, mais aussi stimuler l'industrie agroalimentaire et promouvoir l'exportation de produits à forte valeur ajoutée.

Dans le cadre des travaux de recherche de Master 2, quatre espèces végétales aromatiques ont été sélectionnées sur la base de leur usage traditionnel et leurs propriétés biologiques reconnues pour formuler des thés : *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale*, *Hibiscus sabdariffa* et *Adansonia digitata*. Ces plantes sont couramment utilisées en Afrique de l'Ouest pour leurs effets bénéfiques sur la santé, notamment comme toniques, digestifs, antioxydants et anti-inflammatoires (N'Guessan *et al.*, 2009). Trois formulations ont été élaborées et soumises à une évaluation hédonique auprès d'un panel de dégustateurs. Les résultats ont mis en évidence la préférence de la combinaison *Lippia multiflora* + *Zingiber officinale* notamment pour son profil aromatique équilibré et à sa saveur citronnée et légèrement piquante (N'dri *et al.*, 2023). Dans une démarche d'optimisation sensorielle et fonctionnelle, une troisième plante, *Mentha piperita* L. a été intégrée à la formulation de thé la plus appréciée issue des travaux antérieurs, initialement composée de *Lippia multiflora* et de *Zingiber officinale*.

Les trois espèces aromatiques locales sélectionnées, *Lippia multiflora* (Verbenaceae), *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) et *Mentha piperita* (Lamiaceae) sont largement utilisées en Côte d'Ivoire pour leurs propriétés bénéfiques sur la santé. *L. multiflora* communément appelée « thé de savane », est réputée pour ses effets relaxants et analgésiques (Abena *et al.*, 2003 ; Dibong *et al.*, 2011). *Zingiber officinale* ou gingembre consommé sous forme de jus traditionnel « gnamankoudji », possède des effets digestifs, antiémétiques et anti-inflammatoires bien documentés (Soong *et al.*, 2011). Quant à *M. piperita* ou menthe poivrée, elle est appréciée pour son arôme rafraîchissant et intense, ainsi que pour ses propriétés carminatives, antioxydantes, antiseptiques et antispasmodiques (McKay & Blumberg, 2006 ; Reddy *et al.*, 2017). Elle est traditionnellement utilisée pour soulager divers troubles digestifs tels que les nausées, la diarrhée ou encore le syndrome du côlon irritable (McKay & Blumberg, 2006). L'intégration de ces trois plantes dans une formulation unique de thé pourrait non seulement répondre aux attentes des consommateurs en matière de produits naturels et fonctionnels, mais aussi favoriser une industrie locale durable et économiquement rentable. La valorisation de ces ressources végétales par le biais de thés et de tisanes prêtes à l'emploi contribuerait à leur accessibilité sur le marché ivoirien et international.

Dans cette perspective, cette étude vise à valoriser les espèces végétales *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* à travers un thé innovant et sécurisé en évaluant ses propriétés biologiques et son innocuité. Cette initiative s'aligne sur plusieurs Objectifs de Développement Durable (ODD) : notamment l'ODD 3 (Bonne santé et bien-être)

en offrant une alternative saine aux boissons industrielles, l'ODD 12 (consommation et production responsables) en favorisant une utilisation durable des plantes médicinales et aromatiques, et l'ODD 9 (Industrie, innovation et infrastructure) en encourageant la recherche et le développement de produits naturels à forte valeur ajoutée. Pour atteindre cet objectif général, les objectifs spécifiques suivants ont été définis :

- Formuler un thé à saveur unique et à forte valeur d'appréciation,
- Évaluer l'innocuité du thé formulé,
- Déterminer quelques propriétés biologiques du thé formulé, notamment ses activités antidiabétiques, immunostimulantes et antioxydantes,
- Et caractériser les métabolites secondaires du thé formulé.

En dehors de l'introduction, de la conclusion et des références, ce document est structuré en trois grandes parties. La première partie présente les généralités et l'état des connaissances sur le sujet. La deuxième partie décrit la méthodologie, en précisant le matériel utilisé et les méthodes employées. Enfin, la troisième partie est consacrée à la présentation des résultats et à leur discussion.

**PREMIERE PARTIE :**  
**GENERALITES**

## **1. Plantes médicinales et plantes aromatiques et leur utilisation en phytothérapie**

### **1.1 Plantes médicinales**

Les plantes médicinales par définition sont des végétaux possédant des vertus thérapeutiques utilisées dans les soins de santé. De nos jours, de nombreux travaux consacrés à la chimie, à la pharmacologie et à la toxicologie de ces plantes ont contribué à améliorer la connaissance scientifique dans ce domaine et à l'élaboration de protocoles standards de phytochimie et de screening biologique (Tabuti *et al.*, 2003., Dibong *et al.*, 2011). L'utilisation des plantes en phytothérapie est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 65-80 % de la population mondiale a recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé en raison de la biodisponibilité de ces ressources et de l'insuffisance des structures de santé primaire (OMS, 2003).

Comme l'ont rapporté Kanko *et al.* (2004), les plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs issus du métabolisme secondaire qui sont à la base de la production de près de 70 % des médicaments retrouvés dans les pharmacies avec environ 170 000 molécules bioactives identifiées. Les plantes médicinales sont utilisées dans le traitement de plusieurs maux quotidiens qui vont des simples troubles digestifs jusqu'au traitement des maladies chroniques comme le cancer, les diabètes de type 1 et type 2, l'hypertension artérielle et l'insuffisance rénale chronique.

### **1.2 Plantes aromatiques**

Les plantes aromatiques sont des végétaux riches en composés volatils et odorants, principalement des huiles essentielles, conférant des arômes caractéristiques. Elles appartiennent à diverses familles botaniques et sont utilisées pour leurs propriétés organoleptiques, médicinales et conservatrices. En phytothérapie, elles sont reconnues pour leurs effets biologiques variés, notamment antimicrobiens, antioxydants et immunostimulants en raison de leur composition chimique spécifique (monoterpènes, sesquiterpènes, phénols, flavonoïdes, etc.) (Singh, 2008).

Elles apportent également des nutriments essentiels tels que des protéines, des fibres, des huiles essentielles, des vitamines (A, B et C), des minéraux (calcium, phosphore, sodium, potassium, et fer) et des composés phytochimiques, qui sont des substances bioactives présentes

en petites quantités, agissant comme antioxydants, bactéricides ou antiviraux (Salehi *et al.*, 2018).

Les plantes aromatiques caractérisées par leurs teneurs élevées en composés volatiles tels que les huiles essentielles, jouent un rôle essentiel dans la médecine traditionnelle et moderne grâce à leurs propriétés biologiques variées. En Afrique, et particulièrement en Côte d'Ivoire, *Lippia multiflora* (thé de savane), *Zingiber officinale* (gingembre) et *Mentha piperita* (menthe poivrée) sont largement reconnues pour leurs potentiels thérapeutiques. Ces plantes sont riches en métabolites secondaires tels que les phénols, les flavonoïdes et les terpénoïdes, qui leur confèrent des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et immunomodulatrices. Leur valorisation dans des formulations naturelles, telles que des tisanes, représente une stratégie prometteuse pour améliorer la santé humaine tout en préservant le patrimoine phytothérapeutique africain (Konan *et al.*, 2010 ; N'dri *et al.*, 2024).

### **1.3 Tisanes et thés à base de plantes médicinales**

#### **1.3.1 Définitions**

Les tisanes et thés médicinaux sont largement utilisés dans les médecines traditionnelles et alternatives en raison de leurs bienfaits pour la santé. Plusieurs formulations ont été évaluées scientifiquement pour leur efficacité dans la prévention et le traitement de diverses affections, notamment le stress oxydatif, le diabète, les maladies cardiovasculaires et les troubles digestifs. Leur efficacité est en partie attribuée à la synergie entre les composés bioactifs des plantes tels que les polyphénols, flavonoïdes et huiles essentielles (Cavaliere *et al.*, 2010 ; Nabavy *et al.*, 2015 ; Salehi *et al.*, 2018).

#### **1.3.2 Classification des thés et tisanes**

La tisane est un élément important de la culture du thé, elle complète la consommation de thé et est utilisée pour la préservation de la santé et les soins de santé. La plupart des thés peuvent être classés comme non fermentés et sont produits selon le processus de production du thé vert. Il existe également des thés semi-fermentés (comme le oolong) et fermentés (comme le thé noir) (Shi *et al.*, 2021).

Le thé non fermenté est fabriqué à partir de matières végétales qui sont chauffées immédiatement après la récolte, enroulées et comprimées mécaniquement, puis séchées pour garantir la préservation de la couleur et des ingrédients naturels (Pereira *et al.*, 2014 ; Keerthana & Suweesha, 2017).

Les principales méthodes utilisées pour produire du thé semi-fermenté sont la cueillette, le séchage, le roulage, le séchage supplémentaire, le criblage et la cuisson (Liu *et al.*, 2018). Le principal composant biochimique du thé fermenté est la catéchine lequel représente environ 20 % du poids sec. Les catéchines sont oxydées pour former des théaflavines et des théarubigines par condensation au cours de la fermentation sous l'action de la polyphénol-oxydase. L'étape de la fermentation dans la production du thé fermenté détermine son arôme et sa couleur uniques, les théaflavines contribuant à sa couleur rouge-orange (Samanta *et al.*, 2015).

### **1.3.2.1 Thés fermentés**

Le thé fermenté ne représente qu'une petite partie des tisanes et est principalement produit par la cueillette, le flétrissage, le roulage, la fermentation et le séchage. Le « rooibos » est une tisane populaire produite à partir des arbustes de *Aspalathus linearis*, originaire d'Afrique du Sud (Elizabeth & Hartwig, 2006).

Les tisanes fermentées sont riches en polyphénols. Leur consommation est associée à plusieurs bienfaits pour la santé en partie grâce à leurs constituants phénoliques (Arries *et al.*, 2016 ; Shi *et al.*, 2021). Le thé « Honeybush » (*Cyclopia intermedia*) est séché après la récolte, puis fermenté (Mckay & Blumberg, 2009). Le thé de vigne fabriqué à partir de feuilles fermentées de *Ampelopsis grossedentata*, a été utilisé comme tisane en médecine populaire dans le Sud de la Chine depuis des centaines d'années (Wang *et al.*, 2015). La méthode de traitement du thé de vigne est similaire à la production conventionnelle de thé noir. Les branches et les feuilles tendres de *A. grossedentata* sont sélectionnées puis malaxées en bandes. Après fermentation, elles sont frites et séchées jusqu'à ce qu'elles deviennent des bandes en forme de thé au léger goût aigre-doux.

### **1.3.2.2 Thés non fermentés**

La plupart des tisanes sont des thés non fermentés obtenus par cueillette, flétrissage, blanchiment, roulage et séchage. Les bourgeons tendres de *Castanopsis lamontii* sont séchés pour produire une tisane utilisée dans le Sud-Ouest de la Chine pour rafraîchir l'haleine et prévenir les inflammations buccales (Gao *et al.*, 2020). *Combretum micranthum* G. Don est largement utilisé dans la médecine traditionnelle de l'Afrique de l'Ouest, et est souvent appelé « tisane de longue vie » ou « plante pour guérir ». En outre, les thérapeutes traditionnels utilisent souvent ces plantes pour soulager les maladies rénales (Kpemissi *et al.*, 2020).

*Jasonia glutinosa* D.C. (Asteraceae), communément appelé thé des rochers, est une plante médicinale courante dans la région méditerranéenne. Ses tiges fleuries sont utilisées pour produire des tisanes qui soulagent les troubles digestifs (Valero *et al.*, 2013). La camomille est une tisane très populaire fabriquée à partir des capitules séchés des plantes de la famille des Composées (*Matricaria recutita* L., *Chamomilla recutita* L. et *Matricaria chamomilla*). Elle est traditionnellement utilisée à des fins médicales, principalement en raison de ses effets anti-inflammatoires (McKay & Blumberg, 2006). Le yacon (*Smalanthus sonchifolius*) est une plante andine indigène cultivée et utilisée localement comme médicament traditionnel pour les diabétiques et les personnes souffrant de maladies digestives et rénales (Aybar *et al.*, 2001).

### 1.3.2.3 Thés ou tisanes à base de plusieurs espèces végétales

#### 1.3.2.3.1 Tisanes et thés à activité antioxydante

Les plantes médicinales riches en polyphénols et flavonoïdes sont particulièrement recherchées pour leurs effets antioxydants, qui contribuent à la protection contre les maladies chroniques.

- Thé à base de *Phyllanthus debilis*, *Osbeckia octrandra* et *Artrocarpus heterophyllus*  
Une étude menée par Dai & Mumper, (2010) a montré que l'association de ces plantes médicinales aux proportions (4 :1 :1) renforçait l'activité antioxydante individuelle de chacune des plantes grâce à l'action synergique des composés phénoliques.

- Tisane à base de *Moringa oleifera*, *Zingiber officinale* et *Cymbopogon citratus*  
Ikegwu *et al.* (2023) ont mis au point une tisane à base de citronnelle (*Cymbopogon citratus*), moringa (*Moringa oleifera*) et gingembre (*Zingiber officinale*), présentant un profil physico-chimique stable, riche en composés phénoliques et flavonoïdes (jusqu'à 16,3 mg/g), et dotée d'une forte activité antioxydante. De plus, les caractéristiques sensorielles ont été jugées acceptables, surtout dans la formulation optimale (52 % citronnelle, 18 % moringa, 30 % gingembre)

- Thé à base de *Vitis vinifera*, *Phyllanthus emblica* L., *Punica granatum*, *Cinnamomum cassia*, *Ginkgo biloba* L., et *Camellia sinensis* Linn.

Dheeraj *et al.* (2011) ont montré qu'une combinaison de toutes ces plantes avec le thé vert peut renforcer de manière synergique l'activité antioxydante et que des doses plus faibles de chaque plante avec le thé vert peuvent donc être utilisées. Le potentiel antioxydant de la combinaison de ces espèces végétales était également comparable à celui de l'acide ascorbique standard. Ces

études ont montré que les plantes sélectionnées contenaient une quantité abondante de composés phénoliques et de flavonoïdes.

### 1.3.2.3.2 Tisanes et thés à activité antihyperglycémique et antihyperlipidémique

Les tisanes et infusions à base de plantes sont de plus en plus étudiées pour leur potentiel à réduire la glycémie et améliorer la gestion du diabète.

Petrović *et al.* (2021) ont réalisé des travaux sur des tisanes à base de feuilles de *Vaccinium myrtillus*, de racines de *Potentilla erecta*, de feuilles de *Rubus fruticosus*, de parties aériennes de *Geum urbanum* et gousses de *Phaseolus vulgaris*. Ces travaux ont été effectués sur des rats rendu diabétiques. L'administration pendant 14 jours d'une tisane composée à partir de feuilles de *Vaccinium myrtillus* (10 %), racines de *Potentilla erecta* (30 %), feuilles de *Rubus fruticosus* (10 %), parties aériennes de *Geum urbanum* (30 %) et gousses de *Phaseolus vulgaris* (20 %) à des doses de 10 g/Kg ou 20 g/Kg a permis de ramener la glycémie à des valeurs normales ( $8,64 \pm 4,09$  mmol/L). La dose 10 g/Kg réduire significativement ( $p < 0,001$ ) le cholestérol total, triglycérides, VLDL, LDL, les indices d'athérogénicité et de risque cardiovasculaire. A cette même dose la tisane restaurait l'architecture histologique du pancréas, des reins et du foie au même niveau que dans le groupe témoin sain.

Par cette étude, les auteurs ont expliqué qu'une combinaison de ces plantes pour la formulation d'un thé ou tisane a été plus efficace que les médicaments standards (insuline et la metformine) dans l'amélioration de l'hyperglycémie, de l'hyperlipidémie et des changements histopathologiques de l'épithélium du pancréas, des reins et du foie.

-Tisane à base des feuilles de *Cassia auriculata*, *Centella asiatica*, et des rhizomes de *Zingiber officinale*. Une étude réalisée par Yahya *et al.* (2023) a montré que l'infusion d'une combinaison de ces trois plantes à une efficacité antidiabétique et antihyperlipidémique significative. Cette étude a insisté sur le fait que ce type de combinaison est une formulation sûre et efficace dans le traitement du diabète sucré car elle permet de remplacer ou de réduire la dose de metformine, diminuant ainsi les risques liés à cette dernière.

- Thé à base de *Folium nelumbinis*, *Semen cassiae*, *Camellia sinensis*, *Radix polygoni multiflor* et *Gynostemma pentaphyllum*

Dans une étude conduite par Nkechi *et al.* (2024), il a été démontré qu'une combinaison de ces plantes en infusion améliorerait la dyslipidémie, le déséquilibre redox et les altérations des paramètres biochimiques induits par le triton. En outre, cette formulation corrigeait les effets délétères du triton sur le profil hématologique des rats dyslipidémiques. L'efficacité de cette formulation à plusieurs espèces végétales était comparable à celle de la rosuvastatine.

### 1.3.2.3.3 Tisanes et thés à activité immunostimulante

Certaines formulations ont été étudiées pour leur capacité à renforcer le système immunitaire et à améliorer la réponse inflammatoire.

- Tisane à base de feuilles de *Camellia sinensis*, de feuilles de *Ocimum tenuiflorum* et de rhizomes de *Zingiber officinale*. Veer *et al.* (2025) ont montré à travers une étude conduite en Inde que cette combinaison de plantes a permis d'améliorer le système immunitaire chez les patients consommant cette formulation, l'efficacité thérapeutique ; et elle améliore les bénéfices pour la santé, tout en améliorant la qualité de vie des patients.

- Tisane à base de *Emblica officinalis*, de *Terminalia bellerica*, de *Terminalia chebula* Sabina *et al.* (2009), ont montré qu'une formulation de thé à partir de ces plantes a eu un effet immunostimulant significatif sur les systèmes immunitaires à médiation cellulaire et humorale chez les rats albinos Wistar. En outre, cette formulation a révélé des activités antioxydantes et immunomodulatrices qui peuvent être utilisées pour traiter différentes maladies et améliorer l'immunité de l'organisme.

- Tisane à base de rhizomes de *Picrorhiza kurroa* (*Kutki*), de tige de *Tinospora cordifolia* (*Guduchi*) et les fruits de *Emblica officinalis* (*groseille à maquereau*)

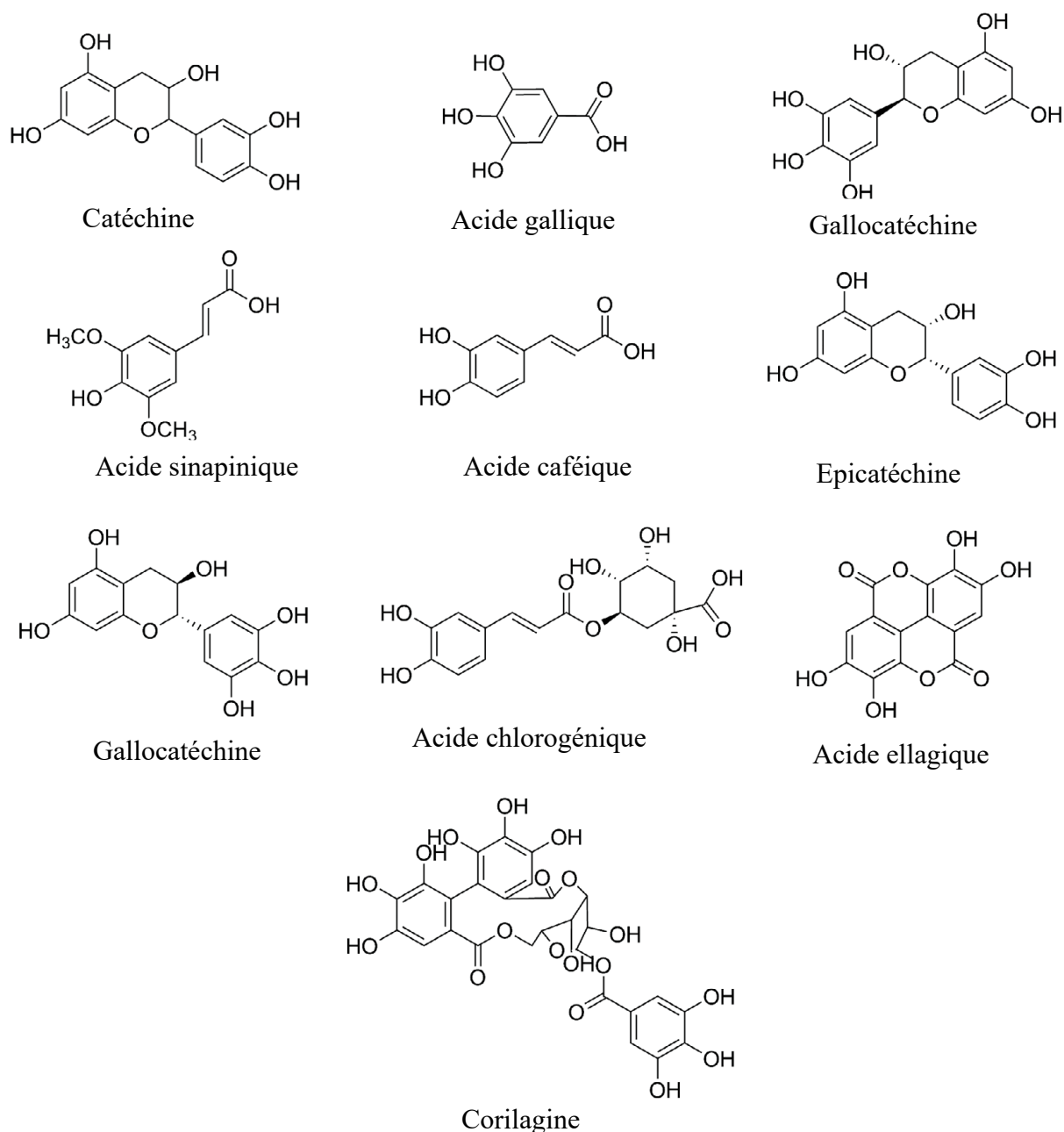
Ratheesh *et al.* (2023) ont montré qu'une combinaison de ces plantes en un thé a protégé correctement les organes immunitaires et déclenché les réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale en réponse à une immunosuppression induite par la cyclophosphamide chez des modèles animaux. En outre, aucun changement significatif n'a été observé dans les paramètres hématologiques. Ainsi, l'utilisation de ce thé contribue à renforcer l'activité antioxydante, ce qui a pour effet de réduire les risques de maladies infectieuses en prévenant les dommages liés au stress oxydatif, et de protéger également le foie de la toxicité induite par la cyclophosphamide.

## 2. Métabolites secondaires d'intérêt dans les thés et tisanes

Selon Yuchao *et al.* (2023), les thés et tisanes contiennent des polyphénols, des flavonoïdes, des terpénoïdes, des huiles volatiles, des alcaloïdes, des acides organiques et des polysaccharides. À l'heure actuelle, les recherches sur les composants chimiques efficaces des tisanes sont peu nombreuses. Dans cette section, la littérature existante sur le sujet sera résumée. Les phénols et les flavonoïdes sont les principaux composants actifs des tisanes.

## **2.1 Polyphénols**

Les polyphénols sont des métabolites phénoliques secondaires complexes largement répandus dans les plantes, principalement dans les fruits, les feuilles, les racines et les écorces (Kai *et al.*, 2019). Les avantages des polyphénols naturels pour le corps humain concernent principalement l'anti-oxydation et l'amélioration de la résistance à l'insuline (Mingyue *et al.*, 2020). Les polyphénols sont les principaux composants actifs du thé, représentant environ 25 % du poids sec. Les polyphénols présents dans les tisanes comprennent notamment la catéchine, l'acide gallique, la (-) gallocatéchine, l'acide sinapinique, l'acide caféique, la (-) épicatechine, la gallocatéchine, l'acide chlorogénique, l'acide ellagique et la corilagine (Ning & Han, 2013 ; Gao *et al.*, 2020 ; Nurfaradilla *et al.*, 2020) (Figure 1).



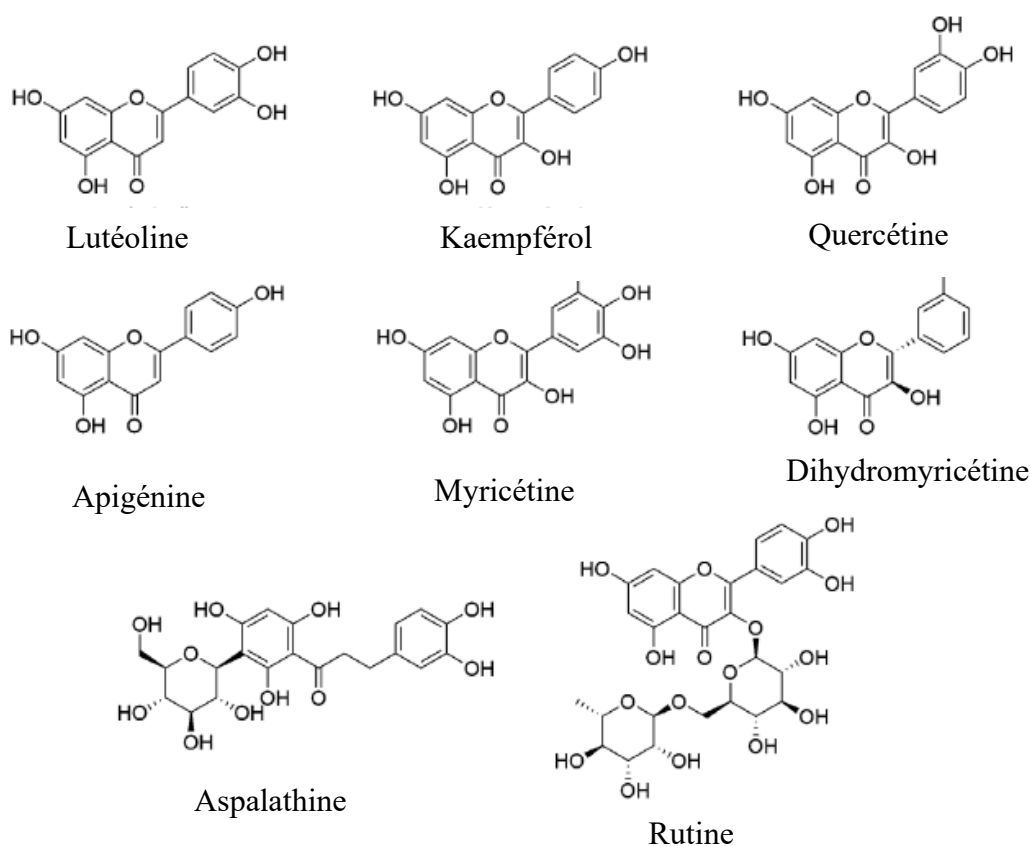
**Figure 1 :** Structures des polyphénols majoritaires dans les thés et tisanes (Wüpper *et al.*, 2020)

## 2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une série de composés de deux anneaux benzéniques (anneaux A et B) avec des groupes hydroxyle phénoliques reliés par trois atomes de carbone centraux. Le noyau de base est le 2-phénylchromone. Des groupes fonctionnels tels que l'hydroxyle phénolique, le méthoxy, le méthyle et l'isopentényle sont souvent attachés à la structure des flavonoïdes (Wüpper *et al.*, 2020). Les flavonoïdes sont les principaux composants actifs de la plupart des tisanes. La lutéoline, la rutine, le kaempférol, la quercétine, la myricétine, la dihydromyricétine et l'apigénine sont les composants actifs du « rooibos », du «Kudingcha »,

du thé « Hong Dou Shan » (*Taxus chinensis*), du thé *Combretum micranthum* G. Don, du thé *Isodon amethystoides* (Benth.) Hara, du thé des montagnes, du thé des plateaux et de la tisane « She Medicine Fresh » (Cooper *et al.*, 2005 ; Maboizou *et al.*, 2020 ; Arries *et al.*, 2016).

Il est intéressant de noter que le « rooibos » contient également une grande quantité d'aspalathine (C-glucosyl dihydrochalcones), qui peut avoir un effet inhibiteur sur les dysfonctionnements métaboliques potentiels liés au développement ou à la progression de maladies métaboliques graves (telles que l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires). Les structures chimiques des flavonoïdes représentatifs des tisanes sont présentées à la figure 2.



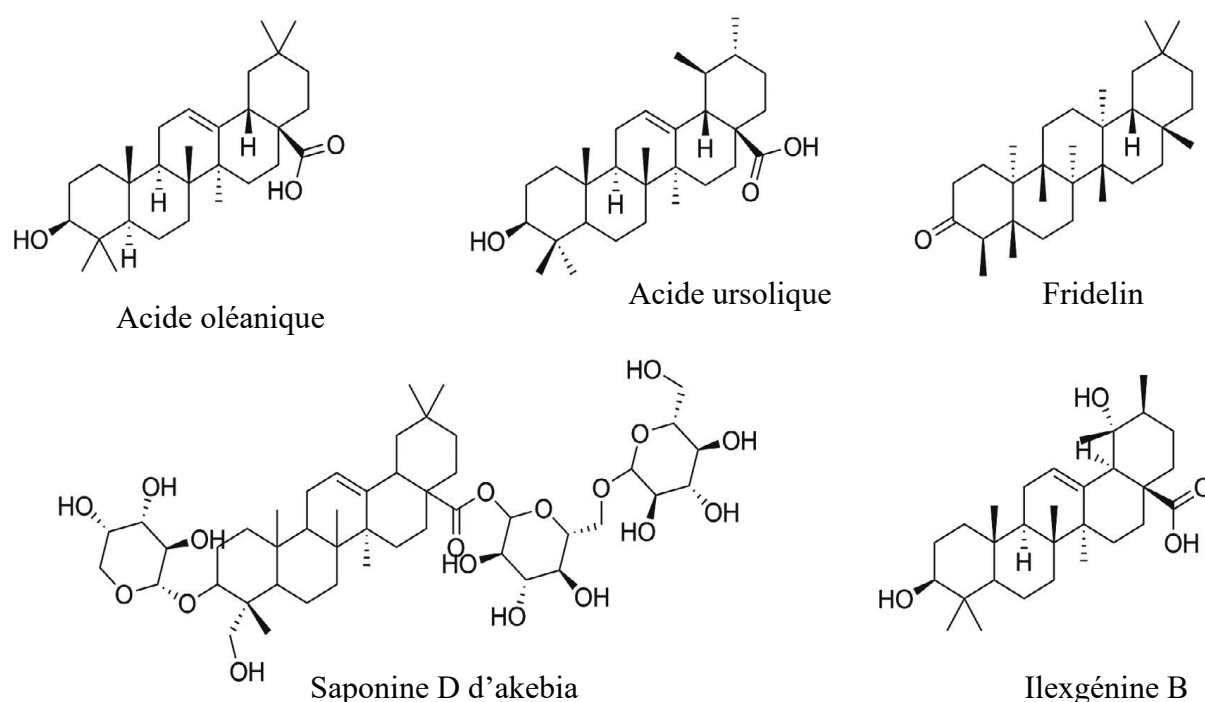
**Figure 2** : Structures chimiques des flavonoïdes majoritaires dans les thés ou tisanes (Yuchao *et al.*, 2023)

### 2.3 Terpènes

Les terpènes (Terpénoïdes) représentent la plus grande classe de composés organiques naturels avec plus de 40 000 structures signalées à ce jour. Sa structure chimique de base est constituée d'une unité isoprène ( $C_5H_8$ ). Selon le nombre d'unités d'isoprène, les terpènes sont

classés en : monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15) diterpènes (C20), triterpènes (C30), tétraterpènes (C40), polyterpènes (C40) (Kim *et al.*, 2020).

Les terpénoïdes sont responsables de l'odeur typique de nombreuses plantes. Ils interviennent dans la stabilisation des membranes cellulaires, dans la régulation de la perméabilité et des réactions enzymatiques. Ces métabolites secondaires ont démontré leur efficacité dans la chimioprévention et la chimiothérapie du cancer et expriment des activités antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, antihyperglycémiques, anti-inflammatoires et antiparasitaires (Paduch *et al.*, 2007 ; Thoppil & Bishayee, 2011). Ces molécules se présentent en forme des huiles essentielles, pigments (carotène), hormones (acide abscissique) et stérols (cholestérol) (Gershenzon & Dudareva, 2007). Les terpènes sont largement répandus dans les plantes et ont attiré beaucoup d'attention en raison de leurs nombreuses activités biologiques (Chen *et al.*, 2017 ; Orimadegun *et al.*, 2018) Les terpénoïdes présents dans les tisanes comprennent principalement l'acide oléanique, l'acide ursolique, la friedeline, la saponine D d'akebia et l'iléxgénine B (Figure 3).



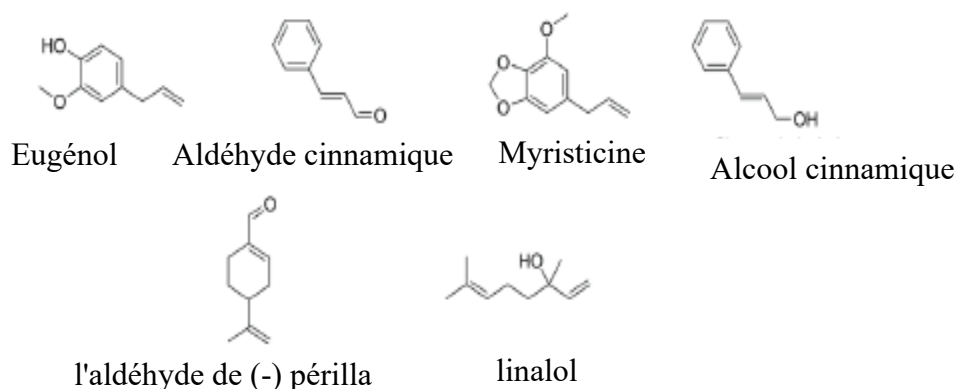
**Figure 3** : Structures des terpènes majoritaires dans les thés et tisanes (Wüpper *et al.*, 2020)

## 2.4 Composés volatiles des plantes aromatiques

Les composés volatiles, également connus sous le nom d'huiles essentielles, sont des liquides à l'odeur très caractéristique. Les huiles essentielles, également appelées huiles odoriférantes volatiles, sont des liquides huileux aromatiques extraits de différentes parties de plantes, par exemple les feuilles, les pelures, les écorces, les fleurs, les bourgeons, les graines, etc. Elles peuvent être extraites des matières végétales par plusieurs méthodes, dont la distillation à la vapeur d'eau, l'expression, etc (Bruneton, 2016).

Parmi toutes les méthodes, celle de la distillation à la vapeur d'eau a été largement utilisée, en particulier pour la production à l'échelle commerciale. Les huiles essentielles ont été largement utilisées comme arômes alimentaires et elles se trouvent dans de nombreuses plantes, en particulier les plantes aromatiques. Outre les composés aromatiques, les pigments indigènes contribuent à la variation des couleurs de l'huile essentielle. Cela peut affecter les applications en tant qu'ingrédient dans certains aliments particuliers. Les huiles essentielles sont connues pour leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes, et servent donc d'additifs naturels dans les aliments et les produits alimentaires (Di Leo Lira *et al.*, 2009). Les technologies modernes ont été continuellement développées pour surmonter les limites des méthodes conventionnelles et pour améliorer l'efficacité de l'extraction.

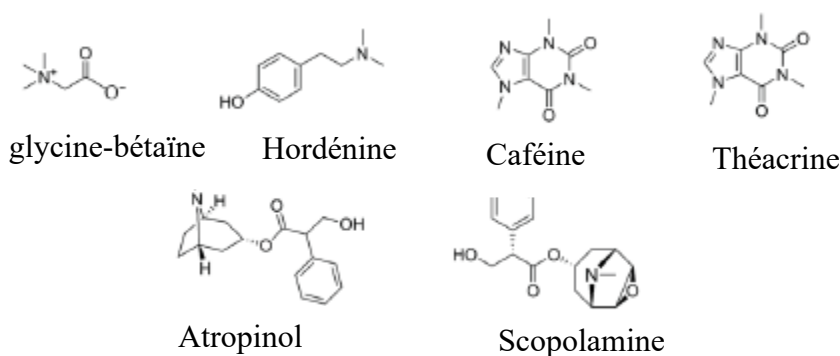
L'arôme fort qui se dégage de la tisane ou du thé est dû à la présence de certains composés contenus dans les huiles essentielles. L'eugénol et l'aldéhyde cinnamique sont les principaux composants du thé «kainari» (Bampali *et al.*, 2018). Le thé de vigne, le «rooibos», le thé «kuding», le thé «yerba mate» et le thé «hawk» contiennent également des composés volatiles. Les principaux composants de l'huile essentielle sont l'eugénol, l'aldéhyde cinnamique, la myristicine, l'alcool cinnamique, l'aldéhyde de (-) périlla et le linalol Figure 4).



**Figure 4** : Structures de quelques composés volatiles dans les thés ou tisanes (Yuchao *et al.*, 2023)

## 2.5 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés autres que les protéines, les peptides, les acides aminés et la vitamine B, qui existent principalement dans le règne végétal (Xue *et al.*, 2020). Les ingrédients actifs de certaines tisanes sont des alcaloïdes, comme la caféine dans le thé jasminé (Yuerong *et al.*, 2010). La théacrine, un alcaloïde purinique naturellement présent dans certaines variétés de thé comme le *Camellia assamica var. kucha* est reconnue pour ses effets stimulants similaires à ceux de la caféine, mais avec une moindre accoutumance (Lin *et al.*, 2020). L'hordénine est un composé phénoléthylaminique retrouvé notamment dans le thé d'orge (*Hordeum vulgare*), traditionnellement consommé en Asie de l'Est. Elle présente des effets stimulants et est impliquée dans la modulation de la dopamine (Arend *et al.*, 2008 ; Beelman *et al.*, 2019). La teneur en glycine-bétaïne du thé gouqiye est d'environ 5,1 %, et ce thé contient également de l'atropinol et de la scopolamine (Dang *et al.*, 2011) (Figure 5).



**Figure 5** : Structures de quelques alcaloïdes dans les thés ou tisanes (Wüpper *et al.*, 2020)

## 3. Activités biologiques des thés ou tisanes

Les tisanes traditionnelles sont largement consommées par la population locale pour leurs effets thérapeutiques. Récemment, avec l'augmentation de l'incidence des maladies neurodégénératives, les tisanes ont attiré l'attention pour leurs fonctions préventives et thérapeutiques. La production de tisanes utilise principalement les feuilles, les bourgeons, les fleurs et les fruits des plantes médicinales comme matières premières et possède de nombreuses propriétés biologiques, telles qu'antioxydant, anti-inflammatoire, antibactérien, antidiabétique et anticancéreux.

### 3.1 Activité antioxydante

L'oxydation est liée à la production de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les antioxydants peuvent protéger l'organisme des maladies associées à l'attaque des

radicaux libres (Antolovich *et al.*, 2002). Les antioxydants sont essentiels à la prévention des maladies dégénératives induites par le stress oxydatif telles que le cancer, le diabète, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Liguori *et al.*, 2018). En tant que boisson de santé populaire, la tisane possède un large éventail d'activités antioxydantes et elle a attiré beaucoup d'attention.

Ortega-Vidal *et al.* (2019) ont étudié l'effet de la tisane de *Jasonia glutinosa* au cours d'une digestion gastro-intestinale simulée *in vitro* et ont identifié l'acide dicaffeylquinique comme le principal composé phénolique dans les extraits aqueux et hydroalcoolique. Par ailleurs, l'activité antioxydante de cette tisane a été confirmée à l'aide des tests ABTS (2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) et DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), deux méthodes couramment utilisées pour évaluer le pouvoir de piégeage des radicaux libres. De plus, Sugahara *et al.* (2015) ont démontré que l'extrait de thé présentait une activité de neutralisation des radicaux superoxyde ( $O_2^-$ ) via les systèmes phénazine méthosulfate/NADH-nitroblue tetrazolium ( $CE_{50} = 64,5 \mu\text{g/mL}$ ) et xanthine oxydase ( $CE_{50} = 20,7 \mu\text{g/mL}$ ). L'extrait a également inhibé la production de radicaux  $O_2^-$  dans des neutrophiles humains cultivés *in vitro*, avec une valeur d'inhibition  $IC_{50}$  de  $65,7 \mu\text{g/mL}$ .

Du point de vue de l'intérêt croissant des consommateurs pour les produits naturels riches en composés bioactifs, ces résultats peuvent contribuer à mieux comprendre l'efficacité fonctionnelle de tels aliments. Les tests d'évaluation de l'activité antioxydante notamment DPPH, ABTS et le test de blanchiment du bêta-carotène ont montré que le thé de reine des prés (*Filipendula* spp.) présente des propriétés antioxydantes attribuées à la présence d'ellagitanins hautement actifs.

### 3.2 Activité anti-inflammatoire

Le processus inflammatoire est une réaction à un stimulus préjudiciable provoqué par un large éventail d'agents toxiques, de maladies, de contaminations, d'anticorps ou de blessures réelles. L'inflammation est une réaction substantielle à une blessure, une contamination ou un anéantissement, qui se manifeste par de la chaleur, des rougeurs, des douleurs, une croissance et un dérèglement des capacités physiologiques (Bhattacharya *et al.*, 2012). L'inflammation est considérée comme une réaction de base importante responsable des symptômes de divers troubles chroniques tels que le cancer, le choc septique, le diabète, l'athérosclérose et l'obésité (Karthikeyan *et al.*, 2019). La réponse inflammatoire est un processus complexe faisant intervenir une cascade de médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines, les prostaglandines et l'oxyde nitrique (NO) en réponse à divers stimuli comme les traumatismes,

les infections, l'ischémie, les toxines ou les maladies auto-immunes (Medzhitov, 2008). De nombreuses plantes médicinales ont démontré leur capacité à inhiber la production de NO, un médiateur clé dans l'amplification de l'inflammation notamment dans des modèles cellulaires stimulés par le lipopolysaccharide (LPS) (Murakami *et al.*, 2012).

L'extrait de thé vert peut être potentiellement utilisé comme médicament anti-inflammatoire en rinçage oral pour le traitement et la prévention des maladies inflammatoires buccales (Cinthura *et al.*, 2019 ; Hagiú *et al.*, 2020). La menthe a une puissante activité anti-inflammatoire dans le modèle d'œdème de l'oreille de souris induit par l'huile de croton, et le mécanisme d'action possible pourrait être attribué à son effet inhibiteur sur la production de NO et de PGE2 (Das *et al.*, 2019).

Les tanins sont des constituants phénoliques puissants pour le traitement des tissus enflammés (Okuda, 2005). Le thé vert et l'épigallocatechine 3-gallate réduisent l'expression protéique des cytokines inflammatoires et des enzymes liées à l'inflammation (Ohishi *et al.*, 2016). Les suppléments de thé vert sont disponibles dans les pharmacies et les hôpitaux. Ils se présentent sous forme de sirop liquide ou de gélule (Lee *et al.*, 2015).

### 3.3 Activité antibactérienne

Ces dernières années, l'activité antibactérienne des plantes, ainsi que leur mécanismes d'action ont fait l'objet d'études approfondies. Dans certains pays industrialisés, les méthodes traditionnelles ont été reprises pour protéger le bétail et les aliments contre les maladies et les parasites (Dorman & Deans 2000). C'est notamment le cas de l'utilisation des principes actifs naturels des plantes à des fins antibactériennes. La tisane présente des avantages uniques à cet égard.

Des données antérieures concernant l'activité antimicrobienne des extraits de tisanes de *Gentiana* ont indiqué une activité similaire. Des extraits de feuilles et de fleurs de *Gentiana lutea* à forte teneur en gentiopicroside (38,85-48,38 mg/g) ont inhibé la croissance de 15 micro-organismes avec des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) de 120-310 µg/mL (Šavikin *et al.*, 2009).

Un extrait alcoolique de *Thunbergia laurifolia* a eu une activité inhibitrice évidente contre *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus epidermidis* (Pukumpuang *et al.*, 2019). Cependant, l'extrait aqueux de cette plante n'a pu inhiber que le SARM et le *S. pyogenes*. L'extrait de feuilles à l'éthanol a montré un effet inhibiteur sur *Bacillus subtilis* sous induction UV, mais n'a pas eu

d'effet inhibiteur sur *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ou *Aspergillus fumigatus* (Chan *et al.*, 2011).

Selon Tshivhandekano *et al.* (2014), les extraits éthanoliques de thé des bois (*Athrixia phylicoides* DC.) et de thé spécial (*Monsonia burkeana*) ont une activité inhibitrice sur les micro-organismes. Cette activité a été observée contre des bactéries gram négatif telles que *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi* et *Klebsiella pneumonia*, et des bactéries gram positif telles que *Bacillus cereus* et *S. aureus*. La CMI du thé de brousse et du thé spécial varie respectivement de 1,56 à 12,50 mg/mL et de 0,39 à 12,50 mg/mL .

En résumé, les recherches existantes montrent que les tisanes ont diverses activités antibactériennes. Cette fonctionnalité justifie des recherches plus approfondies afin de mieux comprendre et utiliser ces boissons multifonctionnelles.

### 3.4 Activité antidiabétique

L'incidence du diabète dans le monde ne cesse d'augmenter et c'est un fléau pour les êtres humains (Husain *et al.*, 2020). Avec le développement de la recherche sur les principes actifs naturels, les gens s'intéressent de plus en plus aux tisanes à base de plantes médicinales.

Kpemissi *et al.* (2020) ont rapporté que les composés de *Combretum micranthum* G. Don ont un effet synergique, inhibant l'expression de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et inhibant la glycolyse dans les cellules d'hépatome H4IIE, ce qui indique son potentiel dans le traitement du diabète résistant à l'insuline. Ces résultats concordent avec ceux d'un autre rapport de (Welch *et al.*, 2018).

Le « yaccin » (*Smallanthus sonchifolius*) (0,76 g/Kg pc) a réduit de manière significative les taux de glucose sanguin, de cholestérol total, de lipoprotéines de haute densité, de lipoprotéines de basse densité et de triglycérides chez les rats diabétiques induits par la streptozotocine (STZ, 60 mg/Kg pc) ( $P < 0,05$ ).

Les analogues de la myricétine présents dans le thé de vigne ont une activité inhibitrice significative de l' $\alpha$ -glucosidase avec une  $CI_{50}$  de 9,3  $\mu\text{mol/L}$ . Le thé administré par voie orale à raison de 50 mg/Kg pc peut réduire de manière significative le taux de sucre dans le sang des souris diabétiques induites par la STZ après les repas. Un autre rapport a montré que le thé de vigne peut réguler le métabolisme du glucose et des lipides, augmenter la sensibilité à l'insuline et améliorer l'accumulation de lipides dans le foie chez les rats nourris avec un régime riche en graisses. Son mécanisme peut être lié à l'amélioration du métabolisme énergétique et à la réduction de l'accumulation de lipides (Wan *et al.*, 2017).

La feuille de *Lycium barbarum* L. est largement utilisée comme tisane en Chine et en Asie du Sud-Est pour la prévention et le traitement du diabète. Zhao *et al.* (2019) ont utilisé un régime riche en graisses associé à une faible dose de STZ pour induire un modèle de rat atteint de diabète de type 2 (DT2). Après quatre semaines d'administration orale d'un extrait de tisane (2,08 g/kg pc), la relation entre les indices biochimiques, les métabolites et la flore intestinale a été analysée. Il a été confirmé que la tisane réduisait significativement la glycémie et les taux de lipides sanguins et réparait les lésions du foie, des reins et du pancréas. Le séquençage de l'ADNr 16S a également montré que la tisane pouvait inverser le déséquilibre du microbiote intestinal causé par le DT2 chez les rats. Toutefois, des essais à plus long terme sont nécessaires pour évaluer et compléter les effets des composés bioactifs des tisanes sur le contrôle de la glycémie et comprendre leurs mécanismes.

### 3.5 Activité anticancéreuse

Le thé *Melissa officinalis* exerce un effet anticancéreux en régulant la transition épithéliale-mésenchymateuse des cellules cancéreuses colorectales HCT116, en réduisant la prolifération cellulaire, en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, en déclenchant l'apoptose dépendante de la caspase et en inhibant la migration cellulaire, ce processus est irréversible (Kuo *et al.*, 2020).

Zhu *et al.* (2014) ont examiné l'effet antitumoral du thé « kuding » à l'aide du test MTT et ont constaté que les taux d'inhibition du « thé kuding » sur les cellules cancéreuses de la langue humaine TCA8113 à 50, 100 et 200 µg/mL étaient respectivement de 10 %, 41 % et 75 %. La transcription inverse de la réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR) et le western-blot ont été utilisés pour analyser l'expression des gènes de transfert et des protéines connexes dans les cellules TCA8113 traitées avec du thé « kuding. Le thé « kuding » a induit de manière significative l'apoptose des cellules TCA8113 en augmentant l'expression de Bax, de la caspase-3 et de la caspase-9 et en diminuant l'expression de Bcl-2 ( $P < 0,05$ ). En parallèle, Zhao *et al.* (2013) ont testé l'effet antitumoral du thé « kuding » sur des cellules de cancer du sein humain MCF-7 *in vitro*. Ils ont observé que le thé « kuding » inhibait la croissance des cellules MCF-7 de 81 % à une concentration de 200 µg/mL confirmant ainsi ses effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques.

*Lagerstroemia speciosa* Pers. est une plante médicinale traditionnelle appelée « Banaba » en Asie du Sud-Est. Ses feuilles sont utilisées pour produire une tisane qui peut induire une perte de poids. Une étude a examiné les effets d'un extrait éthanolique de feuilles de « Banaba » (EBLE) sur les niveaux d'expression des protéines et des gènes dans les cellules de carcinome

hépatocellulaire humain (HepG2) par western blot et réaction en chaîne de la polymérase quantitative (qPCR) respectivement (Thakur & Devaraj., 2020).

La consommation quotidienne de tisanes peut donc exercer une activité anticancéreuse, mais des recherches plus complètes et des études plus longues sont nécessaires sur différents sujets pour confirmer ces résultats expérimentaux *in vivo* et *in vitro*.

### 3.6 Activité immunostimulante

L'activité immunostimulante désigne la capacité d'une substance à activer ou renforcer le système immunitaire, augmentant ainsi la résistance de l'organisme face aux infections ou aux maladies. Les immunostimulants peuvent être d'origine naturelle (plantes médicinales et aromatiques, champignons, produits marins), synthétique ou biotechnologique. L'utilisation de ces substances a gagné en importance pour améliorer les défenses immunitaires, en particulier dans le cadre de la lutte contre les infections, les cancers et en support des vaccinations (Patwardhan *et al.*, 2005).

De nombreuses études ont mis en évidence les bienfaits des immunostimulants naturels provenant de plantes médicinales, de champignons et de substances synthétiques. Par exemple, les polysaccharides issus de *Echinacea purpurea*, une plante utilisée en médecine traditionnelle depuis des siècles, se sont révélés capables de stimuler la production de cytokines, d'activer les macrophages et de renforcer les défenses immunitaires innées (Goel *et al.*, 2005).

De même, les extraits de *Panax ginseng* sont réputés pour leurs propriétés immunomodulatrices, favorisant la prolifération des cellules T et B tout en modulant les niveaux de cytokines, ce qui améliore l'immunité à la fois cellulaire et humorale (Scaglione *et al.*, 1996)

Dans le domaine des plantes médicinales, plusieurs composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes et les glycoprotéines sont reconnus pour leurs propriétés immunostimulantes. Par exemple, les flavonoïdes du *Zingiber officinale* et du *Curcuma longa* ont montré leur capacité à améliorer la réponse immunitaire en stimulant la prolifération des cellules NK (Natural Killer) et en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires (Ali *et al.*, 2008). Ces effets ont été corroborés par plusieurs études, soulignant l'efficacité des immunostimulants naturels dans la gestion des infections virales, bactériennes et fongiques (Sun *et al.*, 2017). Cependant, il est essentiel de noter qu'une stimulation excessive du système immunitaire peut entraîner des effets indésirables comme des réponses inflammatoires incontrôlées ou des réactions auto-immunes.

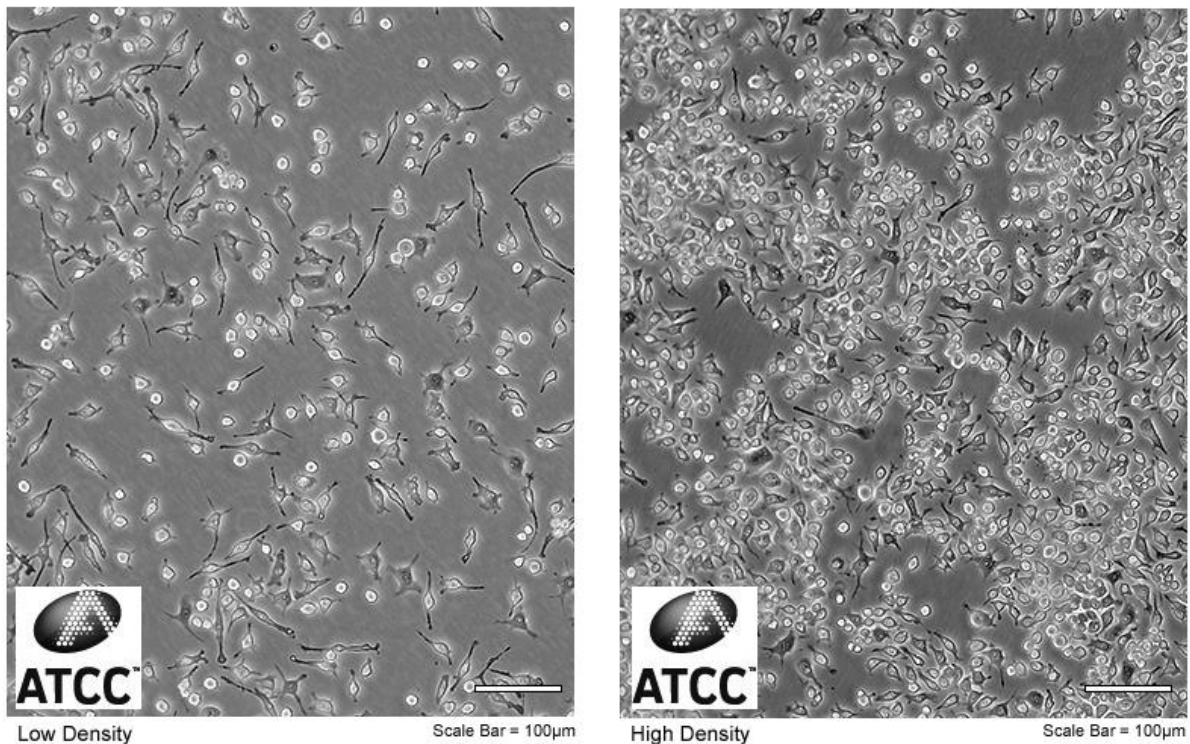
Par conséquent, bien que ces composés présentent un potentiel prometteur pour renforcer l'immunité, leur utilisation doit être soigneusement encadrée en particulier lors d'une administration prolongée (Spelman *et al.*, 2006).

#### **4. Modèle cellulaire pour l'évaluation de l'activité immunostimulatrice**

Les cellules RAW 264.7 (ATCC TIB-71) sont une lignée cellulaire dérivée de macrophages murins, largement utilisée en recherche biomédicale pour explorer les mécanismes impliqués dans l'immunité innée et l'inflammation (Kuo *et al.*, 2021). Initialement isolées à partir d'une leucémie murine, ces cellules présentent une origine clonale qui leur confère une homogénéité expérimentale précieuse, favorisant ainsi la reproductibilité des résultats obtenus dans les études *in vitro* (Mosser & Edwards, 2008). En raison de leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles proches de celles des macrophages primaires, elles constituent un modèle pertinent pour examiner les interactions cellulaires avec divers agents pathogènes, cytokines ou molécules bioactives.

Les cellules RAW 264.7 sont particulièrement appréciées pour leur capacité à mimer des fonctions essentielles des macrophages, notamment la phagocytose et la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine-6 (IL-6) et l'oxyde nitrique (NO) en réponse à des stimuli inflammatoires, comme le lipopolysaccharide (LPS) bactérien (Hsu *et al.*, 2004). Ces propriétés en font un modèle privilégié pour l'étude des processus inflammatoires ainsi que pour le criblage de composés à potentiel anti-inflammatoire ou immunomodulateur (Figure 6).

ATCC Number: **TIB-71**™  
 Designation: **RAW 264.7**



**Figure 6** : Photo des Cellules RAW 264.7 TIB-71, American Type Collection (ATCC)

#### 4. Plantes aromatiques de l'étude

##### 4.1 *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae)

###### 4.1.1 Description botanique

*Lippia multiflora* est une plante aromatique à odeur prononcée ou de citronnelle. C'est une plante annuelle ou bisannuelle d'environ 2 à 4 mètres de haut. Elle est composée d'une tige souterraine, ou souche, comportant un collet au niveau duquel se développent plusieurs rejets ou tiges aériennes, qui portent les feuilles et les fleurs. Le collet est soutenu par de nombreuses racines dont une racine principale à orientation verticale et de nombreuses racines secondaires à orientation sub-horizontale. La circonférence des racines est de l'ordre du centimètre pour les plus grosses et de l'ordre du millimètre pour les plus petites (Aké- Assi, 2009 ; Dibong *et al.*, 2011) (Figure 7).



Figure 7 : Feuille de *Lippia multiflora* (N'guessan *et al.*, 2015)

#### 4.1.2 Position Systématique

Selon les travaux de Abena *et al.* (2003), la position systématique de *Lippia multiflora* est la suivante :

Règne : .....Végétal

Embranchement : .....Spermaphytes

Sous-embranchement : .....Angiospermes

Classe : .....Dicotylédones

Sous classe : .....Gamopétales

Ordre : .....Laminales

Famille : .....Verbenaceae

Genre : ..... *Lippia*

Espèce : ..... *Lippia multiflora*

### 4.1.3 Origine et distribution géographique

Le genre *Lippia* appartient à la famille des Verbenaceae. Il comprend approximativement 3000 espèces. Deux cent vingt (220) de ces espèces se développent dans les régions tropicales d'Afrique Occidentale, Centrale et en Amérique (Brésil). Vingt-cinq (25) représentants de ces espèces se trouvent en Afrique Intertropicale (Afrique du Sud comprise). Seulement quatre (4) espèces ont été recensées dans les savanes d'Afrique Occidentale de la Gambie au Nigéria. Ce sont : *Lippia chevalieri*, *Lippia multiflora*, *Lippia rugosa* et *Lippia savoryi*. L'espèce *L. multiflora* est la plus connue et la plus représentative en Afrique de l'Ouest (Abena *et al.*, 2003)

En Côte d'Ivoire, *L. multiflora* est la seule espèce avec très certainement de nombreux chémotypes. Elle se développe dans la savane depuis la zone de contact forêt savane communément appelée « V Baoulé » (Département de Tiassalé) en passant par les régions des Lacs et du Centre (Yamoussoukro, Dimbokro, Bouaké, Sakassou, Katiola, etc ...), jusqu'aux régions du Nord, Nord-Ouest et Nord-Est telles celles de Korhogo, Odienné, Séguéla, Bouna, Bondoukou etc (Pascual *et al.*, 2001 ; Aké- Assi, 2009)

### 4.1.4 Utilisations traditionnelles et propriétés pharmacologiques

*L. multiflora* est une plante dont l'arôme des feuilles incite à la consommation. Ses feuilles fraîches ou séchées sont communément utilisées comme thé ou sous forme de boisson chaude au petit déjeuner. Sa consommation est conseillée juste après le déjeuner ou le dîner pour faciliter la digestion et lutter contre la constipation et les maladies hémorroïdaires (Abena *et al.*, 2003).

Dans les communautés rurales d'Afrique de l'Ouest et du Centre, la consommation d'une infusion de *L. multiflora* après des activités agricoles a été associée à une amélioration de la relaxation et à un sommeil réparateur (Jim *et al.*, 2004). Au Ghana, Ameyaw (2009) a documenté l'usage traditionnel des feuilles sous forme d'infusion pour le traitement des douleurs abdominales, ainsi qu'en bain de vapeur pour soulager la toux, les affections respiratoires, la maladie du sommeil et la fièvre jaune. En Côte d'Ivoire, la plante est utilisée pour traiter les affections bronchiques, les accès fébriles, la rhinopharyngite, les conjonctivites et les ictères (Kanko *et al.*, 2004 ; Ekissi *et al.*, 2011 ; Bouagnon *et al.*, 2015). La consommation de cette boisson combat les affections du foie, le manque d'appétit, l'anémie, la grippe, les candidoses bucco-anales et digestives. Cette boisson est particulièrement recommandée pour les personnes souffrant d'hypertension artérielle.

Des travaux ont montré que les feuilles de *L. multiflora* possédaient des propriétés sédatives, tranquillisantes, antalgiques et relaxantes (Abena *et al.*, 2003 ; Dibong *et al.*, 2011). Egalement sa richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes notamment l'eugénol, le thymol, le carvacrol et le géraniol lui confèrent une activité antioxydante notable (Agnaniet *et al.*, 2005). Ces composés sont capables de piéger efficacement les radicaux libres (DPPH, ABTS), de chélater les ions métalliques pro-oxydants et de moduler positivement les systèmes enzymatiques antioxydants cellulaires (Avlessi *et al.*, 2005). Par ailleurs, *L. multiflora* possède une activité immunostimulante intéressante, attribuée à la synergie de ses huiles essentielles et de ses métabolites secondaires. Des études ont montré que les extraits aqueux et éthanoliques de cette plante stimulent la phagocytose, augmentent la production d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages et modulent l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , tout en renforçant l'immunité humorale et cellulaire (Masengo *et al.*, 2023). Ces effets suggèrent un potentiel de *L. multiflora* dans le soutien du système immunitaire, particulièrement dans un contexte de stress oxydatif ou d'immunodépression.

#### 4.1.5 Innocuité de *Lippia multiflora*

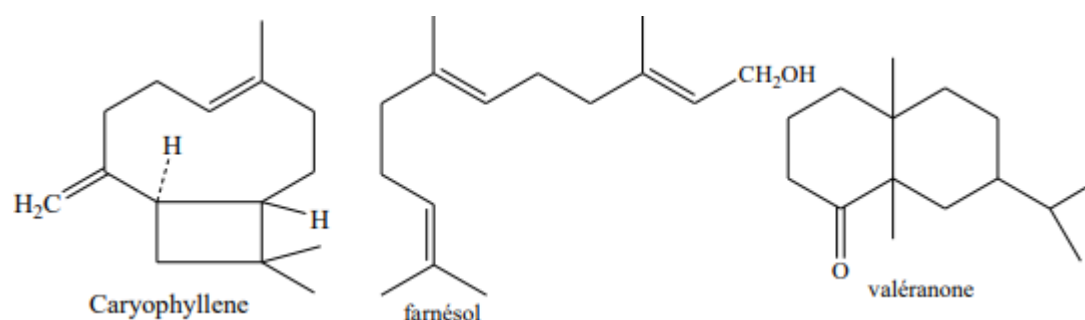
*Lippia multiflora* aussi connue sous le nom de " Thé de savane", est prisée pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et hypotensives. Bien qu'elle soit largement utilisée en médecine traditionnelle, certaines études suggèrent qu'à des doses élevées, elle pourrait présenter une toxicité potentielle. Une étude sur la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Lippia multiflora* a montré qu'à des doses allant jusqu'à 5000 mg/Kg pc, aucun signe de toxicité, ni mortalité n'a été observé chez les rats. Cependant, à des doses subchroniques plus basses, des altérations légères des paramètres biochimiques et hématologiques ont été relevées, ce qui suggère une prudence pour une utilisation prolongée à fortes doses (Allo *et al.*, 2020).

De plus, une autre recherche sur la toxicité hépatique de *Lippia multiflora* a révélé que des doses extrêmement élevées pouvaient entraîner des modifications des cellules hépatiques chez les rongeurs bien que les doses thérapeutiques usuelles soient considérées comme sûres (Djengue *et al.*, 2017).

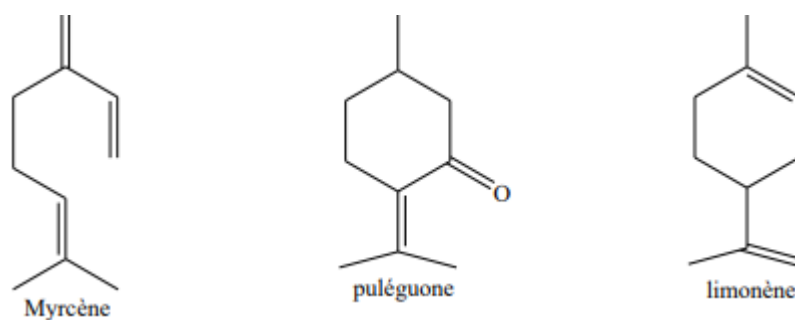
#### 4.1.6 Composition chimique

Les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes. Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. L'huile essentielle de *L. multiflora*, qui est généralement de couleur jaune, a été extraite et caractérisée par divers chercheurs (Juliani *et al.*, 2006).

Les huiles essentielles sont caractérisées par une petite quantité de sesquiterpènes, représentés par le  $\beta$  caryophyllène et le trans- $\beta$ -farnésène, les monoterpènes, le limonène, le p-cymène, le linalol et le camphre. La plupart des études ont identifié le thymol, thymyl acétate, p-cymène et carvacrol comme des composantes essentielles de l'huile (Pascual *et al.*, 2001) (Figures 8 et 9).



**Figure 8 :** Exemples de quelques sesquiterpènes (El haïb, 2011)

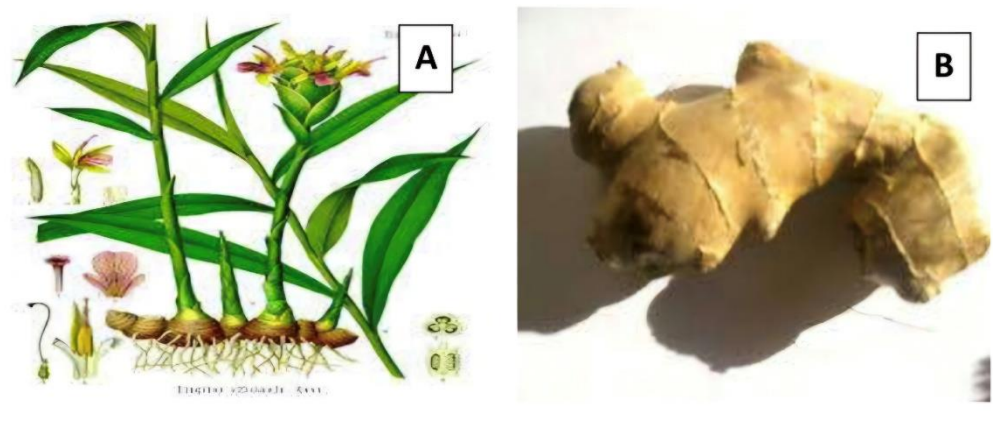


**Figure 9 :** Exemples de quelques monoterpènes (El haïb, 2011)

## 4.2 *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae)

### 4.2.1 Description botanique

Le gingembre dont le binôme latin est *Zingiber officinale* appartient à la famille des Zingiberaceae. Cette famille est constituée de 47 genres et 1400 espèces. Le gingembre est une herbacée annuelle, vivace grâce à son rhizome charnu, allongé et formé de plusieurs ramifications tubéreuses et noueuses. Ce dernier est caractérisé par une odeur forte aromatique et une saveur chaude et poivrée. Il a une peau beige pâle, chair jaune juteuse et il devient de plus en plus fibreux avec l'âge (Kumar *et al.*, 2011) (Figure 10).



**Figure 10** : A : *Zingiber officinale* Roscoe ; B: Rhizome du gingembre (Gigon, 2012).

### 4.2.2 Position systématique

Règne : ..... Végétal

Embranchement : ..... Spermatophyte

Sous-embranchement : ..... Angiospermes (Magnoliophyta)

Classe : ..... Monocotylédones (Liliopsida)

Sous-classe : ..... Zingiberidae

Ordre : ..... Zingibérales

Famille : ..... Zingiberaceae

Genre : ..... *Zingiber*

Espèce : ..... *Zingiber officinale*  
*Roscoe.*

### 4.2.3 Origine et répartition géographique

Selon Kumar *et al.* (2011), le gingembre (*Zingiber officinale*) est originaire du Sud-Est asiatique, d'où il s'est progressivement diffusé à travers l'Asie, les îles du Pacifique et l'Afrique. Il figure parmi les plantes médicinales les plus anciennes connues des civilisations humaines et représente l'une des premières épices orientales largement reconnues pour ses vertus thérapeutiques. Aujourd'hui, le gingembre occupe une place prépondérante dans le commerce mondial des épices, en raison de sa forte valeur économique. Sa culture constitue ainsi une source significative de revenus pour de nombreux producteurs à travers le monde. (Nayak *et al.*, 2005).

### 4.2.4 Utilisations traditionnelles et propriétés pharmacologiques

Le gingembre apporte de l'énergie, du tonus et de la chaleur. En médecine chinoise, le gingembre est traditionnellement utilisé pour traiter les problèmes d'estomac, d'indigestions, de diarrhées, de nausées, le rhumatisme, les maladies des nerfs, les maux de dents, l'asthme, les constipations, le diabète, etc.... La plante est donc une plante d'intérêt majeur pour la pharmacopée (Soong *et al.*, 2011 ; Kumar *et al.*, 2011). Des propriétés antiinflammatoires, antioxydantes, immunostimulantes, antivirales et antipyrétiques ont été étudiées par Ghasemzadeh *et al.* (2016).

Cette plante intervient également dans la prévention de certains cancers (côlon, intestin, ovaire), de maladie cardiovasculaire, de la maladie d'Alzheimer et assure la protection des cellules du corps contre le vieillissement (Kumar *et al.*, 2011 ; Grace *et al.*, 2017). Les composés bioactifs du gingembre, en particulier les gingérols et shogaols, favorisent l'absorption du glucose par les cellules musculaires en augmentant l'expression du transporteur GLUT4 à la membrane cellulaire. Cette action, médiée par l'activation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), suggère un effet similaire à celui des thiazolidinediones utilisées en thérapie antidiabétique (Nalbantsoy *et al.*, 2010).

De plus, *zingiber officinale* stimule la libération d'insuline par les cellules bêta pancréatiques, ce qui favorise la régulation de la glycémie (Shidfar *et al.*, 2015). L'administration d'extraits de gingembre inhibe significativement l'activité de l'alpha-glucosidase et de l'alpha-amylase, deux enzymes responsables de la digestion des glucides complexes en sucres simples, limitant ainsi l'élévation postprandiale de la glycémie (Shidfar *et al.*, 2015).

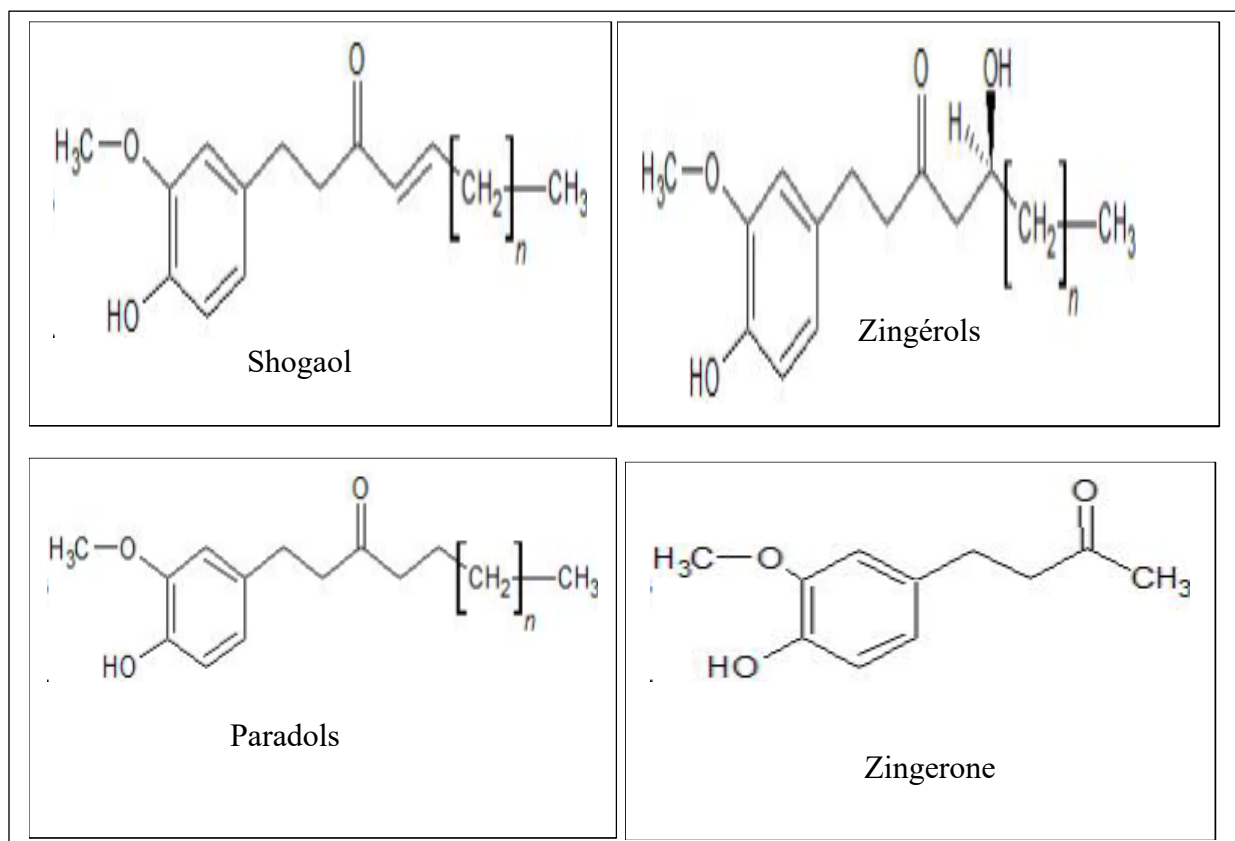
#### **4.2.5 Innocuité**

Le gingembre, utilisé depuis des siècles pour ses propriétés anti-inflammatoires, digestives et antiémétiques, est en général bien toléré. Toutefois, certaines études montrent que des doses très élevées pourraient entraîner des effets indésirables. Une revue des données toxicologiques sur le gingembre a conclu que des doses allant jusqu'à 6 g/jour chez l'humain sont sans danger. Cependant, à des doses plus élevées, des effets secondaires gastro-intestinaux tels que des brûlures d'estomac et des ballonnements peuvent apparaître (Ali *et al.*, 2008).

Par ailleurs, une étude sur la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait éthanolique de gingembre chez les rats a révélé qu'à des doses très élevées (jusqu'à 5000 mg/Kg pc), aucun effet létal n'a été observé. Toutefois, des modifications mineures des paramètres hépatiques et rénaux ont été détectées à des doses prolongées et élevées, suggérant une possible hépatotoxicité (Victor *et al.*, 2024).

#### **4.2.6 Composition chimique**

La majorité des composants chimiques sont situés principalement dans le rhizome, ce dernier contient essentiellement l'amidon (60 %), des protéines et des lipides (10 %) et 10 à 40 mL/Kg d'huile essentielle (volatile). L'odeur du gingembre dépend principalement de son huile volatile qui est constitué de monoterpènes et sesquiterpènes. Cette plante contient des composés phénoliques responsables du goût piquant : shogoal, gingérol, paradol, zingérone et des composés responsables de la saveur très marqué de la drogue sèche. Le gingembre contient également quelques flavonoïdes comme la quercétine, la rutine, la fisetine, la morine, l'acide gallique, l'acide ferulique, l'acide vanillique (Kumar *et al.*, 2011) (figure 11).



**Figure 11** : Structures de quelques composés phénoliques du gingembre

### 4.3 *Mentha piperita* (Lamiaceae)

#### 4.3.1 Description botanique

La menthe poivrée (*Mentha piperita*), également connue sous le nom de *menthe anglaise*, est un hybride stérile issu du croisement entre *Mentha aquatica* et *Mentha spicata*. Elle se développe principalement sur des sols frais, humides et riches en humus, jusqu'à environ 1 800 mètres d'altitude. Cette plante est largement répandue dans les zones tempérées du globe (Diane & Jeffrey, 2006). Plante vivace à rhizome long, rampant et chevelu, la menthe poivrée présente une tige dressée ou ascendante, haute de 50 à 80 cm, divisée en rameaux opposés. Ses feuilles ovales, lancéolées, aiguës et dentées mesurent entre 4 et 10 cm de long. Opposées et courtement pétiolées, elles affichent un vert intense, pouvant se teinter de reflets rougeâtres sous l'effet du soleil ou de nuances cuivrées à l'ombre. Leur surface est couverte de poils sécréteurs globuleux, dans lesquels s'accumulent les composés volatils odorants responsables de son arôme caractéristique. Les fleurs violacées sont regroupées en épis ovoïdes et courts, localisés à l'extrémité des rameaux. Le fruit divisé en quatre parties est entouré d'un calice

persistant. L'ensemble de la plante se distingue par une odeur intense, ainsi qu'une saveur piquante et rafraîchissante (Diane & Deffrey, 2006) (Figure 12).



Figure 12 : Feuilles de *Mentha piperita* (Abadlia & Chebbour , 2014.)

#### 4.3.2 Position systématique

Règne : ..... Plantae

Embranchement : ..... Tracheophyta

Classe : ..... Magnoliopsida

Ordre : ..... Lamiales

Famille : ..... Lamiaceae

Genre : ..... *Mentha*

Espèce : ..... *Mentha piperita* L.

#### 4.3.3 Origine et répartition géographique

*Mentha piperita* L. (menthe poivrée) est considérée comme l'une des meilleures sources potentielles de substances biologiquement actives pour les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Le genre *Mentha* est un groupe taxonomique commun dans la flore méditerranéenne. *M. piperita*, une menthe hybride est une espèce croisée entre la menthe aquatique (*Mentha aquatica* L.) et la menthe verte (*Mentha spicata* L.). *M. piperita* est une

plante herbacée aromatique et vivace originaire d'Europe, mais cultivée dans le Nord des États-Unis, au Canada, en Asie, en Afrique et dans de nombreuses autres parties du monde (Charles, 2012).

Depuis sa découverte, *M. piperita* est l'une des herbes aromatiques les plus utilisées à des fins médicinales. Les qualités aromatiques de *M. piperita* sont liées à son hospitalité dans la mythologie grecque. *M. piperita* a été utilisée comme désodorisant pour les sols afin de réduire l'odeur désagréable des sols durs (Charles, 2012).

#### **4.3.4 Utilisations traditionnelles et propriétés pharmacologiques**

La menthe poivrée (*Mentha piperita*) est une plante riche en vitamine C, fer, manganèse et en antioxydants, ce qui lui confère de nombreuses propriétés digestives, antiseptiques, stimulantes et antispasmodiques (Mahmood *et al.*, 2003 ; De Sousa *et al.*, 2010). Utilisée depuis l'Antiquité, elle est parfois désignée comme la plus ancienne médecine du monde, son usage étant attesté par des découvertes archéologiques dans des tombes égyptiennes datant d'environ 1000 av. J.-C. (Tucker & Naczi, 2007). Sur le plan thérapeutique, la menthe est traditionnellement employée pour soulager la fièvre, la fatigue, la toux, les nausées, ainsi que divers troubles digestifs. Elle est également utilisée dans le traitement de la mélancolie, de l'hystérie et de certaines affections oculaires. Ses propriétés médicinales incluent des effets stimulants sur le système nerveux, toniques, stomachiques, antiseptiques, analgésiques et vermifuges (Ganesan & Laiqur, 2020).

*Mentha piperita* est largement employée dans l'industrie alimentaire pour répondre aux besoins d'agrément. Elle est notamment utilisée pour aromatiser les crèmes, les chocolats, les bonbons, les chewing-gums et divers desserts. Son huile essentielle, riche en menthol lui confère une saveur rafraîchissante et caractéristique à ces produits. Par ailleurs, la menthe poivrée est également intégrée dans certains shampooings et savons. Ces produits cosmétiques exploitent son parfum distinctif et sa sensation de fraîcheur pour parfumer les cheveux et procurer un effet rafraîchissant sur la peau. Les propriétés antiseptiques et tonifiantes de la menthe poivrée en font un ingrédient de choix dans les formulations destinées aux soins corporels (Charles, 2012).

#### 4.3.5 Innocuité de *Mentha piperita*

La menthe poivrée est largement reconnue pour ses effets carminatifs, antispasmodiques et antimicrobiens. Bien qu'elle soit généralement considérée comme non toxique à des doses thérapeutiques, des effets indésirables peuvent survenir à des doses plus élevées.

Une étude de toxicité subchronique de l'huile essentielle de *Mentha piperita* a démontré qu'à des doses relativement élevées, aucun signe de toxicité significative sur les organes vitaux n'a été détecté chez les rongeurs. Cependant, une utilisation prolongée à ces doses peut entraîner des irritations gastro-intestinales et une hépatotoxicité (Thorup *et al.*, 1983 ; Chumpitazi *et al.*, 2018).

#### 4.3.6 Composition chimique

La menthe poivrée est riche en plusieurs constituants tels que : les flavonoïdes (lutéoline, menthoside), les tocophérols, les azulènes, l'acide rosmarinique, les terpènes, les caroténoïdes, les tanins et les huiles essentielles (Charles, 2012 ; Likibi *et al.*, 2015). Ces huiles essentielles concentrées principalement dans la partie aérienne de la plante, représentent environ 1 à 3 % de la masse de matière sèches, et constituent les principaux vecteurs de son activité biologique et de ses propriétés aromatiques. Leurs principaux constituants sont le menthol (29-50 %), le menthone (16-25 %), l'acétate de menthyle (pas plus de 5 %), l'isomenthone (de 10 à 15 %), le menthofurane, et le pipéritone. Elle contient également de 1 à 5 % limonène et de 3,5 à 14 % de 1,8 cinéole (Bruneton, 2009 ; Charles, 2012).

### 5. Innocuité des plantes médicinales et évaluation toxicologique

#### 5.1 Notions d'innocuité et de toxicité en phytothérapie

L'innocuité des plantes médicinales est un paramètre essentiel pour garantir leur utilisation sécurisée. Contrairement à l'idée selon laquelle les produits naturels sont toujours sûrs, plusieurs études ont montré que certaines plantes médicinales peuvent contenir des composés toxiques susceptibles d'engendrer des effets secondaires indésirables notamment à fortes doses ou après une exposition prolongée (Ekor, 2014).

La toxicité des plantes médicinales peut être liée à plusieurs facteurs :

- la présence de métabolites secondaires toxiques (alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, etc.),
- l'interaction avec des médicaments conventionnels ,

- et la contamination par des métaux lourds, des pesticides ou des mycotoxines (Saad *et al.*, 2006).

## 5.2 Méthodes d'évaluation de l'innocuité

### 5.2.1 Approches expérimentales

L'évaluation de l'innocuité d'une substance d'origine naturelle notamment les extraits de plantes médicinales constitue une étape cruciale dans le processus de validation scientifique de son utilisation thérapeutique. Cette évaluation repose sur une série d'études toxicologiques expérimentales réalisées selon des protocoles standardisés et reconnus au niveau international (OCDE, 2001). Ces études visent à déterminer les effets indésirables potentiels d'un produit sur l'organisme et à établir des paramètres de sécurité tels que la dose létale médiane ( $DL_{50}$ ), les doses sans effet observé et les seuils de toxicité.

Deux principales approches sont généralement mobilisées : les tests *in vitro* et les tests *in vivo*.

#### ✓ Etudes *in vitro*

Les tests *in vitro* sont souvent réalisés en amont des expérimentations animales afin d'avoir une première indication du potentiel toxique d'un extrait. Ils consistent à évaluer l'effet de la substance sur des cellules cultivées en laboratoire (par exemple des lignées cellulaires hépatiques, rénales ou neuronales) en observant la viabilité cellulaire, les modifications morphologiques ou les marqueurs biochimiques de cytotoxicité (exemples : test MTT, test de relargage de la LDH, etc.). Bien que ces essais permettent d'identifier certains mécanismes de toxicité, ils ne permettent pas de prédire l'effet global sur un organisme vivant entier.

#### ✓ Etudes *in vivo*

Les tests *in vivo* sont essentiels pour l'évaluation complète de l'innocuité car ils permettent d'observer les effets systémiques d'une substance sur un organisme entier. Ces études sont généralement conduites sur des modèles animaux tels que les rongeurs (rats ou souris), conformément aux lignes directrices de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques).

### 5.2.2 Toxicité aiguë

L'évaluation de la toxicité aiguë consiste en une étude qualitative et quantitative des effets toxiques susceptibles de survenir à la suite de l'administration unique d'une ou plusieurs substances actives présentes dans un médicament. Dans ce cadre, les animaux sont soumis à une observation rigoureuse pendant une période de 14 jours consécutifs, afin de détecter tout

signe clinique de toxicité ou de mortalité. Le terme toxicité orale aiguë est généralement utilisé en lien avec la détermination de la dose létale médiane ( $DL_{50}$ ) définie comme la dose statistiquement estimée qui entraîne la mort de 50 % des animaux traités, dans des conditions précises et sur une durée déterminée (OCDE, 2008).

### **5.2.3 Toxicité subaiguë**

La toxicité subaiguë concerne les effets nocifs dus à la répétition de doses qui ne produisent pas d'effets toxiques immédiats. Des effets tardifs peuvent survenir à cause de l'accumulation du produit dans les tissus ou à cause d'autres mécanismes. La substance à l'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux recevant différents niveaux de dose et ce, pendant une période de 28 jours consécutifs. Conformément aux lignes directrices de l'OCDE (2008), l'étude doit inclure au minimum trois groupes traités et un groupe témoin afin de permettre une évaluation comparative des effets potentiels de la substance testée.

### **5.2.4 Toxicité chronique**

Le but d'une étude de toxicité chronique est de déterminer les effets d'une substance d'essai chez une espèce de mammifère donnée à la suite d'une exposition prolongée et répétée. La substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives en général pendant une période de 12 mois. Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement (OCDE, 2008).

## **6. Généralités sur les paramètres biochimiques et hématologiques**

### **6.1 Généralités sur les paramètres biochimiques**

#### **6.1.1 Principes de dosage de l'ALAT et l'ASAT**

L'alanine aminotransférase (ALAT) est une enzyme principalement localisée dans le foie et constitue un marqueur sensible des atteintes hépatocellulaires. Son dosage repose sur une méthode enzymatique cinétique recommandée par la Fédération Internationale de Chimie Clinique (FICC). Le principe du dosage est basé sur la catalyse du transfert du groupement amine de la L-alanine vers l' $\alpha$ -cétoglutarate, conduisant à la formation de L-glutamate et de pyruvate. Le pyruvate est ensuite converti en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH), réaction couplée à l'oxydation du NADH en  $NAD^+$ . La diminution du NADH, mesurée par

spectrophotométrie, est proportionnelle à l'activité de l'ALAT dans le sérum (Gella *et al.*, 1985 ; Siby, 2008).

L'aspartate aminotransférase (ASAT) est une enzyme présente dans plusieurs tissus, notamment le foie, le cœur et les muscles. Elle est utilisée comme indicateur des lésions hépatiques et musculaires. Son dosage repose également sur une méthode enzymatique cinétique selon les recommandations de la FICC. L'ASAT catalyse le transfert du groupement amine de la L-aspartate vers l' $\alpha$ -cétoglutarate, entraînant la formation de L-glutamate et d'oxaloacétate. L'oxaloacétate formé est réduit en malate sous l'action de la malate déshydrogénase (MDH), réaction associée à l'oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup>. La diminution du NADH est proportionnelle à l'activité de l'ASAT dans le sérum (Gella *et al.*, 1985 ; Siby, 2008).

### **6.1.2 Principe de dosage de la créatinine**

La créatinine est un produit du métabolisme musculaire et constitue un marqueur de référence de la fonction rénale. Son dosage est classiquement réalisé par la méthode de Jaffé, introduite en 1886, qui repose sur la réaction de la créatinine avec le picrate alcalin pour former un complexe coloré mesurable par spectrophotométrie. Afin d'améliorer la spécificité de cette réaction, la méthode de référence associe la technique de Jaffé à l'utilisation de la terre à foulon (floridine), permettant de limiter les interférences (Siby, 2008). Par ailleurs, des méthodes enzymatiques plus spécifiques ont été développées et reposent sur l'action d'enzymes telles que la créatine amidohydrolase, réduisant notamment les interférences liées à l'ion ammonium (Bartels & Böhmer, 1971).

### **6.1.3 Principe de dosage de l'urée**

Le dosage de l'urée repose sur une réaction enzymatique utilisant l'uréase, qui hydrolyse l'urée en ammoniac (NH<sub>3</sub>) et dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). L'ammoniac ainsi libéré réagit avec un réactif spécifique (souvent le 2-oxoglutarate en présence de glutamate déshydrogénase) entraînant l'oxydation simultanée du NADH en NAD<sup>+</sup>. La diminution de l'absorbance à 340 nm, due à l'oxydation du NADH, est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon (Zhang *et al.*, 2017).

#### **6.1.4 Principe de dosage du glucose**

Le glucose est le principal substrat énergétique de l'organisme et constitue un paramètre essentiel de l'équilibre glycémique. Son dosage repose actuellement sur des méthodes enzymatiques, plus spécifiques que les anciennes techniques de réduction du cuivre. Parmi celles-ci, la méthode enzymatique glucose oxydase–peroxydase (méthode de Trinder) est largement utilisée. Elle est basée sur l'oxydation du glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène sous l'action de la glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit ensuite, en présence de peroxydase, avec des composés chromogènes pour produire un complexe coloré. L'absorbance de ce complexe, mesurée par spectrophotométrie à 500 nm, est proportionnelle à la concentration de glucose dans le sérum (Siby, 2008).

#### **6.2 Généralités sur les paramètres hématologiques**

L'hémogramme, également appelé numération–formule sanguine, correspond à l'étude cytologique quantitative et qualitative du sang circulant. Il constitue un outil fondamental d'exploration hématologique permettant d'évaluer le nombre, la proportion, la morphologie et les variations des éléments figurés du sang, à savoir les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes (Scipioni *et al.*, 1997 ; Descat, 2002).

Cette analyse repose, dans un premier temps, sur les numérations absolues des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes. Pour les leucocytes, la formule leucocytaire précise la répartition relative des différents types cellulaires, notamment les granulocytes neutrophiles, éosinophiles et basophiles, ainsi que les lymphocytes et les monocytes, les granulocytes étant également désignés sous le terme de polynucléaires.

L'étude des érythrocytes est complétée par l'évaluation des principaux indices érythrocytaires, incluant l'hématocrite, qui exprime la fraction volumique du sang occupée par les globules rouges, le volume globulaire moyen, indicateur de la taille moyenne des hématies, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, reflétant la quantité moyenne d'hémoglobine par globule rouge, ainsi que la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, qui traduit la concentration d'hémoglobine rapportée à l'hématocrite. À ces paramètres s'ajoutent la concentration totale en hémoglobine, généralement déterminée par méthode spectrophotométrique, et le taux de réticulocytes, marqueur de l'activité érythropoïétique médullaire.

Au-delà des paramètres numériques, l'hémogramme intègre également une appréciation qualitative de la morphologie des cellules sanguines, dont l'analyse revêt une importance diagnostique comparable à celle des données quantitatives (Descat, 2002)

## **7. Activité antiradicalaire**

### **7.1 Test de 2,2-diphényl-1-1-picryl-hydrazyl (DPPH)**

#### **7.1.1 Principe DPPH**

Le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) constitue une méthode de référence largement utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés ou extraits naturels. Ce test repose sur la capacité du DPPH à générer des radicaux libres stables, dont la stabilité résulte de la délocalisation de l'électron non apparié à l'intérieur de la molécule (Roukia *et al.*, 2015). En solution, ces radicaux DPPH• confèrent une coloration violette intense. Lorsqu'un antioxydant est présent, il réduit les radicaux DPPH•, ce qui se traduit par une diminution progressive de la coloration. Cette variation d'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 517 nm permettant ainsi de quantifier le potentiel antioxydant de la substance ou de l'extrait évalué (Popovici *et al.*, 2009).

### **7.2 Test de l'ABTS**

#### **7.2.1 Principe ABTS**

Le principe du test de mesure de l'activité anti-radicalaire par la méthode ABTS est basé sur la diminution de l'absorbance à 734 nm du cation radicalaire ABTS•+ (coloration bleu-vert) en présence d'un composé potentiellement anti-radicalaire qui réduit le radical cation. La diminution de la forme radicalaire d'ABTS•+ entraîne une décoloration de la solution. Ce test se base sur une réaction de décoloration visuellement et quantitativement mesurable. Le cation radicalaire (ABTS•+) est stable pendant plus de 2 jours lorsqu'il est stocké à température ambiante et à l'abri de la lumière (Re *et al.*, 1999).

## 8. Caractérisation phytochimique

### 8.1 Screening phytochimique

#### 8.1.1 Principe de la recherche des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont la propriété de se lier aux ions de métaux lourds tels que le bismuth, l'iode, le mercure ou encore le tungstène, formant ainsi des complexes précipitants. Le réactif de Dragendorff contenant de l'iode et du bismuth, produit un précipité orangé en présence d'alcaloïdes. Quant au réactif de Valsler-Mayer à base d'iode et de mercure, il conduit à l'apparition d'un précipité blanc laiteux, traduisant également la présence de ces composés.

#### 8.1.2 Principe de la recherche des Polyphénols

La détection des composés polyphénoliques repose sur leur réaction colorimétrique avec une solution de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ). Cette réaction entraîne la formation d'une coloration bleu-noirâtre ou verdâtre, selon la nature des polyphénols présents. L'intensité et la teinte de cette coloration sont comparées à un témoin constitué d'une solution standard de phénol, conformément à la méthode décrite par Wood *et al.* (2002).

#### 8.1.3 Principe de la recherche des tanins

Les tanins ont la capacité de former des précipités en présence de sels de métaux lourds tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), l'étain (Sn), le plomb (Pb) ou le mercure (Hg). La réaction de Stiasny utilisant un mélange de formol et d'acide chlorhydrique, permet de différencier les deux principaux types de tanins :

- Les tanins catéchiques (ou condensés, non hydrolysables) précipitent sous forme de gros flocons après chauffage à 80 °C suivi d'un refroidissement.
- Les tanins galliques (ou hydrolysables), quant à eux, subissent une hydrolyse en présence d'acétate de sodium. L'addition de quelques gouttes de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) entraîne alors l'apparition d'une coloration bleu-noirâtre, indiquant leur présence. Un témoin constitué d'acide gallique pur est utilisé à des fins de comparaison (Trease & Evans, 2002 ; Hagerman, 2002).

#### 8.1.4 Principe de la recherche des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont détectés par la réaction à la cyanhydrine, fondée sur la réduction des hétérosides flavoniques en présence d'hydrogène naissant (généré par le magnésium). Cette réaction entraîne la formation de colorations caractéristiques en fonction du type de flavonoïde :

- Flavones : coloration orange
- Flavonols : coloration rouge
- Flavanones : coloration rouge-violacée

L'addition successive de trois copeaux de magnésium et de trois gouttes d'alcool isoamylique, fait apparaître une coloration rose-orangée ou rouge-violacée intense dans la phase amylique, indiquant la présence de flavonoïdes (Miliauskas *et al.*, 2004).

#### 8.1.5 Principe de la recherche des saponosides

Les saponosides sont des hétérosides à génine stéroïdique ou triterpénique reconnus pour leurs propriétés tensioactives. En solution aqueuse, ils produisent une mousse stable et abondante lors d'une agitation. Ainsi, la présence de saponosides est indiquée par une hauteur de mousse supérieure ou égale à 10 mm mesurée après agitation (Trease & Evans, 2002).

#### 8.1.6 Principe recherche des quinones

Les quinones peuvent exister sous deux formes : libres ou combinées. Les quinones libres sont mises en évidence par la réaction de Borntraeger, tandis que les formes combinées nécessitent une hydrolyse préalable. Leur détection repose sur leur capacité à former une coloration rouge cerise en présence d'une base faible (ammoniaque, soude, eau de chaux).

#### 8.1.7 Principe recherche des stérols et polyterpènes

L'ajout de l'anhydride acétique acidifié à l'extrait suivie de l'addition d'acide sulfurique permet de mettre en évidence des stérols et des terpènes. L'apparition d'un anneau pourpre ou violet, évoluant vers des teintes bleues puis verte, traduit une réaction positive (Trease & Evans, 2002).

### 8.1.8 Principe recherche des mucilages

Dans un premier test, un volume de 1 mL de décocté a été introduit dans un tube à essai, puis 5 mL d'alcool absolu ont été ajoutés. Après agitation, la formation d'un précipité floconneux a indiqué la présence de mucilages. Dans un second test, 1 mL d'extrait aqueux a été dilué avec 9 mL d'eau distillée, puis le mélange a été additionné de 5 mL d'éthanol. L'apparition de flocons a également confirmé la présence de mucilages.

Les mucilages sont des polysaccharides hydrophiles de haut poids moléculaire qui, en présence d'alcools tels que l'éthanol ou l'alcool absolu, précipitent sous forme de flocons. Cette propriété est exploitée pour leur identification par des tests de précipitation en milieu hydro-alcoolique (Trease & Evans, 2002).

## 8.2 Etude quantitative des quelques métabolites secondaires

### 8.2.1 Principe de la détermination de la teneur en polyphénols totaux

La quantification des composés polyphénoliques a été réalisée par spectrophotométrie en suivant la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce réactif initialement de couleur jaune pâle, est un mélange d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ). En présence de polyphénols, ces derniers agissent comme agents réducteurs, transformant le réactif en un complexe de couleur bleue composé d'oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). Cette coloration bleue intense, caractéristique de la réaction, présente un maximum d'absorbance autour de 765 nm. L'intensité de l'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration en polyphénols présents dans l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu g \text{ ÉAG/mg d'extrait}$ ), à partir de l'équation de régression linéaire obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Blainski *et al.*, 2021).

### 8.2.2 Principe de dosage de la teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes par la méthode au chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) est une technique spectrophotométrique largement utilisée pour estimer la teneur totale en ces composés dans des extraits végétaux. Ce test est basé sur la capacité des flavonoïdes en particulier ceux possédant certains motifs structuraux (comme un groupe cétone sur le carbone C-4 et un groupe hydroxyle sur le carbone C-5, ou des groupes hydroxyle sur les carbones C-3

et C-4 du cycle B), à former des complexes stables et colorés avec les ions aluminium (Sulaiman *et al.*, 2023).

### **8.2.3 Principe de dosage des tanins condensés**

Le dosage des tanins condensés (aussi appelés proanthocyanidines) par la méthode à la vanilline est une technique spectrophotométrique qui repose sur la capacité de ces composés à réagir avec la vanilline en présence d'un acide fort, formant un complexe coloré. Les tanins condensés sont des polymères de flavan-3-ols (catéchines, épicatechines, etc.). En présence de l'acide fort et de la vanilline, la vanilline réagit spécifiquement avec le cycle A du monomère flavan-3-ol qui constitue les tanins condensés. Cette réaction implique généralement une attaque électrophile de la vanilline sur la position C-8 (ou C-6) du noyau phénolique du flavan-3-ol. Cette condensation conduit à la formation d'un complexe chromogène de couleur rouge-orange ou rose, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des tanins condensés dans l'échantillon. L'absorbance du complexe coloré est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde maximale d'environ 500 nm (Rajvanshi *et al.*, 2024).

## **9. Analyse sensorielle**

### **9.1 Définition**

Selon la norme française NF ISO 5492, l'analyse sensorielle se définit comme « l'évaluation des caractéristiques organoleptiques d'un produit à travers les organes des sens ». Grâce à ses cinq sens (la vue, l'ouïe, l'odorat, le goût et le toucher), l'être humain devient l'instrument principal des techniques d'analyse sensorielle permettant ainsi de caractériser de manière subjective mais rigoureuse divers produits. Rapidement adoptée par l'industrie agroalimentaire, cette approche est aujourd'hui considérée comme un outil stratégique de développement : elle permet de concevoir des produits aux attributs sensoriels différenciateurs répondant aux attentes gustatives des consommateurs tout en assurant leur compétitivité et leur pérennité sur le marché (Conte, 2008 ; Arnaud, 2016).

### **9.2 Méthodologie classique**

Dans la mise en œuvre, l'analyse sensorielle repose sur l'organisation structurée de séances d'évaluation réalisées à l'aide d'un panel de sujets dont le niveau de familiarité avec le produit ou la méthode varie selon les objectifs de l'essai. De manière générale, les approches

en analyse sensorielle se répartissent en trois grandes familles de méthodes : les tests discriminatifs, les tests descriptifs et les tests hédoniques (Conte, 2008 ; Arnaud, 2016).

- Les méthodes discriminatives permettent de mettre en évidence si deux ou plusieurs produits sont différents. Très populaires, les méthodes discriminatives sont généralement utilisées lorsque les différences des produits à comparer sont peu perceptibles.
- Les méthodes descriptives sont utilisées pour caractériser les différences entre divers produits en établissant un profil sensoriel spécifique à chacun. Parmi ces méthodes, le profil sensoriel conventionnel constitue la référence recommandée par les normes AFNOR (NF ISO 13299, Mai 2010). Il repose sur trois approches fondamentales : profil aromatique ou profil de saveur, l'analyse Descriptive Quantitative et la méthode Spectrum (Stone & Sidel, 2004).
- Les méthodes hédoniques visent à évaluer les préférences des consommateurs en se fondant sur leur perception subjective du plaisir ou du déplaisir suscité par un aliment. Elles permettent ainsi de comparer l'appréciation sensorielle globale de différents produits en tenant compte des ressentis individuels relatifs à leur acceptabilité organoleptique.

Contrairement à l'analyse sensorielle descriptive, les autres méthodes font appel à des sujets naïfs n'ayant eu aucune pratique de l'analyse sensorielle. De plus, le recrutement de ces derniers est généralement ciblé sur un groupe spécifique de consommateurs de l'univers produit des échantillons testés. Le nombre de sujets recommandés par les normes AFNOR (NF V09-500 Décembre 2012) pour ce type de test est de 60 consommateurs (Stone & Sidel, 2004).

## **10. Défis et perspectives pour le développement d'un thé phyto-thérapeutique**

### **10.1 Standardisation et formulation des tisanes thérapeutiques**

L'un des défis majeurs dans le développement d'un thé phyto-thérapeutique est la standardisation de sa composition et de son efficacité. Contrairement aux médicaments de synthèse, les extraits de plantes peuvent varier en fonction de plusieurs facteurs notamment :

- La variabilité botanique : les conditions climatiques, la saison de récolte et les techniques de culture influencent la composition des plantes médicinales (Kunle *et al.*, 2012) ;

- Les méthodes d'extraction et de préparation : l'utilisation d'extraits aqueux, hydroalcooliques ou d'autres solvants peut modifier le profil phytochimique du thé (Sasidharan *et al.*, 2011) ;
- Les interactions entre les plantes : dans une formulation contenant plusieurs espèces végétales, les interactions entre leurs métabolites secondaires doivent être étudiées pour éviter des effets antagonistes ou toxiques (Ekor, 2014).

Des protocoles de standardisation basés sur des biomarqueurs chimiques et des tests biologiques sont nécessaires pour garantir une qualité homogène et reproductible du thé.

### **10.2 Statut du thé : Complément alimentaire ou médicament**

Selon la réglementation, un thé thérapeutique peut être classé comme :

- Un complément alimentaire s'il est destiné au bien-être général et ne revendique pas d'indication médicale stricte ;
- Un médicament à base de plantes s'il est développé avec des preuves d'efficacité clinique et une réglementation stricte en matière de fabrication et d'usage thérapeutique.

La distinction entre ces deux catégories influence les exigences légales et les opportunités de commercialisation du produit (Chao-Dong *et al.*, 2017).

### **10.3 Développement d'une filière économique locale**

Le développement d'une filière de production et de transformation du thé phyto-thérapeutique pourrait favoriser :

- La création d'emplois dans la culture, la récolte et la transformation des plantes médicinales.
- Le renforcement des infrastructures locales pour le séchage, l'extraction et le conditionnement des tisanes thérapeutiques.
- L'exportation des produits phytothérapeutiques africains, contribuant ainsi à la valorisation économique des ressources naturelles du continent (Van-Andel & Fundiko, 2016).

**DEUXIEME PARTIE :**  
**MATERIEL ET METHODES**

## II.1 Matériel

### II.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles de *Lippia multiflora* récolté dans la région de Korhogo, de rhizomes de *Zingiber officinale* et les feuilles de *Mentha piperita* pris à Daloa (Figure 13).



**Figure 13** : Plantes et organes végétaux utilisés photoN'dri, (2020)

A) Feuille de *L. multiflora*, B) Rhizome de *Zingiber officinale*

C) feuille de *Mentha piperita*

### **II.1.2 Matériel animal**

Le matériel animal est constitué de rats albinos (*Rattus norvegicus*) de la variété Wistar. Le poids des rats varie de 94 à 145 grammes. Les animaux ont été élevés à l'animalerie de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université Félix Houphouët-Boigny). Tous les animaux ont été maintenus dans une pièce, dans des conditions environnementales contrôlées de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  et dans un cycle de 12 h de lumière - 12 h cycle d'obscurité dans les locaux de (GerProPhaT). Les animaux ont été nourris avec un aliment complet standard sous forme de granulés, fourni par IVOGRAIN, une filiale de la Société Ivoirienne de Productions Animales (SIPRA), spécialisée dans la nutrition animale en Côte d'Ivoire. L'eau potable du robinet leur a été administrée à l'aide de biberons tout au long de l'étude. Une période d'acclimatation d'au moins sept jours a été respectée avant le début des expérimentations, conformément aux recommandations de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE, 2008). Avant l'initiation des traitements, les animaux ont été répartis en groupes homogènes en fonction de leur poids (Figure 14).



**Figure 14:** Rats Wistar

### **II.1.3 Matériel chimique**

Divers produits chimiques et réactifs ont été utilisés au cours des différentes phases expérimentales :

- des réactifs destinés au dosage des paramètres hématologiques et biochimiques, de la solution d'hématoxyline-éosine ainsi que du formol à 10 % utilisés dans les études de toxicité et pour la réalisation des coupes histologiques.
- les composés tels que le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), le radical ABTS, l'acide ascorbique et l'acide gallique, nécessaires à l'évaluation de l'activité antioxydante ont été acquis auprès de Sigma-Aldrich (Allemagne).
- Glucose anhydre utilisé pour induire une hyperglycémie.
- Glibenclamide, un produit de référence utilisé comme anti-hyperglycémiant conventionnel.
- Streptozotocin
- Metformine
- et des réactifs de caractérisation qualitative et quantitative des métabolites secondaire fournis par Sigma Aldrich

### **II.1.4. Matériel technique**

Le matériel technique utilisé pour la réalisation de ce travail comprenait une broyeuse Retsch (type GM300), utilisée pour la pulvérisation fine du matériel végétal afin d'obtenir une poudre homogène. La pesée précise des échantillons et des réactifs a été effectuée à l'aide d'une balance de précision (OHAUS, modèle AX523/E). Une étuve (Memmert, Allemagne) a été employée pour le séchage contrôlé des extraits, permettant l'élimination de l'humidité résiduelle.

Les prélèvements sanguins ont été réalisés à l'aide de seringues stériles, tandis que les rats ont été maintenus dans des cages adaptées servant de dortoirs, assurant des conditions d'hébergement conformes aux normes expérimentales. Des gants de protection ont été systématiquement utilisés afin de prévenir tout risque d'infection et d'assurer la sécurité de l'expérimentateur.

La mesure de la glycémie a été réalisée à l'aide d'un glucomètre, permettant un suivi rapide et fiable des variations glycémiques chez les animaux. Les extraits obtenus ont été conservés dans des pots appropriés, garantissant leur stabilité et leur protection contre toute

contamination. Un spectrophotomètre a été utilisé pour la mesure de la densité optique, essentielle à la quantification des paramètres analytiques.

Un agitateur magnétique (Agimatic-NR) a été employé lors de la préparation des extraits secs afin d'assurer une agitation homogène et une meilleure extraction des composés bioactifs. Par ailleurs, deux automates, le Cabas® U411 et le CYANHemato-Socimed®, ont été utilisés pour le dosage des paramètres biochimiques et hématologiques dans le cadre de l'étude de la toxicité.

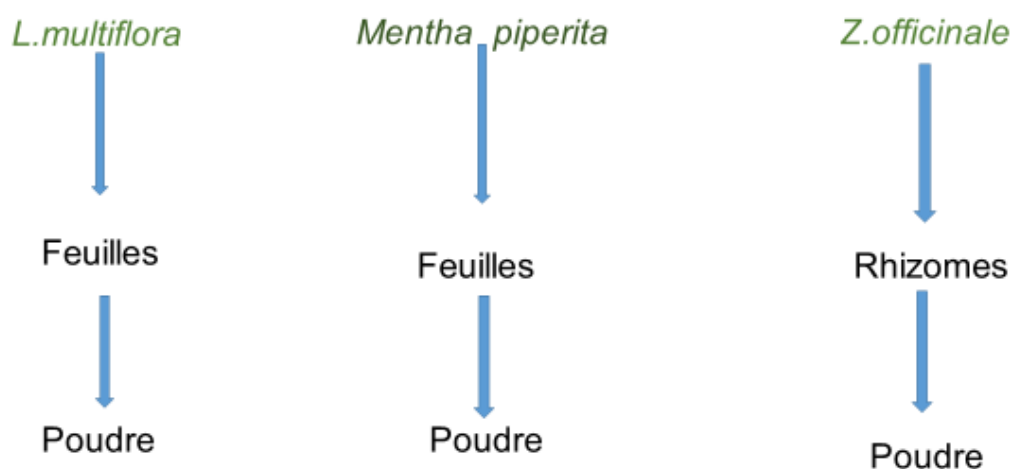
Le matériel chirurgical, comprenant une manche et des lames de bistouri, une paire de ciseaux, des écarteurs, une sonde cannelée, des pinces ainsi qu'une plaque de contention, a servi au prélèvement du sang et des organes chez les rats dans le respect des protocoles expérimentaux.

Enfin, la verrerie usuelle de laboratoire, constituée de tubes à vis, pipettes de 1 mL, erlenmeyers, éprouvettes graduées de 100 mL, ballons chauffants et béchers, a été utilisée pour la préparation, la manipulation et l'analyse des échantillons.

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Méthode de Préparation des poudres végétales

Les feuilles de *Lippia multiflora*, les rhizomes de *Zingiber officinale* et les feuilles de *Mentha piperita* ont été récoltés, triés, découpés, lavés puis séchés à l'abri du soleil pendant 7 jours à la température ambiante. Après le séchage, les organes ont été broyés et tamisés puis stockés dans des papiers Kraft (Figure 15).



**Figure 15:** production des poudres

## II.2.2 Formulation de thés

La formulation du THE polyherbal a consisté en l'association des poudres de *Zingiber officinale*, *Mentha piperita* et *Lippia multiflora* à des proportions variables en comparaison avec la formulation *L. multiflora* et *Z. officinale* (Formulation évaluée par un test hédonique lors des travaux antérieurs) conservant *Lippia multiflora* comme essence de base. Ainsi, quatre nouvelles formulations ont été élaborées.

Formulation 1: X % *L. multiflora* + Y % *Z. officinale* codée THE 1

Formulation 2: X1% *L. multiflora* + Y1 % *Z. officinale* + Z1 % *M. piperita* codée THE 2

Formulation 3: X2 % *L. multiflora* + X2 % *Z. officinale* + X2% *M. piperita* codée THE 3

Formulation 4: X3% *L. multiflora* + X3% *Z. officinale* + X3% *M. piperita* codée THE 4

Formulation 5: X4% *L. multiflora* + X4% *Z. officinale* + X4% *M. piperita* codée THE 5

## II.2.3 Évaluation sensorielle : Test hédonique

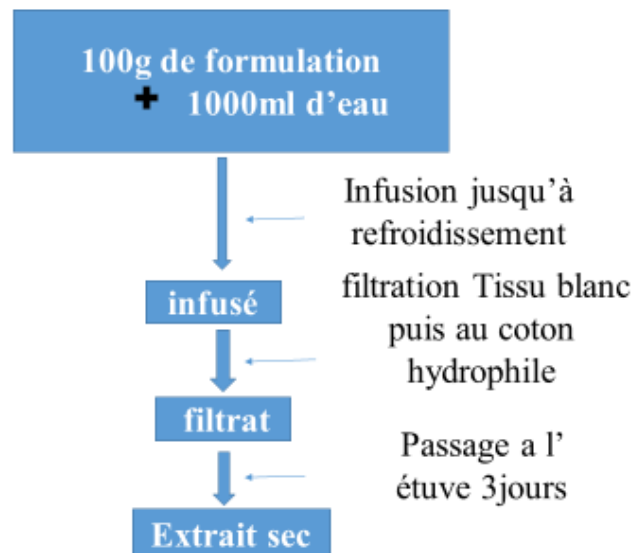
Le test hédonique a été mené afin d'évaluer l'acceptabilité sensorielle des différentes formulations de THE. L'étude s'est déroulée en deux sessions distinctes et elle a mobilisé soixante (60) sujets non entraînés, recrutés sur la base de leur disponibilité et de leur familiarité avec les thés et tisanes. Chaque participant a reçu cinq échantillons codés par des numéros aléatoires, présentés de manière successive. Pour chaque échantillon, le dégustateur devait exprimer son appréciation globale à l'aide d'une échelle hédonique à 9 points, allant de 1 (« extrêmement désagréable ») à 9 (« extrêmement agréable »), avec des niveaux intermédiaires permettant de nuancer le degré de confort ou d'inconfort sensoriel (Arnaud, 2016).

Afin de garantir l'objectivité de l'évaluation et d'éviter les interférences gustatives entre les échantillons, les participants étaient invités à se rincer soigneusement la bouche à l'eau après chaque dégustation. Les tests ont été réalisés dans les locaux de l'Université Jean Lorougnon Guédé à Daloa (Côte d'Ivoire).

## II.2.4 Préparation de l'extrait sec de la formulation 4 pour les tests

La formulation retenue à l'issue du test hédonique (formulation 4) a été utilisée pour la réalisation des tests de cette étude. L'extrait sec de la formulation 4 a été préparé selon la méthode décrite par Zirihi *et al.* (2003). Cette préparation a consisté à prélever 100 g de poudre de cette formulation et à l'infuser dans 1 L d'eau bouillante pendant 15 minutes. L'infusion obtenue a ensuite été soumise à une série de filtrations : une première à l'aide d'un tissu blanc,

suivie de deux filtrations successives sur coton hydrophile et enfin une filtration sur papier Whatman N°3, afin d'éliminer efficacement les fibres. Le filtrat obtenu a été séché à 50 °C pendant 72 heures. Le résidu sec récupéré après séchage représente l'extrait sec de la formulation 4.



**Figure 16:** Préparation de l'extrait sec de THE 4 (Zihiri *et al.*, 2003)

## II.2.5 Evaluation de la toxicité aiguë et subaiguë de la formulation 4

### II.2.5.1 Test de toxicité aiguë

Le test de toxicité aiguë vise à identifier les dangers d'une substance à court terme après une administration unique (ou multiples doses sur une période de 24 heures) et à estimer la dose létale médiane ( $DL_{50}$ ) ou une plage de doses pour des études ultérieures. Il permet de caractériser les effets toxiques immédiats et d'identifier les organes cibles potentiels. L'objectif est de fournir des informations sur le danger intrinsèque de la substance et d'aider à la classification et à l'étiquetage des produits chimiques (Hayes, 2014). L'expérience a été réalisée conformément à la ligne directrice 423 de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE), qui régit les tests de toxicité aiguë. Les animaux ont été répartis en trois (3) groupes distincts, homogène en poids et composé de trois (3) rates. Les administrations des solutions ont été réalisées par gavage à l'aide d'une sonde gastrique adaptée selon la démarche suivante :

- Groupe 1 à reçu de l'eau distillée,
- Groupe 2 à reçu l'extrait sec de la formulation 4 à 2000 mg/kg pc,

- Groupe 3 a reçu 5000 mg/kg pc de l'extrait sec de la formulation 4 .

Avant le début de l'expérience, les rates ont été soumises à une période de jeûne nocturne de 12 à 16 heures afin de garantir des conditions standardisées et de minimiser les variations métaboliques. Chaque animal a été pesé individuellement à l'aide d'une balance analytique de haute précision, permettant de calculer avec exactitude la dose requise en fonction du poids corporel.

Après l'administration, les animaux ont été privés de nourriture pendant 1 à 2 heures afin de favoriser l'absorption initiale du composé sans interférence.

Les animaux ont été surveillés à des intervalles de temps spécifiques au cours des premières heures suivant l'administration (10 min, 30 min, 60 min et 120 min) puis à 4 heures et 6 heures post-administration. Cette observation a été poursuivie quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérience, soit sur une durée totale de 14 jours afin de détecter d'éventuels signes cliniques d'intolérance. Les observations portaient sur l'apparition des signes tels que des changements de comportement, des symptômes neurologiques, des troubles digestifs ou tout autre indicateur de détresse physiologique (OCDE, 2001). Parallèlement, les poids des animaux sont pris chaque semaine durant la durée de l'expérimentation.

#### **II.2.5.2 Évaluation de la toxicité subaiguë**

L'évaluation de la toxicité subaiguë a été réalisée conformément aux directives 407 de l'OCDE. La méthodologie de cette étude a consisté à administrer quotidiennement la substance à tester par voie orale, à plusieurs lots de rats, à raison d'un niveau de dose spécifique par groupe, et ce, sur une période de 28 jours consécutifs.

Le test de toxicité subaiguë (ou subchronique) évalue les effets indésirables d'une substance après une administration répétée sur une période intermédiaire, généralement de 28 jours (toxicité subaiguë) ou 90 jours (toxicité subchronique) chez les rongeurs. L'objectif était d'identifier les organes cibles, les effets cumulatifs, la dose sans effet adverse observé (NOAEL - No Observed Adverse Effect Level) ou la dose la plus basse avec effet adverse observé (LOAEL - Lowest Observed Adverse Effect Level), et d'aider à déterminer les doses pour les études de toxicité chronique (Hayes, 2014).

L'étude a impliqué 24 rats albinos Wistar ayant un poids moyen de 121 g. Ces rongeurs ont été répartis en quatre lots homogènes de six individus comprenant chacun trois mâles et trois femelles. Les lots ont été traités comme suit :

- Lot I (Lot témoin) : les rats ont reçu de l'eau distillée,
- Lot II : les rats ont reçu une dose de 17 mg/Kg de l'extrait,

-Lot III : les rats ont reçu une dose de 85 mg/Kg de l'extrait,

- Lot IV : les rats ont reçu une dose de 425 mg/Kg pc de l'extrait.

Avant le début de l'étude, les rats ont été laissés à jeun la veille de la première administration. La substance testée a été administrée quotidiennement par gavage à l'aide d'une sonde gastrique, sept jours sur sept, pendant les 28 jours de l'étude. Le poids corporel des rats a été déterminé avant la première administration de l'extrait puis une fois par semaine durant 28 jours afin de suivre l'évolution pondérale au cours de l'étude. Cette variable est un indicateur clé pour évaluer l'état général des animaux et détecter d'éventuelles perturbations métaboliques dues à la substance testée. Chaque jour au cours de cette période, les rats sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe d'intolérance.

### **II.2.5.2.1 Dosage des paramètres biochimiques et hématologiques**

#### **II.2.5.2.1.1 Prélèvement du sang**

A la fin de la période de traitement, les rats ont été anesthésiés à l'aide d'éther Cooper pour permettre des prélèvements sanguins dans des conditions sécurisées et conformes aux bonnes pratiques expérimentales. Les échantillons de sang ont été collectés par ponction au niveau du sinus rétro-orbitaire, une méthode couramment utilisée pour les petits rongeurs, permettant un prélèvement rapide et efficace.

Le sang recueilli a été réparti dans trois types de tubes selon l'analyse prévue. Les tubes contenant de l'EDTA (tube violet) ont été réservés aux analyses hématologiques, à cause de la capacité de cet anticoagulant à préserver les éléments figurés du sang. Les tubes rouges et les tubes contenant le fluorure d'oxalate (tube gris) ont été centrifugés à 4000 tours par minute (rpm) pendant 10 minutes. Le sérum obtenu après centrifugation a été aliquoté avec précaution et stocké à -20 °C afin de préserver ses propriétés biochimiques en vue des analyses ultérieures, comme le décrit Manda *et al.* (2017).

#### **II.2.5.2.1.2 Détermination paramètres hématologiques**

Les paramètres hématologiques pour la formule numérique sanguine sont : globules rouges (GR), globules blancs (GB), hémocrite, hémoglobine, plaquettes, volume globulaire moyen (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH). La numération formule sanguine (NFS) a été réalisée immédiatement après le prélèvement sanguin à l'aide de tubes contenant de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) en tant

qu'anticoagulant. L'analyse a été effectuée avec l'analyseur automatique URIT-300 PLUS, conformément aux recommandations des fabricants et aux protocoles standardisés en hématologie.

Avant l'analyse, les échantillons sanguins ont été homogénéisés par retournements successifs afin d'éviter la formation de microcaillots, garantissant ainsi la fiabilité des résultats. L'échantillon a été ensuite introduit verticalement dans l'automate via une aiguille d'aspiration. Une fois l'aspiration terminée, le tube a été retiré. L'analyse complète des paramètres hématologiques a été obtenue au bout d'un temps de 35 secondes à 1 minute. L'appareil URIT-300 PLUS était connecté à une imprimante permettant l'édition automatique des résultats (Kraus, 1980).

#### **II.2.5.2.1.3 Détermination des paramètres biochimiques**

Les paramètres sériques dosés étaient la glycémie, la créatinine, l'urée, l'Alanine aminotransférase (ALAT) et l'Aspartate aminotransférase (ASAT).

##### Principe de dosage de ALAT et ASAT

Le dosage enzymatique a été réalisé selon les instructions du fabricant des réactifs commerciaux ASAT et ALAT (Cromatest Linéar). Pour chaque analyse, deux tubes à hémolyse ont été préparés en introduisant 1000 µL du réactif spécifique dans chacun d'eux. Dans le premier tube (témoin), seul le réactif a été conservé. Dans le second, destiné à l'échantillon, un volume de 100 µL de sérum à analyser a été ajouté au réactif. Après une homogénéisation soignée, ce mélange a été incubé pendant 1 minute à 37 °C. L'activité enzymatique a ensuite été évaluée par lecture de l'absorbance à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, conformément au principe de la méthode cinétique.

Le dosage de la créatinine a été réalisé en utilisant trois tubes à hémolyse correspondant respectivement au tube test, au tube témoin et au tube standard. Chaque tube a été préparé avec 1000 µL du réactif fourni par le laboratoire BIOLABO SAS. Ensuite, un volume de 10 µL de sérum a été ajoutés dans le tube test, tandis que le tube standard a reçu la solution standard de créatinine. Après homogénéisation des mélanges, une incubation de 30 secondes à 37 °C a été effectuée. L'absorbance a ensuite été mesurée au spectrophotomètre à 520 nm (Küme *et al.*, (2017).

Le dosage de l'urée sérique a été réalisé selon une méthode spectrophotométrique. Pour ce faire, trois tubes ont été préparés : un tube étalon, un tube blanc et un tube échantillon, chacun contenant 1000 µL de milieu réactionnel. Un volume de 100 µL de solution étalon d'urée a été ajouté au tube étalon, 100 µL d'eau distillée au tube blanc, et 100 µL de sérum au tube

échantillon. Après homogénéisation, les mélanges ont été incubés à température ambiante (25 °C) pendant 1 minute. L'absorbance a ensuite été mesurée à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, en utilisant le tube blanc comme référence. La concentration sérique d'urée a été déterminée à partir de la valeur d'absorbance obtenue (Zhang *et al.*, 2017).

La glycémie a été mesurée par la méthode enzymatique de la glucose oxydase, qui est plus sensible et spécifique que la technique à l'orthotoluidine.

Une série de trois tubes (blanc, calibrateur et échantillon) a été préparée, chacun contenant 1000 µL de solution enzymatique de glucose. Dans le tube blanc, un volume 10 µL d'eau distillée a été ajoutés, tandis que le tube calibrateur a reçu la solution standard de glucose et le tube échantillon, un volum de 10 µL de sérum à analyser. Après homogénéisation, les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 10 minutes. Enfin, l'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre à 500 nm en utilisant le tube blanc comme référence.

#### **II.2.5.2.1.4 Dosage des ions calcium (Ca<sup>2+</sup>), sodium (Na<sup>+</sup>) et potassium (K<sup>+</sup>)**

##### **✓ Dosage des ions Ca<sup>2+</sup>**

La détermination du calcium sérique a été réalisée par une méthode colorimétrique utilisant un kit commercial (Spinreact®, Réf. SP1001065). Ce dosage repose sur la formation d'un complexe chromogène entre le calcium et le réactif O-cresolphthalein complexone (CPC) en milieu alcalin. L'intensité de la coloration développée, mesurée par spectrophotométrie, est directement proportionnelle à la concentration de calcium présente dans l'échantillon, conformément au principe de la loi de Beer-Lambert.

Un volume défini de sérum a été ajouté à un mélange contenant le réactif CPC et un tampon alcalin fourni dans un kit de dosage commercial. Après l'ajout des réactifs, les échantillons ont été incubés pendant quelques minutes à température ambiante afin de permettre la formation du complexe coloré. L'intensité de la coloration, proportionnelle à la concentration en calcium, a été ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 570 à 580 nm.

##### **✓ Dosage des ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>**

La détermination des concentrations sériques en sodium (Na<sup>+</sup>) et potassium (K<sup>+</sup>) a été effectuée à l'aide de la méthode par électrode ionique sélective (ISE), à l'aide de l'analyseur d'électrolytes AVL 9180®. Cette technique, largement utilisée en Biochimie Clinique, permet une mesure rapide, fiable et spécifique des principaux électrolytes sanguins.

La méthode repose sur le fonctionnement d'électrodes sélectives d'ions, chacune munie d'une membrane spécifique à un ion donné (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>). Ces membranes permettent le développement d'un potentiel électrique ou force électromotrice (f.e.m) généré par la différence d'activité ionique entre la solution analysée et une solution de référence interne contenant l'ion cible à une concentration constante. Ce potentiel est régi par l'équation de Nernst et varie proportionnellement à la concentration de l'ion dans l'échantillon.

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \times \ln \left( \frac{f \times C_t}{f \times C_i} \right) \quad (1)$$

Avec :

E = FEM de l'électrode

E<sub>0</sub> = FEM du standard

R = constante

T = température

n = charge de l'ion

F = constante de Faraday  
(96,496)

ln = logarithme naturel (base e)

f = coefficient d'activité C<sub>t</sub> =  
concentration de l'ion dans la  
solution test

C<sub>i</sub> = concentration de l'ion dans  
la solution interne

L'analyseur calcule alors la concentration ionique à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue par calibrage en un ou deux points avec des solutions standard de concentrations connues (Pioda *et al.*, 1969 ; Hartman *et al.*, 1978 ; Shono *et al.*, 1982).

L'analyse a été réalisée avec l'analyseur AVL 9180® équipé de réactifs et d'électrodes spécifiques pour chaque ion. Le réactif R28 contenu dans un flacon relié à l'électrode de référence, assure le maintien d'un potentiel stable nécessaire à la précision des mesures. Pour chaque détermination, un volume de 100 µL de sérum a été prélevé automatiquement par l'aiguille d'aspiration de l'appareil. L'échantillon a été ensuite mis en contact successivement avec les électrodes spécifiques à chaque ion (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>). Une fois la porte de l'analyseur refermée, les résultats ont été générés, affichés à l'écran imprimés automatiquement.

### II.2.5.2.2 Prélèvement des organes

À l'issue de la période de traitement, les animaux ont été euthanasiés selon un protocole respectant les standards éthiques. Les organes vitaux à savoir le foie, les reins et le cœur ont été soigneusement prélevés pour une analyse approfondie.

Chaque organe prélevé a été rincé à l'aide d'une solution saline isotonique (NaCl à 0,9 %) afin d'éliminer les résidus sanguins ou autres impuretés susceptibles de perturber les mesures. Une fois nettoyé, les organes ont été pesés à l'aide d'une balance analytique de haute précision afin de déterminer leurs poids bruts.

Le poids relatif de chaque organe a ensuite été calculé pour évaluer l'impact éventuel de la substance testée sur ces organes internes, selon la formule suivante (Etame *et al.*, 2017) :

$$P_r = \frac{P_0}{P_a} \times 100 \quad (2)$$

*P<sub>r</sub>* : Poids relatif de l'organe (g/100 g)

*P<sub>0</sub>* : Poids de l'organe (g)

*P<sub>a</sub>* : Poids corporel du rat (g)

*Débarrassés de l'excès de graisse, séchés avec du papier filtre et pesés, le foie, les reins et le cœur ont été conservés dans du formol à 10 %.*

#### II.2.5.2.2.1 Réalisation des coupes histologiques

Les coupes histologiques permettent l'observation au microscope des structures cellulaires et tissulaires d'un organe ou d'un tissu, dans le but de mettre en évidence d'éventuelles altérations morphologiques liées à un traitement, une pathologie ou une expérimentation. Ce procédé repose sur la fixation du tissu pour en préserver la structure, suivie de son inclusion dans un support rigide (paraffine), permettant la réalisation de coupes fines à l'aide d'un microtome. Ces coupes, généralement de 5 µm d'épaisseur, sont ensuite déposées sur des lames, colorées (hématoxyline-éosine) et analysées au microscope optique (John & Marilyn, 2019).

Les coupes histologiques ont été réalisées au Laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Treichville (Abidjan, Côte d'Ivoire) selon un protocole standardisé. Après sacrifice des animaux sous anesthésie, le foie, les reins et le cœur ont été rapidement prélevés puis rincés au sérum physiologique afin d'éliminer le sang et les débris tissulaires.

Les organes ainsi isolés ont été fixés par immersion dans une solution de formol neutre tamponné à 10 % pendant une durée d'une semaine, afin d'assurer une bonne conservation des

tissus et de prévenir l'autolyse. Les échantillons ont ensuite été déshydratés par passage successif dans trois bains d'éthanol de concentrations croissantes (70–75 %, 90–95 % et 100 %), chaque bain durant 30 minutes, dans le but d'éliminer l'eau contenue dans les tissus.

Après déshydratation, les fragments ont été soumis à une étape d'éclaircissement par immersion dans deux bains successifs de toluène, chacun d'une durée de 20 minutes, afin de remplacer l'alcool et de préparer les tissus à l'inclusion en paraffine. L'inclusion a été réalisée par imprégnation des échantillons dans deux bains de paraffine fondue à 60 °C pendant deux heures chacun, à l'aide de l'automate TISSUE-TEK® II, garantissant une infiltration homogène des tissus. L'inclusion définitive a été effectuée dans des moules métalliques pour obtenir des blocs de paraffine rigides, qui ont ensuite été sectionnés à l'aide d'un microtome afin d'obtenir des coupes histologiques fines de 5 µm d'épaisseur. Les coupes ont été déposées sur des lames de verre puis séchées à 37 °C pendant une heure.

La coloration des coupes a débuté par une déparaffinisation dans un bain de toluène, suivie d'une hydratation progressive dans une série décroissante de bains d'éthanol (100 %, 95 % et 70 %) et d'un rinçage à l'eau du robinet. Les coupes ont ensuite été colorées à l'hématoxyline pendant cinq minutes, rincées à l'eau, puis contre-colorées à l'éosine pendant trois minutes. Après coloration, une déshydratation finale a été réalisée par passage successif dans trois bains d'alcool (70 %, 95 % et 100 %).

Le montage a été effectué en appliquant des lamelles sur les lames préalablement imprégnées de toluène, à l'aide du baume d'Eukitt afin d'assurer une bonne adhésion. Après séchage, les coupes ont été observées au microscope optique équipé d'une caméra, en utilisant de l'huile d'immersion, et les images ont été enregistrées (Ouahchia et al., 2017). Les noyaux apparaissent colorés en bleu-violet, tandis que le cytoplasme et les structures extracellulaires prennent une coloration rose. La lecture microscopique a été réalisée dans le but de mettre en évidence d'éventuelles modifications histopathologiques telles que la nécrose, la vacuolisation, la congestion ou toute autre altération cellulaire.

## **II.2.6 Détermination de quelques propriétés biologiques**

### **II.2.6.1 Étude de l'effet antidiabétique de l'extrait de THE 4**

#### **II.2.6.1.1 Test de tolérance au glucose**

Le test de tolérance au glucose (OGTT) mesure la capacité de l'organisme à éliminer une charge de glucose administrée. Il est utilisé pour détecter les perturbations du métabolisme du

glucose, telles que l'intolérance au glucose ou la résistance à l'insuline, qui peuvent être liées à des conditions comme le diabète ou le syndrome métabolique (Bowe & Franklin, 2019).

Le test de tolérance au glucose (TTG) a été réalisé sur 15 rats albinos adultes, répartis en cinq groupes de trois animaux chacun. Tous les rats ont été soumis à un jeûne de 12 heures avant l'expérimentation. Le taux de glycémie à jeun a été mesuré et enregistré sous la désignation T-30 min. Immédiatement après cette mesure, les animaux de chaque lot ont reçu par voie orale les traitements suivants :

- Lot 1 : l'eau distillée ,
- Lot 2 : l'eau distillée, et 30 minutes après, 2 g/kg PC de glucose,
- Lots 3 et 4 : l'extrait aqueux du THE à la dose de 17 mg/kg pc et 85 mg/kg pc, puis 2 g/kg PC de glucose 30 minutes après ,
- Lot 5 : le glibenclamide (5 mg/kg pc), puis 2 g/kg pc de glucose 30 minutes après.

Le suivi de la glycémie a été réalisé aux temps T30, T60, T90, T120 et T150 minutes afin d'évaluer l'évolution de la réponse glycémique (Lawson-Evi & Eklun, 1997).

#### **II.2.6.1.2 Activité antihyperglycémiant de l'extrait de THE 4 formulé chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine**

Après une période d'adaptation de 7 jours, un diabète sucré a été induit expérimentalement chez 30 rats afin d'évaluer l'activité antidiabétique du THE 4 formulé. La méthode employée consiste en une injection unique et intrapéritonéale de Streptozotocine (STZ), un agent connu pour sa capacité à détruire sélectivement les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, entraînant une hyperglycémie persistante (Lenzen, 2008).

La STZ (Sigma-Aldrich, USA) a été fraîchement préparée dans une solution tampon citrate 0,1 M ajustée à un pH de 4,5. Après un jeûne de 12 heures, une dose de la solution préparée de 35 mg/Kg pc a été administrée aux rats pour optimiser l'efficacité de l'induction. Les groupes de rats non diabétiques, utilisés comme témoins, ont reçu le même volume de tampon citrate (0,1 M, pH 4,5) par voie intrapéritonéale.

Le test de l'activité antihyperglycémique vise à évaluer la capacité d'une substance (un extrait, un composé, un médicament) à abaisser ou à contrôler les niveaux élevés de glucose dans le sang (hyperglycémie). Ce test est généralement réalisé sur des rats rendus diabétiques ou hyperglycémiques (Lenzen, 2008).

✓ **Induction du diabète**

Soixante-douze heures après l'administration de la STZ, le diabète a été confirmé chez les rats expérimentaux. Des échantillons de sang ont été prélevés à partir de la veine caudale après une nuit de jeûne, et les taux de glucose plasmatique à jeun (Fasting Blood Glucose, FBG) ont été mesurés à l'aide d'un glucomètre (ACCU-CHEK, Roche Diagnostics, Allemagne).

Les rats présentant une glycémie à jeun comprise entre 1,2 et 2,5 g/L ont été classés comme hyperglycémiques modérés, tandis que ceux ayant une glycémie supérieure à 2,5 g/L ont été considérés comme diabétiques sévères (ADA, 2022).

L'étude d'une durée de 28 jours a été menée sur 30 rats répartis en 5 groupes homogènes selon leur poids corporel et leur taux de glycémie.

✓ **Administration des extraits végétaux et de la metformine**

-Lot 1: Rats témoins non diabétiques recevant 2 mL d'eau distillée,

-Lot 2: Rats diabétiques non traités recevant 2 mL d'eau distillée,

-Lot 3: Rats diabétiques traités avec l'extrait de THE 4 à une dose 17 mg/kg pc,

-Lot 4: Rats diabétiques traités avec l'extrait de THE 4 à une dose 85 mg/kg pc,

-Lot 5: Rats diabétiques recevant la metformine (200 mg/kg pc) ; un antidiabétique de référence.

Le jour où les rats sont devenus diabétiques puis répartis en groupes a été considéré comme J0. Les niveaux de glucose plasmatique ont été mesurés à jeun à des intervalles réguliers de 7 jours J0, J7, J14, J21 et J28 (Wu & Huan, 2008).

### **II.2.6.2 Activité immunostimulante**

Les RAW264.7 sont des cellules de souris de la lignée macrophagique murine, provenant de l'ATCC (TIB-71) cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10 % de Sérum Fœtal bovin (SFB) et 1 % de pénicilline/streptomycine.

#### **II.2.6.2.1 Mesure de la viabilité cellulaire et évaluation de la production de NO**

##### **II.2.6.2.1.1 Préparation des cellules**

Les cellules RAW 264.7 ont été décongelées puis cultivées dans du milieu DMEM complet à 37 °C sous une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Lorsque la culture a atteint environ 80 % de confluence, les cellules sont détachées à l'aide de trypsine. Pour cela, le milieu a été d'abord éliminé, puis les cellules ont été rincées avec 5 mL de PBS afin

d'éliminer les résidus de sérum pouvant inhiber la trypsine. Ensuite un volume 1 mL de solution de trypsine-EDTA à 0,25 % a été ajouté puis les boîtes ont été incubées pendant environ 2 minutes jusqu'à la dissociation des cellules. L'action de la trypsine est neutralisée par l'ajout de 10 mL de milieu complet, permettant de récupérer la suspension cellulaire.

La suspension a été homogénéisée, puis un aliquot a été prélevé pour réaliser un comptage des cellules au moyen d'un hémocytomètre (cellule de Neubauer) après dilution éventuelle dans le bleu trypan afin d'évaluer la viabilité cellulaire. Sur la base de ce comptage, la densité cellulaire a été ajustée en fonction des besoins du test de Griess (Ali-Azouaou, 2016).

Enfin, un volume approprié de suspension cellulaire (1 à 3 mL selon la densité souhaitée) a été ensemencé dans de nouvelles boîtes contenant 10 mL de milieu frais puis replacé en incubation dans les conditions standard.

#### **II.2.6.2.2 Traitement des cellules RAW par le THE4 et la LPS**

Les cellules murines RAW 264.7 ont été ensemencées dans des plaques de culture à 96 puits à une densité de  $5 \times 10^4$  cellules/puits, dans un volume de 100  $\mu$ L par puits. Après une incubation de 24 h à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO<sub>2</sub>, permettant leur adhésion, les cellules ont été exposées à différentes concentrations de l'extrait formulé THE4.

Pour ce faire, une solution mère du THE 4 a été préparée ensuite soumise à des dilutions sérielles au facteur 3 de manière à obtenir une gamme de concentrations comprises entre 400  $\mu$ g/mL et 1,64  $\mu$ g/mL. Un volume de 100  $\mu$ L de chaque dilution a ensuite été ajouté aux puits contenant déjà 100  $\mu$ L de suspension cellulaire ce qui a permis d'obtenir des concentrations finales allant de 200  $\mu$ g/mL à 0,823  $\mu$ g/mL (Novilla *et al.*, 2017). Parallèlement un contrôle négatif contenant les cellules non traitées et un contrôle positif contenant les cellules stimulées avec du lipopolysaccharide (LPS) à 1  $\mu$ g/mL ont été réalisés. Le lipopolysaccharide a été utilisé comme inducteur de la production de NO.

#### **II.2.6.2.3 Evaluation de la production de monoxyde d'azote (NO) par la méthode de Griess**

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule instable qui s'oxyde rapidement en nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) et en nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). La méthode de Griess largement utilisée en Biologie Cellulaire, permet la détection colorimétrique des nitrites, produits stables du NO. Pour une quantification complète, les nitrates peuvent être réduits préalablement en nitrites avant analyse (Reddy *et al.*, 2023).

Après 24 h de traitement des cellules RAW 264.7 avec l'extrait THE 4 ou le LPS, le surnageant des cultures a été soigneusement collecté puis transféré dans une plaque de 96 puits destinée à l'analyse. La quantification des nitrites, produits stables dérivés de l'oxyde nitrique (NO), a été réalisée à l'aide du kit Griess Reagent System (Promega®, USA) conformément aux instructions du fabricant.

Dans chaque puits, un volume équivalent de surnageant a été mélangé au réactif de Griess. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière, la réaction a conduit à la formation d'un complexe azoïque stable de couleur pourpre. L'intensité de la coloration a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

Les concentrations de nitrites ont été déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des solutions standards de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>). Une gamme de concentrations comprises entre 0 et 100 µM a été préparée par dilutions successives dans le même milieu de culture que celui utilisé pour les cellules, de manière à reproduire les conditions de la matrice expérimentale et à éviter toute interférence liée au solvant. Les standards ainsi obtenus ont été traités dans les mêmes conditions que les échantillons en mélangeant des volumes équivalents de solution de NaNO<sub>2</sub> avec le réactif de Griess suivis d'une incubation de 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière (Kim *et al.*, 2009). Les résultats ont été exprimés en µM et utilisés pour évaluer l'effet dose-dépendant de l'extrait THE4 sur la production de NO, en comparaison avec les contrôles négatif et positif.

Les données de concentration de nitrite ont été analysées pour évaluer l'effet de l'extrait végétal sur la production de NO à différentes concentrations à travers une courbe logarithmique par rapport aux contrôles négatif et positif.

## **II.2.7 Activité antiradicalaire**

Les tests de l'effet (Scavenger) d'un antioxydant sur le radical 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) et celui de l'ABTS « acide 2,2'-azino-bis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) » ont été utilisés pour cette étude.

### **II.2.7.1 Test de 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)**

Une solution mère de DPPH a été préparée en dissolvant 24 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. La solution ainsi obtenue a été homogénéisée puis son absorbance mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, afin de s'assurer qu'elle présente une valeur

d'environ  $0,98 \pm 0,021$ . Cette absorbance garantit une concentration adéquate et reproductible pour le test. Des solutions de l'échantillon testé (THE 4) ont été préparées à différentes concentrations variant de 3,125  $\mu\text{g/mL}$  à 100  $\mu\text{g/mL}$  par dilution avec du méthanol. Un volume de 1,68 mL de la solution de DPPH a été ajouté à 1,6 mL de la solution de l'échantillon. Le mélange a été agité vigoureusement afin de garantir une homogénéisation complète. Le contrôle (acide ascorbique) a été préparé comme précédemment, sans aucun échantillon. Les mélanges réactionnels ont été incubés à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante, afin de minimiser l'interférence de la lumière dans la réaction. Après incubation, l'absorbance des solutions a été mesurée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis (Tepe *et al.*, 2005).

Chaque concentration a été testée en triplicat afin de garantir la fiabilité et la reproductibilité des résultats. Le pourcentage de piégeage du radical DPPH a été calculé selon l'équation ci-dessous décrite par Torres (2006).

Les pourcentages d'inhibition ont été évalués à l'aide de la formule de la relation :

$$I \% = [(DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{échantillon}}) / DO_{\text{témoin}}] \times 100 \quad (3)$$

$DO_{\text{témoin}}$  : densité optique du témoin (Solution méthanolique de DPPH)

$DO_{\text{échantillon}}$  : densité optique de l'échantillon testé

➤ Calcul des concentrations inhibitrice  $CI_{50}$

La  $CI_{50}$  ou concentration inhibitrice 50 % (aussi appelée  $EC_{50}$  pour Efficient concentration 50), correspond à la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50 % des radicaux DPPH• présents en solution. Les  $CI_{50}$  ont été déterminées à partir de l'équation de la droite de régression linéaire obtenue en traçant les graphes les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'échantillon testé.

Plus la  $CI_{50}$  est faible plus l'activité antioxydante est forte.

### **II.2.7.2 Test de l'ABTS**

Cette évaluation a été réalisée selon le protocole décrit par Shui & Leong (2002). Pour cela une quantité de 38,40 mg d'ABTS a été dissoute dans 10 mL d'eau, puis 6,75 mg de persulfate de potassium y ont été ajoutés. Le mélange a été conservé à l'obscurité à température ambiante pendant 12 heures avant utilisation. Il a ensuite été dilué avec de l'éthanol pour obtenir une absorbance d'environ 0,7 à 734 nm. L'activité antiradicalaire a été mesurée en mélangeant 2 mL d'une solution éthanolique de l'extrait du THE 4 avec 2 mL de la solution d'ABTS+•.

Les extraits ont été testés à des concentrations allant de 3,125 à 200 µg/mL. L'acide gallique a été utilisé comme antioxydant de référence puis testé aux mêmes concentrations que l'extrait du THE 4. L'absorbance a été enregistrée après 2 minutes d'incubation à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis réglé à 734 nm, en utilisant de l'éthanol comme blanc. Pour chaque concentration testée, trois lectures indépendantes ont été réalisées (n = 3) afin d'assurer la reproductibilité et la fiabilité des résultats.

Dans ce test, l'expression des résultats s'est faite comme précédemment (test de DPPH), c'est-à-dire le calcul des pourcentages d'inhibition et la détermination des concentrations inhibitrice à 50% (EC<sub>50</sub>).

## **II.2.8 Caractérisation phytochimique**

### **II.2.8.1- Screening phytochimique**

Le screening phytochimique permet d'avoir une idée générale sur les différentes familles de métabolites secondaires présentes dans les extraits de plantes sans toutefois renseigner sur la structure d'une molécule bien déterminée. Ainsi, à partir de l'extrait aqueux sec du THE 4 les groupes chimiques tels que les alcaloïdes, les polyphénols totaux, les flavonoïdes, les quinones, les tanins, les mucilages, les saponosides et les polyterpènes ont été recherchés grâce aux méthodes décrites par Trease & Evans (2002).

#### **II.2.8.1.1 Recherche des alcaloïdes**

La mise en évidence des alcaloïdes a été réalisée à l'aide des méthodes classiques de précipitation utilisant les réactifs de Dragendorff et de Valser-Mayer, conformément aux protocoles de référence. Ces techniques reposent sur la capacité des alcaloïdes à former des sels insolubles en présence de certains métaux lourds, ce qui permet leur détection visuelle sous forme de précipités caractéristiques.

Un échantillon de 6 mL de solution aqueuse obtenu à partir de l'extrait sec de THE 4 a été filtré puis évaporé à sec dans une capsule en porcelaine au bain de sable. Le résidu sec a été repris dans 6 mL d'éthanol (60 °). La solution ainsi obtenue a été répartie dans deux tubes à essai (A et B). Dans le tube A, deux gouttes du réactif de Dragendorff ont été ajoutées, tandis que dans le tube B, deux gouttes du réactif de Bouchardat ont été introduites. L'apparition d'une coloration brun-rougeâtre ou la formation d'un précipité blanc laiteux a indiqué une réaction positive.

#### **II.2.8.1.2 Recherche des Polyphénols.**

A 2 mL d'extrait aqueux obtenue à partir de l'extrait sec du TH4 a été ajoutée une goutte d'une solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 %.

#### **II.2.8.1.3 Recherche des tanins**

La détection des tanins catéchiques a été réalisée selon la méthode de Stiasny, reposant sur la réaction au formol en milieu acide. À cet effet, un volume de 5 mL de solution aqueuse préparée à partir de l'extrait sec du THE 4 a été évaporé à sec dans une capsule en porcelaine placée au bain de sable. Le résidu obtenu a ensuite été traité avec 15 mL du réactif de Stiasny (mélange de formol et d'acide chlorhydrique). Le mélange a été chauffé au bain-marie à 80 °C pendant 30 minutes. L'apparition après refroidissement de flocons volumineux a traduit une réaction positive et a indiqué la présence de tanins de type catéchique.

Pour la caractérisation des tanins galliques, La solution obtenue après le test des tanins catéchiques a été filtrée puis saturée avec de l'acétate de sodium. À cette solution, trois gouttes de perchlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) à 2 % ont été ajoutées. L'apparition d'une coloration bleu-noir a confirmé la présence de tanins galliques (Trease & Evans, 2002 ; Hagerman, 2002).

#### **II.2.8.1.4 Recherche des flavonoïdes**

Un volume de 2 mL de l'extrait aqueux obtenu à partir du THE 4 a été évaporé à sec au bain de sable puis repris après refroidissement dans 5 mL d'alcool chlorhydrique à demi dilution (1:2). La solution a été transférée dans un tube à essai. L'ajout de copeaux de magnésium a provoqué un dégagement de chaleur suivi de l'apparition d'une coloration rose-orangée ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique a permis de permettre d'intensifier cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes.

#### **II.2.8.1.5 Recherche des saponosides.**

Un volume de 2 mL d'extrait de THE 4 a été repris dans 20 mL d'eau bouillante puis le mélange a été refroidi ensuite filtré. Ensuite, un volume de 10 mL du filtrat a été versé dans un tube à essai, agité verticalement pendant 15 secondes puis laissé au repos durant 15 minutes. La hauteur de la mousse formée a été mesurée pour confirmer la présence de saponosides.

#### **II.2.8.1.6 Recherche des quinones**

Dans une capsule en porcelaine, un volume de 2 mL d'extrait du THE a été évaporé à sec au bain de sable. Le résidu obtenu a été ensuite soigneusement trituré avec 5 mL d'acide chlorhydrique dilué au 1/5 puis le mélange a été porté au bain-Marie à ébullition douce pendant 30 minutes. Après refroidissement, le contenu a été transféré dans un tube à essai contenant 20 mL de chloroforme. La phase organique (chloroformique) ainsi obtenue a été ensuite saturée par addition de 0,5 mL d'ammoniaque diluée à moitié. L'apparition d'une coloration rouge cerise a indiqué la présence de quinones (Békro *et al.*, 2007).

#### **II.2.8.1.7 Recherche des stérols et polyterpènes**

La détection des stérols et terpènes repose sur la réaction de Liebermann-Burchard

L'échantillon de 5 mL d'extrait aqueux de THE a été évaporé à sec dans une capsule en porcelaine au bain de sable. Le résidu obtenu a ensuite été dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique. Le mélange a été transféré dans un tube à essai puis 0,5 mL d'acide sulfurique concentré a été ajouté délicatement le long de la paroi du tube. L'apparition progressive d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, a permis de confirmer la présence de stérols et de polyterpènes.

#### **II.2.8.1.8 Recherche des mucilages**

Pour la détection des mucilages, deux tests complémentaires ont été réalisés. Au niveau du premier test, un volume de 1 mL de l'extrait THE formulé a été introduit dans un tube à essai, puis complété avec 5 mL d'alcool absolu. Après agitation douce, la formation d'un précipité floconneux a été observée. Ce phénomène a indiqué la présence de mucilages, ceux-ci précipitant en milieu fortement alcoolisé (Trease & Evans, 2002 ; N'guessan *et al.*, 2009).

Dans un second test, un volume de 1 mL d'extrait de THE a été dilué dans 9 mL d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) puis au mélange obtenu, il a été additionné 5 mL d'éthanol. L'apparition de flocons blancs a été interprétée comme un résultat positif, confirmant la présence de substances mucilagineuses dans l'échantillon.

## II.2.8.2 Etude quantitative des quelques métabolites secondaires

### II.2.8.2.1 Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Un volume de 100 µL de l'extrait de THE 4 a été introduit dans une fiole de 25 mL puis 1 mL de réactif de Folin-ciocalteu (dilué à 1/10) y a été additionné. Après 2 min, un volume de 2 mL de bicarbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 20 % (m/v) y a été ajouté. La solution ainsi obtenue a été maintenue à l'obscurité pendant 30 minutes à la température ambiante. Ensuite, la lecture de l'absorbance de chaque solution a été faite au spectromètre UV-visible à 760 nm contre le témoin où l'échantillon a été remplacé par de l'eau bidistillée. La calibration est effectuée avec un extrait d'acide gallique à différentes concentrations (0 à 0,5 g/L). Les lectures ont été répétées trois fois. La concentration en polyphénols est déterminée par interpolation à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec une solution standard d'acide gallique et les résultats sont exprimés en mg équivalents acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).

### II.2.8.2.2 Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux

Dans une fiole jaugée de 25 mL, un volume de 2,5 mL de l'extrait THE 4 a été mélangé à 0,75 mL de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 5 % (m/v). Après homogénéisation, 0,75 mL de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 10 % (m/v) ont été ajoutés, puis le mélange a été incubé pendant 6 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. À l'issue de cette incubation, 5 mL de soude (NaOH, 1N) ainsi que de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge (25 mL) ont été ajoutés. Le mélange obtenu a été agité manuellement puis soumis à une lecture spectrophotométrique à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Les analyses ont été réalisées en triplicat (n = 3) afin d'assurer la fiabilité des données. La teneur en flavonoïdes totaux a été exprimée en microgrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait (µg EQ/g d'extrait), à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine (µg Eq Q/g) selon la formule décrite par Miliauskas *et al.* (2004).

$$C = \frac{C_1 \times V}{m} \quad (4)$$

*C* : mg équivalent quercétine dans 1g d'extrait sec du THE,

*C*<sub>1</sub> : Concentration de l'échantillon lue sur la courbe d'étalonnage (mg/L),

*V* : volume d'extrait utilisé pour le dosage

*m* : masse de l'échantillon (g).

### **II.2.8.2.3 Dosage des tanins condensés**

Pour ce faire, un volume de 200  $\mu$ L de l'extrait de THE 4 à analyser a été mélangé à 1000  $\mu$ L de réactif de vanilline. Après agitation, le mélange a été incubé à l'obscurité à 30 °C pendant 20 minutes. L'absorbance a ensuite été mesurée à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis en utilisant un blanc constitué de volumes égaux de méthanol à 37 % et d'HCl à 8 %. La quantification des tanins condensés a été réalisée par extrapolation sur une courbe d'étalonnage établie avec la catéchine, dans une gamme de concentrations allant de 0 mg/mL à 0,3 mg/mL. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS) conformément à la formule décrite par Miliauskas *et al.* (2004).

### **II.9 Analyses statistiques**

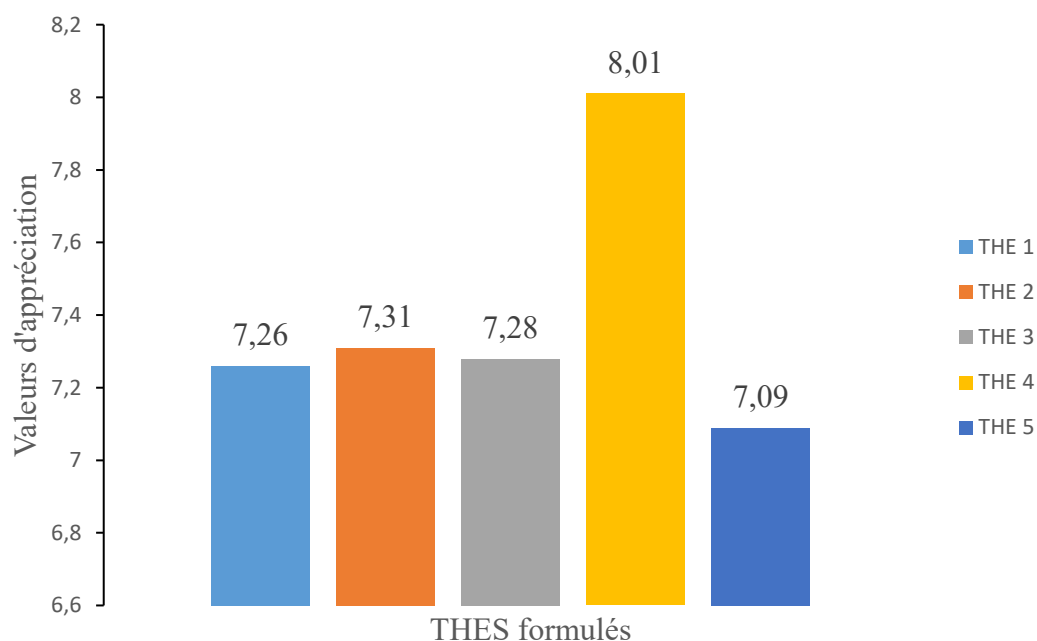
Le logiciel GraphPad.Prism version 8.0.2 et Excel® a été utilisé pour le traitement des données. La moyenne et l'écart-type ont été calculés pour chaque paramètre évalué. Les données ont été analysées avec ANOVA un facteur. La comparaison des moyennes des différents paramètres des lots traités avec le lot témoin a été effectuée par le test de Tukey's. La différence entre les valeurs d'un paramètre dont la *p value* < 0,05 a été estimée statistiquement significative.

**TROISIEME PARTIE :**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

### III.1 Résultats

#### III.1.1 Acceptabilité des formulations

Les données relatives au test hédonique sont présentées dans la Figure 17. Les différentes formulations ont été appréciées par le panel des dégustateurs avec une valeur d'appréciation à 7. Cependant, la formulation THE 4 a enregistré la plus grande valeur d'appréciation (8,01) tandis que la formulation THE 5 a obtenu la valeur d'appréciation la plus basse (7,09).



**Figure 17 :** Histogrammes des valeurs d'appréciation des différents THES

*Les valeurs d'appréciation des différentes formulations ont été comprises entre 7,09 et 8,01. La formulation THE 4 a la plus grande valeur d'appréciation tandis que la formulation THE 5 a la plus faible valeur d'appréciation. Les autres formulations (THE 1, THE 2, THE 3) ont des valeurs d'appréciation intermédiaires entre les deux extrêmes.*

#### III.1.2 Innocuité

##### III.1.2.1 Toxicité aiguë

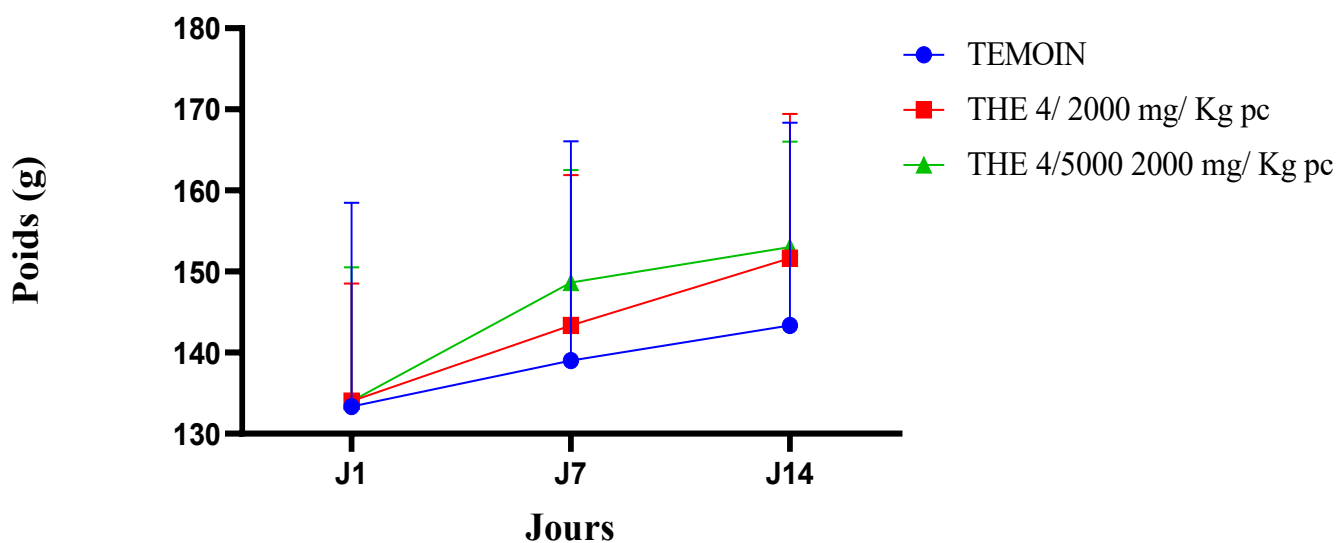
###### III.1.2.1.1 Signes cliniques d'intolérance

L'étude de la toxicité aiguë par voie orale n'a montré aucune mortalité après l'administration des doses de 2000 mg/Kg et 5000 mg/Kg de poids corporel (pc) du THE 4 à l'issu des 14 jours d'observation. Aussi, les signes tels que la somnolence, les contorsions, la

diarrhée, l'excitation, le refus de s'alimenter et le redressement des poils n'ont pas été observés chez les animaux traités aux différentes concentrations de l'extrait sec.

### III.1.2.1.2. Tendence du poids corporel des animaux lors du test de toxicité aiguë

Pendant toute la période de l'expérimentation, le poids des animaux a globalement augmenté au cours du temps. Cette augmentation est passée d'environ 132 g à 150 g chez les rats traités et à 142 g pour les rats témoins au 14<sup>ème</sup> jour d'expérimentation (Figure 18).



**Figure 18 :** Tendence du poids des rats après administration du THE 4

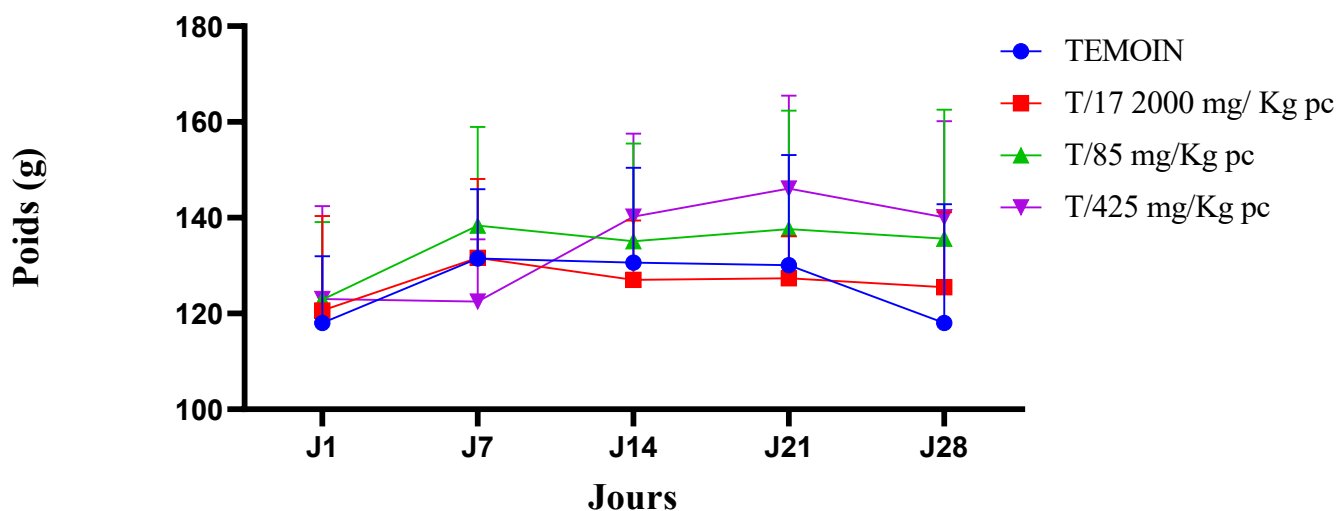
*Comparativement au témoin, le poids des rats traités avec le THE 4 aux différentes doses a augmenté légèrement durant la période de l'expérimentation (14 jours). Toutefois, ces différences de poids ne sont pas statistiquement significatives.*

### III.1.2.2 Toxicité subaiguë

Pendant les 28 jours d'expérimentation, aucun signe clinique d'intolérance et aucune mortalité n'ont été enregistrés.

#### III.1.2.2.1 Tendence du poids corporel des animaux lors du test de toxicité subaiguë

Tous les groupes des rats ont montré une tendance globale à la stabilisation ou à la légère augmentation du poids corporel entre J1 et J28 (Figure 19).



**Figure 19 :** Tendence du poids des rats après administration du THE 4

*Les rats témoins présentent une augmentation modérée du poids jusqu'à J21 puis légère baisse à J28. Les rats traités à la dose T/17 ont un poids quasiment stable, ceux traités à la dose T/85 ont eu leur poids augmenté entre J1 et J7 puis leur poids est devenu constant. Enfin, le poids des rats traités à la dose T/425 a augmenté modérément jusqu'à J21, puis une légère baisse a été observée à J28 mais le poids reste toujours plus élevé que celui des rats témoins.*

#### III.1.2.2.2. Profil des paramètres hématologiques

L'analyse hématologique réalisée sur les rats expérimentaux avec différentes doses de thé 4 a révélé une augmentation des globules blancs dans les groupes traités par rapport au groupe témoin. Cependant, les autres paramètres tels que l'hémoglobine, les plaquettes, l'hématocrite et le VGM n'ont pas montré de variations significatives. Les données sont consignées dans le Tableau I.

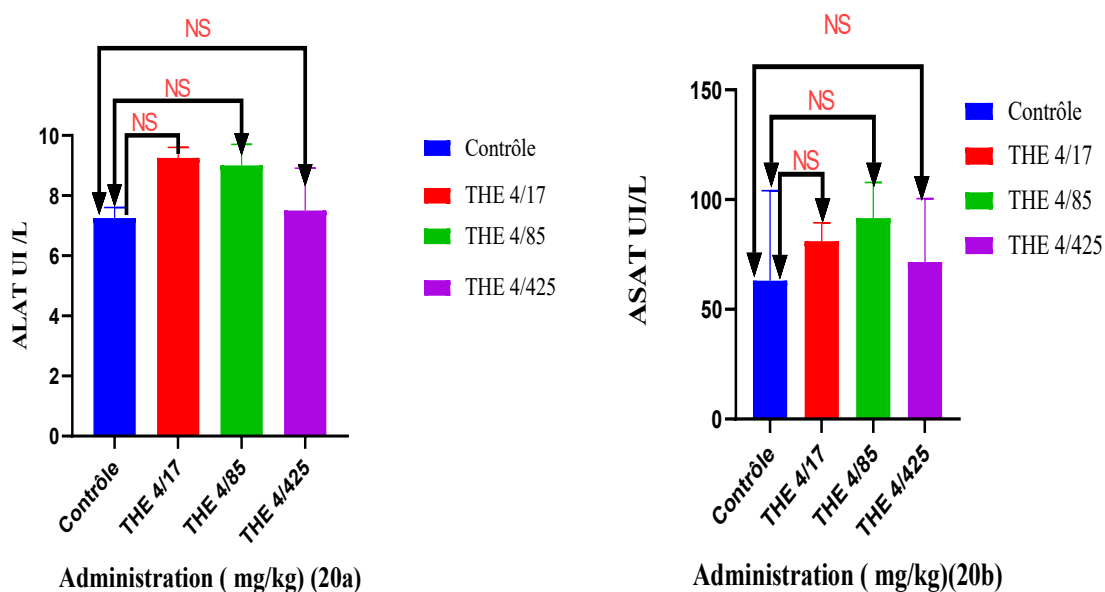
**Tableau I:** Paramètres hématologiques

Paramètres hématologiques	Lot 1(contrôle)	Lot 2 (17 mg/Kg)	Lot 3 (85 mg/Kg)	Lot 4 (425 mg/Kg)
Globules blancs	10,60 ± 0,90	14,40 ± 0,50*	19,30 ± 0,40*	15,45 ± 0,45*
Globules rouge	7,29 ± 0,87	7,72 ± 0,73	5,59 ± 0,49	6,66 ± 0,33
Hématocrite	41,10 ± 6,20	41,70 ± 1,10	37,90 ± 2,20	40,40 ± 1,70
Hémoglobine	12,55 ± 1,45	13,30 ± 0,30	12,65 ± 1,35	13,00 ± 1,30
TCMH	17,25 ± 0,05	17,45 ± 2,05	18,65 ± 1,15	19,50 ± 1,00
CCMH	30,70 ± 1,10	31,90 ± 0,60	36,25 ± 3,75	34,25 ± 2,35
Plaquette sanguine	456,0 ± 116,0	409,0 ± 18	405,5 ± 51,50	497,5 ± 90,50
VGM	56,20 ± 1,80	54,50 ± 5,30	64,95 ± 7,85	56,95 ± 1,05

Les valeurs désignent les concentrations moyennes plasmatiques des paramètres hématologiques ± Ecart type. Les valeurs statistiquement différentes du témoin sont marqués par une étoile (\*).

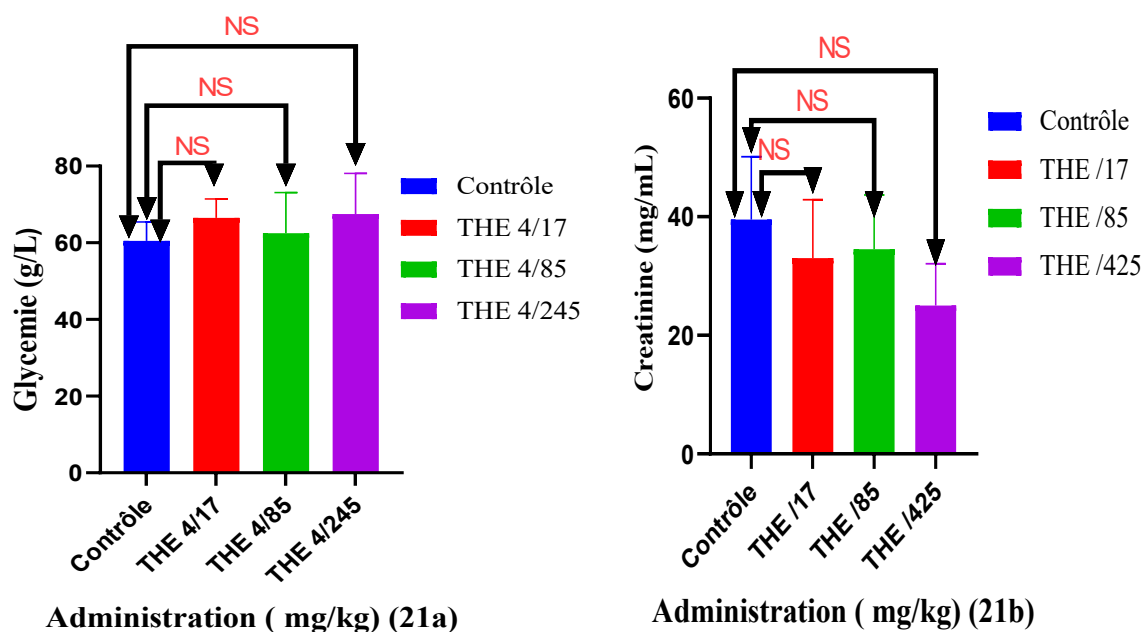
### III.1.2.2.3 Profil des paramètres biochimiques

Pendant les 28 jours d'expérimentation, les concentrations plasmatiques des paramètres biochimiques tels que la glycémie, la créatinémie, l'ASAT et l'ALAT ont varié mais les différentes variations n'étaient pas statistiquement différentes des valeurs des rats témoins (Figures 20, 21 22).



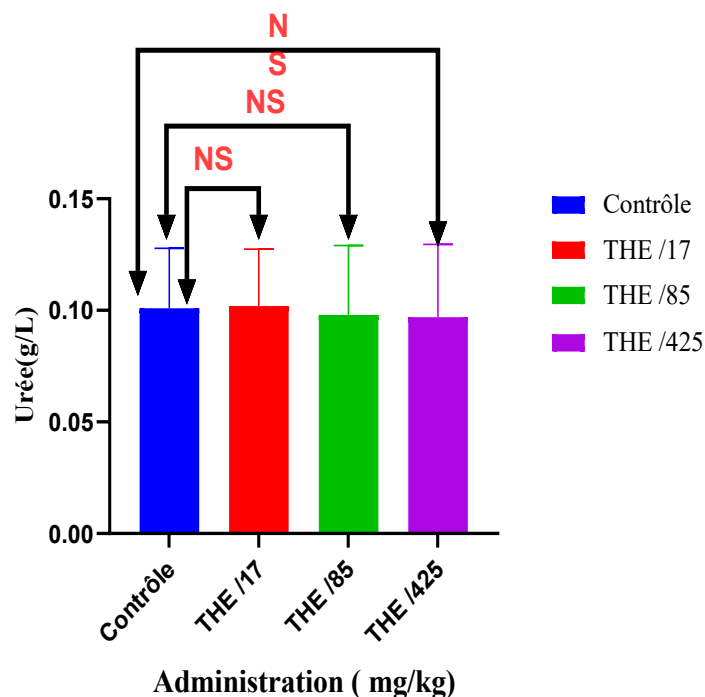
**Figure 20 :** Histogrammes de la concentration en ALAT (20a) et ASAT (20b) après administration de THE 4

Comparativement au lot contrôle, les concentrations de ALAT et ASAT ont connu une augmentation aux doses de THE 4/17 et THE 4/85 mais les variations observées ne sont pas statistiquement différentes du contrôle. A la dose THE 4/425, les concentrations de ces paramètres sont resté stables.



**Figure 21:** Histogrammes de la glycémie (21a) et de la créatinine (21b) après administration de THE 4

Comparativement au lot contrôle, la concentration de glucose chez les différents lots de rats n'a pas significativement augmenté. Par contre, les concentrations de la créatinine ont diminué. Toutefois ces baisses ne sont pas significativement différentes de la concentration des rats du lot contrôle.

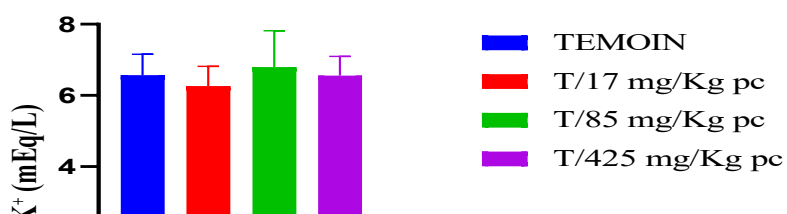
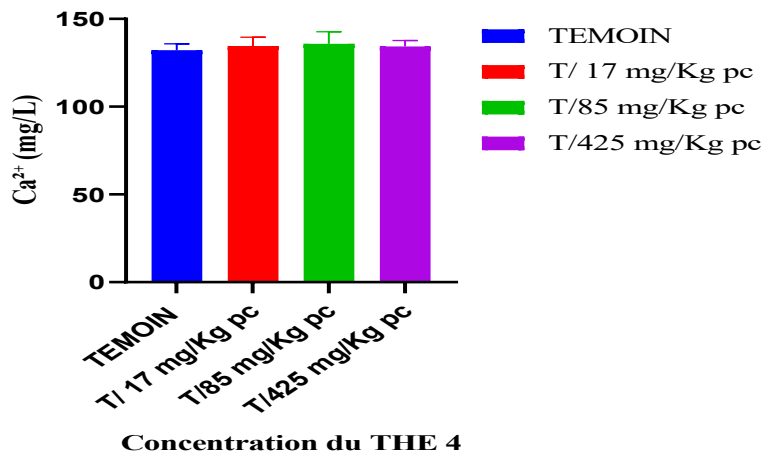
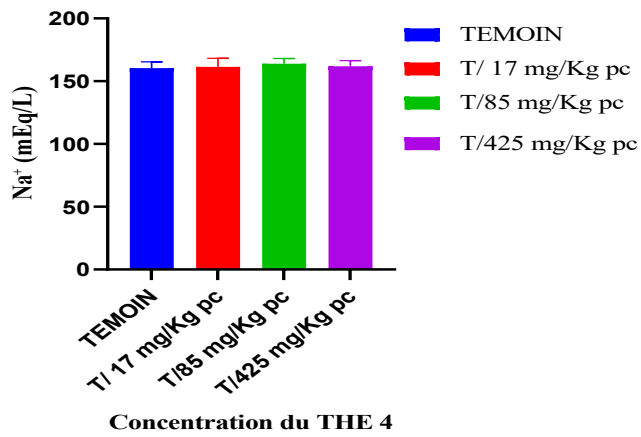


**Figure 22 :** Histogrammes de l'Urée après administration de THE 4

*Comparativement au lot contrôle, la concentration de l'urée chez les différents lots de rats n'a pas significativement varié. Les concentrations de ce paramètre sont presque stables.*

### III.1.2.2.3 Concentrations des minéraux ( $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ) mesurées dans les différents groupes expérimentaux

Une légère élévation non significative du taux de calcium plasmatique a été observée chez les animaux traités, avec des valeurs comprises entre  $134,28 \pm 2,37$  et  $135,86 \pm 4,57$  mg/L, comparativement à  $132,24 \pm 2,49$  mg/L dans le groupe témoin. De même, les concentrations en sodium ont présenté une faible augmentation en fonction de la dose, atteignant un maximum de  $163,88 \pm 3,24$  mEq/L dans le groupe recevant 85 mg/Kg, contre  $160,45 \pm 3,60$  mEq/L chez les témoins. En ce qui concerne le potassium plasmatique, les taux sont restés globalement stables, variant de manière non significative entre  $6,26 \pm 0,38$  et  $6,80 \pm 0,73$  mEq/L, des valeurs proches de celle observée dans le groupe témoin ( $6,57 \pm 0,44$  mEq/L) (Figure 23).



**Figure 23 :** Teneurs en ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  dans les sérums des différents groupes des rats témoins et traités

*a-Variance de concentration en  $\text{Na}^+$*

*b- Variance de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$*

*c- Variance de la concentration en  $\text{K}^+$*

#### III.1.2.2.4 Effet du THE 4 sur le poids relatif des organes foie, reins et cœur des rats

Les résultats présentés dans le Tableau II ont montré que les poids relatifs des organes examinés chez les rats traités n'ont pas diffèrent pas significativement de ceux du groupe témoin ( $p > 0,05$ ). Pour le foie, les valeurs observées ont varié de  $1,157 \pm 0,031$  % à  $1,243 \pm 0,009$  %, contre  $1,283 \pm 0,049$  % chez les témoins. Les reins ont présenté des poids relatifs compris entre  $0,183 \pm 0,008$  % et  $0,186 \pm 0,008$  % comparés à  $0,203 \pm 0,006$  % chez les témoins. Enfin, pour le cœur, les poids relatifs ont été de  $0,083 \pm 0,003$  % à  $0,097 \pm 0,003$  % chez les rats traités contre  $0,093 \pm 0,024$  % dans le groupe témoin.

**Tableau II :** Influence du THE 4 sur poids relatifs des organes vitaux

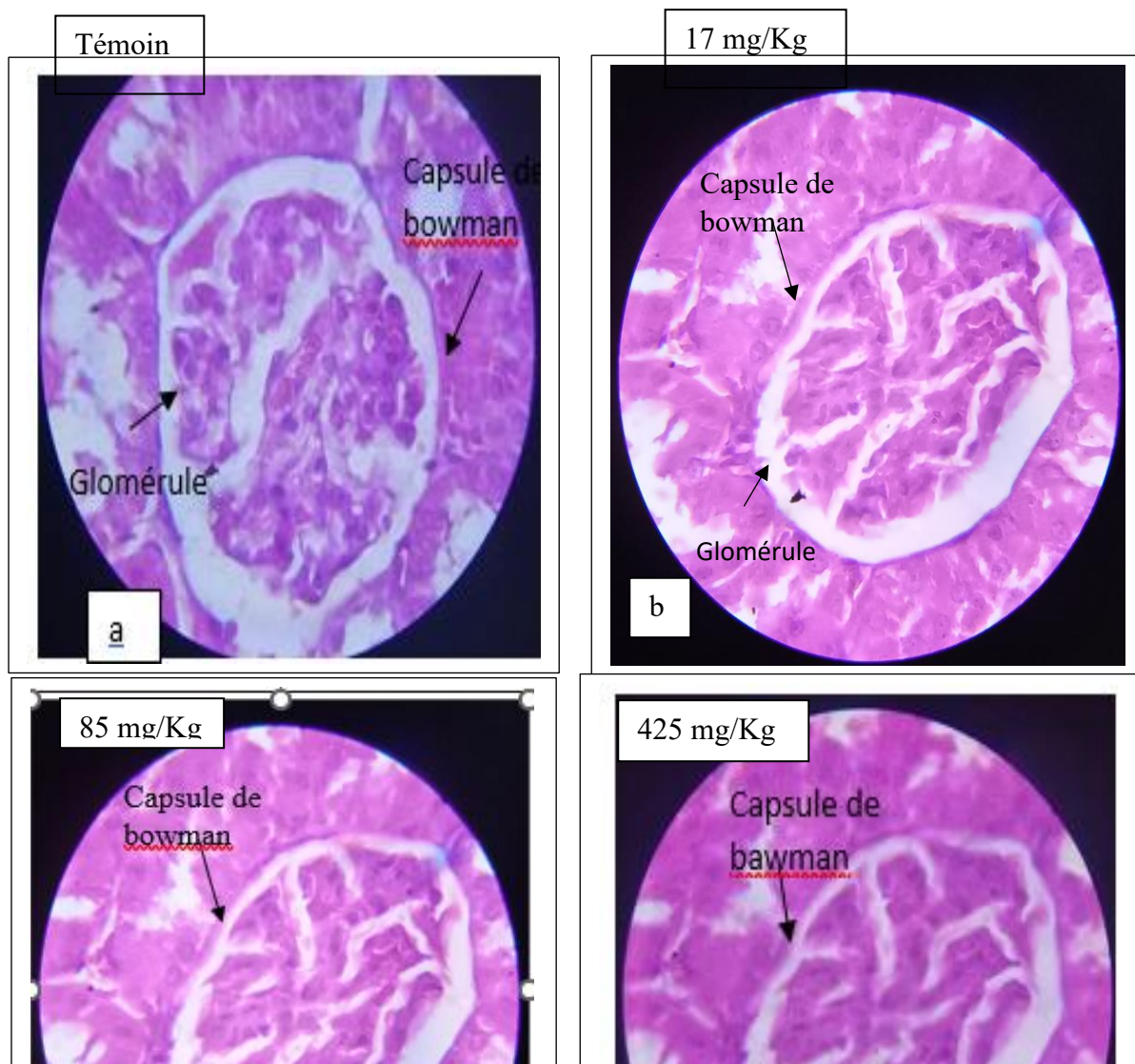
	Témoin	Lot 1 17 mg/Kg pc	Lot 2 85 mg/Kg pc	Lot 3 425 mg/Kg pc
Foie	$1,283 \pm 0,049$	$1,157 \pm 0,031$	$1,133 \pm 0,064$	$1,243 \pm 0,009$
Reins	$0,203 \pm 0,006$	$0,183 \pm 0,008$	$0,186 \pm 0,008$	$0,186 \pm 0,003$
Cœur	$0,093 \pm 0,024$	$0,083 \pm 0,003$	$0,097 \pm 0,003$	$0,087 \pm 0,008$

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type standrad. Les valeurs moyennes des poids relatifs du foie, des reins et du cœur des rats des lots expérimentaux ne sont pas significativement ( $p > 0,05$ ) différentes de ceux des rats des lots témoins

### III.1.2.2.5 Analyses histologiques

Les photomicrographies des coupes histologiques des reins, du foie et du cœur sont illustrées par les Figures 24, 25 et 26. Ces images issues de la coloration hématoxyline/éosine ont montré une structure tissulaire des organes ci-dessus cités chez les rats témoins et les rats traités au THE 4 à 17 mg/Kg pc ; 85 mg/Kg pc et 425 mg/Kg poids corporel.

La coupe histologique des reins de rats traités avec le THE 4 a révèle une architecture tissulaire rénale normale, préservant les structures caractéristiques du parenchyme rénal. Le cortex a montré de nombreux glomérules rénaux bien définis, sans signes d'hypertrophie, d'hypercellularité ni de sclérose. Les lumières tubulaires ont été bien visibles et non dilatées. Dans la médulla, les tubules droits et les anses de Henle ont été clairement organisés et n'ont présenté ni vacuolisation ni dégénérescence. Aucun signe de nécrose, de fibrose interstitielle, de congestion vasculaire, ni d'infiltrat leucocytaire n'a été observé (Figure 24 a, b, c et d).



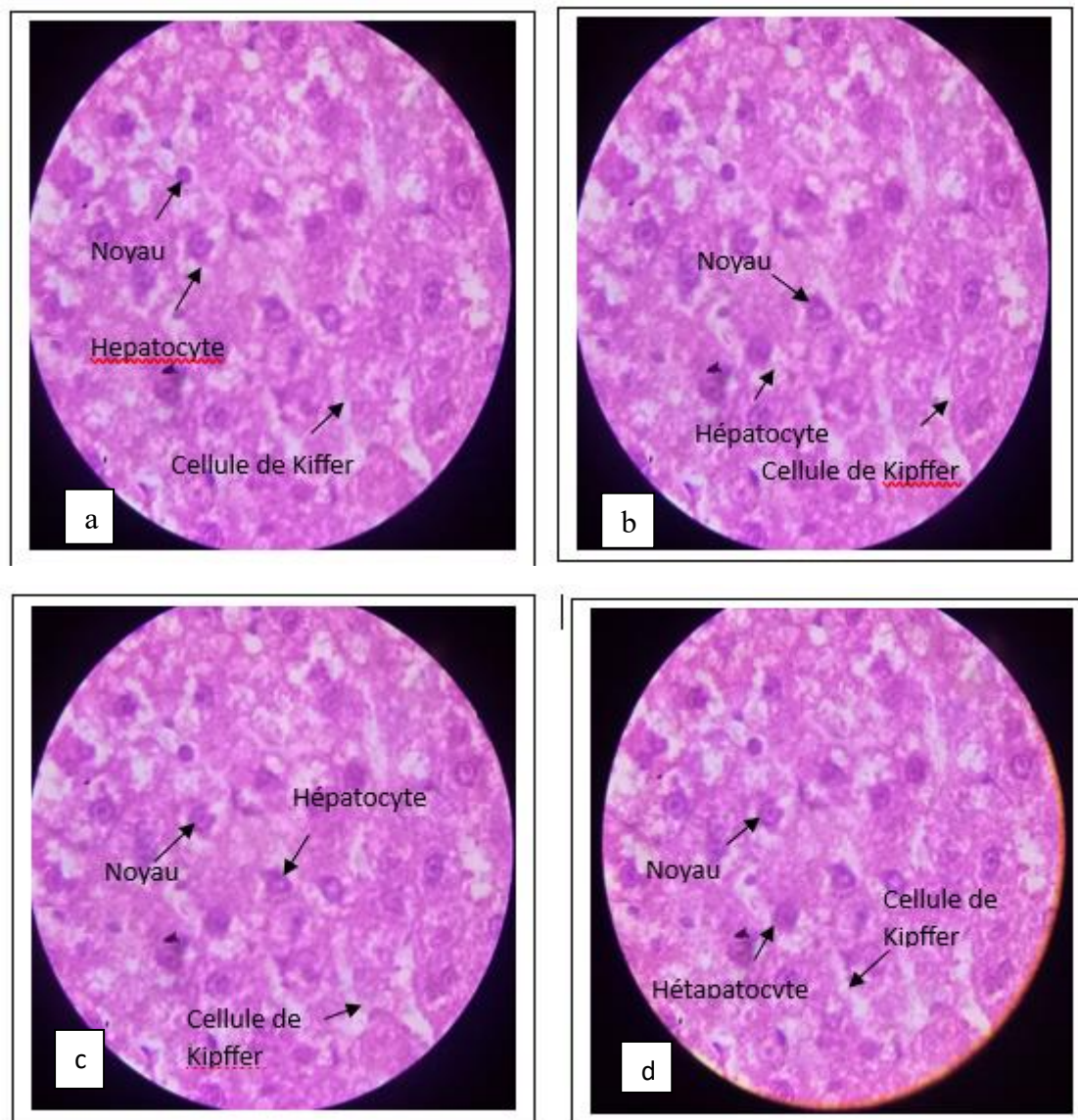
c

d

**Figure 24 :** Photos des coupes histologiques du rein

*Les sections histologiques ont été visualisées par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H et E) puis observées au microscope optique (EDKKLETM) à un grossissement de 40×. (a ) rats témoins, (b) rats traités avec THE 4 (17 mg/Kg), (c) rats traités avec THE 4 à 85 mg/Kg pc et (d) rats traités avec THE 4 à 425 mg/Kg pc.*

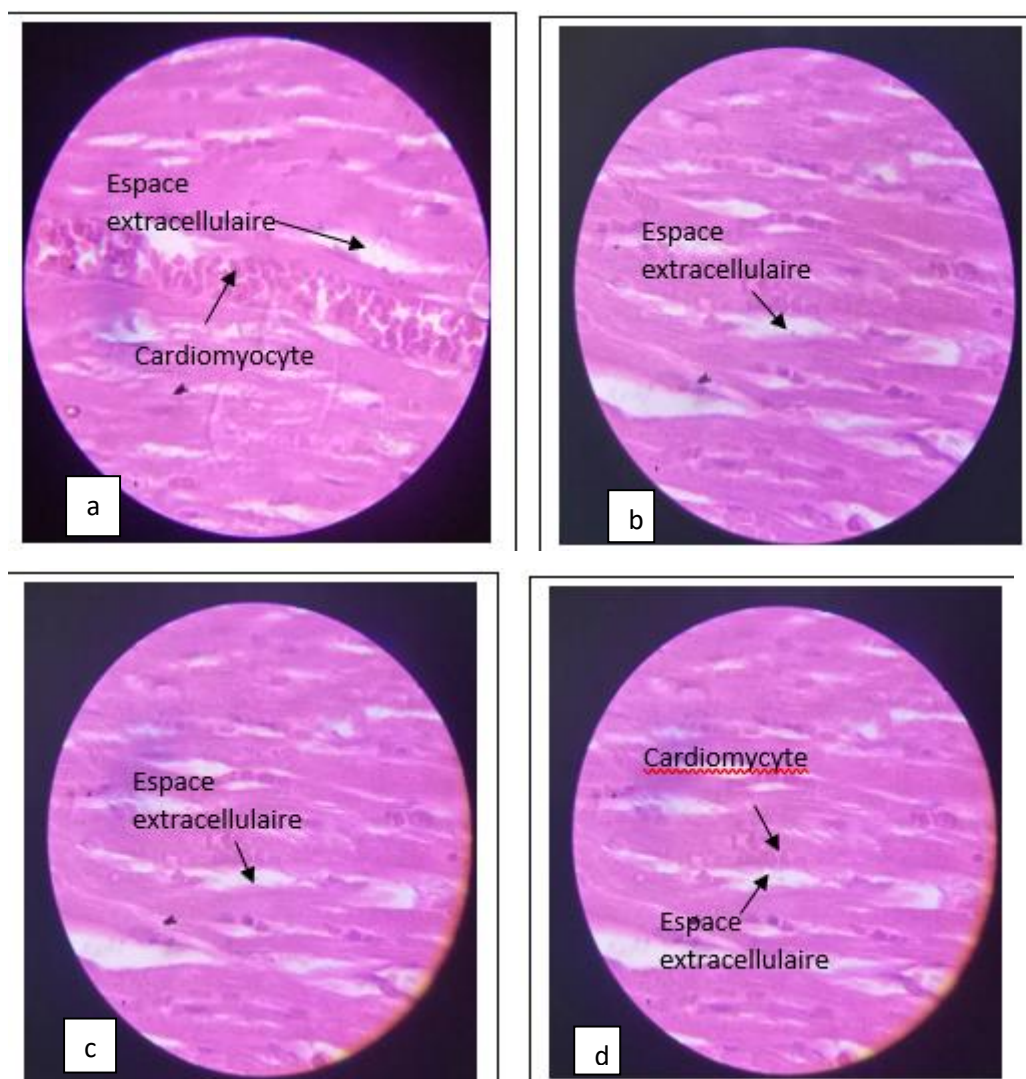
L'analyse histologique du foie des rats traités avec le THE 4 a révélé une architecture hépatique préservée, conforme à celle observée chez les témoins sains. Le parenchyme hépatique montre des hépatocytes polygonaux bien organisés. Les noyaux des hépatocytes ont été ronds, centraux, et des nucléoles parfois visibles, indiquant une activité cellulaire normale. Aucun signe de dégénérescence cellulaire, de nécrose, d'infiltration inflammatoire, ni de stéatose hépatique n'a été observé. L'absence de vacuolisation cytoplasmique, d'apoptose ou de modifications vasculaires a suggéré une bonne tolérance hépatique à l'extrait administré. Ces observations ont traduit une intégrité histologique hépatique conservée, indiquant l'innocuité hépatique de l'extrait aux doses administrées (Figure 25 a, b, c et d).



**Figure 25:** Photos des coupes histologiques du foie

Les sections histologiques ont été visualisées par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H et E) puis observées au microscope optique (EDKKLE™) à un grossissement de 40×. (a) rats témoins, (b) rats traités avec THE 4 (17 mg/Kg), (c) rats traités avec THE 4 à 85 mg/Kg pc et (d) rats traités avec THE 4 à 425 mg/Kg pc.

La coupe histologique du myocarde de rat traité avec le THE à 425 mg/Kg pc a montré une architecture tissulaire globalement préservée identique à celle du témoin. Les fibres myocardiques ont conservé leur organisation striée, avec des noyaux centraux bien visibles. Aucun signe évident de nécrose, d'inflammation ou d'altération vasculaire n'a été observé à ce grossissement (figure 26 a,b,c et d).



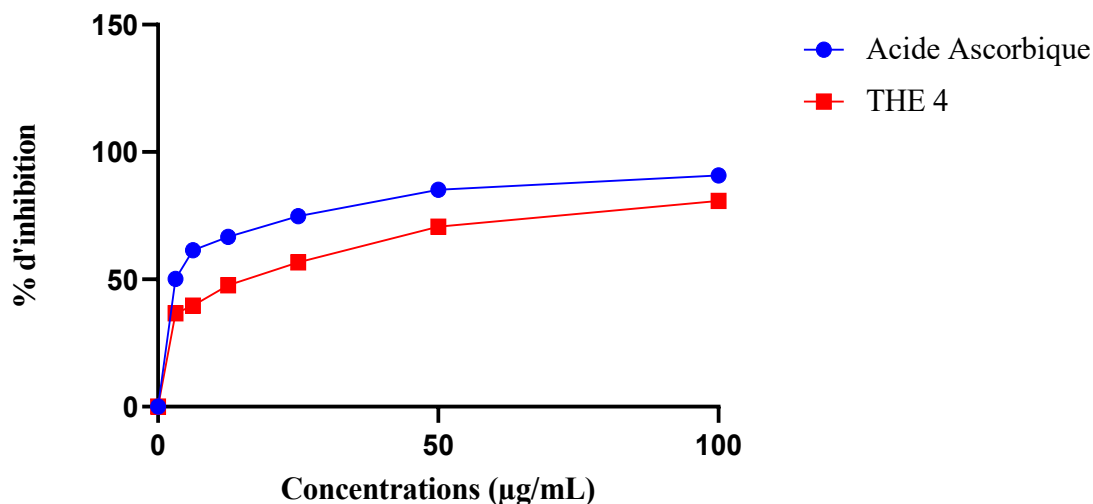
**Figure 26 :** Photos coupes histologiques du cœur

Les sections histologiques ont été visualisées par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H et E) puis observées au microscope optique (EDKKLE™) à un grossissement de 40×. (a) rats témoins, (b) rats traités avec THE 4 (17 mg/Kg), (c) rats traités avec THE 4 à 85 mg/Kg pc et (d) rats traités avec THE 4 à 425 mg/Kg pc.

### III.1.3 Potentiel antiradicalaire

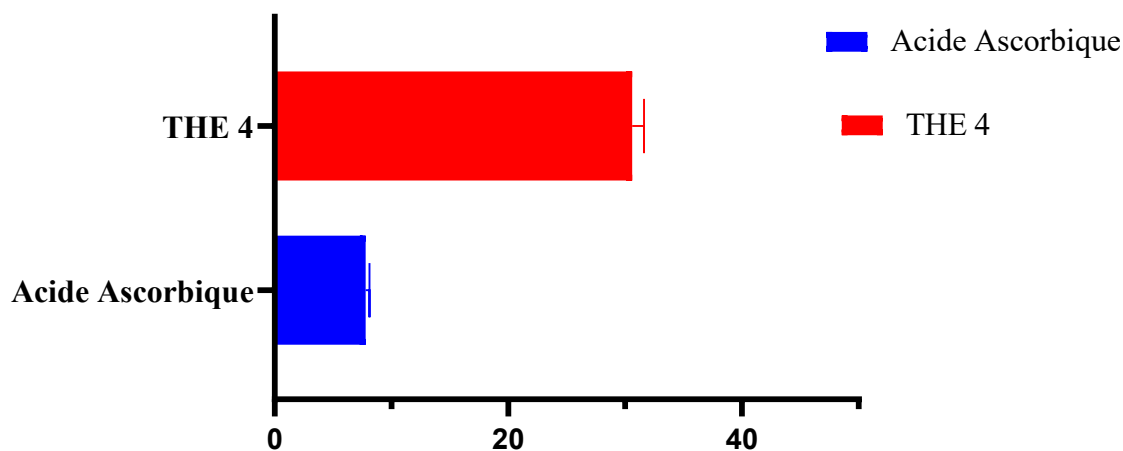
#### III.1.3.1 Potentiel d'inhibition du DPPH

Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH par la vitamine C et du THE 4 ont augmenté avec variation des concentrations. Toutefois, une inhibition d'environ 91 % a été obtenue par l'acide ascorbique à des concentrations comprises entre 50 µg/mL et 100 µg/mL alors que l'inhibition maximale obtenue par le THE 4 est de 80 % à 100 µg/mL (Figure 27). Sur la figure 28, les valeurs de  $CI_{50}$  de la vitamine C et du THE 4 ont été de  $7,78 \pm 0,23$  µg/mL et de  $30,59 \pm 0,72$  µg/mL respectivement.



**Figure 27 :** Evolution des pourcentages d'inhibition du radical DPPH par le THE 4 et la vitamine C

Les courbes traduisant les pourcentages d'inhibition du DPPH par le THE 4 et la vitamine C ont globalement une allure croissante. L'inhibition maximale obtenue à 100 µg/mL a été atteinte à 91 % et à 80 % pour l'acide ascorbique et le THE 4 respectivement.



**Figure 28 :** Histogrammes des valeurs CI<sub>50</sub> de la vitamine C et du THE 4.

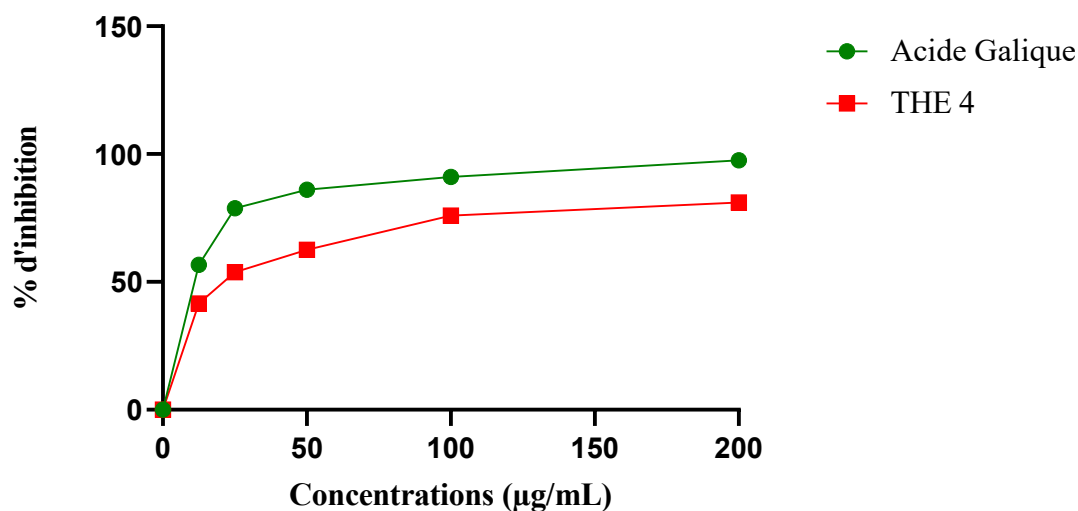
La plus petite valeur de CI<sub>50</sub> a été obtenue avec l'acide ascorbique à 7,78 µg/mL tandis que ce paramètre a été déterminé à 30,59 µg/mL pour le THE 4.

### III.1.3.2 Potentiel d'inhibition du radical ABTS

Les pourcentages d'inhibition du radical ABTS par l'acide gallique et par le THE 4 ont augmenté proportionnellement à la concentration. Toutefois, une inhibition proche de 98 % a été observée avec l'acide gallique pour des concentrations comprises entre 50 µg/mL et 200

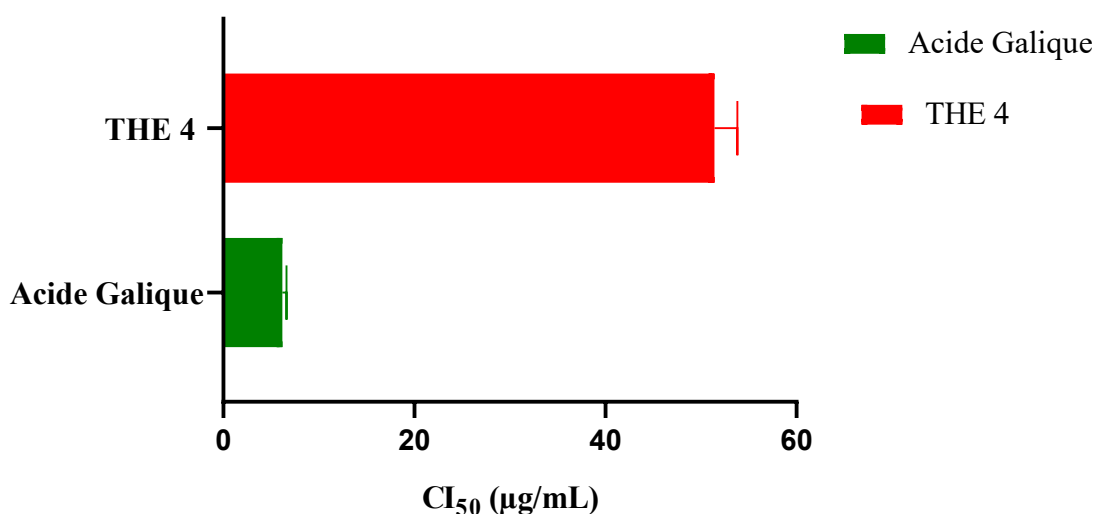
$\mu\text{g/mL}$ , tandis que l'extrait du thé 4 atteint une inhibition maximale de 81 % à la concentration de 200  $\mu\text{g/mL}$ . L'ensemble de ces résultats est illustré dans la figure 29. Les pourcentages d'inhibition du radical ABTS par l'acide gallique et le THE 4 ont augmenté avec l'augmentation des concentrations.

Les valeurs de  $\text{CI}_{50}$  de l'acide gallique et du THE 4 ont été de  $5,86 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$  et de  $53,72 \pm 1,69 \mu\text{g/mL}$  respectivement comme illustrées par la figure 30.



**Figure 29 :** Evolution des pourcentages d'inhibition de l'ABTS par le THE 4 et l'acide

*Les courbes traduisant les pourcentages d'inhibition de l'ABTS par le THE 4 et l'acide gallique ont globalement une allure croissante. L'inhibition maximale obtenue à 200  $\mu\text{g/mL}$  a été atteinte à 100 % et à 75 % pour l'acide gallique et le THE 4 respectivement.*



**Figure 30:** Histogrammes des valeurs  $\text{CI}_{50}$  de l'acide gallique et du THE 4

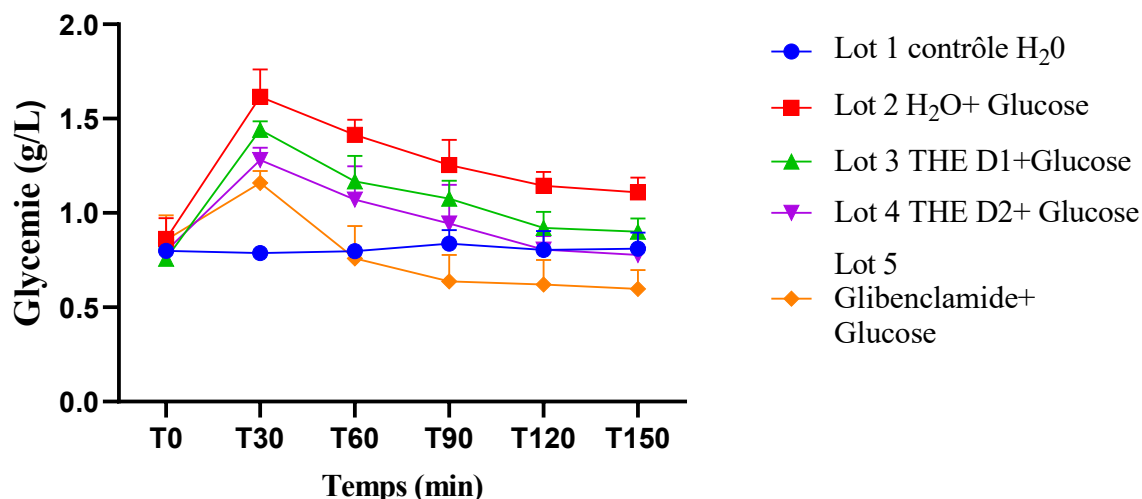
*La plus petite valeur de  $CI_{50}$  a été obtenue avec l'acide gallique à 5,86  $\mu\text{g/mL}$  tandis que ce paramètre a été déterminé à 53,72  $\mu\text{g/mL}$  pour le THE 4*

### **III.1.4 Propriétés biologiques du THE 4**

#### **III.1.4.1 Tolérance au glucose**

Les données présentées dans la figure 31 illustrent l'évolution de la glycémie chez des rats soumis à une hyperglycémie provoquée par voie orale. De façon générale, une élévation brusque de la glycémie (pic glycémique) a été observée à T30 chez tous les groupes expérimentaux (Lots 2, 3, 4 et 5) suite à la charge orale de glucose. En revanche, les rats du lot 1 (non traités et non chargés en glucose) ne présentent aucune variation significative de la glycémie durant toute la durée de l'expérimentation.

Chez les rats du Lot 2 (groupe non traité et chargé en glucose), le pic glycémique a atteint environ 1,6 g/L à T30. Ce pic a été atténué dans les groupes traités : 1,40 g/L pour le Lot 3 (traité à D1 et chargé en glucose) ; 1,25 g/L pour le Lot 4 (traité à D2 et chargé en glucose) et 1,10 g/L pour le Lot 5 (traité à la Glibenclamide et chargé en glucose). Par la suite, une diminution progressive de la glycémie a été observée de T30 à T150 dans tous les groupes traités. La glycémie est revenue à son niveau basal à T150 pour le Lot 4, tandis qu'elle reste légèrement supérieure à la valeur initiale pour le Lot 3. Chez les rats du lot 5, la glycémie basale a été retrouvée dès T60, puis a continué à décroître progressivement jusqu'à atteindre la valeur la plus basse à environ 0,5 g/L à T150.



**Figure 31:** Courbes de l'évolution de la glycémie en fonction du temps chez des rats

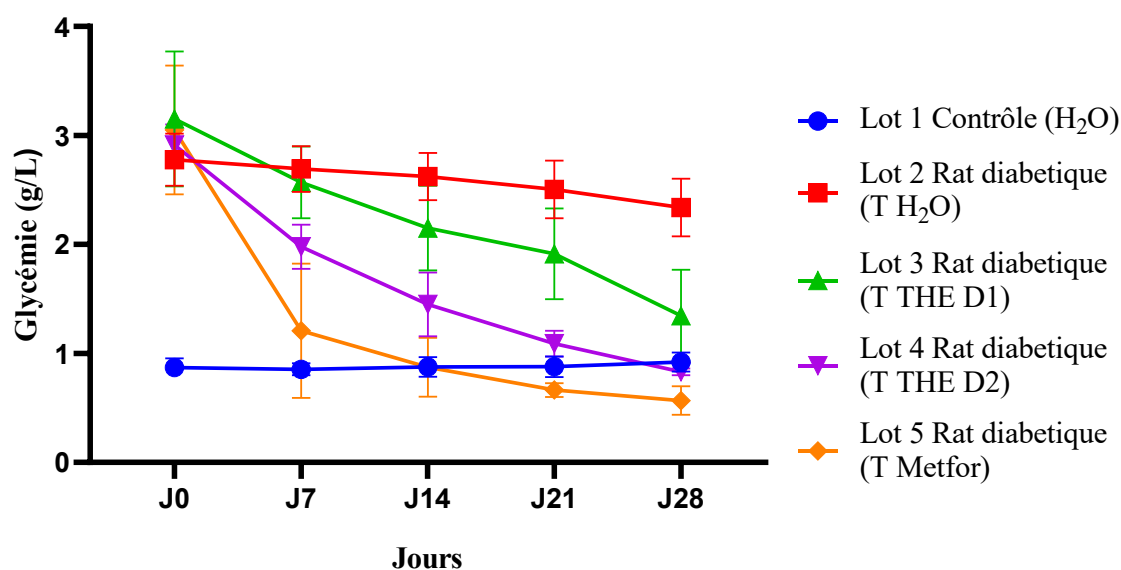
*A l'exception du lot 1, les pics glycémiques ont été observés chez tous les lots traités avec la plus grande valeur pour le Lot 2 et la plus basse pour le Lot 5 tandis que les Lots 3 et 4 présentent des valeurs intermédiaires. Le retour à la valeur initiale de la glycémie a été observé à T150 pour le lot 4 et à T60 pour le lot 5. Pour les Lots 2 et 3, la valeur initiale de la glycémie n'a pas été retrouvée au terme de l'expérimentation.*

#### III.1.4.2. Potentiel antihyperglycémiant du THE 4

Le graphique (Figure 32) présente l'évolution de la glycémie chez différents lots de rats sur une période de 28 jours, dans le cadre d'une étude visant à évaluer l'effet antihyperglycémiant du THE 4 chez des rats rendus diabétiques à la Streptozotocine (STZ). Chez les rats du Lot 1 (témoins sains recevant uniquement de l'eau), la glycémie est restée stable autour de 0,8 g/L tout au long de l'expérimentation. En revanche, les rats du lot 2 (rats diabétiques non traités) ont présenté une glycémie initiale élevée avoisinant 3 g/L, qui demeure élevée jusqu'à J28 confirmant l'installation et la persistance d'un état hyperglycémique en l'absence de traitement.

Chez les rats des Lots 3 et 4 traités respectivement avec les doses D1 et D2 de du THE 4, une diminution progressive de la glycémie a été observée. Cette baisse a été plus marquée avec la dose D2 où la glycémie chute rapidement à partir de J7 pour se stabiliser autour de 1 g/L à J28. Le Lot 3, quant à lui a montré également une réduction progressive de la glycémie, atteignant environ 1,7 g/L à la fin de l'expérimentation. Enfin, les rats du lot 5 traités avec la metformine (référence thérapeutique) ont présenté une diminution rapide et significative de

la glycémie dès J7, atteignant un niveau proche de celui des rats témoins sains dès J28 (environ 0,7 g/L).

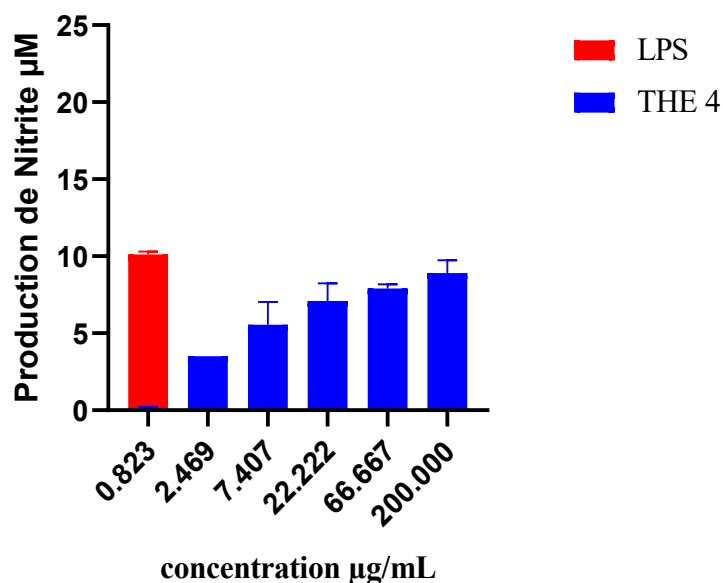


**Figure 32 :** Courbes de l'effet antihyperglycémique du THE 4 chez des rats

*Comparativement au lot témoin diabétique non traité (Lot 2), les lots de rats diabétiques traités (Lots 3, 4 et 5) présentent une diminution progressive de la glycémie au cours du temps. Cette baisse est particulièrement marquée chez les rats du Lot 4, traités avec la dose D2 de l'extrait THE, dont le profil glycémique se rapproche de celui observé chez les rats du Lot 5, traités avec la metformine. Toutefois, la metformine induit une réduction plus rapide et plus prononcée de la glycémie, traduisant une efficacité antihyperglycémique légèrement supérieure à celle de l'extrait végétal.*

### III.1.5. Production de monoxyde d'azote (NO)

La production de nitrite a augmenté progressivement avec la concentration du THE 4, atteignant environ 10  $\mu$ M à la plus forte concentration testée. Le LPS (lipopolysaccharide) a induit une production de NO dans les macrophages à une valeur située autour de 10  $\mu$ M (Figure 33)



**Figure 33 :** Dose-réponse des concentrations du THE 4 sur la production des NO

*La production de NO augmente proportionnellement à celle des concentrations du THE 4. La production maximale de NO a été observée 200 µg/mL à environ 10µM.*

### III.1.6 Profils phytochimiques du THE4

#### III.1.6.1 Profil qualitatif des phytocomposés

Le tableau III donne les grands groupes chimiques contenus dans le THE 4. Le screening chimique en solution réalisé sur le thé a permis d'identifier les composés tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les polyphénols, les leucoanthocyanes, les saponosides, les stérols et polyterpènes, tanins et les quinones. Il faut cependant noter l'absence des tanins et quinones.

**Tableau III:** Métabolites secondaires du THE 4

Famille de métabolites secondaires	Extrait aqueux du THE 4
Alcaloïdes	+
Alcaloïdes	+
Polyphenols	+

Tanins catéchiques	+
Tannins galliques	+
Flavonoïdes	+
Quinones	-
Saponosides	+
Stérols et polyterpènes	+
Leucoanthocyanes	+
Mucilages	+

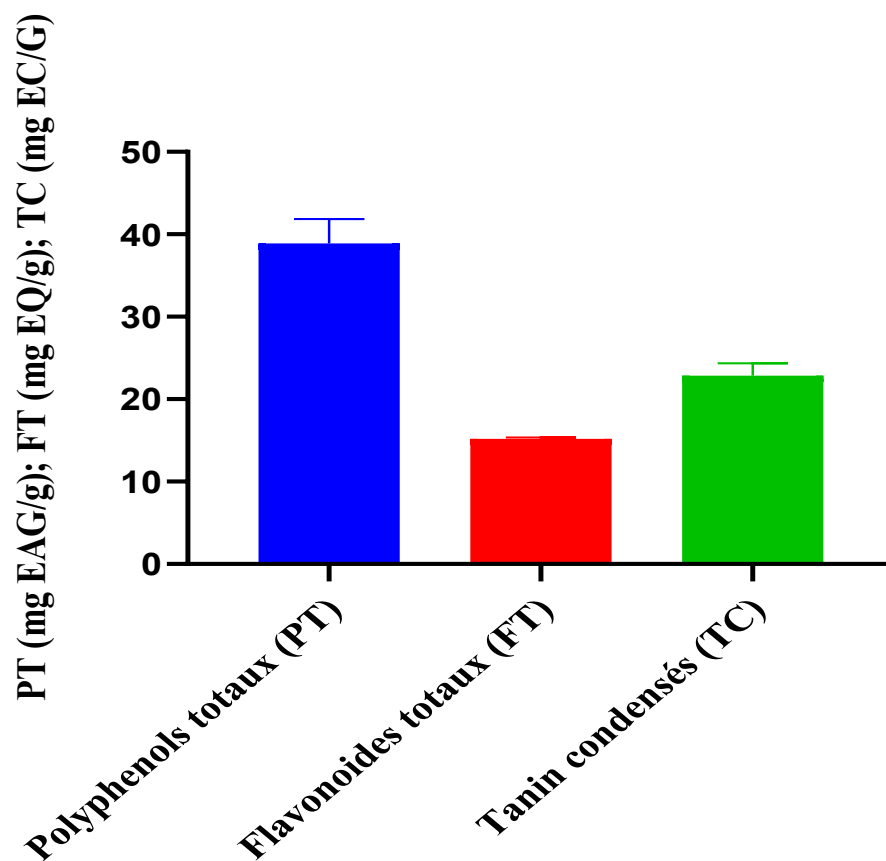
*Le profil phytochimique du THE 4 est marqué par les alcaloïdes, les Polyphénols, les tanins, les flavonoïdes, les saponosides, les stérols et polyterpènes, les leucoanthocyanes et les mucilages*

+ : *Présence*

- : *Absence*

### III.1.6.2 Profil quantitatif en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés du THE 4

La quantification des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés a permis de déterminer les teneurs respectives de ces métabolites secondaires dans les extraits du THE 4, lesquelles sont élevées à  $38,9 \pm 2,97$  mg EAG/g pour les polyphénols totaux,  $15,1 \pm 0,17$  mg EQ/g pour les flavonoïdes et  $22,76 \pm 1,49$  mg EC/g pour les tanins condensés (Figure 34).



**Figure 34 :** Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés

*Les polyphénols totaux sont majoritaires dans la formulation TH4, suivis des tanins condensés et des Flavonoïdes totaux.*

### III.2 Discussion

Dans le cadre de l'évaluation sensorielle, cinq formulations de thés (désignées sous l'acronyme THE) ont été développées à partir de trois espèces végétales aromatiques : *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita*. Le choix de ces plantes a reposé sur une double justification. D'une part, elles ont été bien ancrées dans les habitudes alimentaires ivoiriennes, consommées couramment sous forme de tisanes ou de jus. D'autre part, elles sont reconnues pour leurs propriétés biologiques notamment antioxydantes, digestives et immunostimulantes, comme l'ont rapporté plusieurs études (Abena *et al.*, 2003 ; Ekissi *et al.*, 2011 ; Koulibaly *et al.*, 2016).

L'analyse sensorielle menée auprès d'un panel de consommateurs a révélé une acceptabilité globale élevée pour l'ensemble des formulations avec des scores compris entre 7,09 et 8,01 sur une échelle hédonique de 9 points. Ces résultats ont traduit une appréciation positive des consommateurs pour les différentes associations aromatiques testées, rejoignant ainsi les observations de Stone *et al.* (2004) et Lawless & Heymann (2010) selon lesquelles la complexité aromatique, lorsqu'elle est bien équilibrée, favorise la satisfaction sensorielle.

Parmi les cinq échantillons, la formulation THE 4 s'est nettement démarquée avec un score moyen de 8,01, suggérant une synergie aromatique particulièrement harmonieuse entre les trois espèces. Cette formulation a semblé avoir atteint un équilibre optimal entre intensité aromatique et palatabilité, ce qui en fait une candidate privilégiée pour une éventuelle valorisation commerciale. À l'inverse, la formulation THE 5, bien qu'elle est demeurée dans la zone d'acceptabilité (score de 7,09), a enregistré la note la plus faible, suggérant la nécessité d'un ajustement de sa composition aromatique ou de ses proportions pour améliorer son profil sensoriel (Meilgaard *et al.*, 2006). Les formulations THE 1, THE 2 et THE 3 ont obtenu des scores relativement proches, avec une légère préférence exprimée pour THE 2 (7,31), témoignant d'une acceptabilité homogène mais moins marquée que celle de THE 4.

En définitive, les résultats de cette analyse sensorielle ont fourni des indications précieuses pour orienter les futures décisions en matière de formulation, d'optimisation organoleptique et de stratégie marketing. Ils ont souligné également l'intérêt d'associer des critères traditionnels de consommation à des évaluations scientifiques pour développer des produits naturels à l'interface santé-nutrition avec un fort potentiel d'adhésion.

Au regard de son excellente appréciation sensorielle et de l'équilibre aromatique perçu par les consommateurs, la formulation THE 4 s'est distingué comme la candidate la plus prometteuse pour une valorisation à grande échelle. Toutefois, avant toute mise sur le marché

ou recommandation pour une consommation régulière, il a été impératif de s'assurer de son innocuité. Dans cette perspective, l'étude de la toxicité aiguë et subaiguë du THE 4 s'est avérée essentielle afin de garantir la sécurité d'emploi du produit conformément aux exigences réglementaires en matière de phytomédicaments et de compléments alimentaires (OCDE, 2001).

L'évaluation de l'innocuité de la formulation THE 4, identifiée comme la plus prometteuse sur le plan sensoriel, a constitué une étape déterminante en vue de son développement futur comme produit de santé naturelle. À ce titre, des études de toxicité aiguë et subaiguë ont été menées conformément aux lignes directrices de l'OCDE (425 pour la toxicité aiguë et 407 pour la toxicité subaiguë) afin d'évaluer sa sécurité à court et moyen termes (OCDE, 2008).

L'étude de la toxicité aiguë réalisée chez le rat par voie orale, n'a révélé aucune mortalité ni signe clinique d'intolérance, même à des doses élevées de 2000 et 5000 mg/Kg de poids corporel. L'absence de symptômes tels que la léthargie, la perte d'appétit, les troubles locomoteurs ou une perte pondérale significative indique une excellente tolérance du produit. En conséquence, la dose létale médiane (DL<sub>50</sub>) peut être considérée comme étant supérieure à 5000 mg/Kg, classant ainsi la formulation dans la catégorie des substances « pratiquement non toxiques » selon les critères de l'OCDE (OCDE, 2008) et les recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (Gad, 2007).

Le suivi du poids corporel des animaux au cours de l'expérimentation a montré une tendance non significative à l'augmentation, traduisant une absence d'effet délétère sur le métabolisme global ou l'état nutritionnel. Cette observation pourrait s'expliquer par les effets bénéfiques synergiques des composés bioactifs présents dans les plantes constitutives du THE 4, notamment les gingérols du *Zingiber officinale*, les polyphénols de *Lippia multiflora* et les menthols de *Mentha piperita*, connus pour leurs propriétés antioxydantes, digestives et métaboliques (Singh *et al.*, 2013 ; Dalila *et al.*, 2019 ; Boukhatem *et al.*, 2020).

Concernant la toxicité subaiguë, l'administration quotidienne du THE 4 pendant 28 jours à des doses de 17, 85 et 425 mg/Kg n'a entraîné aucun effet indésirable notable. Aucun signe de toxicité clinique n'a été observé tout au long de l'étude, confirmant la tolérance du produit à moyen terme. Cette innocuité a été conforme aux données disponibles sur les extraits aqueux ou hydroalcooliques des plantes impliquées, dont les DL<sub>50</sub> ont également été estimées à des niveaux supérieurs à 5000 mg/Kg dans des études précédentes (Tullayakorn *et al.*, 2012 ; Malek *et al.*, 2021).

Sur le plan biochimique, les concentrations en glycémie, urée, créatinine, ASAT et ALAT sont restées dans les limites physiologiques normales chez tous les groupes expérimentaux, suggérant une intégrité fonctionnelle des organes clés tels que le foie, les reins et le pancréas. Ces résultats ont été soutenus par l'analyse histopathologique, qui n'a mis en évidence aucune altération tissulaire ni lésion macroscopique au niveau des organes vitaux examinés (foie, reins, cœur), renforçant l'hypothèse d'une bonne tolérance à la formulation (Ramkishan *et al.*, 2025 ; Sarawoot & Chuchard. 2023).

Enfin, les paramètres hématologiques (hémoglobine, hémocrite, VGM, TCMH, CCMH, numération plaquettaire) sont demeurés stables, traduisant l'absence d'effets myélotoxiques. Une élévation modérée mais non pathologique du taux de leucocytes a été observée, suggérant une possible stimulation du système immunitaire. Ce résultat a été en cohérence avec les propriétés immunomodulatrices documentées des plantes utilisées, notamment via leurs métabolites secondaires antioxydants tels que les flavonoïdes, les terpènes et les composés phénoliques (Dehnet *et al.*, 2022 ; Theerawat *et al.*, 2025).

Dans l'ensemble, ces données toxicologiques suggèrent que la formulation THE 4 a présenté un profil de sécurité favorable pour une utilisation par voie orale à des doses modérées, ouvrant la voie à des études complémentaires de toxicité et d'efficacité pharmacologique.

L'évaluation des poids relatifs d'organes est un indicateur important dans l'analyse toxicologique notamment lors des études de toxicité subaiguë car elle permet de mettre en évidence d'éventuelles altérations subcliniques non détectables par les observations macroscopiques ou cliniques apparents (Michael *et al.*, 2007). Dans la présente étude, aucune différence statistiquement significative ( $p > 0,05$ ) n'a été observée dans les poids relatifs du foie, des reins et du cœur chez les rats ayant reçu THE 4 aux doses de 17, 85 et 425 mg/Kg comparativement au groupe témoin. Ces résultats ont indiqué que l'administration orale répétée du THE 4 n'a induit ni hypertrophie ni atrophie de ces organes vitaux, suggérant ainsi une bonne tolérance systémique à court terme.

En ce qui concerne le foie, principal organe du métabolisme et de la détoxification, les valeurs obtenues sont restées dans les limites physiologiques normales, sans différence significative entre les lots. Ces données ont confirmé l'absence d'effet hépatotoxique du mélange tri-herbal conformément aux observations de Raza *et al.* (2002), qui ont estimé qu'une variation supérieure à 20 % du poids relatif hépatique a constitué un marqueur pertinent de toxicité hépatique. Des travaux similaires ont été rapportés par Yapo *et al.* (2020), qui n'avaient observé aucune modification du poids hépatique chez des rats traités avec une infusion de *Lippia multiflora*, soutenant ainsi l'innocuité hépatique de cette espèce.

Concernant les reins, organes excréteurs particulièrement sensibles aux xénobiotiques, l'absence de variation significative de leur masse relative a suggéré que le THE 4 n'a pas entraîné de néphrotoxicité. Ce résultat a été en accord avec les conclusions du Council of Experts of the Cosmetic Ingredient Review (2017), qui a rapporté l'absence d'effets indésirables rénaux après administration chronique d'un thé de *Mentha piperita* (20 g/L pendant 30 jours) chez des rats. De plus, Luteino *et al.* (2022) ont observé une stabilité des poids rénaux chez des rats exposés à un extrait de *Zingiber officinale*, ce a soutenu également la sécurité d'emploi de cette plante dans les formulations à visée thérapeutique.

Quant au cœur, aucun changement significatif de la masse myocardique n'a été observé, ce qui a témoigné de l'absence d'effet cardiotoxique du mélange. Ces résultats ont corroboré ceux de Bouagnon *et al.* (2015), qui ont rapporté une protection de l'architecture myocardique chez des rats prétraités avec un extrait aqueux de *Lippia multiflora*, même en présence d'un agent cardiotoxique tel que la doxorubicine. De plus, Kamtchouing *et al.* (2003) ont montré que l'administration répétée d'extraits de *Zingiber officinale* n'altérait pas la structure ni la masse cardiaque des animaux expérimentaux.

L'ensemble de ces observations a renforcé l'idée que la combinaison tri-herbale composée de *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* a été bien tolérée sur le plan systémique. L'absence de modification des poids relatifs du foie, des reins et du cœur a suggéré que le THE 4 n'a pas présenté de toxicité subaiguë sur ces organes cibles, ce qui a constitué un argument solide en faveur de sa sécurité d'utilisation dans le cadre d'un développement futur comme produit phytothérapeutique fonctionnel.

L'analyse histopathologique constitue un volet essentiel de l'évaluation toxicologique, permettant de détecter d'éventuels dommages cellulaires invisibles aux analyses biochimiques. Dans le cadre de cette étude, l'examen des coupes histologiques du foie, des reins et du cœur des rats traités avec la formulation THE 4 n'a révélé aucune altération morphologique significative. L'architecture tissulaire de ces organes est restée globalement intacte, sans signes de nécrose, d'infiltration inflammatoire ni de dégénérescence cellulaire, indiquant une probable absence d'effet cytotoxique aux doses administrées.

Ces observations histopathologiques ont été en parfaite concordance avec les résultats biochimiques, qui n'ont montré aucune perturbation des marqueurs de la fonction hépatique (ASAT, ALAT) ni de la fonction rénale (urée, créatinine). Ces éléments ont renforcé l'hypothèse d'une innocuité tissulaire de la formulation, même en cas d'administration répétée. De telles conclusions ont été en accord avec plusieurs études antérieures ayant évalué les effets individuels ou combinés des plantes constitutives de THE 4. Par exemple, Masengo *et al.*

(2023) ont rapporté l'absence de lésions histopathologiques hépatiques et rénales après administration subaiguë d'un extrait aqueux de *Lippia multiflora* chez des rats Wistar. De même, les travaux de Esther *et al.* (2019) ainsi que de Lutéino *et al.* (2022) ont montré que l'administration orale d'extraits de *Zingiber officinale* n'induisait aucune altération des structures hépatiques, rénales ou cardiaques à doses modérées. Concernant *Mentha piperita*, Bellassoued *et al.* (2018) ont mis en évidence une activité hépatoprotectrice et néphroprotectrice de l'huile essentielle extraite des feuilles, capable d'atténuer les lésions oxydatives induites par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>), grâce à une modulation significative des processus inflammatoires et oxydatifs.

L'évaluation de la toxicité subaiguë du THE 4 a inclus l'analyse des principaux électrolytes plasmatiques (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>) qui sont des marqueurs pertinents de l'état physiologique général, notamment de la fonction rénale, de l'équilibre hydroélectrolytique et de la régulation neuro-hormonale (OCDE, 2008). Les résultats obtenus montrent que les concentrations moyennes de ces ions chez les animaux traités à différentes doses de l'extrait (17, 85 et 425 mg/Kg) sont restées comparables à celles du groupe témoin.

La variation de la concentration en calcium plasmatique reste dans les limites physiologiques normales rapportées chez le rat (120–140 mg/L), suggérant que l'extrait ne perturbe pas le métabolisme calcique ni les fonctions parathyroïdiennes ou osseuses (Jeremiah *et al.*, 2018).

Les concentrations plasmatiques en sodium n'ont montré aucune variation significative entre le groupe témoin et les groupes traités aux différentes doses. Cette observation suggère une stabilité de l'équilibre hydrosodé et l'absence de dysfonctionnement tubulaire ou de rétention hydrique liée au traitement (Josephine *et al.*, 2012). Les données au sujet de l'ion K<sup>+</sup> ont exclu une atteinte rénale aiguë susceptible de provoquer une hyperkaliémie ou une hypokaliémie ont suggéré que les mécanismes de régulation potassique notamment via le système rénine-angiotensine-aldostérone n'ont pas été altérés. Ces observations concordent avec plusieurs travaux antérieurs ayant évalué des extraits végétaux dans des conditions similaires. En effet, Jeremiah *et al.* (2018) ont rapporté une stabilité des électrolytes plasmatiques chez des rats traités avec un extrait aqueux de *Vernonia mespilifolia* Less aux doses de 2000 mg/Kg pc et de 5000 mg/Kg pc. De même, Ojatula & Ezenwa (2023) ont montré que l'extrait aqueux des racines de *Garcinia kola* n'entraînait pas des variations significatives des ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> des rats aux doses comprises entre 150 et 600 mg/Kg pc. De telles données ont suggéré que la substance testée n'a pas induit de perturbation électrolytique ou de déséquilibre ionique, ce qui est un critère essentiel pour considérer une substance comme relativement non toxique selon les lignes directrices de l'OCDE (2008). Par contre, les études conduites par Josephine *et al.*

(2012) ont montré que l'administration orale d'un extrait aqueux des feuilles de *Moringa oleifera* aux doses comprises entre de 2,01 et 16,1 g/Kg perturbait significativement les concentrations des électrolytes tels que  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  ·  $Cl^-$  et  $PO_4^{3-}$ . Ainsi, l'absence de modification significative des taux plasmatiques de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  et  $K^+$  observé avec le THE 4 dans les différents groupes expérimentaux a constitué un indice favorable de l'innocuité de l'extrait, du moins sur le plan de la régulation ionique et de la fonction rénale.

Ces données ont suggéré qu'au-delà de leur innocuité individuelle, les trois espèces pourraient agir de manière synergique pour renforcer le profil de sécurité globale de la formulation. Cette hypothèse a été appuyée par Bassolé *et al.* (2011) qui ont indiqué que certaines associations phytothérapeutiques bien formulées pouvaient non seulement optimiser les effets pharmacologiques mais également réduire les risques toxiques notamment via des effets antioxydants combinés. En effet, les composés phénoliques, flavonoïdes et huiles essentielles présents dans *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* sont largement documentés pour leur capacité à piéger les radicaux libres, stabiliser les membranes cellulaires et prévenir les dommages oxydatifs (Jamal *et al.*, 2016 ; Kaurinovic & Vastag, 2019 ; Joseph *et al.*, 2024).

En définitive, l'ensemble des résultats histopathologiques, biochimiques et hématologiques ont convergé vers une conclusion rassurante quant à l'innocuité tissulaire de la formulation THE 4. Ces résultats ont constitué un socle solide pour envisager des études de toxicité chronique ou des investigations cliniques ultérieures, en vue d'un éventuel développement pharmaceutique ou nutraceutique.

Après avoir établi le profil d'innocuité de la formulation THE 4 à travers des tests de toxicité aiguë, subaiguë, des analyses hémato-biochimiques et histopathologiques rassurantes, il est apparu pertinent d'approfondir l'évaluation de son potentiel bienfait sur la santé des consommateurs. Ainsi, l'attention a été portée sur l'exploration de quelques propriétés biologiques notamment ses activités antiradicalaires, antidiabétiques et immunostimulantes. Ces investigations visent non seulement à valoriser les usages traditionnels des plantes constitutives, mais aussi à justifier scientifiquement l'intérêt de cette formulation comme produit de santé à visée fonctionnelle ou préventive.

L'activité antiradicalaire de la formulation THE 4 a été évaluée à l'aide des tests DPPH et ABTS, deux méthodes couramment utilisées pour estimer le potentiel antioxydant des extraits végétaux. Les résultats ont révélé que la formulation a présenté une capacité de piégeage des radicaux libres avec des concentrations inhibitrices 50 % ( $CI_{50}$ ) de 31,31  $\mu\text{g/mL}$  pour le test DPPH et de 53,72  $\mu\text{g/mL}$  pour le test ABTS. Bien que ces valeurs soient supérieures à celles

des standards de référence à savoir l'acide ascorbique ( $CI_{50} = 7,55 \mu\text{g/mL}$ ) et l'acide gallique ( $CI_{50} = 5,86 \mu\text{g/mL}$ ), la formulation conserve une activité antioxydante notable, surtout si l'on considère la complexité et la naturalité de sa composition. Cette activité modérée mais significative pourrait être attribuée à la présence des métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et les terpènes, connus pour avoir des activités antioxydantes. Ces composés sont largement documentés pour leur rôle clé dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) notamment via des mécanismes de transfert d'électrons ou de chélation des ions métalliques pro-oxydants (Dai & Mumper, 2010 ; Ghasemzadeh *et al.*, 2012). Les valeurs obtenues sont inscrites dans la même gamme que celles rapportées dans la littérature pour les extraits aqueux des plantes constitutives du mélange. Dabiré *et al.* (2015) ont décrit une  $CI_{50}$  de  $23,8 \mu\text{g/mL}$  pour *Lippia multiflora*, soulignant sa contribution majeure à l'activité antioxydante globale. De même, Ali *et al.* (2018) ont rapporté une  $CI_{50}$  de  $32,4 \mu\text{g/mL}$  pour des extraits de *Zingiber officinale*, ce qui corrobore la participation active de cette espèce à l'effet observé. Concernant *Mentha piperita*, Nataliia *et al.* (2023) ont obtenu une  $CI_{50}$  de  $59,2 \mu\text{g/mL}$  par le test DPPH suggérant un effet complémentaire sur ce paramètre.

Par ailleurs, plusieurs études récentes soulignent l'importance des interactions synergiques entre les composants bioactifs issus de différentes plantes dans l'optimisation de l'activité antioxydante. Ghasemzadeh *et al.* (2012) ont ainsi montré qu'une combinaison d'extraits riches en polyphénols pouvait produire un effet antioxydant supérieur à celui de chaque plante prise individuellement. Ce phénomène de synergie pourrait expliquer pourquoi la formulation THE 4, bien que composée d'extraits non purifiés, a présenté une capacité antiradicalaire robuste et cohérente. La comparaison des valeurs de  $CI_{50}$  met en évidence que le potentiel antioxydant du THE 4 est supérieur à celui d'un thé formulé à partir de *Phyllanthus debilis*, *Osbeckia octandra* et *Artocarpus heterophyllus* (formulation M2). En effet, selon une étude menée par Dias *et al.* (2024), cette association de plantes médicinales testée selon la même méthode de piégeage des radicaux libres (DPPH), a présenté une  $CI_{50}$  de  $45,79 \mu\text{g/mL}$ , contre  $31,31 \mu\text{g/mL}$  pour le THE 4. Ce résultat pourrait suggérer que le THE 4 possède une meilleure capacité de neutralisation des radicaux DPPH•. Par ailleurs, la valeur de  $CI_{50}$  du THE 4 est proche de celle observée pour la formulation M7 de la même étude ( $CI_{50} = 34,40 \mu\text{g/mL}$ ), ce qui confirme la compétitivité antioxydante de la formulation à base de *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita*. Les résultats obtenus par le test ABTS+ ont corroboré ceux du DPPH, en confirmant le pouvoir antiradicalaire du THE 4. En effet, l'analyse des  $CI_{50}$

a révélé que le THE 4 a été également capable d'inhiber efficacement le radical cationique ABTS•+.

En somme, ces résultats ont confirmé que la formulation THE 4 a exercé une activité antioxydante mesurable, en grande partie attribuable à la diversité et à la complémentarité des composés phénoliques, flavonoïdiques et terpéniques présents. Même si son efficacité a été inférieure à celle des antioxydants de référence purs, elle reste biologiquement pertinente et cohérente avec l'usage traditionnel de ces plantes dans la prévention ou le soulagement de troubles liés au stress oxydatif.

L'évaluation de la tolérance au glucose a constitué un indicateur pertinent de l'activité hypoglycémiant potentielle d'un extrait végétal. Dans cette étude, les profils glycémiques obtenus au cours du test oral de tolérance au glucose (OGTT) ont révélé des réponses distinctes selon les traitements administrés aux différents lots de rats, soulignant l'effet modulant du THE formulé à base de *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* sur l'homéostasie glucidique.

Chez les animaux du lot témoin négatif (Lot 1), n'ayant reçu ni glucose ni traitement, la glycémie a demeuré stable tout au long de l'expérimentation, conformément aux attentes physiologiques en condition normoglycémique. Ce comportement a rejoint les observations de Odetola *et al.* (2006), qui rapportaient une stabilité glycémique chez des rats sains non soumis à une charge glucidique. En revanche, les rats du Lot 2 soumis à une charge orale de glucose sans traitement, ont présenté un pic glycémique marqué à 30 minutes (T30) suivi d'une décroissance progressive. Ce profil, caractéristique d'une réponse physiologique à une surcharge glucidique en l'absence de modulation pharmacologique, a illustré une tolérance au glucose réduite. Des travaux antérieurs, tels que ceux de Kazeem *et al.* (2013) ont rapporté des schémas glycémiques similaires chez des modèles animaux non traités, servant de référence pour l'évaluation d'extraits antidiabétiques.

Les profils glycémiques des Lots 3 et 4 traités respectivement avec les doses D1 et D2 de la formulation THE 4, se sont distingué par une élévation modérée de la glycémie à T30 suivie d'un retour plus rapide à des valeurs basales dès T60. Cette réponse atténuée a suggéré une amélioration de la gestion postprandiale du glucose. Une telle action pourrait être attribuée à une synergie des mécanismes antidiabétiques connus des plantes constitutives du mélange : inhibition des enzymes digestives ( $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase), ralentissement de l'absorption intestinale du glucose, ou encore amélioration de la sensibilité à l'insuline (Benmesaoud, 2019).

Plus spécifiquement, *Zingiber officinale* a fait l'objet de plusieurs études démontrant son effet hypoglycémiant par modulation des enzymes impliquées dans le métabolisme

glucidique et par une réduction du stress oxydatif pancréatique (Al-Amin *et al.*, 2006 ; Saghir *et al.* 2021). *Mentha piperita*, de son côté, a été associée à une activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase et à une amélioration du statut antioxydant, contribuant ainsi à la réduction de l'absorption du glucose intestinal (Rajendran *et al.*, 2014 ; Javed *et al.*, 2021). Quant à *Lippia multiflora*, bien que moins étudiée pour ses effets hypoglycémiant, elle s'est distinguée par sa teneur élevée en composés phénoliques et flavonoïdes, aux propriétés antioxydantes et antidiabétiques potentielles (Soro, 2016 ; Masengo *et al.*, 2023).

Le Lot 5 traité à la Glibenclamide a servi de contrôle positif. Il a présenté une réduction marquée du pic glycémique post-charge avec un retour rapide à la normoglycémie, conformément au profil pharmacodynamique bien établi de cette molécule. Ces résultats ont corroboré ceux de UKPDS. (1998) qui ont décrit les effets de la Glibenclamide sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et l'effet hypoglycémiant.

Ainsi, Bien que l'effet hypoglycémiant de la formulation THE 4 soit légèrement inférieur à celui du glibenclamide, ses performances restent significatives et biologiquement pertinentes dans un contexte de phytothérapie. Ces données appuient l'idée avancée par Saghir *et al.* (2011) selon laquelle des combinaisons rationnelles de plantes médicinales antioxydantes peuvent représenter une stratégie alternative prometteuse pour la gestion du diabète de type 2, en particulier dans les contextes à ressources limitées (Umesha *et al.*, 2014 ; Nasri & Rafieian-Kopaei, 2015).

Après avoir mis en évidence l'influence favorable du THE 4 sur le métabolisme glucidique dans un contexte de surcharge en glucose, il apparaît pertinent d'approfondir l'évaluation de son potentiel thérapeutique dans un modèle pathologique. C'est dans cette optique que l'étude de l'activité antihyperglycémiant du THE 4 formulé en comparaison avec la metformine (traitement de référence) a été menée chez des rats rendus hyperglycémiques, afin de mieux caractériser son efficacité dans un contexte simulant le diabète de type 2.

L'évaluation de l'activité antihyperglycémiant du thé formulé THE 4 a été réalisée à travers le suivi de l'évolution de la glycémie sur une période de 28 jours chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine (STZ). Les résultats ont montré des profils glycémiques distincts selon les lots, traduisant des effets variables du traitement sur l'homéostasie glucidique.

Chez les animaux du Lot 1 (rats normoglycémiques non diabétiques), la glycémie est restée stable et dans les limites physiologiques tout au long de l'expérimentation. Ce profil a été conforme aux normes glycémiques de référence chez le rat (Kouehiounon *et al.* 2022) et

concorde avec les observations de Odetola *et al.* (2006), selon lesquelles l'absence de stress métabolique ou de perturbation pathologique maintient la glycémie constante. En revanche, les rats du Lot 2 (diabétiques non traités) ont présenté une hyperglycémie persistante, avec des taux supérieurs à 3 g/L pendant toute la durée de l'étude. Cette installation d'un état d'hyperglycémie chronique est typique du modèle STZ-induit comme l'ont décrit Lenzen (2008) et Faiz *et al.* (2023), et témoigne de l'absence d'auto-régulation glycémique en l'absence de traitement.

Chez les rats du Lot 3, ayant reçu le thé formulé à la dose D1(17 mg/Kg pc), une réduction progressive de la glycémie a été observée à partir du 7<sup>e</sup> jour. Cette diminution est devenue significative entre J14 et J28, traduisant un effet antihyperglycémiant modéré mais progressif. Des résultats similaires ont été rapportés par Saghir *et al.* (2011) qui ont souligné l'effet cumulatif des composés antioxydants et phénoliques sur la régulation du glucose dans les extraits végétaux combinés.

Le Lot 4 traité avec la dose D2 (85mg/Kg pc) du THE 4 a montré une amélioration plus marquée du profil glycémique avec une baisse significative dès J7 et une quasi-normalisation à partir de J14. Ce résultat a suggéré une relation dose-effet, renforcée par l'augmentation de la concentration en principes actifs. Ce phénomène a été corroboré par les travaux de Al-Amin *et al.* (2006) qui ont démontré une réduction dose-dépendante de la glycémie avec des extraits de *Zingiber officinale* et par Javed *et al.* (2021) qui ont mis en évidence une inhibition accrue de l' $\alpha$ -glucosidase avec des concentrations croissantes de *Mentha piperita*.

Le Lot 5 traité à la metformine (médicament de référence) a présenté une forte réduction glycémique dès le 7<sup>e</sup> jour avec une stabilisation autour de 1 g/L entre J14 et J28. Ce profil a été conforme aux mécanismes pharmacodynamiques bien établis de la metformine qui agit par inhibition de la néoglucogenèse hépatique et amélioration de la captation périphérique du glucose (Rena *et al.*, 2017). Les résultats sont cohérents avec ceux de Shirwaikar *et al.* (2003) dans des modèles similaires de diabète expérimental.

Dans l'ensemble, la formulation THE 4 a exercé un effet antihyperglycémiant notable, particulièrement à la dose élevée, approchant l'efficacité de la metformine sur le long terme. Ce potentiel thérapeutique pourrait être attribué à la synergie des composés bioactifs présents dans *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* notamment les flavonoïdes, les phénols et les terpénoïdes qui sont connus pour moduler les enzymes digestives du glucose, améliorer la sensibilité à l'insuline et réduire le stress oxydatif (Brahmachari, 2011 ; Chukwebuku *et al.*, 2021 ; Masengo *et al.*, 2023). Ces résultats soutiennent l'intérêt du développement de formulations associant plusieurs plantes dans la gestion du diabète de type 2

particulièrement dans un contexte de médecine complémentaire et de valorisation des ressources médicinales locales.

Au regard du potentiel antihyperglycémiant significatif de la formulation THE 4, il est apparu pertinent d'explorer son activité immunomodulatrice sachant que cette activité est d'un grand intérêt, en particulier dans le contexte du diabète et du stress oxydatif. Par conséquent, le dosage des oxydes nitriques (NO), marqueurs clés de l'activation des macrophages et de la réponse immunitaire innée, a été réalisé afin d'évaluer l'effet immunostimulant potentiel du THE 4.

Les résultats obtenus ont révélé une augmentation progressive et dose-dépendante de la production de monoxyde d'azote (NO) en réponse aux concentrations croissantes de THE 4, culminant à environ 10  $\mu$ M à la dose la plus élevée. Cette production élevée de NO, comparable à celle induite par le lipopolysaccharide (LPS) dans cette étude, a suggéré une activation significative des macrophages. Le LPS est bien connu pour activer la voie de signalisation TLR4/NF- $\kappa$ B, conduisant à l'induction de la NO synthase inductible (iNOS) et à la libération de NO, un marqueur classique de l'activation immunitaire innée (Zhihong *et al.*, 2012 ; Shanshan *et al.*, 2022). L'activité immunostimulante observée avec la formulation THE 4 peut être attribuée à l'action synergique de ses trois constituants : *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita*, toutes reconnues pour leurs propriétés immunomodulatrices.

En effet, des études récentes ont montré que l'extrait aqueux de *Lippia multiflora* stimule fortement l'activité des macrophages murins avec une production accrue de NO et une surexpression de iNOS à des concentrations supérieures à 100  $\mu$ g/mL (Bayala *et al.*, 2014 ; Soro *et al.*, 2016). Cette action est également accompagnée d'une amélioration de la phagocytose et de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ . Le gingembre (*Zingiber officinale*) est lui aussi largement documenté pour son rôle dans la modulation de la réponse immunitaire. Selon Kiti *et al.* (2024), les gingérols et shogaols présents dans les extraits de gingembre peuvent activer les macrophages tout en régulant positivement la production de NO et la libération contrôlée de cytokines via une modulation partielle de la voie NF- $\kappa$ B. Cette double activité (stimulation du NO et régulation de l'inflammation) positionne le gingembre comme un immunomodulateur équilibré. Quant à *Mentha piperita*, plusieurs auteurs dont Arruda *et al.* (2017) et Cosentino *et al.* (2009) ont rapporté que ses extraits augmentent modérément la production de NO chez les cellules immunitaires tout en maintenant une bonne viabilité cellulaire. Ces effets sont associés à une stimulation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6, ce qui reflète un potentiel immunostimulant sans effet cytotoxique notable.

Comparativement aux résultats d'autres études, les cellules RAW 264.7 stimulées par le LPS, produisent entre 20 et 28  $\mu\text{M}$  de NO (Zhihong *et al.*, 2012 ; Hyun 2020), la réponse induite par THE 4 a été moins importante, indiquant une activation macrophagique modérée. Toutefois, contrairement au LPS, souvent associé à des effets pro-inflammatoires excessifs ou délétères, THE 4 pourrait offrir un profil plus sûr et équilibré.

En somme, l'augmentation marquée de la production de NO induite par THE 4 soutient son potentiel immunostimulant probablement via l'activation des macrophages et la modulation des voies pro-inflammatoires. Ces résultats ont renforcé l'hypothèse selon laquelle la combinaison synergique de *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* pourrait constituer une approche phytothérapeutique prometteuse pour renforcer l'immunité naturelle, notamment dans les contextes d'immunodépression ou d'infections chroniques.

Les effets antiradicalaires, antidiabétiques et immunostimulants mis en évidence au cours de cette étude ont suggéré l'implication directe de composés bioactifs présents dans la formulation THE 4. Afin d'étayer ces observations biologiques par des données chimiques objectives, une analyse phytochimique a été réalisée. Celle-ci a visé à identifier et quantifier les principales familles de métabolites secondaires susceptibles de conférer à la formulation ses propriétés pharmacologiques. En effet, la compréhension du profil moléculaire de THE 4 constitue une étape essentielle pour établir un lien mécanistique entre les activités observées et la composition chimique et ainsi renforcer la validité scientifique de son usage traditionnel.

L'analyse phytochimique de la formulation THE 4 a mis en évidence la présence de plusieurs groupes majeurs de métabolites secondaires notamment les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les alcaloïdes, les mucilages, les polyphénols, les stérols, les leucoanthocyanes et les terpènes. Ces composés bioactifs sont largement reconnus pour leurs effets pharmacologiques diversifiés, incluant des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antinociceptives et immunostimulantes (Chang *et al.*, 2002 ; Serra *et al.* 2012 ; Bouagnon *et al.*, 2015). De surcroît, des études récentes leur ont attribué également un potentiel protecteur au niveau cardiovasculaire, neuroprotecteur et anticancéreux, justifiant ainsi leurs intérêts dans les stratégies de prévention et de soutiens thérapeutiques (Martin & Andriantsitohaina, 2002 ; García-Lafuente *et al.*, 2009 ; Milosz *et al.*, 2022).

Le dosage quantitatif des principaux groupes de composés phénoliques a révélé une teneur élevée en polyphénols totaux (38,9 mg EAG/g) suivie d'une concentration importante en tanins totaux (22,76 mg EAT/g) et d'un niveau modéré mais significatif de flavonoïdes (15,1 mg EQ/g). Ces résultats ont confirmé la richesse en composés antioxydants de la formulation THE 4, dans la mesure où ces composés jouent un rôle clé dans la neutralisation des espèces

réactives de l'oxygène (ERO) par leurs capacités à céder des électrons ou à chélater les ions métalliques pro-oxydants (Pietta, 2000 ; Manel *et al.*, 2017).

L'importante teneur en polyphénols pourrait être principalement attribuée à *Lippia multiflora*, plante traditionnellement utilisée pour ses effets tonifiants et antioxydants. Les travaux de Konan *et al.* (2010) ont notamment rapporté des teneurs comprises entre 35 et 45 mg EAG/g dans des extraits aqueux de cette espèce, des valeurs proches de celles observées dans cette étude. Les contributions de *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* à cette richesse polyphénolique sont également notables bien que fortement dépendantes du type d'extraction et des conditions de culture (Dorman & Deans, 2003 ; Pagano *et al.*, 2021).

La concentration observée des flavonoïdes (15,1 mg EQ/g) résulte assurément de la contribution de chacune des trois plantes de la formulation. Ces composés sont reconnus pour leurs effets anti-inflammatoires et antioxydants notamment par l'inhibition des voies de signalisation impliquées dans l'inflammation chronique telles que NF- $\kappa$ B et MAPK (Middleton *et al.*, 2000 ; Bayala *et al.*, 2014). Toutefois, dans des études antérieures conduites par Oueslati *et al.* (2018), il a été montré que la seule infusion de gingembre contenait entre 23–52 mg EQ/g. Cette différence pourrait être liée à la zone de récolte de *Z. officinale*.

Quant aux tanins totaux (22,76 mg EAT/g), leur présence reflète probablement la contribution importante de *Lippia multiflora*, riche en tanins hydrolysables et condensés. Outre leurs propriétés antioxydantes, les tanins sont connus pour leur activité antimicrobienne, astringente et anti-diarrhéique (Scalbert, 1991 ; Chung *et al.*, 1998 ; El-Aswad *et al.* (2022). Les valeurs obtenues sont supérieures à celles rapportées par Dabiré (2015), qui ont obtenu des teneurs en tanins comprises entre 4 et 5 mg EAT/g dans des extraits secs de *Lippia multiflora*. Cela démontre la contribution probable de chacune des plantes de THE 4 dans la teneur totale en tanins.

L'ensemble de ces résultats conforte la pertinence ethnobotanique de l'association des trois espèces dans la formulation THE 4. La richesse en métabolites phénoliques soutient l'utilisation traditionnelle de ces plantes dans la prise en charge de troubles associés au stress oxydatif tels que les affections digestives, respiratoires ou fébriles, métaboliques et immunitaires (Masengo *et al.*, 2023 ; Muscolo *et al.*, 2024). Ainsi, cette formulation ne se limite pas à un usage traditionnel empirique, mais présente des caractéristiques biochimiques qui justifient son positionnement comme produit à potentiel nutraceutique. Elle pourrait, à ce titre, jouer un rôle d'appoint dans la prévention des pathologies chroniques liées au déséquilibre oxydatif, en plus de son intérêt fonctionnel dans l'alimentation santé.

# **CONCLUSION**

L'objectif général de cette étude a été de valoriser trois essences aromatiques locales *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* à travers la formulation d'un thé fonctionnel, en évaluant à la fois ses propriétés biologiques et son innocuité. À cet effet, quatre nouvelles formulations ont été développées, en complément de celle réalisée au cours des travaux antérieurs.

L'analyse sensorielle a révélé une bonne acceptabilité de l'ensemble des formulations, avec une préférence marquée pour la formulation 4 (THE 4), qui a obtenu le score hédonique le plus élevé (8,01). Cette formulation a donc été retenue pour la suite des travaux.

Du point de vue de l'innocuité, la formulation (THE 4) a montré qu'aux doses de 2000 et 5000 mg/Kg pc en administration unique et aux doses de 17 ; 85 et 425 mg/Kg pc en administration orale quotidienne sur 28 jours à des rats, il n'y avait pas de modifications significatives des paramètres hématologiques, biochimiques et ioniques ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ). En outre, aucune des concentrations testées en toxicité subaiguë n'a occasionné des lésions tissulaires dans les organes vitaux dont les reins, le cœur et le foie.

Au sujet des propriétés biologiques, Le THE 4 a montré un effet antihyperglycémiant notable : les doses de 17 et 85 mg/Kg pc ont réduit le pic de glycémie post-charge en glucose, et la dose de 85 mg/Kg pc a permis un retour progressif à la glycémie basale après 21 jours de traitement dans un modèle d'hyperglycémie induite par la streptozotocine (STZ). De plus, une activité immunostimulante dose-dépendante a été mise en évidence, marquée par une augmentation de la production de monoxyde d'azote (NO). Conformément aux tests DPPH et ABTS, le THE 4 possède une activité antioxydante modérée avec des valeurs de  $\text{CI}_{50} = 30,59 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$  et  $\text{CI}_{50} = 53,72 \pm 1,69 \mu\text{g/mL}$  respectivement.

L'analyse phytochimique qualitative et quantitative a révélé que le THE 4 renferme plusieurs groupes de métabolites secondaires tels que les stérols/terpènes, flavonoïdes, polyphénols, tanins, mucilages, leucoanthocyanes et saponines. Les teneurs en polyphénols totaux, en tanins et en flavonoïdes ont été quantifiées à 38 mg EAG/g, 22,76 mg EC/g et 15,1 mg EQ/g de matière sèche respectivement. La présence de métabolites bioactifs pourrait soutenir les effets biologiques observés et positionner le THE 4 comme un produit naturel à infusion avec des propriétés bénéfiques pour la santé.

Toutes ces données sont très encourageantes et constituent une base solide pour initier une demande d'autorisation de commercialisation du THE 4 afin de l'intégrer dans le segment de marché des produits naturels fonctionnels ou nutraceutiques.

En perspectives, il serait judicieux d'évaluer les propriétés digestives et analgésiques, de contrôler la qualité en éléments traces métalliques et en résidus de pesticides, et d'explorer l'innocuité du THE 4 dans une approche de toxicité Chronique.

# REFERENCES

- Abadlia M. & Chebbour A. H. (2014). Etude des huiles essentielles de la plante *Mentha piperita* et tester leur effet sur un modèle biologique des infusions. Mémoire de Master en Sciences de la Nature et de la Vie, Biologie Végétale, métabolisme secondaire. Université Constantine 1, Algérie, 90 p.
- Abena A. A., Diatwa M., Gakosso G., Gbeassor M., HondiAssah T. & Ouamba J. (2003). Effets analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires de l'huile essentielle de *Lippia multiflora*. *Fitothérapie*, 74(3) : 231-236.
- ADA (2022). Standards of medical care in diabète. *Diabète care*, 45(1) : 97-112.
- Agnaniet H., Makani T., Akagah A., Menut C. & Bessière J.M. (2005). Volatile constituents and antioxidant activity of essential oils from *Lippia multiflora* Moldenke, growing in Gabon. *Flavour, Fragrance Journal*, 20 : 34-38.
- Aké-Assi L. (2009). Diversité spécifique de *Lippia multiflora* (Verbenaceae) en Afrique intertropicale. Utilisations traditionnelles de quelques-unes de ses espèces en Afrique de l'Ouest. Discours inaugural des premières journées scientifiques de valorisation de *Lippia multiflora* et autres plantes stimulantes de Côte d'Ivoire tenues à Yamoussoukro les 1, 2 et 3 juillet 2009, 4 p.
- Akinmoladun F.O., Akinrinlola B.L., & Farombi E.O. (2007). Phytochemical constituents and antioxidant activity of extract from the leaves of *Zingiber officinale*. *African Journal of Biotechnology*, 6(8): 979–983.
- Al-Amin Z. M., Martha T., Al-Qattan K.K., Peltonen-Shalaby R. & Muslim A. (2006). Propriétés antidiabétiques et hypolipidémiantes du gingembre (*Zingiber officinale*) chez des rats diabétiques induits par la streptozotocine. *British Journal of Nutrition*, 96(4) : 660-666.
- Ali A., El-Nour M. & Yagi S.M. (2018). Teneurs totales en phénols et flavonoïdes et activité antioxydante du rhizome, du cal et du cal de gingembre (*Zingiber officinale* Rosc.) traités avec certains éliciteurs. *Revue Genetetic Engineering and Biotechnology*, 16(2): 677-682.
- Ali B. H., Blunden G., Tanira M. O. & Nemmar A. (2008). Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 409-420.
- Ali-Azouaou S. (2016). Evaluation of the anticancer effects of pharmacological compounds on cancer stem cells and their descendants: characterization of molecular

- mechanisms. Thèse de Doctorat de Pharmacologie, École doctorale des Sciences de la vie et de la santé, Université de Strasbourg, France, 158 p.
- Allo F.Y., Konan A.B., Méité S. & Datté J.Y. (2020). Acute and sub-acute toxicity studies of the aqueous leaf extract of *Lippia multiflora* from the Béliér Region (Côte d'Ivoire). *Asian Journal of Emerging Research*, 2 : 43-53.
- Ameyaw Y. (2009). A growth regulator for the propagation of *Lippia multiflora* Moldenke, a herbal for the management of mild hypertension in Ghana. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(9) : 681-685.
- Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S. & Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1) : 183–198.
- Arend M., Speck M., Nowack S. & Schulz K. (2008). Pharmacological profile of hordenine, a natural dopaminergic agent. *Planta Medica*, 74(9) : 1070.
- Arnaud T. (2016). Analyse sensorielle temporelle descriptive et hédonique. Thèse de Doctorat des Sciences de l'alimentation, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Université de Bourgogne Franche-Comté, France, 324 p.
- Arries W. J., Tredoux A. G. J., De Beer D., Joubert E. & De Villiers A. (2016). Evaluation of capillary electrophoresis for the analysis of rooibos and honeybush tea phenolics. *Electrophoresis*, 38(6) : 897–905.
- Arruda M.O., Mendes S.J.F., Teixeira A.S., Ludmilla S.S.M., Ribeiro M.N.S., Stanley De Sousa L.G., Muscara M.N., Fernandes E.S & Monteiro-Neto V. (2017). The hydroalcoholic extract obtained from *Mentha piperita* L. Leaves attenuates oxidative stress and improves survival in Lipopolysaccharide-Treated macrophages. *Journal of Immunology Research*, 20: 1-9.
- Avlessi F., Alitonou G., Sohounhlou D.K., Menut C. & Bessiere J.M (2005). Plantes aromatiques d'Afrique de l'Ouest tropicale. Partie XIV. Étude chimique et biologique de l'huile essentielle de *Lippia multiflora* Moldenke du Bénin. *Journal of Essential Oil Research*, 17: 405-407.
- Aybar M.J, Sánchez Riera A.N., Grau A. & Sánchez S.S. (2001). Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2-3) : 125-132.
- BAD (2022). "Rapport sur la consommation de thé en Côte d'Ivoire."
- Bampali E., Graikou K., Aligiannis N. & Chinou I. (2018). Kainari, à Unique Greek traditional herbal tea, from the Island of Lesbos: Chemical Analysis and Antioxidant and

- Antimicrobial Properties, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7 p.
- Bartels H. & Bohmer M. (1971). Eine mikromethode zur kreatininbestimmug. *Clinica Chimica Acta*, 32: 81-85.
- Bassolé I. H. N., Lamien-Meda A., Bayala B., Obame L. C., Ilboudo A.J., Franz C., Novak J., Nébié R.H.C. & Dicko M.H. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* et de *Cymbopogon giganteus*, seules ou en association. *Phytomedicine, Revue internationale de phytothérapie et de phytopharmacie*, 18 : 1070-1074.
- Bayala B., Bassole I.H.N., Gnoula C., Nebie R., Yonli A., More L., Figuered G., Nikiema J-B., Lobaccaro J.-M.A. & Simpure J. (2014). Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina-Faso. *Plos one*, 9(3): 1-11.
- Beelman R. B., Royse D. J. & Chikthimmah N. (2019). The Hordeum genus: Phytochemistry and functional properties. In: *Bioactive Molecules in Food* (pp. 267–290). Springer.
- Békro Y. A., Békro J. A. M., Boua B. B., Tra Bi F. H. & Ehilé E. E. (2007). Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, 4(2): 217–225.
- Bellassoued K., Hsouna A. B., Athmouni K., Pelt J v., Ayadi, F. M., Rebai T. & Elfeki A. (2018). Protective effects of *Mentha piperita* L. leaf essential oil against CCl4 induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Lipids in Health and Disease*, 17 : 9
- Benassel N. & Kameli A. (2020). Lavande papillon (*Lavandula stoechas* L.) : une plante à parfum aux multiples vertus. *Phytothérapie*, 18 : 33-44.
- Benkhnigue O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A. & Douira A. (2010). Études ethnobotaniques des plantes médicinales dans la région de Mechraa Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica Brasilica*, 53 : 191-216.
- Benmessaoud A. (2019). Recherche de l'effet inhibiteur des extraits des feuilles d'*Olea europea* sur l'activité de l'alpha amylase *in vitro*. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Département de Biologie, Université de Tlemcen, République Algérienne Démocratique et Populaire, 63 p.
- Bhattacharya S., Chandra S., Chatterjee P. & Dey P. (2012). Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative *in vitro* study. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3:136.

- Blainski A., Lopes N.P. & De Mello J.C.F. (2021). Determination of Total Phenolic Content by Folin-Ciocalteu Method. *In: Methods in Molecular Biology*, vol 2196: Natural Products Isolation, 2 éd. Humana Press, New York, NY, US: 215-224.
- Bouagnon R., Yeo D., Kouassi K., Bahi A. G., Meité S., Amino Konan G., Djaman J. A., N'guessan J. D. (2015). Cardioprotective effect of aqueous extract of *Lippia multiflora* leaves against doxorubicin-induced toxicity in Wistar rats. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(5): 1046-1050.
- Boukhatem M.N., Ferhat M.A., Benassel N. & Kameli A. (2020). Lavande papillon (*Lavandula stoechas* L). Une plante a parfum aux multiples vertus. *Phytothérapie*, 18, 33-44
- Bouquet A. & Debray M. (1974). Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire, Paris, Orstom, 32, 231 p.
- Bowe J. & Franklin Z. J. (2019). "The glucose tolerance test in mice: Sex, drugs and protocol." *Journal of Endocrinology*, 240(3): R53-R68.
- Brahmachari G. (2011). Natural products in drug discovery: Impacts and opportunities, an assessment in: brahmachari, G., Ed., Bioactive Natural Products, pp1-199.
- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes Médicinales. Lavoisier 4e éd, revue et augmentée, Tec & Dac-Editions médicinales internationales, Paris, 1288 p.
- Bruneton, J. (2016). Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales (5<sup>e</sup> éd.). Lavoisier / Tec & Doc, Paris.
- Cavaliere C., Foglia P., Gubbiotti R., Sacchetti P., Samperi R. & Lagana A (2010). Chemometric characterization of Italian Commercial herbal teas and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 120 (2): 538-544.
- Chan E.W., Eng S.Y., & Tan Y.P. (2011). Phytochemistry and pharmacological properties of *Thunbergia laurifolia*: A review. *Pharmacognosy Journal*, 3(24): 1-6.
- Chang C. C., Yang M. H., Wen H.M. & Chern J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal Food and Drug Analysis*, 10(3): 178-182.
- Chao-dong J., Li-na Z., Yin-feng L. & Mu-jun Z. (2017). Traditional herbal medicines: Clinical, Pharmaceutical, and Biological Analysis *In: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Encyclopedia of Analytical Science, 3rd edition, Elsevier, Amsterdam (Pays-Bas):148-151.
- Charles D. J. (2012). Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. *Springer nature* 377-383.

- Chaudhary A., Trivedi S. & Bag A. (2015). Traditional knowledge and intellectual property rights on medicinal plants: An overview. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(41): 1051-1061.
- Chen X., Gao Z., Song M., Ouyang W., Wu X., Chen Y. & Xiao, H. (2017). Identification of terpenoids from *Rubus corchorifolius* L. f. leaves and their anti-proliferative effects on human cancer cells. *Food & Function*, 8(3) : 1052–1060.
- Chukwuebuka E., Chinaza G.A., Garima K., Mithun R., Kingsley C. P-I., Omkar S., Uchenna E.O., Johra K., Jaison J., Suresh K., Vincent O.C., Mathiyazhagan N., Santwana P., Mihnea-Alexandru G., Chukwuemeli Z.U., Daprim S.O., Nebechi J.E., Andrew G.M., Chinyere C. P.-I., Shyam S.K., Chandan S., Kaliyaperumal S., Habibu T., Muhammad A., Jonathan C.I. & Michael C.O. (2021). Bioactive compounds effective against Type 2 Diabetes Mellitus : A systematic review. *Current Tropics in Medicinal Chemistry*, 21(12) : 1067-1095
- Chumpitazi B. P., Kearns G. L. & Shulman R. J. (2018). Article de synthèse : effets physiologiques et sécurité de l’huile essentielle de menthe poivrée et son efficacité dans le syndrome du côlon irritable et d’autres troubles fonctionnels. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 47(6): 738-752.
- Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.I., Yao-Wen H. & Yuan L. (1998). Tannins and human health : A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 421-464.
- Cinthura C., Thangavelu L., Rajeshkumar S., Gurunadhan D., Pradeep K. R. & Roy A. (2019). COX2 Inhibitory activity of *Abutilon indicum*-An *In vitro* Study. *Indian Journal of Public Health Research & Development*, 10(11) : 3523.
- Conte S. (2008). Evolution des caractéristiques organoleptiques, physicochimiques et microbiologiques du lait caillé traditionnel. Mémoire de Diplôme D’études Approfondies de Productions Animales, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, 45 p.
- Cooper R., Morré D. J. & Morré D. M. (2005). Medicinal Benefits of Green Tea: Part II: Review of Anticancer Properties. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 11(4): 639–652.
- Cosentino M., Bombelli R., Conti A., Colombo M.L., Azzetti A., Bergamaschi A., Marino F. & Lecchini S. (2009). Antioxidant properties and in vitro immunomodulatory effects of peppermint (*Mentha x piperita* l.) Essential oils in human leukocytes. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(3): 33-43.

- Council of Experts of the Cosmetic Ingredient Review (CIR) (2017). Amended Safety Assessment of *Mentha piperita* (Peppermint) Leaf Extract (as *Mentha piperita* tea) and related ingredients. CIR, pp. (see section “Nephrotoxicity” reporting no nephrotoxic effects in rats at 20 g/L tea for 30 days).
- Dabire C.M., Bationo R.K., Adama H., Nebie R.C.H., Pale E., Dhanabal S. P. & Nacro M. (2015). Total phenolics content, flavonoids profiling and antioxidant activity of *Lippia multiflora* leaves extracts from Burkina Faso. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(5) : 28-33.
- Dai J., & Mumper R. J. (2010). Plant phenolics : extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10) : 7313–7352.
- Dalila T.L., Gleide G.F, Julia K.D.V., Rodrigo B.F., Mateus G.C., Camilo A.C., Virginia R.P. & Marisa A.N.D. (2019). La formulation de *Zingiber officinale* réduit les lésions hépatiques et la prise de poids chez les rats nourris avec une alimentation malsaine. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(4) : 1-11.
- Dang J., Liu. Z.G., Tao Y.D. & Wang. J (2011). Extraction of betaine in leaf of *Lycium barbarum*. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 5: 2194-2197.
- Das A., Roy A., Rajeshkumar S. & Lakshmi T (2019). Anti-inflammatory Activity of Turmeric Oil Mediated Silver Nanoparticles. *Research Journal of Pharmacy and Technology*.
- De Sousa A.A.A.S., Soares P.M.G., De Almeida A. N. S., Maia Q.R., De Sousa E.P. & Assreuy A. M.S. (2010). Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2) : 433-436.
- Dehmet A., Aman K., Helen B. & Gomathi P. (2022). Évaluation *in vivo* de l'activité immunomodulatrice de l'extrait brut et des fractions solvantées de *Cyphostemma adenocaula* (Steud. ex A. Rich). *Heliyon*, 8(12) :1-5.
- Descat F. (2002). Rat haematology: haemogram and myelogram. Thesis, Toulouse National Veterinary School - ENVT, 110 p.
- Dheeraj P. J., Shyam S. P. & Rakesh P. (2011). Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(3):177–183.
- Di Leo Lira P., Retta D., Tkacik E., Ringuet J., Coussio J.D., van Baren C. & Bandoni A. L. (2009). Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurusnobilis* L.) from Argentina. *Indian Crops and Products*, 30 : 259-264.
- Diane L. M. & Jeffrey B.B. (2006). A Review of the bioactivity and potential health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy research*, 20: 619–633.

- Dias P.G.I., Marapana R.A.U.J., Rathnayaka R.M.U.S.K., Gayathri S.M.D.S., Anuradha N.G.D., Kananke T.C., Rathnayaka R.M.K.T., Perera M.G.A.N., Sabaragamuwa R.S. & Wickramaratne M.N. (2024). Identification of the best plant ratios for a polyherbal tea mix to obtain optimum antioxidant, antidiabetic, and  $\beta$ -glucuronidase inhibition activities. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* ,15(5):101053.
- Dibong S. D., Mpondo M. E., Nigoye A., Kwin M. F. & Betti J. L. (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37 : 2496-2507.
- Djengue H. W., Dansil A., Assogba M. F., Ahissou H., Adjatin A., Dansi M. & Gbénou D. J. (2017). Phytochemical screening and toxicity of *Lippia multiflora* Moldenke, a minor aromatic leafy vegetable consumed in Benin. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 4(5) : 77-84
- Dorman H. J. D. & Deans S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316.
- EFSA (2018). Scientific Opinion on the safety of green tea catechins. *EFSA Journal*, 16(4) : 5239.
- Ekissi A. C., Konan A., Yao-Kouamé A., Bassirou B. & Kati-Coulibaly S. (2011). Evaluation of the chemical constituents of savannah tea (*Lippia multiflora*) leaves. *Journal of Applied Biosciences*, 42: 2854-2858.
- Ekor M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*, 10 (4): 177.
- El Haïb A. (2011). Valorisation de terpenes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Chimie organique et catalyse l'Université Toulouse III. Paul Sabatier, 195 p.
- El-Aswad A. F., Aisu J. & Khalifa M.H. (2022). Biological activity of tannins extract from processed *Camelia sinensis* (black and green tea), *Vicia faba* and *Urtica dioica* and *Alium cepa* essential oil on three economic insects. *Journal of Plant Diseases and Protection* [https](https://doi.org/10.1007/s12619-022-01014-1), 130(2) : 1-14.
- El-Aswad A. F., Aisu J. & Khalifa M.H. (2022). Biological activity of tannins extract from processed *Camelia sinensis* (black and green tea), *Vicia faba* and *Urtica dioica* and *Alium cepa* essential oil on three economic insects. *Journal of Plant Diseases and Protection* [https](https://doi.org/10.1007/s12619-022-01014-1), 130(2): 1-14.

- Elgert K. D. (2009). *Immunology : Understanding the Immune System* (2nd ed.). Wiley-Blackwell, 744p.
- Elizabeth J ; Hartwig S. (2006). Production and quality aspects of rooibos tea and related products. *Journal of applied botany and food quality*, 80 : 138-144
- Esther O. I., Omoniyi K.Y., Herbert O. C. M., Godswill J. U., Emmanuel O. O., & John. (2019). Évaluation toxicologique des extraits d'huile de racine de *Zingiber officinale* Roscoe (gingembre) chez le rat albinos. *Toxicology Digest*, 4(1) : 108-119.
- Etame L.G., Yinyang J., Okalla E. C., Makondo B. V., Ngaba G. P., Mpondo M. E. & Dibong S.D (2017). Etude de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait au vin des graines de *Carica papaya* Linn. *Journal of Applied Biosciences*, 120 : 12077-12085
- Euromonitor International. (2021). *Global Tea Market Overview*. Londres : Euromonitor International.
- Faiz Q., Shirin S. & Manju S. (2023). Modèles animaux pour l'induction du diabète et ses complications. *Journal du diabète et des troubles métaboliques*, 22 :1021–1028
- FAO (2018). La consommation et la production mondiale de thés, <http://www.fao.org/news/story/fr/item/1136354/icode/>, consulté le 15/03/2018
- FAO. 2021. *The State of Food and Agriculture 2021 : Making agri-food systems more resilient to shocks and stresses*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 978-92-5-134329-6.
- Gad S. C. (2007). *Animal Models in Toxicology*. Taylor & Francis Group, Boca Raton
- Ganesan M. & Laiq-Ur R. (2020). Mises à jour ethnométriques, phytochimiques et pharmacologiques sur la menthe poivrée (*Mentha piperita* L.). *Recherche en phytothérapie*, 34(9) : 2088-2139.
- Gao Y., Wang J.Q., Fu Y.Q., Jun-Feng Y., ShiJ & Xu Y. Q. (2020). Chemical composition, sensory properties and bioactivities of *Castanopsis lamontii* buds and mature leaves. *Food Chemistry*, 30: 316 :126370.
- García-Lafuente A., Guillamón E., Villares A., Mauricio A. R. & Martínez J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9) : 537-552.
- Gella F. J., Olivella T., Cruz P. M., Moreno R., Durban R. & Gomez J. A. (1985). A simple procedure for routine détermination of aspartate aminotransférase and alanine aminotransférase with pyridoxal phosphate. *Clinica Chimica Acta*, 53 : 241-247.
- Gershenzon J. & Dudareva N. (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3 : 408-414.

- Gershenzon J., & Dudareva N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7): 408-414.
- Ghasemzadeh A., Azarifa M., Soroodi O. & Jaafar H Z. E. (2012). Flavonoid compounds and their antioxidant activity in extract of some tropical plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(13): 2639-2643
- Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z. E. & Rahmat A. (2016). Variation of the Phytochemical constituents and antioxidant activities of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade associated with different drying methods and polyphenol oxidase activity, *Molecules*, 21 (6) :780
- Gigon F. (2012). Le Gingembre, Une Epice Contre la Nausée. *Phytothérapie*, 10 : 87-91.
- Goel V., Lovlin R., Barton R., Lyon M. R., Bauer, R., Lee T. D. & Arnason J. T. (2005). Efficacy of a standardized Echinacea preparation (Echinilin™) for the treatment of the common cold a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Canadian Medical Association Journal*, 173(9): 1043–1048.
- Grace S. U., Sankari M. & Gopi B. (2017). Antimicrobial activity of ethanolic extract of *Zingiber Officinale* an in vitro study. *Journal of Pharmaceuticals Sciences and Research* 9(9): 1417- 1419.
- Hagerman A. E. (2002). Tannin chemistry. Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, Oxford, Ohio, USA. 116 p.
- Hagiu A., Attin T., Schmidlin PR., & Ramenzoni L.L. (2020). Dose-dependent green tea effect on decrease of inflammation in human oral gingival epithelial keratinocytes: *in vitro* study. *Clinical Oral Investigations*, 24(7) :2375-2383.
- Hartman K., Luterotti S., Osswald H., Oehme M., Meier P., Ammann D. & Simon W. (1978). Chloride-selective liquid-membrane electrodes based on lipophilic methyl-tri-N-alkylammonium compounds and their applicability to blood serum measurements. *Microchimica Acta*, 70(3-4): 235-246.
- Hayes A. W. (2014). Principles and Methods of Toxicology (6th ed.). CRC Press, London, UK, 2184p.
- Heinrich M. & Jäger A. K. (2015). Ethnopharmacology in the 21st century - grand challenges. *Frontiers in Pharmacology*, 6: 1-4.
- Hsu C. L., Chang F. R., Chang C. T., Chiang Y. C., Chia Y. C. & Yang H. L. (2004). Inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1): 161–165.

- Husain M., Bain S. C., Holst A. G., Mark T., Rasmussen S. & Lingvay I. (2020). Effects of semaglutide on risk of cardiovascular events across a continuum of cardiovascular risk: combined posthoc analysis of the Sustain and Pioneer trials. *Cardiovasc Diabetol*, 19 :156
- Hyun S.K., Jae H.L., Sun H.M., Dong U.A. & Hyun-Dong P. (2020). Ovalbumin hydrolysates inhibit Nitric Oxide production in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages. *Journal Science of Animal resources*, 40(2): 273-285.
- Ikegwu T. M., Obiora C. U., Onwuemeri J. N., Anene N. N., Igwe P. N. & Okolo C. A. (2023). Nutritional, Phytochemical and Sensory Properties of Herbal Tea: *Cymbopogon citratus*, *Moringa oleifera* and *Zingiber officinale*. *Journal of Advances in Food Science & Technology*, 10(3): 1-14
- Jamal A. A., Mohammad K.A., Abdul R.K., Nishat F., Homat J.K., Namrata R., Durga P.M. & Abbas A.M. (2016). Anticancer and Antioxidant activity of *Zingiber officinale* Roscoe rhizome, *Indian Journal of Experimental Biology*, 54(11): 767-773.
- Javed A. (2021). Profil aromatique et activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase de l'huile essentielle de feuilles de *Mentha spicata* *Journal of Essential Oil Bearing*, 24(5) : 1042-1048.
- Jeremiah O. U., Gloria A. O., Anthony J. A. (2018). Evaluation of acute and subacute toxicity of whole-plant aqueous extract of *Vernonia mespilifolia* Less. in Wistar rats. *Journal of Integrative Medicine*, 16(5): 335-341.
- Jim S., Wudeneh L., Mariana S. & Dan A. (2004). Agribusiness in Sustainable Natural African Plant Product : *Lippia* tea. Ph.D Center for New Use Agriculture and Natural Plant Products. disponible auprès de <http : // [www.jesimonaesop.rutgers.edu](http://www.jesimonaesop.rutgers.edu).
- John D. B. & Marilyn G. (2019). Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8 ed, Elsevier, Philadelphie, US, 800 p.
- Joseph N.B., Antoine K. K., Yvette N., Tchang A.W., Lamido G., Germain S.T. & Elisabeth N.B. (2024). Effets antiépileptiques et anti-inflammatoires de *Lippia multiflora* moldenke (Verbenaceae) dans un modèle murin d'épilepsie chronique du lobe temporal induite par la pilocarpine. *Heliyon*, 10: 1-9.
- Josephine N.K., Gabriel. S. B., Lonzi O. & Jasper W. O. (2012). Sub-acute toxicity evaluation of *Moringa oleifera* leaves aqueous and ethanol extracts in Swiss Albino rats. *International Journal of Medicinal Plant Research*, 1 (6): 075-081.
- Juliani HR., Wang M, Moharram H., Asante-Dartey J., Acquaye D., Koroch A. R. & Simon J. E. (2006). Intraspecific variation in quality control parameters, polyphenol profile,

- and antioxidant activity in wild populations of *Lippia multiflora* from Ghana. In *Herbs : Challenges in Chemistry and Biology* pp 126–142, American Chemical Society Press.
- Kai R., Bi-qun H., Li-juan L., Guo-jun Z., Lu-jing L., Xiao-rong B., Pei-gen X. & Min-hui Li (2019). Non-camellia tea in China: traditional usage, phytochemistry, and pharmacology. *Chinese Herbal Medicines*, 11: 119- 131.
- Kamtchouing P., Fandio G. Y., Dimo T. & Jatsa H. B. (2003). Evaluation of androgenic activity of *Zingiber officinale* and *Pentadiplandra brazzeana* in male rats. *Asian Journal of Andrology*, 4(4): 299-301.
- Kanko C., Sawaliho B. E. H., Kone S., Koukoua G. & N'Guessan Y. T. (2004). Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes Rendus Chimie*, 7 : 1039-1042.
- Karthikeyan G., Lakshmi T., Rajeshkumar S., Roy A., Gurunadhan D. & Geetha R.V. (2019). Glucose uptake potential in L6 Myotubes by *Ficus racemosa*. *Indian Journal of Public Health Research & Development*, 10(11) :3527-3531.
- Kaurinovic B. & Vatag D. (2019). Flavonoides et acides phenoliques comme antioxydant naturels potentiels. *Antioxydants*, 21p.
- Kazeem M.I., Raimi O.G., Balogun R.M. & Ogundajo L. (2013). Étude comparative sur le  $\alpha$ -amylase et Potentiel inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase de différents extraits de *Blighia sapida* Koenig. *Revue Américaine de Communication de Recherche*, 1(7) :178-192.
- Keerthana S. & Suweesha A. (2017). Bioactivity of fruit teas and tisanes, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1) : 323-327.
- Kim J.H., Park Y.M., Shin J.S., Park S.J., Choi J.H., Jung H.J., Park H.J. & Lee K.T. (2009) Fraxinellone inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by negatively regulating nuclear factor-kappa B in RAW 264.7 macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(6):1062–1068.
- Kim T., Song B., Cho K.S. & Lee I.S. (2020). Therapeutic Potential of Volatile Terpenes and Terpenoids from Forests for Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6) : 2187. *Revue Internationale des Sciences Moléculaires*, 21 (6) : 2187.

- Kitti P., Beatrix A., Attila G.S., Attila B. & Tünde F. (2024). Ginger-derived bioactive compounds attenuate the Toll-like receptor mediated responses of human dendritic cells. *European Journal of Pharmacology*, 967 : 1-16.
- Koffi N., Beugré K., Guédé N., Zirihi D. & Laurent A (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales Ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Cote d'Ivoire). *Science & Nature*, 6(1): 1-15.
- Kofinas P., Koutsoumpas A. & Lagoudaki I. (2018). Essential Oils and Aromatic Plants: Their Role in Traditional and Modern Medicine. In: F. Balkaya & P. Christou (Eds.), *Aromatic and Medicinal Plants: Back to Nature* (pp. 1–20). InTechOpen.
- Konan J. L. K., Turquin L., Attah H., Yao-Kouame A. & Allou K. (2010). *Lippia multiflora* en Côte d'Ivoire : premiers résultats de recherche et enjeu culturel. *Agronomie Africaine*, 22(2): 121–130.
- Kouadio F. A., Koffi C. & Kouamé L. (2015). "Anti-obesity effects of *Lippia multiflora* on diet-induced obese rats". *Journal of Ethnopharmacology*. 174: 290-295.
- Kouehiouon D.A.B.J., Koffi C., Zahoui O.S., Nene Bi A.A & Traoré F. (2022). Évaluation des propriétés antidiabétiques de l'extrait aqueux d'écorces de tronc de *Sclerocarya birrea* (Anacardiceae) et de sa fraction cyclohexanique chez des rats diabétiques de type 2. *International Journal of Advances Research*, 10(6): 712-721.
- Koulibaly A., Monian M., Ackah J., Koné M. W. & Traoré K. (2016). Étude ethnobotanique des plantes médicinales : cas des affections les plus fréquentes d'une région agricole de Daloa (Centre-Ouest, Côte d'Ivoire). *Journal of Animal & Plant Sciences*, 31(2) : 5021-5032.
- Kpemissi M., Potârniche A.V., Povi L. E., Kossi M. M. M., Pare D. M. T., Vivek C.D. S. S, Tumbadi A. P., Kumar V. S., Laurian V., Sanda A., Kwashie E.G., Bogdan S. & Veeresh P. V. (2020). Nephroprotectiv effect of *Combretum micranthum* G. Don in nicotinamide-streptozotocin induced diabetic nephropathy in rats: *in-vivo and in-silico experiments*. *Journal of Ethnopharmacol*, 261 :113133.
- Kraus A. L. (1980). Research methodology in the Laboratory Rat. *New York Acadimic Press*, 2: 1-30.
- Kumar G., Karthik K. V. & Rao B. (2011). A Review on Pharmacological and Phytochemical Properties of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). *Journal of Pharmacy Research*, 4(9): 2963-2969.
- Küme T. , Sağlam B., Ergon C. & Sisman A. R. (2017). Evaluation and comparison of Abbott Jaffe and enzymatic creatinine methods: Could the old method meet the new

- requirements. *International Journal of Clinical Laboratory Science and Disorders*, 1(1): 1-9.
- Kunle O. F., Egharevba H. O. & Ahmadu P. O. (2012). Standardization of herbal medicines A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3): 101-112.
- Kuo C.Y., Yang T.H., Tsai P.F. & Yu C.H. (2021). Role of the inflammatory response of RAW 264.7 cells in the metastasis of novel cancer stem-like cells. *Medicina*, 57(8) : 1-13.
- Kuo T. T., Chang H. Y., Chen T.Y., Liu.B. C., Chen H. Y., Hsiung Y. C., Hsia S. M., Chun-J.C. & Huang T.C (2020). *Melissa officinalis* Extract Induces Apoptosis and Inhibits Migration in Human Colorectal Cancer Cells. *ACS Omega*, 5(49) : 31792-31800.
- Lawless H. & Heymann H. (2010). *Sensory Evaluation of Food Science Principles and Practices*. 1, 2nd Edition, Ithaca, New York. 1-18.
- Lawson E. P. & Eklu G. (1997). Activité hypoglycémiant de quelques plantes médicinales. *Revue Médecine Traditionnelle Africaine*, 1 (9) : 60-79.
- Lee H. J., Choi I. H., Kim D H., Amanullah S. M. & Kim S. C. (2015). Nutritional characterization of tannin rich chestnut (*Castanea*) and its meal for pig. *Journal of Applied Animal Research*, 1-5.
- Lenzen S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2): 216-226.
- Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D. & Abete P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 26(13):757-772.
- Likibi B. N., Tsiba G., Madiélé A. B., Nsikabaka S., Moutsamboté J.M. & Ouamba J.M. (2015). Constituants chimiques de l'huile essentielle de *Mentha piperata* L. (Lamiaceae) du Congo. *Journal of Applied Biosciences*, 92: 8578 -8585
- Lin Y., Li J., Xu J., Chen Y. & Zheng X. (2020). A comparative study of non-volatile taste components in Chinese Kucha (bitter tea) and regular tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 316, 126271.
- Lin Z. (2021). The production and consumption of tea in China. Tea Research Institute, CAAS, China, 4 p.
- Liu P.P., Yin J., Chen G.S., Wang F. & Xu Y.Q. (2018). Flavor characteristics and chemical compositions of oolong tea processed using different semi-fermentation times. *Journal of Food Science and Technology*.55(3) :1185-1195.

- Luteino L.H., Sani H.G., Tamunotonye W.J., Joseph V.Z., Nathan I.D. & Martha O.O. A. (2022). Acute toxicity and effect of prolonged oral administration of *Zingiber officinale* ethanol extract on liver and kidney histology in Rats. *Arid Zone Journal of Basic and Applied Research*, 1(3): 17-23.
- Mahmood S. A., Abbas N. A. & Rojas R. L. (2003). Effects of aqueous extracts of peppermint, fennel, dill and cumin on isolated rabbit duodenum. *University of Aden Journal of Natural and Applied Sciences*, 7 : 377–383.
- Malek M.K., Rafieian-Kopaei M., Sardari S. & Sewell R. (2021). Toxicological effects of *Mentha × piperita* (peppermint). *Toxin Reviews*, 40 (4) : 445-459.
- Manda P., Manda O. M, Manda V., Kroa E. & Dano S. D. (2017). Etude des toxicités aigue et subaiguë du remède nature utilisé dans le traitement du paludisme. *Revue Ivoirienne des Science et Technologies*, 29 :145 - 158.
- Manel O., Maria P.A. & Leila B.B. K. (2017). Composés phénoliques et capacité antioxydante des extraits méthanoliques du *Tripodion (Anthyllis tetraphylla L.)*. *Revue des Régions Arides*, 43 : 589-594.
- Martin S. & Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51(6) : 304-315.
- Masengo C. A., Ngbolua K.N., Omeonga S.L., Nzuzi N.P., Ilumbe G.B. & Mpiana P.T. (2023). Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-radicalaire, anti-inflammatoire, anti-drépanocytaire et cytotoxique des feuilles de *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 11(3) : 303-312.
- McKay D. L. & Blumberg J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita L.*). *Phytotherapy Research*, 20(8): 619-633.
- McKay D. L. & Blumberg, J. B. (2009). A review of the bioactivity and potential health benefits of herbal teas. *Phytotherapy Research*, 23(4): 239–254.
- Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203) : 428–435.
- Meilgaard M., Civille G. V., & Carr B. T. (2006). *Sensory Evaluation Techniques*. Boca Raton, FL : CRC Press 464 p.
- Michael B., Yano B. L., Sellers R. S., Perry R., Morton D., Roome N., Johnson J. K., Schafer K. & Pitsch S. (2007). Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent

- toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicologic Pathology*, 35(5): 742-750.
- Middleton E.J., Kandaswami C. & Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacology Review*, 52(4): 673-751.
- Miliauskas G., Venskutonis P. R & Beek V. T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2): 231-237.
- Miłosz C. & Urszula L. (2022). Polyphenols and the potential mechanisms of their therapeutic benefits against inflammatory bowel diseases. *Journal of Functional Foods*, 95: 1-22.
- Mingyue Ji., Xue Gong., Xue Li., Congcong Wang & Minhui Li. (2020). Advanced research on the antioxidant activity and mechanism of polyphenols from hippophae species. *A review, Molecules* 25: 1-24.
- Ministère du Commerce et de l'Industrie (MCI). (2021). Rapport annuel d'activités 2021. Ministère du Commerce et de l'Industrie, République de Côte d'Ivoire.
- Mishal A., Saravanan R., Sakthi Atchitha S., Santhiya K., Rithika M., Sanju M.S & Thiruvalluvan T. (2020). Effet de l'extrait de feuille de *Gymnema sylvestris* sur les rats diabétiques induits par la streptozotocine. *Journal de Pharmacologie et de Phytochimie*, 9(4) : 20-23.
- Mosser D. M. & Edwards J.P. (2008). Exploration du spectre complet de l'activation des macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 8: 958-969.
- Murakami Y., Shoji M., Hirata, A., Tanaka S. & Yokoe I. (2012). Inhibitory effects of constituents from *Piper species* on nitric oxide production by activated macrophages. *Planta Medica*, 78(15) : 1612–1617.
- Muscolo A., Mariateresa O., Giulio T. & Mariateresa R. (2024). Oxidative Stress : The Role of Antioxidant Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Diseases. *International Journal of Molecular Science*, 25(6) : 1-22.
- N'guessan K., Kadja B., Zirihi G.N., Traoré D. & Aké-Assi L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte d'Ivoire). *Revue Sciences & Nature*, 06(1) : 1 -15.
- N'guessan K. A., Diarrassouba N., Kone B., Alui K. A. & Yao-Kouamé A. (2015). Caractérisation morpho-pédologique et contraintes au développement de *Lippia*

- multiflora* sur deux sols tropicaux de Côte d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(3) : 3814-3828.
- Nabavy S. M., Nabavy S. F., Ebrahimzadeh M. A. & Bekhradnia A. R. (2015). Phytochemicals as potential nutraceuticals. Antioxydant and anti-inflammatory activities of plant derived compounds. *Critical Reviews in food science and nutrition*, 55 (7): 929-956
- Nalbantsoy A., Ayyıldız T.D., Akgün I.H., Öztürk Y. T., Deliloğlu G.I. & Karaboz I. (2010). Activités antimicrobiennes et cytotoxiques des extraits de *Zingiber officinalis*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33 : 76-85.
- Nasri H. & Rafieian-Kopaei M. (2015). Antioxidant plants and diabetes mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 14(1) : 1-10.
- Nataliia H., Lesya K., Katarzyna P., Vladimira H., Sedlá C., Roman F., Mariia V., Iryna M., J. B., Piotr P.W. & Jacek L. (2023). *Mentha piperita* : Huile essentielle et extraits, leurs activités biologiques et perspectives de développement de nouveaux produits médicaux et cosmétiques. *Molecules*, 28(21) : 1-27.
- Nayak S., Naik P.K., Qcharya L., Mukherjee A. K., Panda P.C. & Das P. (2005). Assessment of genetic diversity among 16 promising cultivars of ginger using cytological and molecular markers. *Z. Naturforsch* 60 : 485-492.
- N'dri Q. E., Kporou K. E., Ouattara S., Beugré A. G. M. & Kouakou-Siransy. G. (2024). Phytochemical Screening and Safety Assessment of a Polyherbal Tea Formulation of *Lippia Multiflora*, *Zingiber Officinale* and *Mentha Piperita*. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 36(11): 29-40.
- N'dri Q. E., Kporou K., Ekissi A C., Choho M. F., Djadji A. T. L. & Kouakou G.S. (2023). Sensory analysis and physicochemical parameters of three "teas" formulations obtained from aromatic plant powders from Côte d'Ivoire. *Journal of Advances in Food Science & Technology*, 10 (4): 129-137.
- Ning. N. & Han J. (2013). Progress on lipids-decreasing components from traditional Chinese medicine, *Asia-Pacific. Traditional Medicine*, 9: 82-86.
- Nkechi R. O., Adaugo D. A., Oluwatoyin O. O., Sunday S. J., Joan O. O., Mary T. O. & Afolabi C. A. (2024). Biochemical and pharmacological properties of a polyherbal antilipemic tea in chemically induced hyperlipidemia. *Scientific African*, 24: e02239.
- Novilla A, Djamhuri D.S, Widyaningrum A. & Widodo M.A. (2017). Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechin

- gallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(11) :1035-1041.
- Nurfaradilla S.A., Saputri F.C. & Harahap Y. (2020). Pharmacokinetic herb-drug interaction between *Hibiscus sabdariffa* Calyces aqueous extract and captopril in rats. *Journal of Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 1-8.
- OCDE (2001). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë, N° 423, 14 p.
- OCDE (2008). Lignes directrices de l'OCDE 407 pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris, France, 14 p.
- Odetola A.A., Akinloye O. & Egunjobi C. (2006). Possible antidiabetic and antihyperlipidaemic effect of fermented *Parkia biglobosa* (Jacq) extract in alloxan-induced diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(9) : 808-812.
- Ohishi T., Goto S., Monira P., Isemura M. & Nakamura Y. (2016). Anti-inflammatory action of green Tea. *Antiinflammatory & Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 15(2):74–90.
- Ojatula A.O. & Ezenwa K.C. (2023). Sub-acute toxicity effects of *Garcinia kola* on serum electrolytes, haematological, visceral organ weights and histopathological profiles in wistar rats. *Science World Journal* 18(2) : 283-289.
- Okuda T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66(17): 2012–2031.
- OMS (2003). Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales. Genève, Suisse, 84 p.
- Orimadegun B.E., Bolajoko E.B., Onyeaghala A.A. & Ademola-Aremu O.O. (2018). Quantitative analyses of phytochemical and trace elements contents of daily detox, herbal tea consumed in Nigeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(20): 289–295.
- Ortega-Vidal J., Ruiz-Riaguas A., Fernández-de Córdova M.L., Ortega-Barrales P. & Llorent-Martínez E.J. (2019). Phenolic profile and antioxidant activity of *Jasonia glutinosa* herbal tea influence of simulated gastrointestinal *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 287: 258-264.
- Ouahchia C., Cherif H., Hamaidi-chergui F., Merzen L., Deradji S., Hemma R., Nourar N. & Saidi F. (2017). Toxicité aigue et subaigue des extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* L ; *Ditrichia viscosa* L. *Revue Agrobiologia*, 7(2) : 562-573.

- Oueslati S., Gharsalli W., Abdelkarim M., Aissa-Fennira F.B. & Ksouri R. (2018). Biochemical evaluation and exploration of the antioxidant, antibacterial and anticancer potential of *Zingiber officinale*. *Journal of New Sciences*, 54(1) : 3561-3568.
- Paduch R., Kandefer-Szerszeń M., Trytek M. & Fiedurek J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(5) : 315–327.
- Pagano E., Souto E.B., Durazzo A., Sharifi-Rad J., Lucarini M., Souto S.B., Salehi B., Zam W., Montanaro V., Lucariello G., Izzo A.A., Santini A. & Romano B. Ginger (2021). *Zingiber officinale* Roscoe as a nutraceutical: Focus on the metabolic, analgesic, and antiinflammatory effects. *Phytotherapy Research*, 35(5): 2403-2417.
- Pascual M. E., Slowing K., Carretero E., Sanchez D. M. & Villar A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76 (3): 201-214.
- Patwardhan B., Warude D., Pushpangadan P. & Bhatt N. (2005). Ayurveda and traditional chinese medicine: A Comparative Overview. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2: 465-473.
- Peraira V., Knor F., Velloso J.C. & Beltrame F.L. (2014). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. *Theaceae, Revista Brasileira de Plantas Medicinai*, 16(3): 490-498.
- Pereira D. M., Valentão P., Pereira, J. A. & Andrade P. B. (2014). Phenolics : From chemistry to biology. *Molecules*, 19(5): 7904–7917.
- Peter F.G. (2016). TEA association of USA. Word Green Tea Conference, Shizuoka, Japan, 30 p.
- Petrović A., Madić V., Jušković M., Đorđević L., & Vasiljević P. (2021). Osteoprotective effects of ‘anti-diabetic’ polyherbal mixture in type 1 diabetic rats. *Acta Veterinaria-Beograd*, 71(3): 256–272.
- Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- Popovici C., Saykova I. & Tylkowski B. (2009). Evaluation de l’activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, (4): 25– 39.

- Pukumpuang, W. & Chaliewchalad, P. (2019). Anti-Cariogenic Activity, Cytotoxicity and Chemical Constituents of *Zingiber rubens* Roxb. *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*, 12(3) : 13-9.
- Rajendran R.P., Chockalingam V. & Subramani P. (2014). Activité antidiabétique d'une formulation à base de plantes chez des rats Wistar diabétiques induites par la streptozotocine et le nicotinamide. *Journal de Médecine Traditionnelle et Complémentaire*, 4(2) : 108-117.
- Rajvanshi P.S., Patel K.S. & Singh A.K. (2024). Quantitative determination of tannins in plant extracts *In bioactive compounds: Health Benefits and Analysis*. Springer, Singapore, Singapour, Singapour, 269-284.
- Ramkishan J., Dhanabal S.P., Senthil.V., GaneshT., Jubie S. & Venkatesan P.S (2025). Étude de toxicité orale aiguë de nouvelles formulations à base de plantes, réalisée sur des rats Wistar et des souris albinos suisses, conformément à la ligne directrice 425 de l'OCDE. *Phytomedicine*, 5 : 1-11.
- Ratheesh M., Sheethal S., Svenia P. J., Sandya S., Aditya A., Jatheera K., Jayesh T. , Tariq J. & Mahesh A. (2023). Immunomodulatory effect of a polyherbal formulation (Imusil) on cyclophosphamide induced experimental animal model. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 24(11): 3729-3738.
- Raza M., Al-Shabanah O.A., El-Hadiyah T.M. & Al-Majed A.A. (2002). Effect of Prolonged Vigabatrin Treatment on Hematological and Biochemical Parameters in Plasma, Liver and Kidney of Swiss Albino Mice. *Scientia Pharmaceutica*, 70, 135-145.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. & Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
- Reddy D.N., Al-Rajab A.J., Sharma M., Moses M. M., Reddy G.R. & Albratty M. (2017). Chemical constituents, *in vitro* antibacterial and antifungal activity of *Mentha × Piperita L* (peppermint) essential oils, *Journal of King Saud University – Science*, 31(4) : 528-533.
- Reddy P.S.S.B.V.V., Reddy G.B. & Rao K. G. N. S. (2023). Determination of Nitric Oxide and Its Metabolites in Biological Samples in Nitric Oxide and Its Role in Biology, Springer Nature Singapore, Singapour, Singapour, 41-55.

- Rena G., Grahame HD2 & Ewan RP (2017). Les mécanismes d'action de la metformine. *Diabétologie*, 60 :1577-1585.
- Saad B., Azaizeh H., Ghassa A. H. & Said O. (2006). Safety of traditional Arab herbal medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(4): 433-439.
- Sabina E.P., Rasool M.K. & Mathew L. (2009). *In vivo* and *in vitro* immunomodulatory effects of indian ayurvedic herbal formulation triphala on experimental induced inflammation. *Pharmacologyonline*, 2 : 840-849.
- Saghir AJ, Sohail A. & Muhammad Q. (2011). Effet hypoglycémiant du gingembre (*Zingiber officinale*) chez les rats diabétiques induits par l'alloxane (*Rattus norvegicus*). *Pakistan Veterinary Journal*, 31(2) : 160-162.
- Salehi B., Kumar N. V. A., Sener B., Sharifi-Rad M., Mahadyg B., Vlaisavlievic S. Iriti M., Kobarfard F., Ayatollahi S. T., Javad A. A & Sharifi Rad (2018). Medicinal Plant Used in the Treatment of Human Immuno deficiency Virus International. *Journal of Molecular Sciences* 19 (5) : 1459.
- Samanta T., Cheeni V., Das S., Roy, A. B., Ghosh B. C. & Mitra A. (2015). Assessing biochemical changes during standardization of fermentation time and temperature for manufacturing quality black tea. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5) : 2387-2393.
- Sarawoot P. & Chuchard P. (2023). Biochemical and Histological Study of Rat Liver and Kidney Injury Induced by Cisplatin. *Journal of Toxicopogic Pathology*, 15 : 26(3) :293–299.
- Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K. M. & Latha L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1): 1-10.
- Savikin K., Menković N., Zdunić G., Stević T., Radanović D. & Janković T. (2009). Antimicrobial activity of *Gentiana lutea* L. extracts. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 64(5-6): 339–342.
- Scaglione F., Ferrara F., Dugnani S., Falchi M., Santoro G. & Fraschini F. (1996). Immunomodulatory effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 22(2): 65-72.
- Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 : 3875-3883.

- Scipioni R.L., Diters R.W., Myers W.R. & Hart S.M. (1997). Clinical and clinicopathological assessment of serial phlebotomy in the SpragueDawley rat. *Laboratory Animal Science*, 47(3) : 293-299.
- Serra A.T., Rocha J., Sepodes B., Matias A.A. & Feliciano R.P. (2012). Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple Varieties-Correlation of response with composition. *Food Chemistry*, 135 : 2378-2386.
- Shanshan W., Ting W., Qi C., Xue C., Zhiyong C. & Zhenzhen Z. (2022). Anti-inflammatory effects of Torin2 on lipopolysaccharide-treated RAW264.7 murine macrophages and potential mechanisms. *Heliyon*, 8 : 1-8.
- Sharangi, A. (2009) Medicinal and Therapeutic Potentialities of Tea (*Camellia sinensis* L.) A Review. *Food Research International*, 42 : 529-535.
- Shi J., Yang G., You Q., Sun S., Chen R., Lin Z., Simal Gandara J. & Lv, H. (2021). Updates on the chemistry, processing characteristics, and utilization of tea flavonoids in the last two decades (2001–2021). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(20) : 4757-4784.
- Shidfar F., Rajab A., Rahideh T., Khandouzi N., Hosseini S. & Shidfar S. (2015). Effet du gingembre (*Zingiber officinale*) sur les marqueurs glycémiques chez les patients atteints de diabète de type 2. *Journal of Complement Integrative Medicine*, 12(2): 165–170.
- Shirwaikar A. & Somashekar AP (2003). Études sur l'activité anti-inflammatoire et la capacité de piégeage des radicaux libres *Aristolochia bractéolate* Lam., *Journal indien des Sciences Pharmaceutiques*, 65(1) : 67-69.
- Shono T., Okahara M., Ikeda I., Kimura K. & Tamura H., (1982). Sodium-selective PVC membrane electrodes based on bis (12-crowns-4). *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 132: 99-105.
- Shui G & Leong L. P (2002) An investigation of antioxydant capacity of fruit in Singapore market. *Food Chemistry*, 76 : 69-75.
- Siby S. (2008). Study of the variation in biochemical and haematological parameters in the district of Bamako. State Thesis in Medicine. Faculty of Medicine, Pharmacy and Odonto-Stomatology, Bamako University, Mali, 77 p.
- Singh R., Shushni M.A.M. & Belkheir A. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale* (Ginger) and *Mentha piperita* (Peppermint). *Food and Chemical Toxicology*, 62: 296-304.

- Singh V.K & Singh D.K (2008). Pharmacological effects of garlic (*Allium sativum L*). *Annual Review of Biomedical Sciences*, 10: 6-26.
- Soong Y., Rong J. L., Yu T. Y., Jun Y. L. & Chung Y. C. (2011). A new phenylalkanoïd from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Natural Product Research*, 26: 1318-1322.
- Soro L.C. (2016). Caractérisation biochimique et activités biologiques des feuilles de *Lippia multiflora* Verbenaceae "théier de savane" cultivées en milieux forestiers et savanicoles de Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat de Nutrition et Sécurité Alimentaire, Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire, 204 p.
- Spelman K., Burns J., Nichols D., Winters N., Ottersberg S. & Tenborg M. (2006). Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review*, 11(2): 128-150.
- Statista. (2021). Consumer market share in Asia as percentage of global consumption and value of Chinese consumer market in 2021
- Stone H. & Sidel J. L. (2004). Sensory evaluation practices. *Elsevier Academic Press*, London, U.K, 290 p.
- Sugahara S., Ueda Y., Fukuhara K., Kamamuta Y., Matsuda Y., Tatsuro M. Yasuhiro K., Kiyotaka K., Masateru O., Keiji I. & Shin Y. (2015). Antioxidant effects of herbal tea leaves from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on multiple free radical and reducing power assays, especially on different superoxide anion radical generation systems. *Journal of Food Sciences*, 80 (11): C2420-C2429.
- Sulaiman N.L., Hashim Z.M.N., Nasir A.F.M., Nazmi M.F.M., Nordin N.N. & Jamil S.K.A.N. (2023). Total Flavonoid Content Determination by Aluminium Chloride Colorimetric Method *In* Bioactive Compounds: Synthesis, Characterization and Pharmaceutical Applications. Springer, Singapore, Singapour; Singapour, pp 23-28.
- Sun L. M., Wang J. J., Song H. L. & Li X. M. (2009). Immunomodulatory effect of polysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *International Immunopharmacology*, 9(4), 383-389.
- Sun Y., Hu X. & Li W. (2017). Antioxidant, antitumor and immunostimulatory activities of the polypeptide from *Pleurotus eryngii* mycelium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97 : 323-330.
- Tabuti J. R. S., Lye K. A. & Dhillon S. S. (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda : plants, use and administration. *Journal Ethnopharmacology*, 88 : 19-44.

- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. & Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxydant activities of the essential oil and variouse extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90 :333-340.
- Thakur R. S. & Devaraj E. (2020). *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. triggers oxidative stress mediated apoptosis via intrinsic mitochondrial pathway in HepG2 cells. *Environmental Toxicology*, 35(11): 1225-1233.
- Theerawat D., Nisachon J., Rina P., Jureerut D., Sirinan K., Jrringjai A., Komsorn L. & Sakda D. (2025). Criblage d'extraits aqueux de plantes pour leurs effets immunomodulateurs sur les cellules immunitaires et la production de cytokines : analyses *in vitro* et *in vivo*. *Héliyon*,11 : 1-11.
- Thoppil R. J. & Bishayee A. (2011). Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World Journal of Hepatology*, 3(9) : 228-249.
- Thorup I., Wurtzen G., Carstensen J. & Olsen P. (1983). Short term toxicity study in rats dosed with peppermint oil. *Toxicology Letters*, 19(3): 211-215.
- Torres R., Francesca F., Brenda. M., Francisco U., Cecilia L. & Juan G. (2006). Antioxydant activity of coumarins and flavonols fom the resinous exudates of *Haplopapus multifolius*. *Phytochemistry*, 67 (10) : 984-987.
- Trease G.E. & Evans W.C. (2002). Pharmacognosy. 15th Edition, Saunders Publishers, London, 393 p.
- Tshivhandekano I., Ntushelo K., Ngezimana W., Thilivhali E.T. & Fhatuwani N.M. (2014). Chemical composition and antimicrobial activities of *Athrixia phyllicoides* DC. (bush tea), *Monsonia burkeana* (special tea) and synergistic effects of both combined herbal teas. *Asian Paciffic Journal of Tropical Medicine*, 7(S1): S448-S453.
- Tucker A.O. & Naczi R.F.C. (2007). *Mentha*: An overview of its classification and relationships. Lawrence M.M., Mint: The Genus *Mentha*. Medicinal and Aromatic plants, CRC Press, Cleveland, USA, 1-39.
- Tullayakorn P., Vithoon V., Veerachai E., Smarn T., Wanna C., Arunporn I. & Kesara N. (2012). Cytotoxicité, toxicité et activité anticancéreuse du *Zingiber Officinale* Roscoe contre le cholangiocarcinome. *Revue Asie-Pacifique de prévention du cancer*, 13 : 4597-4606.
- Turan S. & Kennedy J. F. (2002). Production and processing of teas A review. *Carbohydrate Polymers*, 47(3) : 263-271.

- UKPDS (Groupe d'étude prospective sur le diabète du Royaume-Uni) (1998). « Contrôle glycémique intensif par sulfamides hypoglycémisants ou insuline comparé au traitement conventionnel et risque de complications chez les patients atteints de diabète de type 2 » (UKPDS 33). *Lancet*, 352 (9131): 837-853.
- Umesha S., Marahel, S. & Aberomand, M. (2014). Antioxidant and antidiabetic activities of medicinal plants: a short review. *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology*, 3(1): 40-53.
- Valero M. S., Berzosa C., Langa E., Gómez-Rincón C. & López V. (2013). *Jasonia glutinosa* D.C (“Rock tea”): botanical, phytochemical and pharmacological aspects. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12 (6) : 543-557.
- Van-Andel T. & Fundiko M.C. (2016). The trade in African medicinal plants in Matonge-Ixelles, Brussels (Belgium). *Economic Botany*, 70(1): 64-75.
- Veer M., Patil M., Shewale M. & Nikam R. (2025). Formulation and evaluation of dispersible polyherbal immunity booster green tea tablets. *International Journal of Biology, Pharmacy and allied Sciences*, 14(1): 18-26.
- Víctor E.V.L.T., Juana E.C.F., Carmen R.S.C., Abhel A.C.P., Cinthya L.A.V., Julio H.V., Maria J.A.V., César D.G.S., Yuri F.C.V., Marco L.S.C., Icela M. R.H., Flor S.L., Renato C.V. & José L. C.R. (2024). Evaluation of the acute toxicity of the ethanolic extract of the Rhizome of *Zingiber officinale* Roscoe in Rats. *Pharmacognosy Journal*, 16(2): 323-331.
- Wan C., Wang C., Wang Y., Xu J., Tang X., Xiang Y., Zhao X. & He X. (2017). Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by flavonoids isolated from *Ampelopsis grossedentata* and their structure–activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(36) : 7706–7713.
- Wang D., Wang L., Jin Y. & Hu D. (2015). Vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) and its major bioactive compound dihydromyricetin : Review on their chemistry, bioactivity, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 16 : 88-103.
- Welch C., Zhen J., Bassène E., Ilya R., James E.S. & Qingli W. (2018). Bioactive polyphenols in Kinkéliba tea (*Combretum micranthum*) and their glucose-lowering activities. *Journal of Food Drug Analysis*, 26: 487-496.
- Wood J.E., Senthilmohan S.T. & Peskin A.V (2002). Antioxydant activity of procyanidin containing plant extracts at different pH. *Food Chemistry*, 77(2) : 155-161.

- Wu K. K. & Huan Y. (2008). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*. 5471-54714.
- Wüpper S., Lüersen K. & Rimbach G. (2020). Chemical Composition, Bioactivity and Safety Aspects of Kuding Tea-From Beverage to Herbal Extract. *Nutrients*, 12(9) : 1-19.
- Xue G., Xue L., Ying X., Mingyue J. & Minhui L. (2020). Effects of phytochemicals from plant-based functional foods on hyperlipidemia and their underpinning mechanisms. *Trends in Food Science and Technology*, 103: 304-320.
- Yadav R., Singh R. & Gupta R. (2011). Study of immunomodulatory effect of *Zingiber officinale* in albino rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(6): 1520-1523.
- Yahya A., Syed S.A., Rupesh K.M., Salahuddin M.D., Bharathi D.R., Mohammed M.A., Syeda A.F. & Mohamed R. (2023). Synergistic antihyperglycemic and antihyperlipidemic effect of polyherbal and allopolyherbal formulation. *Pharmaceuticals*, 16(10) : 1-18
- Yapo A. F., Brou K. A., Souleymane M. & Yao D.J (2020). Études de toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait aqueux de feuilles de *Lippia multiflora* de la région du Béliér (Côte d'Ivoire). *Revue Asiatique de Recherche Emergente*, 2(1) : 43-53.
- Yoo H. H. & Park J. H. (2012). Effects of curcumin on the production of interleukin-10 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 607–613.
- Yuchao L., Chunyan G., Erhuan Z., Ruyu S., Qian L., Min Z., Keyong Z. & Minhui L. (2023). Review on herbal tea as a functional food: classification, active compounds, biological activity, and industrial status. *Journal of Future Foods*, 3(3): 206-219.
- Yuerong L., Ying W., Jianliang L. & Lingyun Z. (2010). Application of chemical composition and infusion colour difference analysis to quality estimation of jasmine-scented tea, *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 459-468.
- Zhang G. M., Guo X. X. & Zhang G.M. (2017). Limiting the testing of urea: Urea along with every plasma creatinine test? *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 31(5): e22103
- Zhao R., Chen X., Shen L. & Xu W. (2019). Protective effect of *Lycium barbarum* leaf flavonoids on type 2 diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*, 236: 183-192.
- Zhao X., Wang Q., Qian Y. & Song J.-L. (2013). *Ilex kudingcha* C.J. Tseng (Kudingcha) has *in vitro* anticancer activities in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells and exerts anti-metastatic effects *in vivo*. *Oncology letters*, 5: 1744-1748.

- Zhihong C., Walid J., Karl B.S., Kenneth T.F., Ranjan D., Xinghua Y., Grahame J.K., Cornelia C.B., Stephen A.S. & Bruce D.T. (2012). *Journal of Neurosciences*, 32(34): 11706-11715.
- Zhu K., Li G., Sun P., Wang R., Qian Y. & Zhao X. (2014). *In vitro* and *in vivo* anti-cancer activities of Kuding tea (*Ilex kudingcha* C.J. Tseng) against oral cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7 (3): 709-715.
- Zirihi D.G., Kra A.K.M., Guédé-Guina F. & Bahi C. (2003). Évaluation de l'activité antifongique des extraits de *Mitragyna ciliata* sur des souches de *Candida albicans* résistantes aux antifongiques. *Revue Africaine des Médecines Traditionnelles, Complémentaires et Alternatives*, 1(1) : 67-73.

# **ANNEXES**

## Test Hédonique

### Fiche de notation pour les tests hédoniques

#### TEST D'ACCEPTANCE

Nom :

Séance N°

Date :

Prénom :

Code de l'échantillon n°

Tranche d'âge :  20-30  30-40  0-60 :

Sexe

F

M

**Instructions:** goûtez le produit servi et cochez le numéro correspondant à votre impression.

- 1. Extrêmement désagréable
- 2. Très désagréable
- 3. Désagréable
- 4. Assez désagréable
- 5. Ni, désagréable ni agréable
- 6. Assez agréable
- 7. Agréable
- 8. Très agréable
- 9. Extrêmement agréable

## **PUBLICATIONS**

### **ARTICLE 1 :**

N'dri Q. E., Kporou K., Ekissi A C., Choho M. F., Djadji A. T. L. & Kouakou G.S. (2023). Sensory analysis and physicochemical parameters of three "teas" formulations obtained from aromatic plant powders from côte d'ivoire. *Journal of advances in food science & technology* 10 (4): 129-137.

### **ARTICLE 2 :**

N'Dri Q. E., Kporou K. E., Ouattara S., Beugré A. G. M. & Kouakou-Siransy, G. (2024). Phytochemical Screening and Safety Assessment of a Polyherbal Tea Formulation of *Lippia Multiflora*, *Zingiber Officinale* and *Mentha Piperita*. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 36(11), 29–40.

### **ARTICLE 3 :**

N'Dri Q. E., Kporou K. E., Ouattara S., Beugré A. G. M. & Kouakou-Siransy. G. (2025) Quantification des métabolites spécialisés, activités anti radicalaire et immunostimulante d'un thé codé « THE » formulé à partir d'essences aromatiques de la Côte d'Ivoire. *Revue RAMReS-Série Pharmacie – Médecine Traditionnelle Africaine*, 24(1) : 117-125

# **ARTICLE 1**



# Sensory Analysis and Physicochemical Parameters of Three "TEAS" Formulations Obtained from Aromatic Plant Powders from Côte d'Ivoire

N'dri Quesnelle Epiphanie <sup>a\*</sup>, Kporou Kouassi Elisée <sup>a</sup>,  
Ekissi Alice Christine <sup>b</sup>, Choho Meney Frederic <sup>a</sup>,  
Djadji Ayoman Thierry Lenoir <sup>c</sup>  
and Kouakou Gisèle-Siransy <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Agrovalorization Laboratory, Research Group on Traditional Pharmacopoeia Products (GeRProPhaT), UFR Agroforestry, Jean Lorougnon Guédé University, BP.150 Daloa, Côte d'Ivoire.

<sup>b</sup> Agrovalorization Laboratory, Biochemistry and Food Technologies Team, Jean Lorougnon Guédé University, BP. 150 Daloa, Côte d'Ivoire.

<sup>c</sup> Laboratory of Clinical and Therapeutic Pharmacology, UFR of Pharmaceutical and Biological Sciences, Félix Houphouët-Boigny University, BP.1679, Abidjan, 22, Côte d'Ivoire.

## Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. All authors read and approved the final manuscript.

## Article Information

DOI: 10.56557/JAFSAT/2024/v11i18480

Original Research Article

Received: 24/10/2023

Accepted: 30/12/2023

Published: 30/12/2023

## ABSTRACT

The use of plants by humans for their nutritional, health and wellness needs dates back to ancient times. This trend has increased to date with the boom in the tea/tisane market. The aim of this project is to gather scientific data on three 'teas' formulations obtained from aromatic plant resources commonly used in food. For this purpose, the species *Lippia multiflora*, *Hibiscus sabdariffa*, *Zingiber officinale* and *Adansonia digitata* were harvested, processed into powders and

\*Corresponding author: E-mail: quesnellendri15@gmail.com;

then combined two by two in precise proportions, keeping *L. multiflora* as the species common to the different formulations. A sensory analysis using the hedonic test was carried out on each of the formulations by a panel of tasters, and then some physico-chemical parameters of these formulations were determined. All three formulations were appreciated by the tasters.

"However, the TEA 3 formulation "*L. multiflora* + *Z. officinale*" was the most popular. The pH values of the formulations ranged from 3.5 to 7.5. The ash content ranged from 7% to 10%. The total polyphenol content ranged from 12 to 17 mg gallic acid equivalent/g and the total flavonoid content ranged from 15 to 20 µg quercetin equivalent/g. Concentrations of total sugars and reducing sugars expressed as mg glucose equivalent/g ranged from 10 and 20.36 and 0.2 and 0.46, respectively. Fat content (%) varied from 3.5 to 4.6.

The formulated TEAS contain compounds of therapeutic and nutritional interest that could enter the nutraceutical market in Côte d'Ivoire for the well-being of consumers.

**Keywords:** TEA; formulation; vegetable powders; aromatic.

## 1. INTRODUCTION

Human use of plants for food, health and well-being dates back to ancient times. Currently, WHO estimates that more than 80% of the population in sub-Saharan Africa depends on wild plants for various needs [1,2]. Some of these species are commonly used in food in the form of non-alcoholic drinks (juices), condiments and infusions (teas or herbal teas) for their various properties (digestive, anti-fatigue, relaxing, energizing, insomnia, analgesic, etc.). These plants are freely available to the public [3].

In Côte d'Ivoire, plants such as *Adansonia digitata* (Bombacaceae), *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae), *Lippia multiflora* (Verbenaceae), *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) and many others are widely consumed by the population for their various benefits to the body. The powder of *A. digitata*, known as baobab, is reputed for its nutritious and slimming properties (reference). *H. sabdariffa* is consumed in a juice called "bissap" for its role in treating excess blood cholesterol, sleep disorders and constipation (Reference). *L. multiflora* or savannah tea is known for its relaxing and analgesic properties, and *Z. officinale* is consumed in a juice called "gnamankoudji" for its effects on digestion, vomiting and inflammation [4,5,6].

As global consumption of teas and herbal teas was increasing and estimated at nearly 4.1 billion liters in 2016 [7]. It is therefore clear that more and more people have a great interest in drinking tea/tisanes thanks to its health benefits. Processing Ivorian aromatic plants into ready-to-use teas or herbal teas would contribute to the development of an economically viable value chain for the country,

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Plant material

The plant material consists of *Lippia multiflora* leaves, *Hibiscus sabdariffa* flowers, *Zingiber officinale* rhizomes and *Adansonia digitata* seeds harvested in November 2019 in the Poro region (Korhogo, Côte d'Ivoire).

### 2.2 Methods

#### 2.2.1 Preparing plant powders

The leaves of *L. multiflora*, the flowers of *H. sabdariffa*, the rhizomes of *Z. officinale* and the seeds of *A. digitata* were harvested, cut, washed, sorted and dried in the shade for 7 days. The dried organs were then ground and sieved to obtain fine powders.

#### 2.2.2 Formulation of TEAS

To formulate the different TEAS, the plant powders were paired together using *L. multiflora* as the base species, as follows:

TEA 1 is a blend *L. multiflora* and *H. sabdariffa*  
TEA 2 is a blend *L. multiflora* and *A. digitata*  
TEA 3 is a blend *L. multiflora* and *Z. officinale*

The aromatic essences were combined in specific proportions (X, Y and Z) to create a unique flavor from each combination.

#### 2.2.3 Sensory analysis

Hedonic tests were used to determine the acceptability of the TEAS formulation. The tests

were conducted over two sessions, with approximately sixty untrained individuals recruited based on their availability and knowledge of teas and herbal teas. Each assigned three random numbers, were presented to each taster one at a time. The acceptability of each sample was rated on a 1 to 9 point hedonic scale [8]. The scale also included intermediate values of unpleasantness and pleasantness, ranging from very unpleasant to quite unpleasant and from quite pleasant to very pleasant. The taster was required to rinse their mouth after each taste and rate the samples on a scale from 1 to 9, with 1 being extremely unpleasant and 9 being extremely pleasant. The taster is required to rinse his/her mouth after each taste. The hedonic tests were conducted at Jean Lorougnon Guédé University (Daloa, Côte d'Ivoire).

#### 2.2.4 Physico-chemical properties

##### *Determining the pH*

The pH measurement was carried out from each tea bag (TEA 1, TEA 2 and TEA 3). Samples were prepared in 150 mL of preheated distilled water. The pH was determined using a HANNA HI 8010 pH meter by inserting directly the electrode into the samples.

##### *Determination of ash content*

Total ash is the residue of mineral compounds remaining after combustion of organic substances in a sample of animal or plant origin. The ash is determined according the AOAC [9] method using a quantity of 1g of each sample taken and placed in the tared crucible. The mass of the crucible + sample is recorded as Mce. The assembly was then placed in a 19-muffle furnace (Nabertherm) at 550°C for four hours. At the end of the combustion time, the assembly was removed from the furnace and placed in a desiccator to cool; the sample was then weighed. The ash content is determined by the following formula:

(Formula 1)

$$\text{Ash content (\%)} = (\%) \frac{M_{ce} - M_{cv}}{M_{cc} - M_{cv}} \times 100$$

$M_{cc}$  = Mass of crucible + ash (g)

$M_{cv}$  = Mass of empty crucible (g)

$M_{ce}$  = Mass of crucible + sample (g)

##### *Determination of reducing sugars*

Quantification of reducing sugars was performed according to the method of Bernfeld [10]. To a

one milliliter (1 mL) volume of an ethanolic extract of the sample placed in a test tube, a 0.5 mL volume of distilled water and a 0.5 mL volume of dinitrosalicylic acid (DNS) were successively added. The mixture was heated in a water bath boiling for 5 minutes and, after cooling, 5 mL of distilled water was added. The optical density was read at 540 nm against a blank. A calibration range with 0.1 mg/mL glucose solution was used to quantify reducing sugars. Assays were performed in triplicate.

##### *Determination of total soluble sugars*

The determination of total soluble sugars was carried out according to the method of Dubois et al [11]. After extraction with ethanol 80°G.L (Gay Lussac) of the free sugars contained in 5 g of each sample, purification was carried out with solutions of lead acetate (10%) and oxalic acid (10%). The solution obtained was evaporated on a sand bath and made up to 25 mL with distilled water. One milliliter (1 mL) of the previous sugar solution was taken and 1 mL of phenol (5%) and 5 mL of concentrated sulfuric acid (94-97%) were added successively. After cooling to room temperature, the reading was made at a wavelength of 490 nm using a Hach: DR 1900 spectrophotometer against a standard range of 0 to 80 µg glucose. Assays were performed in triplicate.

##### *Determining lipid content*

The lipid content of each sample was determined by Soxhlet hexane extraction for 6 hours at 69-70°C (AOAC, 1995). Ten (10 g) grams of sample were weighed using an analytical balance (OHAUS, model: PA2102C) and then placed in a Kumagawa cartridge (cellulose cartridge). Lipids were extracted from the sample using 300 ml of hexane. Hexane was used to recover all lipids. After total evaporation of the solvent using the Rotavapor IKA HB 10 basic, the extraction flasks were recovered and dried in an oven (MEMMERT 854 SCHWABACH, Germany) at 105°C for 10 min. The difference between the initial and final mass of the balloons corresponds to the lipid content. The lipid content was determined using the following expression:

(Formula 2)

$$\text{Lipid content (\%)} = \frac{B_{v1} - B_{v0}}{PEO} \times 100$$

$B_{v1}$  = Mass of flask + lipid after evaporation of excess solvent (in g)

$B_{v0}$  = Mass of empty flask (in g)

$PEO$  = Test weight (in g)

### Determination of total polyphenol content

Total polyphenols were determined by the modified method described by Wood et al. [12]. The principle is based on the reduction of Folin-Ciocalteu reagent during the oxidation of polyphenols. A 100 µL volume of each powder solution placed in a 25 mL flask was added to a 1 mL volume of Folin-Ciocalteu reagent (diluted 1:10). After 2 min, 2 mL of 20% (w/v) sodium bicarbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) was added. The resulting solution was kept in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance of each solution was then read using a JASCO UV- 530 visible UV spectrometer at 760 nm against a control in which the sample was replaced with double-distilled water. Calibration was performed using a gallic acid extract at different concentrations (0 to 0.5 g/L). Measurements were repeated three times. The phenolic content of each sample was calculated from the calibration curve and expressed as mg gallic acid equivalent/g extract.

### Determination of total flavonoid content

The method of Marinova et al. [13] was used to determine the total flavonoids in the samples. In a 25 mL flask, 0.75 mL of 5% (w/v) sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) was added to 2.5 mL of sample. The homogenized mixture was added to a volume of 0.75 mL of 10% (w/v) aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>), and the entire solution was incubated for 6 minutes in the dark. After incubation, 5 mL of sodium hydroxide (NaOH, 1N) and 25 mL of

distilled water were added. The mixture was stirred manually before assaying with a UV-visible spectrophotometer. Readings were taken at 510 nm. Assays were performed in triplicate. Flavonoid content was expressed as micrograms quercetin equivalents per gram extract (µg QE/g).

## 2.3 Statistical Analysis

The mean and standard deviation were calculated for each parameter evaluated. Student's t-test was used to compare the means obtained according to the different TEAS. The difference between the values of a parameter with a p-value < 0.05 was considered statistically significant.

## 3. RESULTS

### 3.1 Formulation of the Different TEAS

**TEA 1:** X1% *L. multiflora* and X2% *H. sabdariffa*

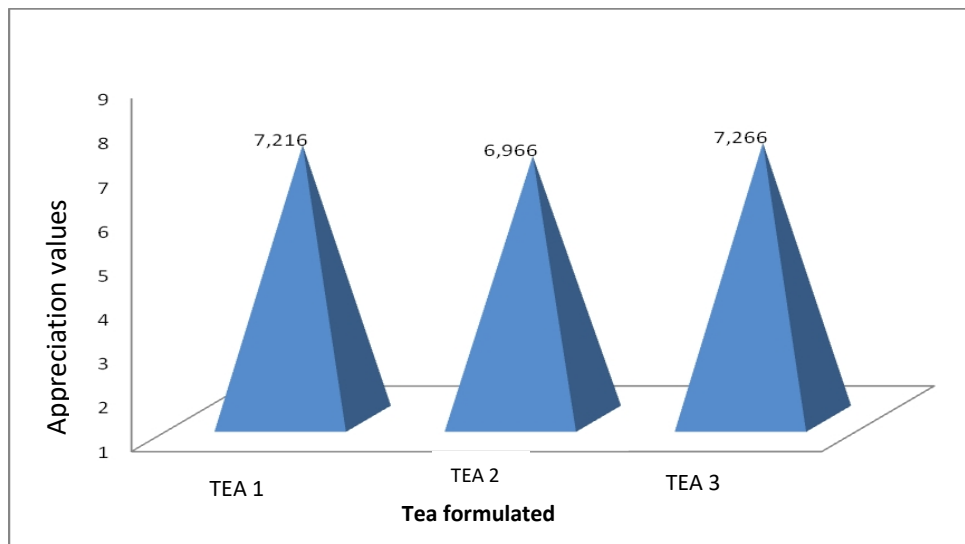
**TEA 2:** Y1% *L. multiflora* and Y2% *A. digitata*

**TEA 3:** Z1% *L. multiflora* and Z2% *Z. officinale*

This formulation was chosen after several trials to obtain a tea that combines a unique, distinct flavor derived from the associated aromatic essences.

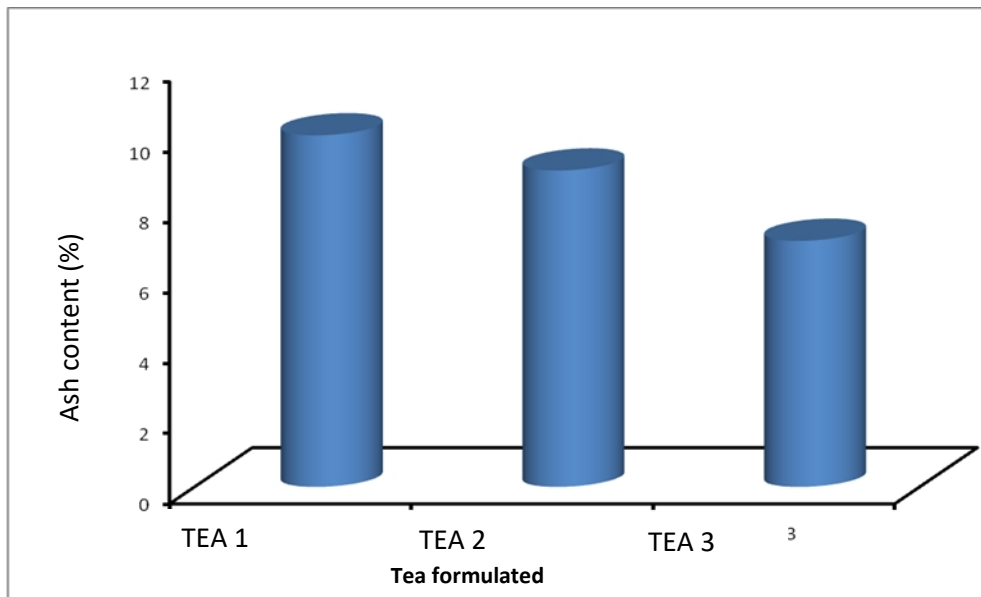
### 3.2 Sensory Evaluation

The data for the hedonic test are shown in Fig. 1.

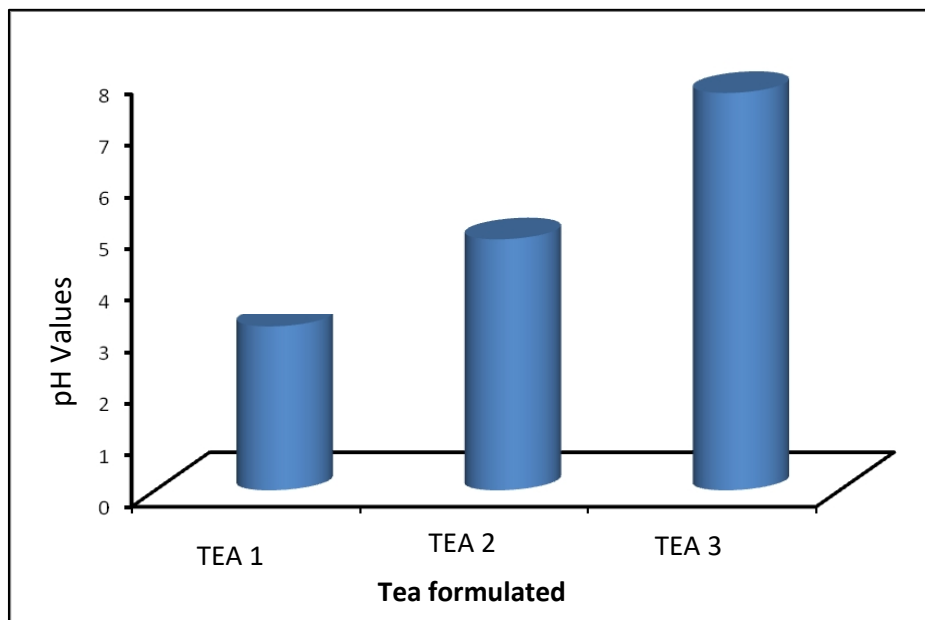


**Fig. 1. Histograms of assessment values for different TEAS**

The hedonic test showed that the different TEAS had rating values around 7. The formulated TEAS had a rating score around 7 on the rating scale



**Fig. 2. Histograms of TEAS ash content**  
*The ash content of TEA 1, TEA 2 and TEA 3 is 10%, 9% and 7% respectively*



**Fig. 3. Histograms of pH values for TEAS**  
*TEAS 1 and 2 have pH values <7 while TEA 3 has a pH > 7. The differences between these values are statistically different*

### 3.3 Physico-Chemical properties

The ash content and pH of the different TEAS formulations were evaluated. The data from this evaluation are shown in Figs. 2 and 3.

The contents of total polyphenols, total flavonoids, total sugars, reducing sugars and fat content are shown in Table 1. In this table, TEAS

1 and 2 have statistically identical levels of total polyphenols and flavonoids; and these levels are higher than those of TEA 3. In addition, in descending order, the concentrations of total sugars are higher in TEA 2, then in TEA 1 and finally in TEA 3, while for reducing sugars, these values are almost identical in TEAS 1 and 2 and higher than in TEA 3. Finally, TEAS 1 and 3 are richer in fat than TEA 2.

**Table 1. Content of some chemical compounds in formulated TEAS**

	TEA 1	TEA 2	TEA3
Total polyphenols (mg Gallic acid eq/g)	16,8 ± 0,282a	15,667 ± 0,286a	12,767 ± 0,694b
Total flavonoids (µg Eq Quercetin/g)	20,06 ± 0,601a	20,1 ± 0,725a	15,8 ± 0,216b
Total sugars (mg Glucose eq/g)	18,1 ± 0,244a	20,36 ± 0,249b	10 ± 0,408c
Reducing sugars (mg Glucose eq/g)	0,4 ± 0,000a	0,46 ± 0,047b	0,2 ± 0,000c
Fat content (%)	4,6 ± 0,081a	3,567 ± 0,262b	4,567 ± 0,205a

For a row in the table, identical superscripts indicate that there is no significant difference between the values, while different superscripts indicate that there is a significant difference

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Formulation of TEAS

Three TEAS were formulated based on 4 aromatic plant species. The selection of species was based on the aromas they give off, their daily use in the diet of the Ivorian population in the form of herbal teas or juices and the specific health benefits that each of these species could bring as added value.

*Lippia multiflora*, also known as savannah tea, savannah tea bush or Gambia tea, is known to the people of northern, central and eastern Côte d'Ivoire, who use it in infusions as an anti-fatigue drink and to treat insomnia, fever, hypertension and liver disease [14,1,15]. In addition, a number of biological and pharmacological studies conducted on this plant have shown that it has relaxing and analgesic properties, as well as antioxidant properties [16]; hepatoprotective [17]. Hypotensive [18] and many other activities. The known and studied therapeutic virtues of *L. multiflora* and its common consumption as an infusion in urban and rural environments have led to the choice of this plant as the base essence for all formulations.

*Hibiscus sabdariffa* is a plant known in West Africa for its use in the production of a juice commonly known as "Bissap". This plant has important therapeutic properties, including the treatment of hypercholesterolemia, insomnia, arterial hypertension and constipation [19,20]. This plant was chosen for the formulation of TEA1 because of its widespread popularity among the population and the benefits it is thought to have.

*Adansonia digitata* or Baobab is a species of plant found in various regions of Africa whose fruits contain edible seeds. These seeds, usually ground into a powder, have beneficial health properties, including nutritive (rich in vitamins C and B6 and minerals K+, Mg2+ and Ca2+),

slimming (rich in fiber), blood sugar regulating, antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, immunomodulating and digestive [21,22,2]. The choice of this plant in the formulation of TEA 2 is explained by its widespread use in food and cooking by the Ivorian population and by its extensively studied pharmacological properties.

*Zingiber officinale* is also a well-known plant in West Africa. It is used to make a non-alcoholic drink commonly known as "Gnamankoudji" which is commonly consumed during various ceremonies. The drink is made from the rhizomes are known for their pungency. The rhizomes are known for their pungent taste and possess a variety of properties, including anti-diabetic, antioxidant, anti-inflammatory, antispasmodic, antimicrobial, antiemetic and antitumor properties [23,3,24]. The choice of this plant in the formulation of TEA 3 is also based on its popularity and the therapeutic virtues associated with it.

All plants used in the formulation of the different TEAS are known to be commonly consumed plants with proven biological and pharmacological properties.

The different formulations obtained with proportions X1/X2 (TEA1); Y1/Y2 (TEA 2) and Z1/Z2 (TEA 3) were selected on the basis of a series of tests offered for tasting to different consumers. The proportions chosen for the formulations were therefore determined by the tasters' evaluations, but also by the desire to distinguish two mixed aromas for each TEA.

### 4.2 Sensory Analysis

The hedonic test was used to determine the acceptability of the 3 formulated teas. The test showed that these teas were considered pleasant by the panel of tasters. This evaluation could be due to the chemical composition of the tea's aromas, since aroma is a very important aspect of quality that determines the acceptance

or rejection of the tea before it is tasted. This assessment implies that the tea would be accepted by consumers and could well enter the market segment of herbal teas and teas competing with already known products. In fact, Stone and Sidel [25] and [8] reported that a product that passed the 7 (pleasant) mark in a hedonic test is a product that could establish itself in the market among consumers. This test showed that on the acceptability scale, TEA 3 would be better positioned in the market than TEA 1, which would be better positioned than TEA 2.

### 4.3 Physico-chemical Properties

The ash content of TEAS 1 and 2 is almost identical, while that of TEA 3 is lower than the first two. In addition, TEAS 1 and 2 have a pH < 7, so they are acidic, whereas TEA 3 has a pH > 7, so it is basic. The ash content is therefore inversely proportional to the pH. Combining these two physico-chemical parameters, this result means that TEAS 1 and 2 are rich in acidifying mineral elements (chlorine, sulfur and phosphorus), while TEA 3 is rich in basifying mineral elements (magnesium, calcium, sodium and potassium), as noted by Florence [26].

In terms of total polyphenols, total flavonoids, reducing sugars and total soluble sugars, TEAS 1 and 2 have higher levels than TEA 3, while the latter has a higher lipid content than the former 2. The presence of phytochemicals such as flavonoids and polyphenols in formulated TEAS could be the source of the antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities attributed to the plant species used in their formulation, as shown by (2003); Alarcón et al. [16] and Rita et al. [17]. The presence of these compounds in the different TEAS would allow them to have a beneficial effect on the health of consumers in the prevention of certain pathologies, namely cardiovascular diseases, cancer and neurodegenerative diseases [16]. In addition, the presence of sugars (carbohydrates) and fats (lipids) in these formulations could explain their energetic value. Drinking these hot beverages throughout the day would provide energy and combat fatigue, carbohydrates and fats are known to be energy-providing foods [27]. In addition, the low levels of these two elements in TEAS suggest that they could be easily consumed by people suffering from hyperglycemia and obesity without fear of raising blood sugar and cholesterol levels [28].

## 5. CONCLUSION

In this study, four aromatic plant essences were used in the preparation of three TEAS. *Lippia multiflora* essence was used as the basis for the formulation of the teas: TEA 1 (*L. multiflora* + *H. sabdariffa*), TEA 2 (*L. multiflora* + *A. digitata*), and TEA 3 (*L. multiflora* + *Z. officinale*). The hedonic test showed that these teas were rated as pleasant and that TEA 3 and TEA 1 were the most appreciated by the panelists. The physicochemical parameters of the different teas showed that these teas have both therapeutic and nutritional values and could easily enter the nutraceutical market segment.

## COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

## REFERENCES

1. Dibong SD, Mpondo ME, Nigoye A, Kwin MF, Betti JL. Ethnobotany and phytomedicine of medicinal plants from Douala, Cameroon. J. Appl. Biosci. 2011;37:2496-2507. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v5i3.72227>
2. Samatha T, Chandrakala G, Thirupathi K, Rama SN. In vitro free radical scavenging activity of different extracts of *Adansonia digitata* L. Int. J. Environ. Agric. Biotech. 2017;2(3):1169-1172. DOI: <http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/2.3.21>
3. Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A. Variation of the Phytochemical constituents and antioxidant activities of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade associated with different drying methods and polyphenol oxidase activity, Molecules. 2016;21(6):1-12. DOI:<https://doi.org/10.3390/molecules21060780>
4. Bouquet A, Debray M. Medicinal plants of the Ivory Coast. Works and Documents of ORSTOM, Paris, France. 1974;231.
5. Ekissi AC, Konan A, Yao-Kouamé A, Bassirou B, Kati-Coulibaly S. Evaluation of the chemical constituents of savannah tea (*Lippia multiflora*) leaves. J. Appl. Biosci. 2011;42:2854-2858. DOI: <http://m.elewa.org/JABS/2011/42/2.pdf>
6. Abba PO. Phytochemistry and biological activities of *Hibiscus sabdariffa*

- (Malvaceae). European University Publishing, Baznıcas iela, European Union. 2018;188.
7. FAO. World tea consumption and production; 2018. Available: <http://www.fao.org/news/story/fr/item/1136354/code/>, accessed 15/03/2018
  8. Arnaud T. Descriptive and hedonic temporal sensory analysis. PhD thesis in food science, Center for Taste and Food Sciences, University of Burgundy Franche-Comté, France. 2016;324.
  9. AOAC. Official methods of Analysis of AOAC International, 16th ed. AOAC International, Arlington, USA. 1995;78(3):338.
  10. Bernfeld P. Amylase and proteases. In Methods in Enzymology, Colswick SP, Kaplan NO (eds). Academic Press: New-York, USA. 1955;149-154.
  11. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Pebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956;28(3):350-356. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
  12. Wood JE, Senthilmohan ST, Peskin AV. Antioxidant activity of procyanidin containing plant extracts at different pHs. Food Chem. 2002;77(2):155-161. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00329-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00329-6)
  13. Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgaria fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 2005;40: 255-260. DOI: <https://www.researchgate.net/publication/258769164>
  14. Kanko C, Sawaliho BEH, Kone S, Koukoua G, N'Guessan YT. Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. Comptes Rendus Chimie. 2004;7:1039-1042. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crci.2003.12.030>
  15. Abena AA, Diatewa M, Gakosso G, Gbeassor M, Hondi-Assah T, Ouamba JM. Analgesic, antipyretic and antiinflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. Fitoterapia. 2003;74:231-236. DOI: 10.1016/s0367-326x(03)00029-7
  16. Alarcón E, Campos AM, Edwards AM, Lissi E, López-Alarcón C. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. Food Chem. 2008;107:1114-1119. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.09.035
  17. Rita B, Dodehe Y, Konan K, Kadja B, Joseph AD, Jean DN. Hepatoprotective effect of aqueous extract of *Lippia multiflora* Leaves against ethanol-induced toxicity in Wistar Rats. European J. Med Plants. 2015;7(3):146-155. DOI: <http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=1019&id=13&aid=8460>
  18. Noamesi BK. Power tea (*Lippia multiflora*) a potent hypertensive therapy West African Journal of Pharmacology and Drugs Research. 1977;4(1):33-36.
  19. Amos S, Binda L, Chindo BA, Tseja A, Odotola AA, Wambebe C. Neuropharmacological effects of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. J. Pharm. Biol. 2008;41(5):325-329. DOI: <https://doi.org/10.1076/phbi.41.5.325.15933>.
  20. Hernández-Pérez A, Herrera-Arellano A. Therapeutic use *hibiscus sabdariffa* extract in the treatment of hypercholesterolemia. A randomized clinical trial. Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2011;49(5):469-80.
  21. Vertuani S, Braccioli E, Manfredini S. Antioxidant capacity of *Adansonia digitata* Fruit Pulp and Leaves. Acta Phytotherapeutica. 2002;5(2):2-7.
  22. Abeer H, Hibah MA, Jihan MB, Amany KI, Seham El-Sayed AH. Evaluation of hepatoprotective activity of *Adansonia digitata* extract on Acetaminophen-Induced hepatotoxicity in Rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2016;1-7. DOI: 10.1155/2016/4579149
  23. Kumar G, Karthik KV, Rao B. A Review on pharmacological and phytochemical properties of zingiber officinale roscoe (*Zingiberaceae*). J. Pharm. Res. 2011; 4(9):2963-2969.
  24. Grace SU, Sankari M, Gopi. Antimicrobial activity of ethanolic extract of Zingiber Officinale- An *In vitro* study. J. Pharm. Sci Res. 2017;9(9):1417-1419.
  25. Stone H, Sidel, JL. Sensory evaluation practices. Elsevier Academic Press, London, U.K. 2004;290.
  26. Florence P. Guide de l'équilibre Acide-Base, Thierry Souccar Editions, Vergèze, France. 2007;47.

27. Touitou Y. Biochemistry course: Structure of carbohydrates and lipids, Pierre and Marie Curie Faculty of Medicine, Paris, France. 2005;48.
28. WHO. WHO guidelines on good agricultural and harvesting practices (GAPP) for medicinal plants. Geneva, Switzerland. 2003;84.

---

© Copyright I.K. Press. All rights reserved.

# **ARTICLE 2**



# **Phytochemical Screening and Safety Assessment of a Polyherbal Tea Formulation of *Lippia multiflora*, *Zinger officinale* and *Mentha piperita***

**N'DRI Quesnelle Epiphanie <sup>a\*</sup>, KPOROU Kouassi Elisée <sup>a</sup>,  
OUATTARA Sitapha <sup>b</sup>, BEUGRE Avit Grah Maxwell <sup>c</sup>  
and KOUAKOU-SIRANSY Gisèle <sup>d</sup>**

<sup>a</sup> Agrovalorization Laboratory, Research Group on Traditional Pharmacopoeia Products (GeRProPhaT), UFR Agroforestry, Jean Lorougnon Guédé University, BP.150 Daloa, Côte d'Ivoire.

<sup>b</sup> Biology and Health Laboratory, UFR Biosciences, Félix Houphouët-Boigny University, BP 582 Abidjan-Cocody, Côte d'Ivoire.

<sup>c</sup> Agrovalorization Laboratory, Biochemistry and Food Technologies Team, UFR Agroforestry, Jean Lorougnon Guédé University, BP. 150 Daloa, Côte d'Ivoire.

<sup>d</sup> Laboratory of Clinical and Therapeutic Pharmacology, UFR of Pharmaceutical and Biological Sciences, Félix Houphouët Boigny University, BP. 1679, Abidjan, 22, Ivory Coast.

## **Authors' contributions**

*This work was carried out in collaboration among all authors. All authors read and approved the final manuscript.*

## **Article Information**

DOI: <https://doi.org/10.9734/jpri/2024/v36i117598>

## **Open Peer Review History:**

This journal follows the Advanced Open Peer Review policy. Identity of the Reviewers, Editor(s) and additional Reviewers, peer review comments, different versions of the manuscript, comments of the editors, etc are available here: <https://www.sdiarticle5.com/review-history/123688>

**Original Research Article**

**Received: 01/08/2024**

**Accepted: 03/10/2024**

**Published: 14/10/2024**

\*Corresponding author: E-mail: [quesnellendri15@gmail.com](mailto:quesnellendri15@gmail.com);

## ABSTRACT

**Aims:** *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale*, and *Mentha piperita* are aromatic plants known for their health benefits. This study the phytochemical composition and evaluate the safety of a tea made from them for safe human consumption.

**Methodology:** For tea formulations, powder of each plant was prepared and weighed in specific proportions to formulate five different polyherbal tea. A hedonic test was then conducted on each formulation to evaluate consumer appreciation. Phytochemical composition was carried out by coloration and precipitation tests. This was followed by acute and subacute toxicity tests.

**Results:** Among the five formulations, formulation 4 consisting of "55% *L. multiflora*, 30% *Z. officinale* and 15% *M. piperita*" was the most appreciated tea with a value of 8.01. Regarding safety of the formulation 4, no deaths or signs of intoxication were observed. Subacute toxicity tests showed that the polyherbal tea 4 has no adverse effects on biochemical parameters. Apart from white blood cells for which there was an increasing number from  $14.40 \pm 0.50 \times 10^3/\mu\text{L}$  to  $19.30 \pm 0.40 \times 10^3/\mu\text{L}$  in comparison to the control group ( $10.60 \pm 0.90 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), the haematological parameters were not significantly modified. This Tea formulation was rich in compounds such as alkaloids, polyphenols, flavonoids, saponosides, sterols and polyterpenes, leucoanthocyanins, and mucilages, which made its consumption more attractive.

**Conclusion:** The polyherbal tea 4 which was the most appreciated, was rich in secondary metabolites such as alkaloids, polyphenols, flavonoids, saponosides, sterols and polyterpenes, leucoanthocyanins, and mucilages, and was not toxic to wistar rats.

**Keywords:** Tea; polyherbal; powder; aromatic; hedonic test.

## 1. INTRODUCTION

Medicinal and aromatic plant play a prominent role in traditional health care practices across the world. As reported by the World Health Organization, approximately 80% of the population in sub-Saharan Africa rely on plant-based remedies for their primary health needs [1]. This practice is justified by the cultural habits of the populations living in these areas, and by the region's high biodiversity. In addition to their therapeutic applications, certain plant species are also incorporated into the dietary practices of local populations [2,3]. Such consumption is not merely for the purpose of meeting energy requirements, it is a means of ensuring growth and consumer protection. A diverse array of these plants offers a combination of medical and nutritional benefits [4]. These include the species *Lippia multiflora* Mold., *Zingiber officinale* Rosc., and *Mentha piperita* L.; three aromatic plants, widely distributed in West Africa, and free to access on local markets [5,6].

In Côte d'Ivoire, *L. multiflora* known as "savannah tea or Gambian tea", is utilized in the form of herbal tea for the treatment of respiratory diseases, fever, malaria, microbial infections, inflammations, pain, diabetes, and asthenia [7,8]. *Zingiber officinale*, commonly known as ginger or "Gnamankou", is a widely utilized plant in Côte d'Ivoire for its medicinal and culinary properties.

It is employed as a beverage due to its anti-fatigue, digestive, antimicrobial, analgesic, anti-inflammatory, immunomodulatory and mucolytic properties [9,10,11]. With regard to *M. piperita*, commonly known as peppermint, it is a plant widely used in the culinary field for the purpose of flavoring dishes and juices [12]. However, it is also known to possess beneficial properties for human health when consumed in the form of tea. These properties include the treatment of gastrointestinal disorders, inflammation, microbial infections, pain, and diabetes [13].

Among plant foods utilized as medicinal agents, aromatic plants have garnered the most attention [14,15]. The use of preparations from these plants, typically prepared through soaking or heating plant organs, has been prevalent for centuries. In this present era, health care providers in Europe and Asia, frequently prescribe herbal teas for general well-being [16,17]. It is regrettable that despite their presence within the flora, these plant species of interest as previously described, are not yet well developed in ready-to-use commercial products such as teas or herbal teas in Côte d'Ivoire. It is therefore recommended that local aromatic plants be valorized by offering an innovative tea formulation based on palatability and acceptability with a view to enriching the market for natural wellness products in line with the Sustainable Development Goals (SDG3). In a

previous study conducted by N'DRI *et al.* (2019), it was demonstrated that the combination of *Z. officinale* and *L. multiflora* was more accepted than other combinations by tasters following a hedonic test. The aforementioned result demonstrates that specific combinations of plant species may be more accepted by consumers than others. Building on this, the present study the introduction of *Mentha piperita*, a food plant widely used in cooking to flavor dishes, into the previous formulation with the aim of improving the acceptability.

The combination of the aforementioned plant species in a unique tea formulation has the potential to offer a synergistic effect, resulting in a product with enhanced therapeutic properties. However, to optimize the benefits associated with the use of this product and ensure consumer safety, it is imperative to characterize the phytochemicals that constitute it and to evaluate its safety in an animal model.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Materials

#### 2.1.1 Plant material

The composition is derived from the leaves of *Lippia multiflora*, the rhizomes of *Zingiber officinale*, and the leaves of *Mentha piperita*. The harvesting of the different organs was conducted in the Poro region (Korhogo, Côte d'Ivoire).

#### 2.1.2 Animal material

The animal experiments were conducted using albino rats (*Rattus norvegicus*) of the Wistar variety. The rats weighed between 94 g and 145 g. They were provided by the animal facility of the UFR of Pharmaceutical and Biological Sciences of the Félix Houphouët-Boigny University (UFHB). All animals were acclimated to the GeRProPhaT (UJLoG) facility within a controlled environment, maintained at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  with a 12-hour light/dark cycle. They were fed a complete standard pellet diet provided by the company "IVOGRAIN" and had constant access to tap water via feeding bottles.

### 2.2 Methods

#### 2.2.1 Preparation of plant powders

Following the harvest, the leaves of *L. multiflora*, the rhizomes of *Z. officinale* and the leaves of *M*

*piperita* were harvested, washed, sorted and dried in a location free from sunlight for a period of 7 days. Subsequently, the dry organs were individually pulverized and filtered to produce fine powder.

#### 2.2.2 Tea formulation

To formulate the polyherbal tea, the powders were combined in varying proportions to obtain 5 combinations, the basis of which was the previous result published [18]:

**Tea formulation 1:** 70% *L. multiflora* +30% *Z. officinale*

**Tea formulation 2:** 65% *L. multiflora* + 30% *Z. officinale* + 5% *Mentha piperita*

**Tea formulation 3:** 60% *L. multiflora* + 30 % *Z. officinale*+ 10% *M. piperita*

**Tea formulation 4:** 55% *L. multiflora* + 30% *Z. officinale* + 15% *M. piperita*

**Tea Formulation 5:** 55% *L. multiflora* + 25% *Z. officinale* + 20% *M. piperita*

#### 2.2.3 Sensory analysis

The acceptability of the formulated tea was assessed using hedonic tests. These tests were conducted over the course of several sessions, with approximately sixty untrained individuals selected based on their availability and familiarity with herbal teas. The samples, coded with 5 random numbers corresponding to the different tea formulations, were presented individually to each taster. The acceptability of each sample was evaluated on a hedonic scale of 1 to 9 [19].

1: Extremely unpleasant; 2: Very unpleasant; 3: Unpleasant; 4: Quite unpleasant 5: Neither unpleasant nor pleasant; 6: Quite pleasant; 7: Pleasant; 8: Very pleasant; 9: Extremely pleasant. The taster was required to rinse mouth after each snack.

#### 2.2.4 Evaluation of toxicity

##### 2.2.4.1 Preparation of the extract to be administered

The extract to be administered was separately prepared according to the method described by Zihiri DG *et al.* [20] using each tea formulations. A mass of 100 g of the formulation was infused in 1 L of boiling water for a period of 15 min. Subsequently, the infusion was filtered twice on filter cotton, and once on Whatman paper No. 3 with the objective of removing fibers. The resulting filtrate was subjected to  $50^\circ\text{C}$  drying process in an oven for 3 days. The residual

material was then recovered and constituted the dry extract of the formulation.

#### 2.2.4.2 Assessment of acute toxicity

The experiment was conducted with the best formulation according to OECD 423 guidelines. Two doses including 2000 mg/kg and 5000 mg/kg were tested on 9 female Wistar rats divided into 3 groups of 3 rats. The rats were fasted during the night preceding the experiment. Before starting the experiment, the animals were weighed. Thereafter, the extract was administered via gavage in a single dose using a gastric tube. The dose to be administered was calculated based on the fasting body weight of each rat. After administration of the extract, the animals were deprived of food for 1 to 2 hours. The treated animals were observed for 14 days for signs of acute poisoning [21]

#### 2.2.4.3 Evaluation of subacute toxicity

The study was carried out with the best formulation in accordance with OECD 407 guidelines. It involved 24 albino Wistar rats, divided into four equal groups, each comprising 3 males and 3 females. Three doses were tested: 17 mg/kg bw, 85 mg/kg bw and 425 mg/kg bw. The test substance was administered by daily oral gavage for 28 days. The dose to be administered was adjusted according to the fasting body weight of each rat. Before starting the experiment, the rats were fasted with free access to water. The concentrations 17 mg/kg bw, 85 mg/kg bw and 425 mg/kg bw were tested on groups 2, 3, and 4 respectively at a rate of 1 mL per 100 g bw. Group 1 received only distilled water. During this period, the animals were carefully observed every day for possible signs of toxicity. Finally, the rats were weighed every 7 days for 28 days [22].

#### 2.2.4.4 Determination of hematological and biochemical parameters

At the end of the treatment period, the rats were anesthetized via inhalation of Cooper's solution. Blood samples were obtained by puncture of the retro-orbital sinus. Blood samples were collected in two tubes: one containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and the other containing heparin. Tubes containing EDTA were used for hematological analysis whereas heparinized tubes were subjected to centrifugation at 4000 rpm for a period of 10 minutes. The serum was stored at -20°C for subsequent biochemical analysis [23]. The

impact of the administered dose was evaluated based on the results of blood analysis (complete blood count), as well as measurements of specific hepatic markers (AST and ALT transaminases, alkaline phosphatase: PAL), renal (creatinine and urea), lipid (total cholesterol, HDL, LDL and triglycerides) and carbohydrate metabolism (glycemia).

#### 2.2.5 Phytochemical screening

Phytochemical tests were conducted using colorimetry and precipitation techniques. The tests offer a comprehensive overview of the diverse range of secondary metabolites present in plants.

The search for alkaloids was carried out using Dragendorff's reagent, which produces an orange precipitate; and Valser-Mayer reagent (iodine and mercury), which forms a milky white precipitate [24,25].

The search for polyphenolic compounds was carried out by the test with ferric chloride solution (FeCl<sub>3</sub>) which in the presence of the latter gives a blue-blackish or green coloring. The search for tannins was carried out using Stiasny's reagent which precipitates the latter. Subsequently, the addition of a 2% FeCl<sub>3</sub> solution allows for the highlighting of gallic tannins which appear as a blackish-blue color [26].

The search for flavonoids was conducted using the cyanidin reaction, wherein the addition of magnesium shavings results in the emergence of an orange-pink or purplish color, indicative the presence of flavonoids [27].

The search for sterols and polyterpenes was carried out using Liebermann- Burchard reagent. The formation of a purple or violet ring, which subsequently changes to blue then green, serves as an indicator of their presence [28].

The search for quinones was carried out using Borntraëger reagent, which produces a cherry red color in the presence of quinones [24].

The reaction with cyanidin without the addition of magnesium chips enabled the detection of leucoanthocyanins by the formation of a red color [25]. Pour the aqueous extract into a test tube, then add the absolute alcohol. The formation of a flaky precipitate after shaking suggests the presence of mucilages [29].

Finally, the saponosides were identified by the very high foam index test (1 cm).

## 2.3 Statistical Analysis

GraphPad.Prism version 8.0 and Excel ® software was used for data processing. The mean and standard deviation were calculated for each parameter evaluated. Data were analyzed with one-way ANOVA. Comparison of the means of the different parameters of the groups treated with the control group was carried out using the Tukey's test. The difference between the values of a parameter whose *p value* < 0.05 was estimated to be statistically significant.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Results

#### 3.1.1 Acceptability of formulations

The data relating to the hedonic test is presented in Fig. 1.

Tea formulation 4 stood out with a higher rating (8.01) and thus was selected for further investigations.

### 3.2 Toxicity

#### 3.2.1 Acute toxicity

##### 3.2.1.1 Signs of poisoning

The acute oral toxicity study demonstrated that administration of doses of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg body weight (bw) of Tea 4 did not result in mortality after 14 days of observation. Furthermore, the treated animals did not exhibit

any signs or symptoms, including drowsiness, writhing, diarrhea, excitement, refusal to feed or straightening of hair due to different concentrations of the extract.

##### 3.2.1.2 Effect of tea on animal body weight

The animal's weights exhibited a general increase over time (Fig. 2).

In comparison to the control group, the weight of rat treated with Tea 4 at varying doses demonstrated a slight increase over the course of the 14-day experimental period. However, these weight differences were not statistically significant.

#### 3.2.2 Subacute toxicity

During the 28 days of experimentation, no signs of poisoning and no mortalities were recorded.

##### 3.2.2.1 Effect of tea on animal body weight

Overall, there was a notable increase in the animals' weights over time (Fig. 3).

#### 3.2.3 Effect of Tea 4 on hematological parameters

The hematological analysis doses of tea 4 revealed an increase in white blood cells in the treated groups compared to the control. However, other parameters such as hemoglobin, platelets, hematocrit and MCV did not show significant variations. The data are reported in Table 1.

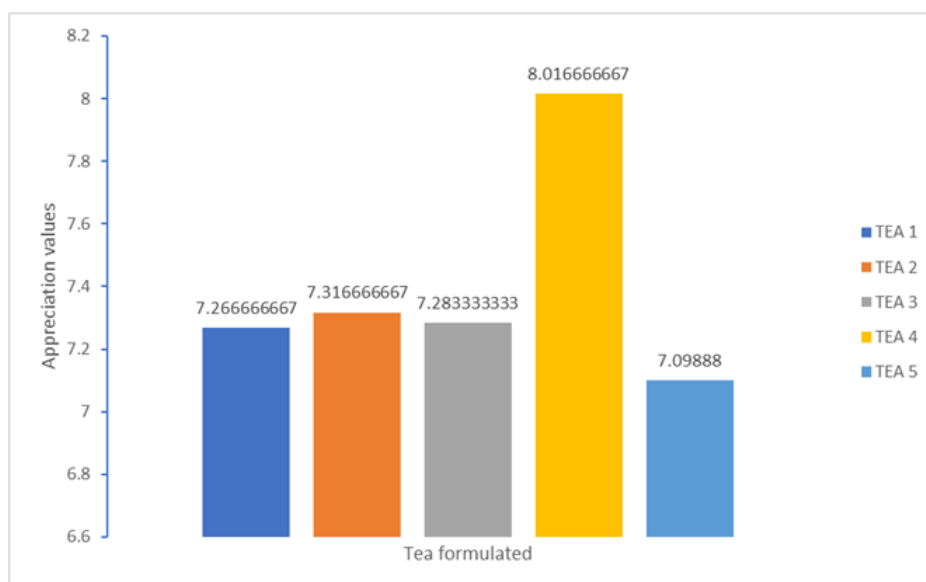


Fig. 1. Histograms of the appreciation values of the different THES

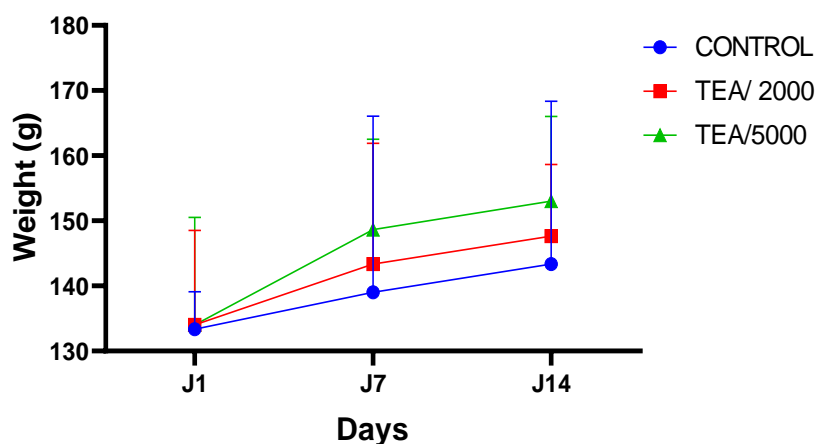


Fig. 2. Evolution of the weight of rats after administration of Tea

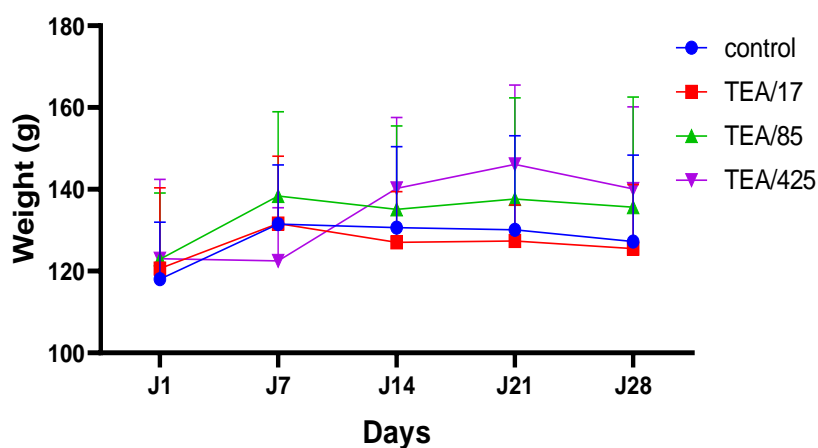
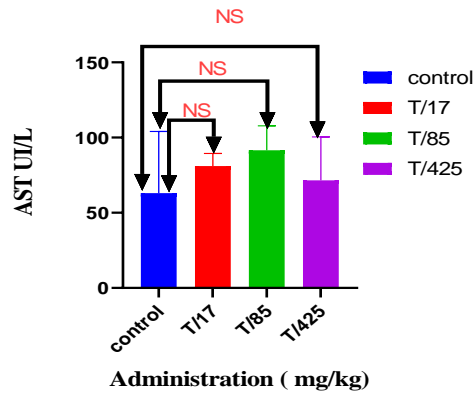


Fig. 3. Evolution of the weight of rats after administration of Tea 4

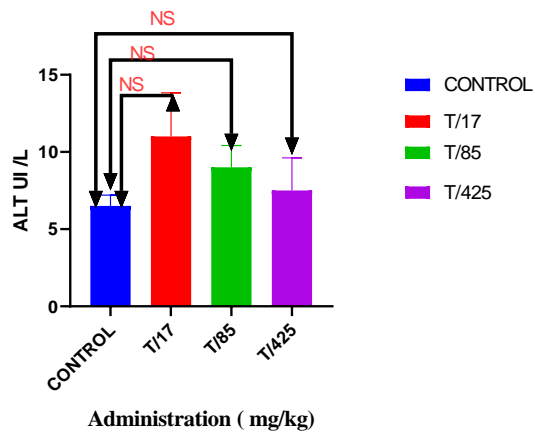
Table 1. Hematological parameters

Hematological parameters	Group1 (control)	Group 2 (17mg/kg)	Group 3 (85 mg/kg)	Group 4 (425 mg/kg)
White blood cells ( $10^3/uL$ )	$10.60 \pm 0.90$	$14.40 \pm 0.50^*$	$19.30 \pm 0.40^*$	$15.45 \pm 0.45^*$
Red cells ( $10^6/uL$ )	$7.29 \pm 0.87$	$7.72 \pm 0.73$	$5.59 \pm 0.49$	$6.66 \pm 0.33$
Hematocrit (%)	$41.10 \pm 6.20$	$41.70 \pm 1.10$	$37.90 \pm 2.20$	$40.40 \pm 1.70$
Hemoglobin (g/L)	$12.55 \pm 1.45$	$13.30 \pm 0.30$	$12.65 \pm 1.35$	$13.00 \pm 1.30$
TCMH (pg)	$17.25 \pm 0.05$	$17.45 \pm 2.05$	$18.65 \pm 1.15$	$19.50 \pm 1.00$
CCMH (g/dL)	$30.70 \pm 1.10$	$31.90 \pm 0.60$	$36.25 \pm 3.75$	$34.25 \pm 2.35$
Blood platelets ( $mm^3$ )	$456.0 \pm 116.0$	$409.0 \pm 18$	$405.5 \pm 51.50$	$497.5 \pm 90.50$
VGM (fL)	$56.20 \pm 1.80$	$54.50 \pm 5.30$	$64.95 \pm 7.85$	$56.95 \pm 1.05$



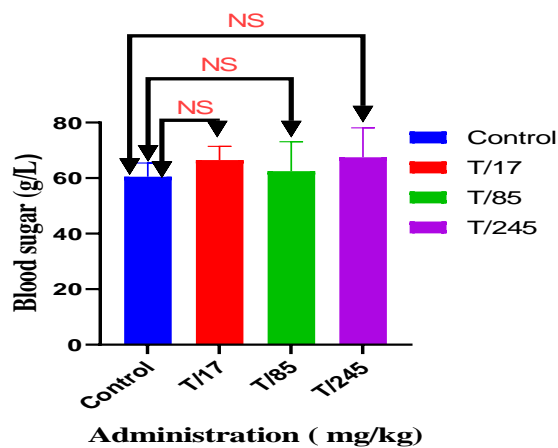
**Fig. 4. Histograms of AST concentration after administration of Tea 4**

No significance difference was observed in the AST concentrations between the control and treated groups; T/17: Rats treated by 17 mg/kg bw; T/85: Rats treated by 85 mg/kg bw; T/425: Treated by 425 mg/kg bw



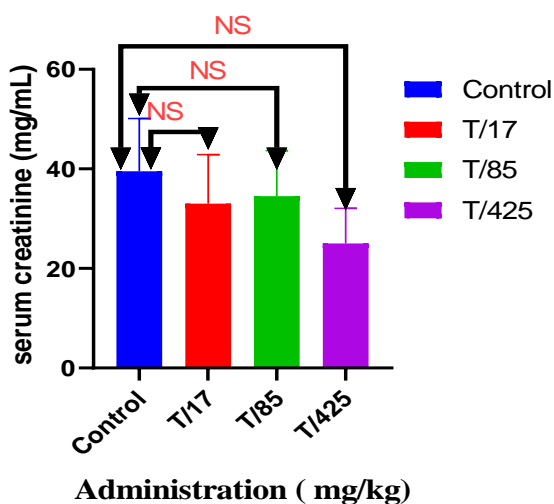
**Fig. 5. Histograms of ALT concentration after administration of Tea 4**

No significance difference was observed in the ALT concentration between the control and treated groups; T/17: Rats treated by 17 mg/kg bw; T/85: Rats treated by 85 mg/kg bw; T/425: Treated by 425 mg/kg bw



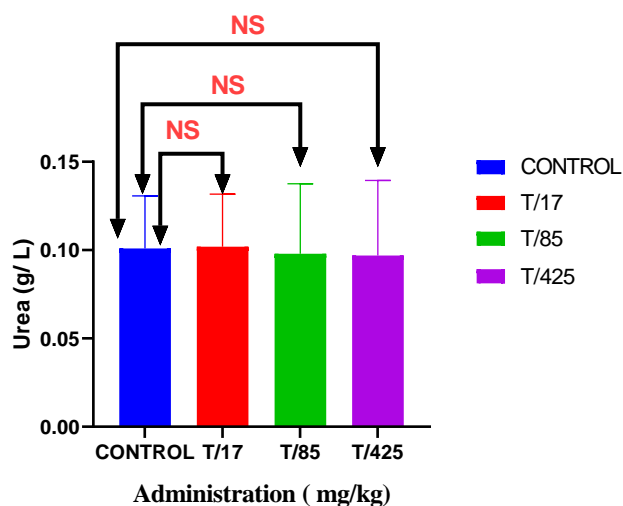
**Fig. 6. Blood sugar histograms after administration of Tea 4**

No significance difference was observed in Blood sugar concentration between the control and treated groups; T/17: Rats treated by 17 mg/kg bw; T/85: Rats treated by 85 mg/kg bw; T/425: Treated by 425 mg/kg bw



**Fig. 7. Histograms of creatinemia after administration of Tea 4**

No significance difference was observed in serum creatinine concentration between the control and treated groups; T/17: Rats treated by 17 mg/kg bw; T/85: Rats treated by 85 mg/kg bw; T/425: Treated by 425 mg/kg bw



**Fig. 8. Histograms of Urea after administration of Tea 4**

No significance difference was observed in Urea concentration between the control and treated groups; T/17: Rats treated by 17 mg/kg bw; T/85: Rats treated by 85 mg/kg bw; T/425: Treated by 425 mg/kg bw

**Table 2. Identification of secondary metabolites**

Secondary metabolite families	Tea formulation 4
Alkaloids (Vaiser-Mayer Reagent)	+
Alkaloids ( Dragendorff Reagent )	+
Polyphenols	+
Catechic tannins	+
Gallic tannins	+
Flavonoids	+
Quinones	-
Saponosides	+
Sterols and Polyterpenes	+
Leucoanthocyanins	+
Mucilages	+

### 3.2.4 Effect of Tea 4 on biochemical parameters

During this work, biochemical parameters such as blood sugar, creatinemia, urea, AST and ALT were evaluated. The results are illustrated in Fig. 4, 5, 6, 7,8.

### 3.3 Chemical Screening

Table 2 gives the major chemical groups contained in the tea formulation 4. The chemical screening in solution carried out on the tea made it possible to identify compounds such as alkaloids, flavonoids, polyphenols, leucoanthocyanins, saponosides, sterols and polyterpenes, tannins and quinones. However, quinones were absent (Table 2).

### 3.4 Discussion

In terms of the hedonic test, five teas were formulated from three aromatic plant species: *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale*, and *Mentha piperita*. The choice of these plants was guided by their aromas, their common use in the Ivorian diet in the form of herbal teas or juices and the specific health benefits that each could provide as added value for consumers [7,10,30]. In terms of overall acceptability of the formulations, the scores range from 7.09 to 8.01 on a scale of 9, indicating that all the formulations were well accepted by the participants. The highest score 8.01 was assigned to Tea 4, indicating that it is the most popular formulation those tested. Tea 5 exhibited the lowest score (7.09), yet it remained within the acceptability zone, albeit slightly lower than the other formulations. The scores for Teas 1, 2, and 3 are nearly identical, with a slight preference for Tea 2 (7.31) over Teas 1 (7.26) and 3 (7.28). The difference between Tea 4 and other teas is more pronounced, suggesting that Tea 4 possesses a distinctive quality or attribute that sets it apart from other formulations. This formulation has the highest score and should be considered the optimal basis for potential optimizations or market release. Tea 5, although well-accepted exhibits, a slightly lower score, indicating potential for acceptability enhancement through adjustments. Teas 1, 2, and 3, while also well-accepted, a near-equivalent score. Understanding the specific consumer perceptions of these teas could inform improvement strategies.

The considerable approval of formulation 4 (Tea 4) demonstrates its marketability and could serve

as a valuable decision-making tool in the development of marketing strategies for the product [31,32].

In general, the results demonstrated a high level of overall acceptability for all formulations, with a notable preference for Tea 4. Formulations 1, 2, and 3 also exhibited a favorable reception; although the scores were relatively similar. Tea 5 while still deemed acceptable, was slightly less preferred.

With the regards to the acute toxicity study, the absence of mortality at doses as high as 2000 mg/kg and 5000 mg/kg that the substances had low acute toxicity. This indicates that the administered doses are not lethal for Wistar rats under the conditions of the study. Moreover, the absence of clinical signs (such as lethargy, behavioral changes and weight loss.) at these doses indicates that the substance were well tolerated by rats and do not induce visible toxic effects in the short term. The absence of mortality or clinical signs at doses of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg allows for the reasonable conclusion that the LD50 of the substance is greater than 5000 mg/kg. This classification aligns with the WHO 214 and OECD 425 guidelines, which a practically non-toxic substance [33].

The insignificant increase in weight observed in rats treated with the tea suggests that the tea may possess beneficial effects on general health. Indeed, the bioactive compounds of *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale*, and *Mentha piperita* can work together to stimulate metabolism. Ginger, with its thermogenic properties, when combined with the lipid-regulating effects of *Lippia multiflora* and the ability of peppermint to improve digestion, can create a beneficial combined effect for weight management [34,35].

The absence of clinical signs of intoxication or mortality at doses of 17 mg/kg bw, 85 mg/kg bw, 425 mg/kg bw at the subacute toxicity test level is an important indicator of the safety of tea during use over 28 days. The safety of Tea 4 is contingent upon the absence of individual toxicity of each of the plants comprising tea formulation 4. Indeed, the LD50 values of the plant species involved in the formulation exceed 5000 mg/kg bw [36,37]. Therefore, the tea can be consumed without risk of intoxication at the doses tested over a period of 28 days.

The absence of significant variations in biochemical parameters (glycemia,

creatinemia, urea, AST, ALT) in the treated rats, when compared to the controls, demonstrates that renal, hepatic, and pancreatic functions were not altered by the consumption of tea [38]. With regard to the hematological parameters (WBC, GR, Hb, Hte, VGM, TCMH, CCMH, and blood platelets), only white blood cells (WBC) exhibited notable alterations, this may be attributed to the potential immunostimulatory effect of formulation 4 (tea 4), as the utilized species recognized for their antioxidant and immunomodulatory properties [39,40].

The results of phytochemical sorting the presence of flavonoids, polyphenols, alkaloids, tannins, saponosides, sterols, polyterpenes, leucoanthocyanins, and mucilages in formulation 4. These compounds are known for their antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, and immunostimulating properties, among others, and are beneficial for health [41,42]. These compounds contribute to the reduction of oxidative stress and may confer cardiovascular and neuroprotective benefits, as well as potential anticancer effects [43].

#### 4. CONCLUSION

Of the five tea formulations produced from the aromatic plants *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale*, and *Mentha piperita*, formulation 4 (Tea 4) was the highly rated in a hedonic test, with a score of 8.01. The safety study of this formulation in Wistar rats demonstrated no mortality and no clinical signs of poisoning. Furthermore, analysis of biochemical and hematological parameters revealed no significant modifications. Based on these findings, it can be concluded that Formulation 4 (Tea 4) does not present a potential risk of poisoning for users over a period of 28 days. Additionally, the presence of certain phytocompounds in formulation 4 (Tea 4) suggests that it may enhance the well-being of users.

#### DISCLAIMER (ARTIFICIAL INTELLIGENCE)

Author(s) hereby declare that NO generative AI technologies such as Large Language Models (ChatGPT, COPILOT, etc.) and text-to-image generators have been used during the writing or editing of this manuscript.

#### CONSENT

It's not applicable.

#### ETHICAL APPROVAL

All protocols in this study were approved by the institutional Committee on the Ethics of Animal Experiments of Jean Lorougnon Guede University, in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication no.85-23, revised 1996).

#### COMPETING INTEREST

The authors of this manuscript declare that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest in the subject matter or materials discussed.

#### REFERENCES

1. WHO. WHO Guidelines on Good Agricultural and Harvesting Practices (GAP) for medicinal plants. Geneva, Switzerland. 2003;84.
2. Ake-Assi L. Health and valorization of medicinal plants in Côte d'Ivoire. *Bothalia*. 1983;14(3 & 4):603-605
3. Diallo D, Paulsen BS. Traditional phytotherapy and pharmacopoeia: Contribution to ethnobotanical and floristic studies in Mali. 2000; 161.
4. Adjanooun E, Aké Assi L. Contribution to the Inventory of medicinal plants in Côte d'Ivoire. 1979;358.
5. Kon WM, Atindehou KK. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in traditional veterinary medicine in Northern Côte d'Ivoire (West Africa). *South African Journal of Botany*. 2008;74:76-84.
6. Asomaning WA, Lockett C. Ethnobotanical survey of medicinal plants used to manage diabetes in the Central Region of Ghana. *Journal of Ethnopharmacology*; 2012.
7. Abena AA, Diatewa M, Gakosso G, Gbeassor M, Hondi AT, Ouamba J. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of *Lippia multiflora* essential oil. *Fitotherapy*. 2003;74(3): 231-236.
8. Koffi N, Beugré K, Guédé NZ, Dossahoua T, Laurent AA. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire) *Sciences & Nature*. 2009;6(1): 1-15.
9. Kouadio K. Use of medicinal plants in Ivory Coast. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;146(2): 589-598.

10. Ekissi AC, Konan A, Yao-Kouamé A, Bassirou B, Kati-Coulibaly S. Evaluation of the chemical constituents of savannah tea (*Lippia multiflora*) leaves. *Journal of Applied Biosciences*. 2011;42: 2854-2858.
11. Abba PO. Phytochemistry and biological activities of *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae). European University Editions, Baznīcas iela, European Union. 2018;188.
12. Kouadio E, Kouakou-Siransy G, N'Doua PT. Culinary and medicinal uses of *Mentha piperita* in Ivory Coast. *International Journal of Herbal Medicine*. 2018;6(5):123-128.
13. Yapo AF, Amalaman K, Kouadio L. Traditional uses of medicinal plants in Ivory Coast. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2018;15(2):23-24.
14. Cappello G, Spezzaferro M, Grossi L, Manzoli L, Marzio L. Peppermint oil (Mintoil®) in the treatment of irritable bowel syndrome: a prospective double-blind placebo-controlled randomized trial. *Digestive and Liver Disease*. 2007;39(6): 530-536.
15. Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D, Van Griensven LJLD. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*. 2009;15(1): 7532-7546.
16. Dubick M A. Historical perspectives on the use of herbal preparations to promote health. *Journal of Nutrition*. 1996;116: 1348–1354.
17. Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, Gruenwald J, Hall T, Riggins CW, Rister RS. The complete german commission e monographs: Therapeutic guide to herbal medicines. American Botanical Council: Austin. 1998;685.
18. N'dri QE, Kporou KE, Ekissi AC, Choho MF, Djadji ATL, Kouakou GS. Sensory analysis and physicochemical parameters of three "TEAS" formulations obtained from aromatic plant powders from Côte d'Ivoire. *Journal of Advances in Food Science & Technology*. 2023;10(4): 129-137.
19. Arnaud T. Descriptive and hedonic temporal sensory analysis. Doctoral thesis in food sciences, Center for Taste and Food Sciences, University of Burgundy Franche-Comté, France. 2016; 324.
20. Zihiri DG, Kra AKM, Guédé-Guina F, Bahi C. Evaluation of the antifungal activity of extracts of *Mitragyna ciliata* on *Candida albicans* strains resistant to antifungal agents. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2003 ;1(1): 67-73.
21. OECD. OECD guidelines for testing chemicals: Acute oral toxicity - Method by acute toxicity class. 2001;423:14.
22. OECD. 28-day repeat-dose oral toxicity study in rodents. In: *OECD Guidelines for Testing Chemicals*. Paris: OECD. 2008;1-14.
23. Manda P, Manda OM, Manda V, Kroa E, Dano SD. Toxicity studies acute and subacute remedy of the nature remedy used in the treatment of malaria. *Ivorian Journal of Science and Technology*. 2017;29:145 – 158.
24. Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: A thin layer chromatography, Atlas*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 1996;384.
25. Harborne JB. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer, Dordrecht. 1998;302.
26. Houghton PJ, Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. 1998;199.
27. Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002;10(3):178-182.
28. Finar IL. *Organic Chemistry: stereochemistry and the chemistry of natural products*. Longman, London. 1975;840.
29. Trease GE, Evans WC. *Trease and Evans Pharmacognosy*, 16th Edition. Saunders Elsevier. 2009;850.
30. Akaffou DS, Koffi N, Djaman AJ, Kouassi KK. Ethnomedical and ethnopharmaceutical studies on medicinal plants used in the region of Daloa, Côte d'Ivoire. *Ethnopharmacology Letters*. 2020; 10(2):23-30.
31. Morten CMB, Thomas C, Gail VC. *Sensory Evaluation Techniques*. 4<sup>th</sup> ed, CRC Press. 2006;464.
32. Lawless HT, Heymann H. *Sensory evaluation of food: Principles and Practices*. Springer. New York. 2010;744.
33. Gad SC. *Animal Models in Toxicology*. 2<sup>nd</sup> ed, CRC Press. 2007;952.
34. Singh G, Kapoor IPS, Singh P, De Heluani CS, De Lampasona MP, Catalan C. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and

- oleoresins of *Zingiber officinale* (Ginger) and *Mentha piperita* (Peppermint)". Food and Chemical Toxicology. 2013;62:296-304.
35. Kouadio FA, Koffi C, Kouamé L. Anti-obesity effects of *Lippia multiflora* on diet-induced obese rats. Journal of Ethnopharmacology. 2015 ;174:290-295.
36. Amgad AH, Al Bahi, Warda SA. Effects of dietary Furundu (Fermented Hibiscus sabdariffa Seed) supplementation on the performance, some blood and serum parameters and histopathology of Wistar Rats. Advances Journal of Food Science and Technology. 2012;4(2): 64-69.
37. Djengue MA, Ateba SB, Nukene EN, Abine JP, Ndoumou SO, Lenta BN. Acute and subacute toxicity studies of the ethanol extract of *Zanthoxylum leprieurii* Guill. & Perr. (Rutaceae) root bark in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2017;198:179-187.
38. Kaba S. Management and interpretation of analyses at the biochemistry and endocrinology laboratory of the E.I.S.M. V in Dakar. State Diploma of Doctorate in Veterinary Medicine, Inter-State School of Veterinary Medicine Sciences, Dakar, Senegal. 2000;87.
39. Amos S, Binda L, Chindo BA, Tseja A, Odutola AA, Wambebe C. Neuropharmacological effects of Hibiscus sabdariffa aqueous extract. Journal Pharmaceutical Biology. 2008;41(5): 325-329.
40. Abeer H, Hibah MA, Jihan MB, Amany KI, Seham El-Sayed AH. Evaluation of hepatoprotective activity of *Adansonia digitata* extract on Acetaminophen-Induced hepatotoxicity in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016; 7. Available:<http://doi.org/10.1155/2016/4579149>
41. Alarcón E, Campos AM, Edwards AM, Lissi E, López-Alarcón C. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. Food Chemistry. 2008;107: 1114–1119.
42. Rita B, Dodehe Y, Konan K, Kadja B, Joseph AD. & Jean DN. Hepatoprotective effect of aqueous extract of *Lippia multiflora* Leaves against ethanol-induced toxicity in Wistar Rats. European Journal of Medicinal Plants. 2015;7(3): 146-155.
43. García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno MA, Martínez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. Inflammation Research. 2009 ;58(9):537-552.

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of the publisher and/or the editor(s). This publisher and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

© Copyright (2024): Author(s). The licensee is the journal publisher. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:

<https://www.sdiarticle5.com/review-history/123688>

# **ARTICLE 3**

## Quantification des métabolites spécialisés, activités anti radicalaire et immunostimulante d'un thé codé « THE » formulé à partir d'essences aromatiques de la Côte d'Ivoire

N'DRI Quesnelle Epiphanie<sup>1,\*</sup>, KPOROU Kouassi Elisée<sup>1</sup>, OUATTARA Sitapha<sup>2</sup>, BEUGRE Avit Grah Maxwell<sup>1</sup>, KOUAKOU-SIRANSY Gisèle<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire d'Agrovalorisation, Groupe de Recherche sur les Produits de la Pharmacopée Traditionnelle (GeRProPhaT), UFR Agroforesterie, Université Jean Lorougnon Guédé, BP.150 Daloa, Côte d'Ivoire..

<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie et Santé, UFR Biosciences, Université Félix Houphouët-Boigny, 22 BP. 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

<sup>3</sup> Laboratoire de Pharmacologie clinique et thérapeutique, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët Boigny, BP.1679, Abidjan, 22, Côte d'Ivoire).

Date de réception : 15 Mai 2025 ; Date de révision : 25 Juin 2025 ; Date d'acceptation : 09 Juillet 2025.

### Résumé :

Les plantes aromatiques constituent une source précieuse de métabolites spécialisés aux propriétés biologiques variées. Cette étude vise à valoriser un thé codé « THE » formulé à partir d'essences aromatiques locales. Pour ce faire, les poudres végétales des espèces *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* ont été combinées selon des proportions spécifiques. L'activité antioxydante du THE a été évaluée par les tests (DPPH) et (ABTS). L'effet immunostimulant a été étudié selon le protocole de Griess par le dosage des monoxyde d'azote (NO) à partir d'une culture *in vitro* de cellules RAW. La quantification des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés a été réalisée par spectrophotométrie UV-Vis à différentes longueurs d'ondes. L'analyse du potentiel antiradicalaire du THE a donné des valeurs de  $IC_{50}$  de 7,55  $\mu\text{g/mL}$  (DPPH) et 53,72  $\mu\text{g/mL}$  (ABTS). Une augmentation progressive de la production de nitrites a été observée avec des doses croissantes du THE jusqu'à atteindre une production de 10  $\mu\text{M}$  à 300  $\mu\text{g/mL}$  du THE. Les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins ont été évaluées 38,9  $\pm$  2,97 mg EAG/g; 15,1  $\pm$  0,17 mg EQ/g et 22,76  $\pm$  1,49 mg EC/g respectivement. Ces résultats suggèrent que ce le THE pourrait être utilisé comme complément alimentaire pour la prévention du stress oxydatif et le renforcement des défenses immunitaires.

**Mots-clés :** Antiradicalaire, immunostimulant, THE, Essence aromatique, métabolites spécialisés.

## Quantification of specialized metabolites, antiradical and immunostimulant activities of a TEA formulated from aromatic plants of Côte d'Ivoire

### Abstract:

Aromatic plants represent a valuable source of specialized metabolites with diverse biological properties. This study aims to assess the multiple bioactivity values of a tea codified mix «THE » formulated from locally sourced aromatic plant species. To achieve this, plant powders of *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale*, and *Mentha piperita* were combined in specific proportions. The antioxidant activity of the tea was assessed using the 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging assays. The immunostimulatory effect was evaluated using the Griess assay by measuring nitric oxide (NO) production from an *in vitro* culture of RAW cells. Quantification of total polyphenols, total flavonoids, and condensed tannins was performed using UV-Vis spectrophotometry at specific wavelengths. The antiradical potential analysis revealed  $IC_{50}$  values of 7.55  $\mu\text{g/mL}$  (DPPH) and 53.72  $\mu\text{g/mL}$  (ABTS) for the tea. A dose-dependent increase in nitrite production was observed, reaching 10  $\mu\text{M}$  at a concentration of 200  $\mu\text{g/mL}$  of the tea. The contents of total polyphenols, flavonoids, and tannins were estimated at 38,9  $\pm$  2,97 mg EAG/g; 15.1  $\pm$  0.17 mg GAE/g and 22.76  $\pm$  1.49 mg CE/g, respectively. These results suggest that this tea « THE » could be used as a dietary supplement for the prevention of oxidative stress and the enhancement of immune defenses.

**Keywords:** Antiradical, immunostimulant, TEA, Aromatic plant, specialized metabolite.

### Introduction

L'intérêt croissant pour les produits naturels à potentiel thérapeutique s'est renforcé ces dernières décennies en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine et de leur toxicité relativement faible. Parmi ces produits, les infusions ou thés à base de plantes médicinales et aromatiques occupent une place importante dans les pratiques de santé traditionnelles et dans la recherche sur les agents bioactifs naturels (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011). Les plantes médicinales renferment des métabolites spécialisés tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et les

alcaloïdes, qui confèrent à ces espèces des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et immunostimulantes (Harborne, 1998 ; Balasundram *et al.*, 2006).

En Afrique de l'Ouest, et particulièrement en Côte d'Ivoire, la richesse du patrimoine phytogénétique demeure encore largement sous exploitée, en dépit de son potentiel significatif pour le développement de produits naturels à visée fonctionnelle et thérapeutique. Dotée d'une biodiversité végétale remarquable, la Côte d'Ivoire regorge d'espèces aromatiques utilisées en médecine traditionnelle ; mais, dont les

(\*) Correspondance : N'DRI Q.E ; e-mail : [quesnellendri15@gmail.com](mailto:quesnellendri15@gmail.com) ; tél. : (XXXX) XXXXXXXXXXXXX.

propriétés restent souvent peu valorisées de façon scientifique. Parmi ces espèces à fort intérêt, *Lippia multiflora* Moldenke, *Zingiber officinale* Roscoe, et *Mentha piperita* L. se distinguent par leur usage répandu, tant dans l'alimentation que dans les soins traditionnels. *Lippia multiflora*, plante aromatique emblématique de la pharmacopée africaine, est connue pour ses vertus antioxydantes, anti-inflammatoires et immunostimulantes, bien que les données mécanistiques sur ses effets demeurent encore limitées (Abena et al., 2003). *Zingiber officinale*, quant à lui est l'un des végétaux les plus étudiés pour ses composés phénoliques actifs (gingérols et shogaols) dont les propriétés antioxydantes et immunomodulatrices sont bien établies (Mashhadi et al., 2013). Enfin, *Mentha piperita*, riche en acides phénoliques et flavonoïdes, est reconnue pour sa capacité à neutraliser efficacement les radicaux libres (McKay & Blumberg, 2006).

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles de *Lippia multiflora*, de rhizomes de *Zingiber officinale* et des feuilles de *Mentha piperita*. Ces organes ont été récoltés en Côte d'Ivoire de Juin à Août 2020 respectivement à Korhogo pour *L. multiflora* et à Daloa pour *Z. officinale* et *M. piperita*.

### 1.2. Méthodes

#### 1.2.1. Préparation de l'extrait sec du thé

Cette préparation a consisté à prélever 100 g du mélange des poudres végétales des différents organes de plante dans des proportions égales, puis cette quantité de poudre a été infusée dans 1 L d'eau bouillante pendant 15 minutes. L'infusât obtenu a ensuite été soumis à une série de filtrations : une première à l'aide d'un tissu blanc, suivie de deux filtrations successives sur coton hydrophile, et enfin une filtration sur papier Whatman N°3, afin d'éliminer efficacement les fibres. Le filtrat obtenu a été séché à 50 °C pendant 72 heures. Le résidu sec récupéré après séchage représente l'extrait sec du thé codé «THE».

#### 1.2.2. Etude quantitative des quelques métabolites spécialisés

##### 1.2.2.1 Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Un volume de 100 µL d'extrait aqueux de «THE» a été introduit dans une fiole jaugée de 25 mL, suivi de l'ajout de 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu préalablement dilué au dixième. Après un temps de réaction de 2 minutes, 2 mL d'une solution de bicarbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 20

Dans cette optique, la formulation d'un thé associant ces trois essences aromatiques vise à exploiter la synergie de leurs composés bioactifs pour proposer une boisson chaude à la fois agréable à consommer et dotée d'un effet bénéfique démontré sur la santé. Le développement d'un tel produit s'inscrit dans une démarche de valorisation des ressources végétales locales, avec pour ambition de créer une solution naturelle à haute valeur ajoutée. La présente étude a pour objectif d'évaluer le contenu en métabolites spécialisés d'un thé codé « THE » formulé à base de *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita*, ainsi que ses activités antiradicalaire et immunostimulante à travers des tests *in vitro*. Cette investigation permettra non seulement d'appuyer scientifiquement les usages traditionnels, mais également de favoriser l'émergence de produits phytothérapeutiques innovants, issus de la biodiversité ivoirienne, au service de la santé humaine.

% (m/v) ont été ajoutés. Le mélange a été ensuite maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante pour permettre le développement de la coloration.

L'absorbance de chaque solution a été mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant une solution témoin dans laquelle l'extrait avait été remplacé par de l'eau bidistillée. Une courbe d'étalonnage a été établie à partir d'un standard d'acide gallique à différentes concentrations (de 0 à 0,5 g/L), permettant de déterminer la teneur en polyphénols totaux par interpolation. Chaque mesure a été réalisée en triplicat. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).

##### 1.2.2.2 Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux

Pour la quantification des flavonoïdes totaux, 2,5 mL de l'extrait de THE ont été mélangés à 0,75 mL d'une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 5 % (m/v) dans une fiole de 25 mL. Après homogénéisation, 0,75 mL d'une solution d'aluminium trichlorure ( $\text{AlCl}_3$ ) à 10 % (m/v) ont été ajoutés, et le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 6 minutes. Par la suite, 5 mL d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ , 1 N) et de l'eau distillée ont été ajoutés pour compléter jusqu'à 25 mL. Après agitation manuelle, l'absorbance de la solution a été mesurée à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Chaque échantillon a été analysé en triplicat.

La concentration en flavonoïdes totaux a été déterminée par interpolation à partir d'une

courbe standard de quercétine et les résultats exprimés en microgrammes équivalents quercétine par gramme d'extrait sec ( $\mu\text{g Eq Q/g}$ ), selon la méthode décrite par Miliauskas *et al.* (2004).

:

$$C = \frac{C_1 \times V}{m}$$

C : mg équivalent quercétine dans 1g d'extrait sec du THE,

$C_1$  : Concentration de l'échantillon lue sur la courbe d'étalonnage (mg/L),

V : volume d'extrait utilisé pour le dosage

M : masse de l'échantillon (g).

### 1.2.1.3 Dosage des tanins condensés

Un volume de 200  $\mu\text{L}$  de l'extrait aqueux de «THE » a été mélangé à 1 000  $\mu\text{L}$  de réactif à la vanilline. Après agitation, le mélange a été incubé à l'obscurité à une température contrôlée de 30 °C pendant 20 minutes. L'absorbance a ensuite été mesurée à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en utilisant un blanc constitué d'un mélange de méthanol à 37 % et d'acide chlorhydrique (HCl) à 8 %, à volumes égaux.

La teneur en tanins condensés a été déterminée par interpolation à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec des solutions standards de catéchine, dans une gamme de concentrations comprises entre 0 et 0,3 mg/mL. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS), selon la méthode décrite par Miliauskas *et al.* (2004).

### 1.2.3. Activités antiradicalaires

L'évaluation de l'activité antiradicalaire du THE formulé a été réalisée à l'aide de deux méthodes spectrophotométriques couramment utilisées : le test de réduction du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et celui de l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)).

#### - Test de DPPH

Une solution stock de DPPH a été préparée en dissolvant 24 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. La solution obtenue a été homogénéisée, puis son absorbance a été ajustée à environ  $0,98 \pm 0,021$  à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, assurant ainsi une concentration stable et reproductible pour l'essai.

Des solutions de l'échantillon de «THE » ont été préparées à différentes concentrations (de 3,125 à

100  $\mu\text{g/mL}$ ) par dilution méthanolique. Pour chaque essai, 1,68 mL de la solution de DPPH a été mélangée à 1,6 mL de la solution d'échantillon. Le mélange a été agité vigoureusement afin d'assurer une bonne homogénéisation, puis incubé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à température ambiante pour éviter toute dégradation photochimique du radical DPPH. Le blanc (contrôle négatif) a été préparé dans les mêmes conditions, mais sans ajout d'extrait, tandis que l'acide ascorbique a servi de contrôle positif et préparé dans la gamme de concentrations que l'extrait. L'absorbance finale a été mesurée à 517 nm.

Toutes les analyses ont été réalisées en triplicat pour assurer la fiabilité des données.

L'activité antiradicalaire a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH, calculée selon l'équation proposée par Torres *et al.* (2006) :

#### • Expression des résultats

##### ➤ Calcul des pourcentages d'inhibitions

Les pourcentages d'inhibition ont été évalués à l'aide de la formule de la relation :

$$I \% = [(DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{échantillon}}) / (DO_{\text{témoin}})] \times 100$$

$DO_{\text{témoin}}$  : densité optique du témoin (Solution méthanolique de DPPH)

$DO_{\text{échantillon}}$  : densité optique de l'échantillon testé

##### ➤ Détermination des Concentrations inhibitrices 50 efficaces $CI_{50}$

$CI_{50}$  ou concentration inhibitrice 50 est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les  $CI_{50}$  sont déterminées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'échantillon testé. Plus la  $CI_{50}$  est faible plus l'activité antiradicalaire est forte.

#### - Test de l'ABTS

Cette évaluation a été réalisée selon le protocole décrit par Leong & Shui (2002). Une solution mère du radical ABTS $\bullet^+$  a été préparée en dissolvant 38,40 mg d'ABTS dans 10 mL d'eau distillée, à laquelle ont été ajoutés 6,75 mg de persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ). Le mélange a été incubé à l'obscurité, à température ambiante, pendant 12 heures afin de permettre la formation complète du radical stable ABTS $\bullet^+$ .

Avant utilisation, cette solution a été diluée avec de l'éthanol pour ajuster son absorbance à 734 nm à une valeur d'environ  $0,70 \pm 0,02$ , garantissant ainsi une réactivité optimale. L'essai

a été réalisé en mélangeant à parts égales 2 mL de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> avec 2 mL d'une solution éthanolique de l'extrait du THE formulé, préparée à des concentrations allant de 3,125 à 200 µg/mL.

L'acide gallique, un composé de référence, a été utilisé comme témoin positif et testé dans les mêmes conditions expérimentales. L'absorbance des mélanges réactionnels a été mesurée après 2 minutes de réaction à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, l'éthanol servant de blanc. Chaque concentration a été testée en triplicat pour assurer la robustesse statistique des résultats

Dans ce test, l'expression des résultats a été faite comme précédemment (test de DPPH), c'est-à-dire le calcul des pourcentages d'inhibition et la détermination des concentrations inhibitrices à 50% (CI<sub>50</sub>).

#### 1.2.4. *Activité immunostimulante*

Les cellules RAW264.7, issues de la lignée macrophagique murine (ATCC TIB-71), ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enrichi de 10 % de sérum foetal bovin (SFB) et de 1 % de pénicilline/streptomycine.

##### 1.2.4.1 *Mesure de la viabilité cellulaire et évaluation de la production de NO*

###### - *Préparation des cellules*

Les cellules macrophagiques murines RAW 264.7 ont été décongelées et cultivées dans un milieu DMEM complet, maintenu à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Lorsque la confluence cellulaire atteignait environ 80 %, les cellules ont été délicatement détachées à l'aide d'une spatule cellulaire stérile, puis numérotées à l'aide d'un hémodécomètre afin de déterminer leur densité.

###### - *Traitement des cellules RAW par le THE et le lipopolysaccharide LPS*

Les cellules RAW 264.7 ont étéensemencées dans des plaques de culture de 96 puits à une densité de  $5 \times 10^5$  cellules par puits, dans un volume de 100 µL de milieu complet par puits. Après 24 heures d'incubation pour permettre l'adhésion cellulaire, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations du thé formulé (THE),

## 2. Résultats

### 2.1. *Teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés*

La quantification des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés a permis de déterminer les teneurs respectives de ces métabolites spécialisés dans les extraits du THE lesquelles s'élèvent à  $38,9 \pm 2,97$  mg EAG/g pour les polyphénols totaux,  $15,1 \pm 0,17$  mg EQ/g pour

allant de 1 à 200 µg/mL, selon des dilutions successives avec un facteur de dilution de 3. Ces concentrations ont été établies selon un protocole de dilution standard, en ajoutant l'extrait directement dans le milieu de culture (Novilla *et al.*, 2017).

Des contrôles ont été mis en place : un contrôle négatif (sans traitement) et un contrôle positif induit par le lipopolysaccharide (LPS) à une concentration de 1 µg/mL, connu pour stimuler la production de NO par les macrophages.

#### 1.2.4.2. *Evaluation de la production de monoxyde d'azote (NO) par la méthode de Griess*

Ce test permet d'évaluer l'effet immunomodulateur ou anti-inflammatoire potentiel de l'extrait végétal à travers la mesure de la production de NO par les cellules RAW 264.7.

Après traitement avec le THE et/ou le LPS, les cellules ont été incubées pendant 24 heures supplémentaires à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Le surnageant de chaque puits a ensuite été recueilli et transféré dans une nouvelle plaque de 96 puits pour l'analyse.

La concentration de NO a été estimée de manière indirecte en mesurant les nitrites, principaux produits stables du NO, par la méthode colorimétrique de Griess. Le réactif de Griess a été ajouté aux échantillons, et le mélange incubé à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 10 minutes. Un complexe azoïque de couleur pourpre s'est ainsi formé, dont l'intensité a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Les concentrations de nitrites ont été déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec du nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>), conformément à la méthode de (Kim *et al.*, 2009).

Les résultats obtenus ont été exprimés en fonction des concentrations de nitrite mesurées dans le surnageant, permettant d'évaluer quantitativement l'effet dose-dépendant du THE sur la production de NO. Ces données ont été comparées aux témoins négatif et positif, et représentées sous forme de courbe dose-réponse en échelle logarithmique.

les flavonoïdes, et  $22,76 \pm 1,49$  mg EC/g pour les tanins condensés (Figure 1).

### 2.2. *Potentiel antiradicalaire*

#### - *Test de DPPH*

Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH par la vitamine C et du THE augmentent avec la croissance des concentrations. Toutefois une inhibition d'environ 91 % a été obtenue pour

l'acide ascorbique à des concentrations comprises entre 50 µg/mL et 100 µg/mL, alors que l'inhibition maximale obtenue par l'extrait est de 80 % à 100 µg/ mL (Figure 2).

Sur la figure 3, les valeurs de CI<sub>50</sub> de la vitamine C et de l'extrait de THE étaient de 7,78 ± 0,23 µg/mL et de 31,31 ± 0,72 µg/mL respectivement.

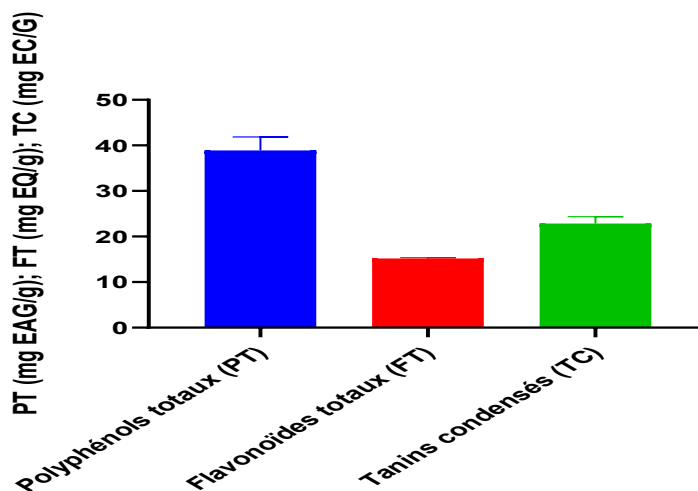


Figure 1 : Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés

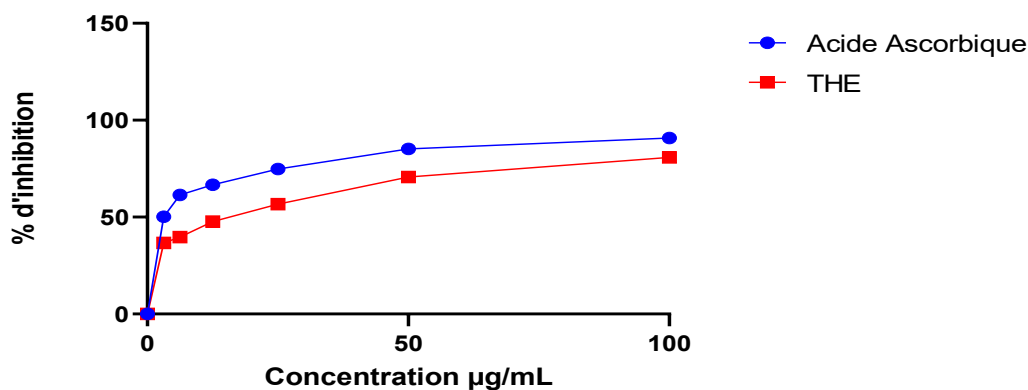


Figure 2: Evolution des pourcentages d'inhibition du radical DPPH par l'extrait de THE et la vitamine C

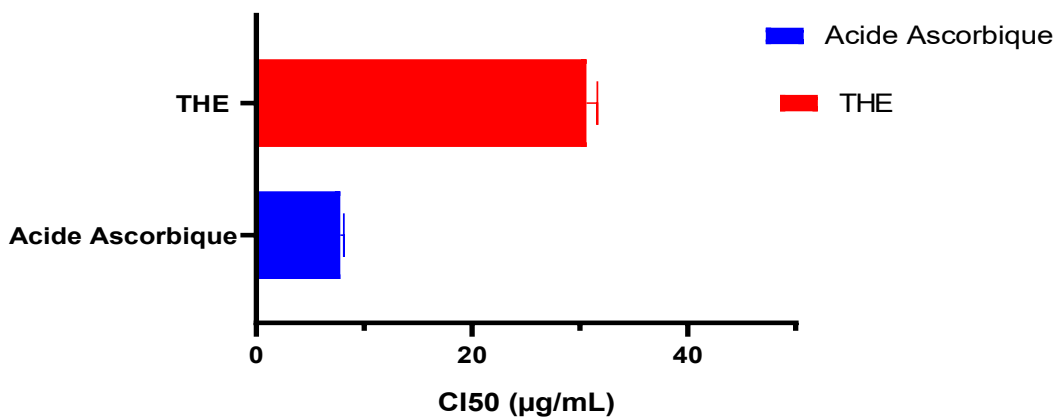


Figure 3 : Représentation en histogramme des valeurs CI<sub>50</sub> de la vitamine C et de l'extrait de THE

**- Test de l'ABTS**

Les pourcentages d'inhibition du radical ABTS par l'acide gallique et par l'extrait du THE augmentent proportionnellement à leurs concentrations.

Toutefois, une inhibition proche de 98 % est observée avec l'acide gallique pour des concentrations comprises entre 50 µg/mL et 200 µg/mL, tandis que le THE atteint une inhibition maximale de 81 % à la concentration de 200 µg/mL. L'ensemble de ces résultats est illustré dans la figure 4.

Les valeurs de CI<sub>50</sub> de l'acide gallique et de l'extrait de THE étaient de 5,86 ± 0,32 µg/mL et de 53,72 ± 1,69 µg/mL respectivement comme illustrées par la figure 5.

**2.3. Activité immunostimulante**

La production de nitrite augmente progressivement avec la concentration du THE 4, atteignant environ 10 µM à la plus forte concentration de 200 µg/mL. Le LPS (lipopolysaccharide) a induit la production de NO dans les macrophages à une valeur située autour de 10 µM (Figure 6).

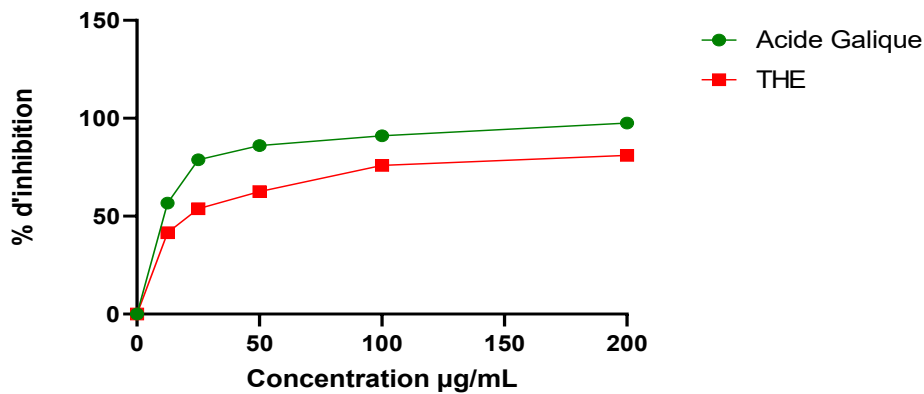


Figure 4 : Evolution des pourcentages d'inhibition de l'ABTS par l'extrait de THE et l'acide gallique

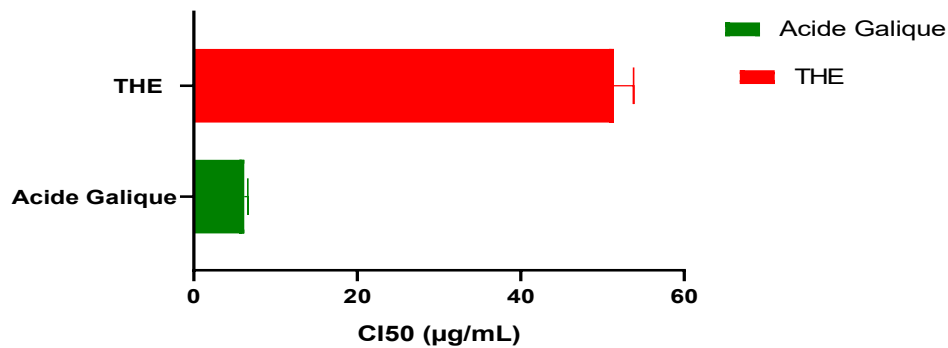


Figure 5 : Représentation en histogramme des valeurs de CI<sub>50</sub> de l'acide gallique et du THE

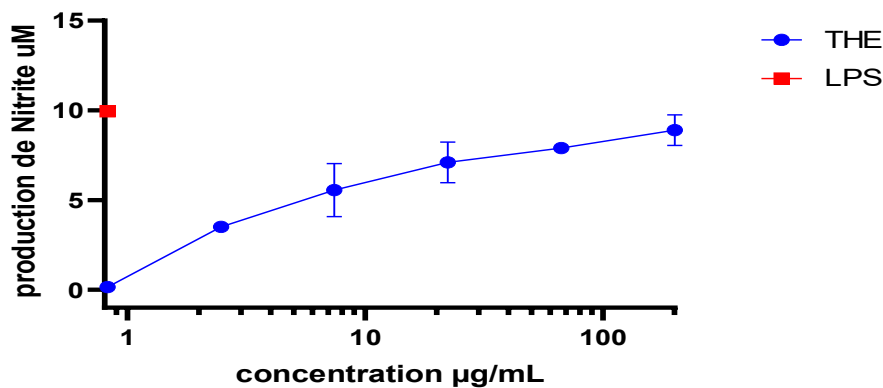


Figure 6 : Courbe Dose-réponse des concentrations du THE sur la production des NO

#### 2.4. Discussion

Les teneurs en phytoconstitués du « THE » ont révélé une richesse en métabolites spécialisés, notamment en polyphénols totaux ( $38,9 \pm 2,97$  mg EAG/g), flavonoïdes ( $15,1 \pm 0,17$  mg EQ/g) et tanins condensés ( $22,76 \pm 1,49$  mg EC/g). Ces constitués sont bien connus pour leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène (ROS), principalement via des mécanismes de transfert d'électrons, de donation de protons, ou encore de chélation des ions métalliques pro-oxydants (Pietta, 2000 ; Manel et al., 2017).

L'évaluation de l'activité antiradicalaire de la formulation THE par les méthodes DPPH et ABTS a mis en évidence un potentiel antiradicalaire notable, avec des valeurs de  $CI_{50}$  respectives de  $31,31 \mu\text{g/mL}$  et  $53,72 \mu\text{g/mL}$ . Bien que ces valeurs soient supérieures à celles des standards de référence tels que l'acide ascorbique ( $CI_{50} = 7,55 \mu\text{g/mL}$ ) et l'acide gallique ( $CI_{50} = 5,86 \mu\text{g/mL}$ ), elles traduisent néanmoins une activité antioxydante significative. Cette activité, bien que modérée en comparaison avec les antioxydants purs, demeure biologiquement pertinente, surtout si l'on considère la complexité de la matrice végétale et l'effet synergique potentiel entre les différents constituants phytochimiques (Dai & Mumper, 2010 ; Ghasemzadeh et al., 2012). La comparaison des valeurs de  $CI_{50}$  met en évidence que le potentiel antioxydant du « THE » est supérieur à celui d'un thé formulé à partir de *Phyllanthus debilis*, *Osbeckia octandra* et *Artocarpus heterophyllus* (formulation M2). En effet, selon une étude menée par Dias et al. (2024), cette association de plantes médicinales, testée selon la même méthode de piégeage des radicaux libres (DPPH), a présenté une  $CI_{50}$  de  $45,79 \mu\text{g/mL}$ , contre  $31,31 \mu\text{g/mL}$  pour « THE ». Ce résultat suggère que THE possède une meilleure capacité de neutralisation des radicaux DPPH•. Par ailleurs, la valeur de  $CI_{50}$  de « THE » est proche de celle observée pour la formulation M7 de la même étude ( $CI_{50} = 34,40 \mu\text{g/mL}$ ), ce qui confirme la compétitivité antioxydante de la formulation à base de *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale* et *Mentha piperita*.

Les résultats obtenus par le test ABTS+ corroborent ceux du DPPH, en confirmant le pouvoir antiradicalaire de « THE ». En effet, l'analyse des  $CI_{50}$  révèle que « THE » est également capable d'inhiber efficacement le radical cationique ABTS•+.

Les valeurs de  $CI_{50}$  observées pour la formulation s'inscrivent dans la même gamme que celles rapportées pour ses plantes

constitutives. Par exemple, Dabiré et al. (2015) ont mis en évidence une  $CI_{50}$  de  $23,8 \mu\text{g/mL}$  pour *Lippia multiflora*, soulignant sa contribution prépondérante à l'activité antioxydante globale. De leur côté, Natalia et al. (2023) ont obtenu une  $CI_{50}$  de  $59,2 \mu\text{g/mL}$  pour *mentha piperita*, confirmant l'implication modérée de cette espèce dans l'effet observé de « THE ». En ce qui concerne *Z. officinale*, Ali et al. (2018) ont rapporté une  $CI_{50}$  de  $250 \mu\text{g/mL}$  pour l'activité antioxydante. Ces données corroborent la contribution de chacune de ces plantes à l'activité antiradicalaire globale de la formulation. Il est également bien établi que la combinaison de plusieurs extraits végétaux peut générer une synergie positive, augmentant l'efficacité antioxydante globale par rapport aux extraits pris individuellement (Ghasemzadeh et al., 2012). Cette assertion a été confirmée avec « THE » par le test réalisé au DPPH.

D'un point de vue immunologique, la formulation THE induit une production dose-dépendante de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages, atteignant environ  $10 \mu\text{M}$  à la concentration la plus élevée testée ( $200 \mu\text{g/mL}$ ). Cette production est comparable à celle induite par le lipopolysaccharide (LPS), une substance de référence connue pour activer la voie TLR4/NF- $\kappa$ B, entraînant l'induction de la NO synthase inductible (iNOS) et la libération de NO, un marqueur clé de l'activation immunitaire (Zhihong et al., 2012 ; Shanshan et al., 2022).

L'effet observé pourrait résulter de l'action combinée des trois plantes utilisées. Des travaux récents ont montré que *Lippia multiflora* stimule l'activité des macrophages, induisant une production accrue de NO et une expression significative de iNOS à des concentrations supérieures à  $100 \mu\text{g/mL}$  (Soro et al., 2016 ; Bayala et al., 2014). Le gingembre (*Zingiber officinale*), riche en gingérols et shogaols, exerce un effet immunomodulateur en activant les macrophages tout en modulant positivement la production de cytokines via la régulation de la voie NF- $\kappa$ B (Kitti et al., 2024). Quant à *Mentha piperita*, ses extraits ont démontré une capacité à augmenter modérément la production de NO et à stimuler la sécrétion de cytokines telles que IL-1 $\beta$  et IL-6, sans compromettre la viabilité cellulaire (Arruda et al., 2017 ; Cosentino et al., 2009).

En comparaison avec le LPS dans la stimulation des cellules RAW 264.7, la production de NO est comprise entre  $20$  et  $28 \mu\text{M}$  de NO (Zhihong et al. 2012 ; Hyun et al. 2020). Cela montre que le THE est capable de susciter une activation

macrophagique similaire, mais potentiellement plus équilibrée. Contrairement au LPS, souvent associé à une inflammation excessive, les extraits

végétaux de THE pourraient offrir une alternative plus douce et physiologiquement tolérable.

### Conclusion

Cette étude vise à quantifier les métabolites spécialisés, et à évaluer les activités anti radicalaire et immunostimulante d'un thé codifié « THE », élaboré à partir de *lippia multiflora*, *zingiber officinale* et *mentha piperita*. L'analyse quantitative des métabolites spécialisés a révélé des teneurs appréciables en polyphénols totaux ( $38,9 \pm 2,97$  mg EAG/g), en flavonoïdes ( $15,1 \pm 0,17$  mg EQ/g) et en tanins condensés ( $22,76 \pm 1,49$  mg EC/g), soulignant la richesse chimique de la formulation.

L'évaluation des activités biologiques de « THE » a montré un potentiel anti radicalaire significatif

avec des valeurs de  $CI_{50}$  de  $31,31 \mu\text{g/mL}$  (DPPH) et  $53,72 \mu\text{g/mL}$  (ABTS), indiquant une bonne capacité de piégeage des radicaux libres. Par ailleurs, Ce « THE » stimule la production d'oxydes nitriques (NO) de manière dose dépendante, suggérant une activation de la réponse immunitaire.

Ces résultats fondés sur des données expérimentales soutiennent la valorisation scientifique des ressources végétales locale et appuis leur usage traditionnel dans une perspective de développement de produits de santé naturels à haute valeur ajoutée.

### Références

**Abena A.A., Diatwa M., Gakosso G, Gbeassor M., HondiAssah T., & Ouamba J., 2003.** Effets analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires de l'huile essentielle de *Lippia multiflora*. *Fitothérapie*, **74**(3), 231-236.

**Ali A., El-Nour M. & Yagi S.M., 2018.** Teneurs totales en phénols et flavonoïdes et activité antioxydante du rhizome, du cal et du cal de gingembre (*Zingiber officinale* Rosc.) traités avec certains éliciteurs. *Revue Genetetic Engineering and Biotechnology*, **16**(2), 677-682.

**Arruda M.O., Mendes S.J.F., Teixeira A.S., Ludmilla S.S.M., Ribeiro M.N.S., Stanley De Sousa L.G., Muscara M.N., Fernandes E.S. & Monteiro-Neto V., 2017.** The hydroalcoholic extract obtained from *Mentha piperita* L. Leaves attenuates oxidative stress and improves survival in Lipopolysaccharide-Treated macrophages. *Journal of Immunology Research*, **20**, 1-9.

**Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S., 2006.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**(1), 191-203.

**Bayala B., Bassole I.H.N., Gnoula C., Nebie R., Yonli A., More L., Figuered G., Nikiema J-B., Lobaccaro J.-M.A. & Simporé J., 2014.** Chemical composition, antioxidant, anti-Inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina-Faso. *Plos one*, **9**(3), 1-11.

**Cosentino M., Bombelli R., Conti A., Colombo M.L., Azzetti A., Bergamaschi A., Marino F. & Lecchini S., 2009.** Antioxidant properties and in vitro immunomodulatory effects of peppermint (*Mentha x piperita* L.) Essential oils in human

leukocytes. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **1**(3), 33-43.

**Dabire C.M., Bationo R.K., Adama H., Nebie R.C.H., Pale E., Dhanabal S. P. & Nacro M., 2015.** Total phenolics content, flavonoids profiling and antioxidant activity of *Lippia multiflora* leaves extracts from Burkina Faso, *Asian Journal of Plant Science and Research*, **5**(5), 28-33.

**Dai J., & Mumper R.J., 2010.** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, **15**(10), 7313-7352.

**Dias P.G.I., Marapana R.A.U.J., Rathnayaka R.M.U.S.K., Gayathri S.M.D.S., Anuradha N.G.D., Kananke T.C., Rathnayaka R.M.K.T., Perera M.G.A.N., Sabaragamuwa R.S. & Wickramaratne M.N., 2024.** Identification of the best plant ratios for a polyherbal tea mix to obtain optimum antioxidant, antidiabetic, and  $\beta$ -glucuronidase inhibition activities. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, **15**(5), 1-7.

**Ghasemzadeh A., Azarifa M., Soroodi O. & Jaafar H.Z.E., 2012.** Flavonoid compounds and their antioxidant activity in extract of some tropical plants *Journal of Medicinal Plants Research*. **6**(13), 2639-2643.

**Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N., 2011.** Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human health a review. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(31), 6697-6703.

**Harborne, J.B., 1998.** *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (3rd ed.). Chapman & Hall, London.

- Hyun S.K., Jae H.L., Sun H.M., Dong U.A. & Hyun-Dong P., 2020. Ovalbumin hydrolysates inhibit Nitric Oxide production in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages. *Journal Science of Animal resources*, 40(2), 273-285.
- Kim J.H., Park Y.M., Shin J.S., Park S.J., Choi J.H., Jung H.J., Park H.J. & Lee K.T., 2009. Fraxinellone inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by negatively regulating nuclear factor-kappa B in RAW 264.7 macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(6), 1062-1068.
- Kitti P., Beatrix A., Attila G.S., Attila B. & Tünde F., 2024. Ginger-derived bioactive compounds attenuate the Toll-like receptor mediated responses of human dendritic cells. *European Journal of Pharmacology*, 967, 1-16.
- Manel O., Maria P.A. & Leila B.B. K., 2017. Composés phénoliques et capacité antioxydante des extraits méthanoliques du *Tripodion (Anthyllis tetraphylla L.)*. *Revue des Régions Arides*, 43, 589-594.
- Mashhadi N.S., Ghiasvand R., Askari, G., Hariri, M., Darvishi, L., & Mofid, M.R., 2013. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of ginger in health and physical activity: Review of current evidence. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(Suppl 1), S36-S42.
- McKay D.L., & Blumberg, J.B., 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita L.*). *Phytotherapy Research*, 20(8), 619-633.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R. & Beek V.T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.
- Nataliia H., Lesya K., Katarzyna P., Vladimira H., Sedlá C., Roman F., Mariia V., Iryna M.J.B., Piotr P.W. & Jacek L., 2023. *Mentha piperita* : Huile essentielle et extraits, leurs activités biologiques et perspectives de développement de nouveaux produits médicinaux et cosmétiques. *Molecules*, 28(21), 1-27.
- Novilla A, Djamhuri D.S., Widyaningrum A. & Widodo M.A., 2017. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechin gallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(11) :1035-1041.
- Pietta P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
- Shanshan W., Ting W., Qi C., Xue C., Zhiyong C. & Zhenzhen Z., 2022. Anti-inflammatory effects of Torin2 on lipopolysaccharide-treated RAW264.7 murine macrophages and potential mechanisms. *Heliyon*, 8, 1-8.
- Soro L.C., 2016. Caractérisation biochimique et activités biologiques des feuilles de *Lippia multiflora* Verbenaceae "théier de savane" cultivées en milieux forestiers et savaniques de Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat Nutrition et sécurité alimentaire, Université Nangui ABROGOUA, Abidjan, Côte d'Ivoire, 204 p.
- Torres R., Francesca F., Brenda M., Francisco U., Cecilia L & Juan G., 2006. Antioxydant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry*, 67 (10), 984-987.
- Zhihong C., Walid J., Karl B.S., Kenneth T.F., Ranjan D., Xinghua Y., Grahame J.K., Cornelia C.B., Stephen A.S. & Bruce D.T., 2012. *Journal of Neurosciences*, 32(34), 11706-11715.

## RESUME

En Côte d'Ivoire, *Lippia multiflora*; *Zingiber officinale* et *Mentha piperita* sont reconnues traditionnellement pour leurs effets bénéfiques sur le bien-être digestif, tonique et préventif. Cependant, la généralisation de leur consommation en une formulation unique sous forme d'un thé, souvent en dehors de tout cadre scientifique validé, pose la question de leur innocuité, de même que celles de leurs propriétés biologiques réelles. Cette étude vise à valoriser ces essences végétales aromatiques locales à travers le développement d'un produit naturel sûr et efficace.

A cet effet, des poudres végétales de ces trois plantes ont été combinées pour formuler cinq types de thés codés « THE » soumis à une évaluation sensorielle selon un test hédonique. L'innocuité de la formulation la plus appréciée a été ensuite évaluée en toxicités aiguë et subaiguë conformément aux directives de l'OCDE 423 et 407. Les propriétés antiradicalaires (DPPH/ABTS), immunostimulante (dosage du NO) et antihyperglycémiant (modèle STZ chez le rat) ont été évaluées expérimentalement. L'analyse phytochimique qualitative et quantitative a été conduite par des tests de coloration/précipitation et par spectrophotométrie.

De l'analyse sensorielle, il ressort que la formulation de THE 4 associant X4 *L. multiflora*, Y4 *Z. officinale* et Z4 *M. piperita* a été la plus appréciée avec un score de 8,01. L'étude de l'innocuité a révélé que la DL<sub>50</sub> était supérieure à 5000 mg/Kg pc et qu'aucune modification des paramètres hématologiques, biochimiques et ioniques n'a été observée aux doses répétées de 17 ; 85 et 425 mg/Kg p.c. Le THE 4 possède un potentiel antiradicalaire modéré évalué à CI<sub>50</sub> = 30,59 ± 0,72 µg/mL (DPPH) et CI<sub>50</sub> = 53,72 ± 1,69 µg/mL (ABTS), corrélés à une teneur élevée en composés phénoliques totaux quantifiés à 38,9 mg EAG/g. L'efficacité immunostimulante s'est traduite par une augmentation dose-dépendante de la production de NO. Après 30 min de charge orale en glucose, les doses de 17 mg/Kg pc et 85 mg/Kg pc du THE 4 réduisent le pic hyperglycémique, puis la dose de 85 mg/kg pc assure un retour progressif à la glycémie de base en 21 jours dans une hyperglycémie induite par STZ. En outre, la présence dans le THE 4 des phytoconstitués tels que les alcaloïdes, les polyphénols, les saponosides, les stérols et polyterpènes, des tanins, des mucilages, des leucoanthocyanes et des saponines justifie en partie ces activités.

Les données obtenues soutiennent l'innocuité et les effets biologiques bénéfiques de la formulation THE 4, ouvrant la voie à sa valorisation en tant que nutraceutique local fiable. Ce travail s'inscrit dans une démarche de sécurisation de l'usage des plantes aromatiques, de promotion des savoirs traditionnels validés et de développement de produits naturels sûrs et efficaces.

**Mots clés :** Formulation, THE, Espèces aromatiques, DL<sub>50</sub>, Antiradicalaire, Immunostimulant, et Antihyperglycémiant

## ABSTRACT

In Côte d'Ivoire, *Lippia multiflora*, *Zingiber officinale*, and *Mentha piperita* are widely used in traditional medicine for their presumed digestive, tonic, and preventive properties. While commonly consumed as infusions, their increasing use in combined formulations without scientific validation raises concerns regarding their safety and real biological effects.

This study aimed to valorize these local aromatic species by developing a natural tea formulation with verified safety and biological activity. Five herbal tea formulations (coded THE) were prepared by mixing plant powders in various proportions. A hedonic sensory evaluation was performed to identify the most acceptable formulation. The most preferred formulation (THE 4) was subjected to acute and subacute toxicity testing in Wistar rats, following OECD guidelines 423 and 407. Its antioxidant potential was assessed using DPPH and ABTS assays; immunostimulant properties were evaluated by nitric oxide (NO) production *in vitro*; and antihyperglycemic activity was tested in streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic rats. Phytochemical screening and total phenolic content determination were also performed using standard biochemical techniques.

Results showed that THE 4, containing *L. multiflora* (X4), *Z. officinale* (Y4), and *M. piperita* (Z4), obtained the highest sensory score (8.01). No signs of toxicity or mortality were observed at doses up to 5000 mg/Kg body weight, and no significant alterations were detected in hematological, biochemical, or ionic parameters at 17; 85 and 425 mg/Kg in the subacute test. THE 4 demonstrated moderate antioxidant activity (IC<sub>50</sub> = 30.59 ± 0.72 µg/mL for DPPH; 53.72 ± 1.69 µg/mL for ABTS), correlated with a high phenolic content (38.9 mg GAE/g). Immunostimulatory effects were observed with a dose-dependent increase in NO production. In hyperglycemic rats, doses of 17 and 85 mg/kg significantly reduced the postprandial glycemic peak, with 85 mg/Kg normalizing blood glucose within 21 days. Phytochemical analysis confirmed the presence of alkaloids, polyphenols, saponins, sterols and polyterpenes.

These findings support the safety and biological efficacy of the THE 4 formulation, providing a scientific basis for its development as a standardized nutraceutical. This work contributes to the valorization of local aromatic plants, the promotion of evidence-based traditional medicine, and the development of safe, natural health products.

**Keywords:** Formulation, THE, Aromatic species, LD<sub>50</sub>. Antiradical, Immunostimulant, Antihyperglycemic

**Université**  
**Jean Lorougnon GUÉDÉ**

**THESE DE**  
**DOCTORAT**

**Innocuité et évaluation de quelques propriétés biologiques  
d'un THE formulé à partir de *Lippia multiflora*, *Zingiber  
officinale* et *Mentha piperita* ; trois plantes aromatiques  
récoltées en Côte d'Ivoire**

**ANNEE : 2025-2026**

**N°:**

**N'DRI**  
**QUESNELLE**  
**EPIPHANIE**