

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE SCIENCE DE LA
VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
SCHOOL FOR LIFE, SCIENCES, HEALTH
AND ENVIRONMENT

DOCTORATE TRAINING UNIT OF LIFE
SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE NUTRITION ET DE BIOCHIMIE NUTRITIONNELLE

LABORATORY OF NUTRITION AND NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY

Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et de ses fractions sur le stress oxydant et le microbiote intestinal induit par l'eau oxygénée chez le rat

Mémoire rédigé comme requis partiel en vue de l'obtention du diplôme de Master en
Biochimie

Option : Sciences des Aliments et Nutrition

Par :

OSSELE Anne Sygrid

Licencié-ès Sciences

Matricule :18N2971



Sous la Co-direction de :

MBONG ANGIE Mary-Ann

Maître de Conférences

Université de Yaoundé I

OBEN Julius ENYONG

Professeur

Université de Yaoundé I

Année académique : 2024

DEDICACE

✚ A ma grand-mère ENYEGUE OSSELE Claire

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail n'aurait été possible sans l'aide de plusieurs personnes à qui j'adresse mes sincères remerciements. Ainsi, je tiens à remercier :

- ✚ **Pr. OBEN Julius ENYONG et Pr. MBONG Angie Mary – Ann**, qui ont accepté de guider mes tous premiers pas dans le monde de la recherche, pour leur présence et leur disponibilité permanente, pour les conseils et le soutien multiforme qu'ils m'ont apportée, et pour l'intérêt constant qu'ils n'ont cessé de m'accorder pour l'orientation de ce travail ;
- ✚ **Pr. NTENTIE Françoise Raïssa**, pour les conseils et le soutien durant tout ce travail ;
- ✚ **Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef de Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I et à travers lui, tous les enseignants dudit Département pour leurs encadrements reçus ;
- ✚ Mes **aînés** de laboratoire MAKAMWE Inelle, FOTSO Huiny, AKAMBA Dupon pour leurs observations, leurs conseils et leurs encouragements ;
- ✚ Mes **Camarades de laboratoire et amis de promotion**, WANMEGNE Karel, NGUE Cyrille, DONGMO Nadine, SOKOUDJOU Sharone, FOURA WOUNDI pour les moments de travail, le soutien durant la réalisation de ce travail ;
- ✚ Mes parents OSSELE Anne, MENGUE Nicole, ENYEGUE Claire, BIDJO Benjamin pour l'amour, les encouragements, les conseils, le soutien moral et financier que vous m'avez apporté ;
- ✚ Mes sœurs ENYEGUE Claire Désirée, BIDJO Elisette, BIDJO Gaëlle, EKOMBA Kimberlie pour le soutien moral et financier, les conseils que vous m'avez apportés ;
- ✚ Tous les membres **de ma famille**, je vous suis grée pour tout votre soutien.
- ✚ Mes **ami(e)s** SANMEGNI Alvine, TOUELE Ruth, ASSET Stephen, NGONO Cyndia, DOUANDJI Jersel pour leurs encouragements, leurs soutiens, ainsi que les moments de joie partagés durant la réalisation de ce travail ;
- ✚ Tous ceux ou celles qui de près ou de loin et de quelque façon que ce soit ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms ne figurent pas ici : soyez convaincus de ma profonde gratitude.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES PHOTOGRAPHIES	xi
LISTE DES ANNEXES	xii
RESUME	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE	3
I.1- Généralités sur le stress oxydant	3
I.1.1-Definition du stress oxydant	3
I.1.2- Sources du stress oxydant	3
I.1.2.1- Sources exogènes	3
I.1.2.2- Sources endogène	4
I.1.3-Radicaux libres	5
I.1.3.1-Classification des radicaux libres	5
I.1.3.1.1-Radicaux libres azotés	5
I.1.3.1.2-Radicaux libres oxygénées	6
I.1.3.2-Rôle des radicaux libres	8
I.1.4- Les défenses antioxydantes	8
I.1.4.1-Définition et rôle	8
I.1.4.2-Système enzymatique	9
I.1.4.3- Système antioxydant non enzymatique	10
I.1.5- Conséquences biologique du stress oxydant	12
I.1.5.1-Acide nucléique	12

Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur le stress oxydant induit par l'eau oxygénée chez le rat

I.1.5.2- Oxydation des lipides	13
I.1.5.3-Oxydation des protéines	13
I.1.6-Maladies liées au stress oxydant.....	14
I.1.6.1-Stress oxydatif et cancers	14
I.1.6.2-Stress oxydatif et maladies cardiovasculaires	15
I.1.6.3- Stress et obésité	15
I.1.6.4- Stress et maladies neuro-dégénératives.....	15
I.1.6.5- Stress et microbiote intestinal.....	16
I.1.7-Induction du stress oxydant.....	16
I.1.7.1- Les agents chimiques.....	16
I.1.7.2-L'alimentation hypercalorique	17
I.1.8-Moyen de lutte contre le stress	17
I.1.8.1- Médicaments.....	17
I.1.8.2-L'alimentation.....	17
I.2-Généralités sur <i>Aframomum angustifolium</i>	20
I.2.1-Classification.....	20
I.2.2-Description de la plante	21
I.2.3-Répartitions géographiques.....	21
I.2.4-Utilisations traditionnelles.....	22
I.2.5-Etudes antérieures sur <i>Aframomum angustifolium</i>	22
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	21
II.1-Matériel.....	21
II.1.1- Matériel végétal.....	21
II.1.2- Matériel animal	21
II.1.3. Matériel de laboratoire.....	22
II.2-Methodes	22
II.2.1- Collecte et traitement des échantillons.....	22
II.2- Détermination de la teneur en quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions.....	25
II.2.1- Dosage des composés phénoliques totaux.....	25
II.2.2- Dosage des flavonoïdes totaux.....	26
II.2.3- Dosage des alcaloïdes.....	27
II.3- Détermination de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	28
II.3.1-Test d'évaluation de la capacité antioxydante totale.....	28

Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur le stress oxydant induit par l'eau oxygénée chez le rat

II.3.2-Test d'évaluation du pouvoir réducteur du fer	29
II.3.3-Test de piégeage du radical libre ABTS ⁺	30
II .4- Evaluation de l'activité antioxydante <i>in-vivo</i>	31
II.4.1- Protocole expérimental.....	31
II.4.2- Sacrifice des animaux.....	32
II.4.2.1- Préparation du plasma, des homogénats d'organes, de l'hémolysât d'érythrocytes, de l'inoculum bactérien	32
II.4.2.1.1. Préparation du plasma	32
II.4.2.1.2. Préparation de l'hémolysât d'érythrocytes	33
II.4.2.1.3. Préparation des homogénats d'organes.....	33
II.4.2.1.4- Prélèvement du contenu intestinal.....	33
II.4.2.1.5-Préparation de l'inoculum bactérien	33
II.4.2.2-Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique et de ses fractions sur le microbiote intestinal	33
II.4.2.2.1 Préparation des milieux de culture	33
II.4.2.2.2 Ensemencement et incubation.....	34
II.4.2.2.3- Comptage microbien	35
II.5-Dosages des paramètres biochimiques	35
II.5.1- Dosages des marqueurs du système antioxydant.....	35
II.5.1.1- Evaluation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD).....	35
II.5.1.2- Détermination de l'activité de la catalase.....	36
II.5.1.3- Dosage du glutathion.....	37
II.5.2- Dosages des marqueurs du système pro-oxydant	38
II.5.2.1- Dosage du radical oxyde nitrique (NO•)	38
II.5.2.2- Dosage d'un marqueur de la peroxydation lipidique : Malondialdéhyde (MDA).....	39
II.6- Analyses statistiques des résultats.....	41
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	41
III.1-Résultats	41
III.1.1-Rendement d'extraction.....	41
III.1.2.1-Teneurs en composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions	41
III.1.2.2-Teneurs en alcaloïdes de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions.	42

Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur le stress oxydant induit par l'eau oxygénée chez le rat

III.1.3- Potentiel antioxydant <i>in vitro</i> de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions.....	42
III.1.3.1-Capacité antioxydante totale (CAT) de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions.....	42
III.1.3.2-Piégeage du radical ABTS ⁺ par l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions.....	43
III.1.3.3-Réduction du fer de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions.....	44
III.1.4-Potentiel antioxydant <i>in vivo</i> de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions.....	44
III.1.4.1- Effet de l'extrait éthanolique d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions sur quelques marqueurs du statut pro-oxydant chez les rats.	45
III .1.4.2-Effet de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et les fractions sur quelques marqueurs enzymatiques chez les rats.	48
III .1.4.3-Effet de l'extrait éthanolique et ses fractions sur le glutathion (marqueur non enzymatique)	50
III.1.4.4- Effet de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions sur la flore intestinale	52
III.1.4.4. Analyse en composantes principales (ACP).....	53
III.2- Discussion.....	56
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	61
CONCLUSION	61
PERSPECTIVES	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62
ANNEXES.....	a

LISTE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

- ABTS:** 2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzotriazoline-6-sulfonic acid)
- ACP :** Analyse en composantes principales
- ADN:** Acide Désoxyribonucléique
- AGE:** *Advanced Glycation End Products*
- ANOVA :** *Analysis of Variance*
- ARN :** Acide ribonucléique
- ATP :** Adenosine Triphosphate
- BHT :** Butylhydroxytoluene
- CAT :** Capacité Antioxydante Totale
- CE₅₀ :** Concentration Efficace 50
- CI₅₀:** Concentration Inhibitrice 50
- DO :** Densité Optique
- EDTA :** Ethylène Diamine Tétra-Acétique
- EOR :** Espèces Oxygénées Réactives
- ERA :** Espèces Réactives Azotées
- ERO :** Espèces Réactives Oxygénées
- FRAP:** Ferric Reducing Antioxidant Power
- GPx :** Glutathion Peroxydase
- GR :** Glutathion Réductase
- GSH :** Glutathion forme Réduite
- H₂O₂ :** Peroxyde d'hydrogène
- LSD :** *Least Significant Difference*
- MDA :** Malondialdéhyde
- MDA :** Malondialdéhyde
- ml :** Millilitre
- NaCl :** Chlorure de Sodium
- NADH :** Nicotinamide Adénine Dinucléotide
- NADPH :** Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate forme réduite
- NO :** Oxyde Nitrique
- NO :** Oxyde Nitrique
- O₂⁻ :** Anion Superoxyde

OH• : Radical hydroxyle

ONOO⁻ : Anion Peroxynitrite

PC : Poids Corporel

Ph : Potentiel Hydrogène

SOD : Superoxyde Dismutase

SOD : Superoxyde Dismutase

SPSS : Statistical Package for Social Science

TBA : *Thiobarbituric Acid*

TCA : Acide Trichloracétique

TN : Témoin Négatif

TP : Témoin Positif

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification botanique d' <i>Aframomum angustifolium</i>	21
Tableau II : Étalonnage de la catalase	37
Tableau III : Teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes totaux de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions.	41
Tableau IV : Teneurs en alcaloïdes de l'extrait éthanolique d' <i>Aframomum angustifolium</i> et de ses fractions.	42
Tableau V: Effet de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions sur les bactéries commensales.....	52
Tableau VI: Effet de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions sur les bactéries pathogènes.	53
Tableau VII : Pourcentage (%) de contribution des différentes variables étudiées à la formation du système d'axe (F1xF2).	54

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Balance d'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants	3
Figure 2 : Source de production des ERO	5
Figure 3 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes	11
Figure 4 : Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine	12
Figure 5 : Étapes de la peroxydation lipidique	13
Figure 6 : Obtention de la poudre des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i>	23
Figure 7 : Diagramme d'obtention de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions	24
Figure 8 : Capacité antioxydante totale de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions	43
Figure 9 : Test de piégeage du radical ABTS de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions	44
Figure 10 : Concentration efficace 50 de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions	44
Figure 11 : Effet de l'extrait éthanolique d' <i>Aframomum angustifolium</i> et les fractions sur la concentration en radical oxyde nitrique chez les rats dans (a) Plasma, (b) Foie, (c) Cœur, (d) rein chez les rats	46
Figure 12 : Effet de l'extrait éthanolique et les fractions sur la concentration en malondialdéhyde (MDA) dans le (a) plasma, (b) foie, (c) cœur, (d) rein chez les rats	47
Figure 13 : Effet de l'extrait éthanolique et ses fractions sur l'activité de la SOD chez les rats	48
Figure 14 : Effet de l'extrait et ses fractions sur l'activité de la catalase dans (a) les érythrocytes, (b) le cœur chez les rats	49
Figure 15 : Effet de l'extrait éthanolique des graines d' <i>Aframomum angustifolium</i> et ses fractions sur l'activité du glutathion dans (a) foie, (b) cœur, (c) rein (d) plasma chez les rats	51
Figure 16 : Cercle de corrélation entre les variables (axes F1 et F2)	54
Figure 17 : Analyse en composante principales de l'extrait éthanolique et de ses fractions	56

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1: Fruits secs d' <i>A. angustifolium</i> (a) ; fruits frais d' <i>A. angustifolium</i> (b) ; graines <i>A. angustifolium</i> (c)	21
Photographie 2: Rat mâle de souche wistar	22

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Préparation des solutions	a
Annexe 2: Différentes courbes d'étalonnage	a
Annexe 3: Dosages des protéines totales (Gornall, 1949).....	c
Annexe 4: préparation de milieux de cultures	d
Annexe 5 : Considérations éthiques	e

RESUME

Le stress oxydatif a été associé à l'apparition de diverses pathologies comme l'altération du microbiote intestinal, les cancers, les maladies cardio-vasculaires et le diabète. L'objectif de cette étude était de comparer les propriétés antioxydantes *in vitro*, *in vivo* et l'effet sur le microbiote intestinal de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions. La teneur en composés phénoliques, flavonoïdes et alcaloïdes totaux ont été déterminé par les méthodes colorimétriques. La capacité antioxydante totale, le pouvoir réducteur et le piégeage du radical ABTS⁺ ont permis la détermination du potentiel antioxydant *in vitro* de l'extrait éthanolique et ses fractions. Concernant l'étude *in vivo*, des rats mâles de souche *wistar* pesant entre 180-200g ont été subdivisés en 2 lots de rats, le lot 1 de 05 rats représentant le groupe témoin négatif (TN) qui recevait de l'eau distillée et le lot 2 (25 rats) qui ont été stressés par injection intrapéritonéale à l'eau oxygénée à la dose unique de 2ml/kg de pc de 3% de peroxyde d'hydrogène, puis subdivisé en 05 groupes de 05 rats : un groupe témoin positif (TP) recevant de l'eau distillée, un groupe EEA recevant 300 mg/kg pc de l'extrait éthanolique, deux groupes FDCM et FMETH recevant respectivement 150 mg/kg de pc de la fraction au dichlorométhane et au méthanol et un groupe référence recevant 10 mg/kg pc de vitamine E. Après 14 jours de traitement, les animaux ont été sacrifiés après anesthésie. Par la suite le plasma, les homogénats (foie, cœur, rein) et l'hémolysât ont été préparés pour le dosage des paramètres biochimiques (radical NO[•], malondialdéhyde, catalase, superoxyde dismutase, glutathion) par les méthodes colorimétriques et le prélèvement du contenu intestinal pour la quantification des bactéries. Les résultats obtenus ont montré que la fraction au méthanol possède les meilleures teneurs en composés phénoliques, flavonoïdes, alcaloïdes. L'extrait éthanolique a présenté la meilleure capacité antioxydante totale et les fractions une meilleure capacité à inhiber le radical ABTS⁺, un meilleur pouvoir réducteur comparé à l'extrait éthanolique. *In vivo*, l'extrait a mieux réduit le malondialdéhyde et les fractions ont présenté une meilleure réduction du NO[•]. Concernant le statut des marqueurs antioxydants, les fractions ont permis d'augmenter l'activité de la catalase, superoxyde dismutase et le taux de glutathion par rapport à l'extrait éthanolique. La fraction au méthanol a eu un effet bénéfique sur les bactéroïdes et les *clostridioles*. L'analyse en composantes principales a montré que la fraction au méthanol présentait les meilleures associations avec les paramètres du stress oxydant.

Mots clés : stress oxydatif, extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium*, Fractions, microbiote intestinal.

ABSTRACT

Oxidative stress has been associated with the development of various pathologies such as the alteration of the intestinal microbiota, cancer, cardiovascular diseases and diabetes. The aim of this study was to compare the in vitro and in vivo antioxidant properties and the effect on the intestinal microbiota of the ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds and its fractions. The content of total phenolic compounds, flavonoids and alkaloids was determined by colorimetric methods. The total antioxidant capacity, reducing power and ABTS+ radical scavenging capacity were used to determine the in vitro antioxidant potential of the ethanolic extract and its fractions. For the in vivo study, male wistar rats weighing between 180-200g were subdivided into 2 batches of rats, batch 1 of 05 rats representing the negative control group (TN) which received distilled water and batch 2 (25 rats) which were stressed by intraperitoneal injection with hydrogen peroxide at a single dose of 2ml/kg bw of 3% hydrogen peroxide, then subdivided into 05 groups of 05 rats: a positive control (PC) group receiving distilled water, an EEA group receiving 300 mg/kg bw of the ethanolic extract, two FDCM and FMETH groups receiving 150 mg/kg bw of the dichloromethane and methanol fractions respectively and a reference group receiving 10 mg/kg bw of vitamin E. After 14 days of treatment, the animals were sacrificed after anaesthesia. Plasma, homogenates (liver, heart, kidney) and haemolysate were then prepared for the determination of biochemical parameters (NO● radical, malondialdehyde, catalase, superoxide dismutase, glutathione) using colorimetric methods, and intestinal contents were sampled for bacterial quantification. The results showed that the methanol fraction contained the highest levels of phenolic compounds, flavonoids and alkaloids. The ethanolic extract showed the best total antioxidant capacity and the fractions showed a better capacity to inhibit the ABTS+ radical and a better reducing power compared to the ethanolic extract. In vivo, the extract was better at reducing malondialdehyde and the fractions were better at reducing NO●. In terms of antioxidant markers, the fractions increased the activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione levels compared with the ethanolic extract. The methanol fraction had a beneficial effect on bacteroids and clostridioles. Principal component analysis showed that the methanol fraction had the best associations with oxidative stress parameters.

Key words: oxidative stress, ethanolic extract of *Aframomum angustifolium*, fractions, intestinal microbiota.

INTRODUCTION

Le stress oxydant joue un rôle essentiel dans la pathogenèse des maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies neurodégénératives et le cancer (**Sharifi- Rad et al., 2020**). Le stress oxydant a également le potentiel d'influencer le microbiote intestinal en le perturbant (**Altwegg et Michon, 2020**). Le microbiote intestinal à son tour, joue un rôle majeur dans de nombreux processus physiologiques (modulation du système immunitaire, dégradation des fibres, synthèse des vitamines B et K...) (**Casati et al., 2019**). Une fois la flore intestinale perturbée, elle peut provoquer une série de maladies telles que : les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le diabète de type II, le cancer (**Sun et al., 2024**). Tout cela montre l'importance d'une bonne gestion du stress oxydant afin d'éviter ces diverses pathologies liées ou non à la perturbation du microbiote.

L'âge, l'alimentation, l'état sanitaire de l'individu, l'environnement, augmentent de façon anormale la production des radicaux libres dans l'organisme (**Jomova et al., 2023 ; Abdelazim et al., 2024**). Par conséquent, les radicaux libres à concentration élevée, sont capables de s'attaquer aux membranes biologiques et de générer des dommages cellulaires (altération de l'ADN, glycation des protéines, peroxydation lipidique...) (**Chaudhary et al., 2023**). Afin de se protéger des effets nocifs des radicaux libres, l'organisme dispose d'un ensemble de défenses antioxydantes mis en exergue par l'action des enzymes à activités antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) (**Tumilaar et al., 2024**). Outre ces mécanismes de défenses propres à l'organisme, l'alimentation et l'utilisation des plantes médicinales jouent un rôle primordial dans la lutte contre le stress oxydant car elles représentent une source de molécules antioxydantes notamment les vitamines (E, A, C), les oligoéléments ou cofacteurs d'enzymes antioxydantes (zinc, cuivre, sélénium) et les métabolites secondaires des plantes (composés phénoliques, alcaloïdes, terpenoïdes) (**Kiran et al., 2023**).

Aframomum angustifolium, de nom commun cardamome de Madagascar, graines de paradis est une plante herbacée vivace appréciée pour ses graines et fruits comestibles. Cette dernière représente une source importante en composés phytochimiques tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes, les terpenoïdes (**Anywar et Kirimuhuzya, 2015**). Dans la pharmacopée camerounaise, elle est utilisée pour lutter contre la diarrhée, la toux, la rougeole, l'épilepsie, les douleurs articulaires, les œdèmes (**Rakotonirina, 2019**). De nombreuses études ont mis en lumière le potentiel thérapeutique de ses graines notamment leurs propriétés

antioxydantes, antiprolifératives, antidiabétiques, anti-inflammatoires, anti-âge, antiparasitaire, antinociceptive et antimicrobienne (Inkoto *et al.*, 2021 ; Ebhohimen et Okolie, 2021 ; Tchokouadjeu, 2022 ; Makamwe *et al.*, 2023).

Les études entreprises jusqu'ici sur la mise en évidence du potentiel thérapeutique de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* se sont intéressées aux extraits bruts et non sur les fractions issues de cet extrait (Ebhohimen et Okolie, 2021 ; Tchokouadjeu, 2022 ; Makamwe *et al.*, 2023). Cependant, il a été montré que le fractionnement d'un extrait brut de plantes permettrait de concentrer les composants bioactifs dans les fractions spécifiques, ce qui augmenterait leur efficacité et leur stabilité. De plus il permettrait de réduire l'impact des impuretés qui peuvent altérer le potentiel thérapeutique de l'extrait et permettrait ainsi de répondre au besoin spécifique, ce qui ouvrirait des possibilités nouvelles pour le développement des produits naturels et de médicament à base de plantes (Lakhdari et Guerni, 2020). C'est dans ce contexte que la présente étude visait à évaluer le potentiel antioxydant et l'effet sur le microbiote intestinal de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses différentes fractions. Ainsi le fractionnement augmenterait-il l'activité antioxydante et l'effet sur le microbiote intestinal chez le rat ?

HYPOTHESE

Le fractionnement de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* potentialise son effet antioxydant et son effet bénéfique sur le microbiote intestinal chez le rat.

OBJECTIF GENERAL

Comparer les propriétés antioxydantes et l'effet sur le microbiote intestinal de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Déterminer la teneur en composés phénoliques, flavonoïdes et alcaloïdes totaux et le potentiel antioxydant *in vitro* de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions ;
- Explorer les mécanismes d'action antioxydant *in vivo* de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions chez un modèle animal de stress oxydant induit par l'eau oxygénée chez le rat *Wistar* ;
- Déterminer l'effet de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur le microbiote chez un modèle animal de stress oxydant induit par l'eau oxygénée chez le rat *Wistar*.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1- Généralités sur le stress oxydant

I.1.1- Définition du stress oxydant

Le stress oxydant, dénommé également stress oxydatif, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants/antioxydants » en faveur des oxydants. Ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Un stress oxydant peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants (**Mahmoud et Fenghour, 2016**). La figure 1 représente la d'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants.



Figure 1 : Balance d'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants (**Belaïch et Boujraf, 2016**)

I.1.2- Sources du stress oxydant

I.1.2.1- Sources exogènes

Les facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à une diminution de l'élimination des EOR sont également très variés. Parmi ces facteurs, on retrouve : l'alimentation notamment : alcool, café, aliments riches en protéines, en glucides et en lipides, faible consommation d'antioxydants (**Chimou, 2019**). Nous avons également l'exposition à la fumée de cigarette, aux rayons UV (ultraviolets), aux métaux lourds, aux allergènes, aux médicaments ou aux toxines, aux polluants, à l'ozone, aux pesticides ou insecticides peuvent participer à l'augmentation de la production des radicaux libres dans les cellules (**Abdelazim et al., 2024**). Les rayonnements ionisants agissent en convertissant les radicaux hydroxyles, les super oxydes et les radicaux organiques en hydroperoxydes organiques et en H_2O_2 ; Les rayonnements ultraviolets déclenchent les réactions oxydative en stimulant la riboflavine, la

NADPH-oxydase et les porphyrines avec pour principal résultat la production de la 8-oxo-guanine et la diminution du taux de glutathion intracellulaire ; les métaux lourds tels que le fer ,cuivre, cadmium, nickel, arsenic ,plomb peuvent induire la production des radicaux libres par des réactions de fenton ou Haber-weiss (**Sharifi-Rad et al.,2020**).

I.1.2.2- Sources endogène

➤ La respiration cellulaire

Les mitochondries sont des organites intracellulaires qui permettent la synthèse d'énergie cellulaire par la production d'ATP (Adénosine Triphosphate) qui est nécessaire à la cellule (**Mellit et Moussaoui., 2021**). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produits dans les mitochondries lors du métabolisme aérobie. La génération des ROS dans les mitochondries est étroitement associée à la synthèse d'ATP (**Sharifi-rad et al., 2020**). Les principaux sites endogènes de génération d'espèces cellulaires redoxréactives, y compris les ROS et les espèces réactives de l'azote (RNS), comprennent la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (ETC), le réticulum endoplasmique (ER), les peroxysomes, les isoformes de NADPH oxydase (NOX) liées à la membrane 1–5, les complexes doubles oxydases (Duox) 1 et 2 et les isoformes 1–5 des synthases de l'oxyde nitrique (NOS1– 3). Les complexes I et III de l'ETC mitochondrial produisent l'anion superoxyde. L'ETC mitochondrial est considéré comme la principale source endogènes des ROS (**Liguori et al., 2018**).

➤ La phagocytose

C'est un processus cellulaire qui permet l'ingestion et l'élimination des particules étrangères, notamment des bactéries, des débris cellulaires ou des cellules mourantes. Celle-ci se fait par certains leucocytes et en particulier les macrophages. Les microorganismes sont alors absorbés puis digérés par des enzymes digestives. Un autre mécanisme coopère : la dégranulation indépendante de l'oxygène qui permet le déversement de substances bactéricides dans le phagosome. La NADH-oxydase (Nox2) est composé de différentes sous-unités cytosoliques et membranaires qui s'assemblent à la membrane du phagosome. L'activation du système enzymatique de la NADPH-oxydase dans l'explosion oxydative entraîne la production de formes réactives de l'oxygène. Une fois phagocytés, les ERO synthétisés par la NADPH-oxydase vont détruire l'agent responsable puis les déchets sont expulsés (**Oueslati, 2017**). La Figure 2 représente les sources de production des espèces réactives de l'oxygène.



Figure 2 : Source de production des ERO (Massilia, 2023)

I.1.3-Radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules hautement réactives avec un ou plusieurs électrons non appariés dans leur enveloppe externe et peuvent se former lorsque l'oxygène interagit avec certaines molécules. Ces radicaux peuvent être produits dans les cellules en perdant ou en acceptant un seul électron, se comportant donc comme des oxydants ou des réducteurs (Liguori *et al.*, 2018).

I.1.3.1-Classification des radicaux libres

Il existe de nombreux radicaux libres, ceux-ci sont classés en deux groupes à savoir les radicaux libres azotés et les radicaux libres oxygénés.

I.1.3.1.1-Radicaux libres azotés

➤ Le peroxynitrite (NO_3^-)

La réaction du NO avec anion super oxyde donne naissance au peroxynitrite suivant l'équation :



Le Peroxynitrite est un dérivé d'oxygène très toxique provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL. Peroxynitrite apparait comme l'espèce la plus toxique pour les tissus au niveau des sites de l'inflammation et participe dans plusieurs désordres neurodégénératifs et des lésions rénales. Le peroxynitrite (OONO^-) est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle (Ouznadji, 2020).

➤ **Le radical oxyde nitrique (NO°)**

C'est une molécule de signalisation primaire présente dans presque toutes les fonctions cellulaires essentielles. Il est nécessaire pour la fonction cardiaque où il joue un rôle protecteur important dans la cardiopathie ischémique. Il module la génération des espèces oxygénées réactives mitochondriales et peut avoir des effets sur la survie ou la mort des cellules (**Chimou, 2019**). L'oxyde nitrique est un gaz qui ainsi diffuse bien à travers les membranes. Il est synthétisé par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS) à partir de l'O₂ et l'acide aminé L'arginine. Il est délétère pour la cellule lorsqu'il est en grande quantité et qu'il génère aussi un autre radical : le peroxynitrite (NO₃⁻) (**Djeffal, 2014**).

➤ **Dioxyde nitrique (NO₂)**

Formé à partir de la réaction du radical pyroxyde avec NO. Le nitrique dioxyde est un puissant déclencheur de la peroxydation lipidique par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés (**Mahmoud et Fenghour, 2016**).

I.1.3.1.2-Radicaux libres oxygénées

➤ **Le radical anion super oxyde O₂•⁻**

C'est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron. Au niveau de la chaîne respiratoire, lors du transfert d'électron il est le premier radical à se former. La principale source est l'explosion oxydative des cellules phagocytaires entrées en contact avec des antigènes ou des complexes-immuns. Les cellules phagocytaires connues pour produire le radical super oxyde sont les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles, les macrophages et les monocytes (**Ghoumrani et al., 2014**).



La réactivité et le pouvoir oxydant de ce radical est faible mais il peut réagir avec les métaux de transition (fer, cuivre et zinc) présents dans les sites actifs de certains enzymes, et former des espèces plus réactives. L'anion super oxyde O₂•⁻ joue un rôle très important dans la génération de d'autres radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, le radical hydroxyle •OH, et l'oxygène singulet O₂•⁻ (**Guinard, 2023**).

Ce radical est également capable de réagir avec l'oxyde nitrique pour former le peroxynitrite (ONOO⁻) qui est capable de donner par la suite des composés très toxiques comme le radical hydroxyle et le dioxyde nitrique selon les réactions :



➤ **Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)**

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est une molécule stable, mais diffusable et avec une durée de vie compatible avec une action à distance de son lieu de production. Il est généré dans le peroxysome, les microsomes et les mitochondries par une réaction de dismutation (Gagné, 2008).



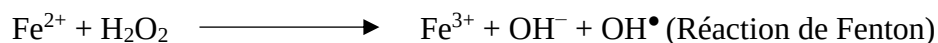
La dismutation de O₂[°] spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases est la source majeure de H₂O₂. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. En présence de métaux de transition (fer et cuivre), Il donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle hautement réactif. Le peroxyde d'hydrogène est généralement inactivé par la catalase, le glutathion peroxydase (Ransy *et al.*, 2024).

➤ **Le radical hydroxyle HO[°]**

C'est un radical extrêmement réactif et considéré comme le plus dangereux dans l'organisme. Il est formé lors de la réaction de l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène suivant l'équation ci-dessous :



Cette réaction est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. Mais en revanche, en présence de métaux de transition (fer, cuivre), H₂O₂ donne naissance in vivo via la réaction de Fenton (Djeffal, 2014) suivant l'équation :



Il est certainement l'espèce réactive oxygénée (ERO) la plus destructrice pour la cellule et ses composants. Malgré une durée de vie très brève et l'impossibilité pour lui de franchir les membranes, il possède une très grande réactivité qui lui permet de réagir avec les constituants de l'ADN, les lipides, protéines, et polypeptides dû à un potentiel oxydant très élevé (Guinard, 2023).

➤ **L'oxygène singulet**

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) correspond à une forme excitée de l'oxygène O_2 , il possède la même structure électronique que l'oxygène mais « agencée » différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état « excité » lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (Bensakhria, 2018).

I.1.3.2-Rôle des radicaux libres

A des niveaux faibles ou modérés, les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans plusieurs processus biologiques. Beaucoup d'entre eux sont nécessaires à la vie parce qu'ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones (Martemucci *et al.*, 2022). Mais de façon générale, les radicaux libres contribuent au stress oxydatif par une série de réactions en chaîne. Leur durée de vie est très courte (10-4s) et leur réactivité réside dans la recherche d'un électron afin de ré-apparier leur électron célibataire (Martemucci *et al.*, 2022). Une production excessive de ROS (Espèces Réactives de l'oxygène) détermine la modification structurelle des protéines cellulaires et l'altération de leurs fonctions, entraînant un dysfonctionnement cellulaire et une perturbation des processus cellulaires vitaux, ce niveau élevé de ROS causent des dommages aux lipides, aux protéines et à l'ADN (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

I.1.4- Les défenses antioxydantes

I.1.4.1-Définition et rôle

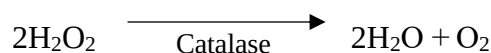
L'organisme est doué d'un système de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Hellal, 2011). Les antioxydants sont aussi des molécules naturellement produites par le corps ou bien apportés par l'alimentation pour combattre les effets toxiques des radicaux lors du stress oxydatif (Jomova *et al.*, 2023). Un dysfonctionnement ou déficit des défenses antioxydantes a pour conséquence une augmentation des dommages tissulaires. Selon leur origine les antioxydants peuvent être en deux classes : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non-enzymatiques.

I.1.4.2-Système enzymatique

Il est considéré comme la première ligne de défense de notre organisme face aux différentes espèces oxydantes. Les systèmes enzymatiques les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont : la catalase, le glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase (**Rezaire, 2012**).

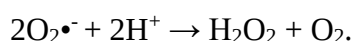
➤ La catalase (CAT) (EC : 1.11.1.6)

C'est une enzyme que l'on retrouve dans les cellules vivantes principalement au sein des peroxysomes, et en faible quantité dans le cytosol (**Garait, 2006**). Elle permet l'élimination d'H₂O₂ par une transformation en H₂O et O₂ selon la réaction ci-dessous (**Starlin et Gopalakrishnan, 2013**).



➤ Superoxyde dismutase (SOD) (EC : 1.15.1.1)

Ce sont des métallo-enzymes catalysant la dismutation de l'O₂^{•-} en H₂O₂. Elles représentent donc la première ligne de protection contre les ROS. En fonction du cofacteur associé à la SOD, on distingue plusieurs isoformes dans la cellule et le milieu extracellulaire. La SOD a cuivre et à zinc (CUZN-SOD ou SOD1) est la forme la plus abondante dans le cytoplasme, la SOD a manganèse (Mn-SOD ou SOD2) est localisé dans les mitochondries, et la SOD3 (ou EC-SOD) représente la forme extracellulaire de l'enzyme SOD (**Vide, 2015**).



➤ Glutathion peroxydase (Gpx) (EC : 1.11.1.9)

La glutathion peroxydase est une enzyme antioxydante du plasma, des fluides extracellulaires et du cytosol, dépendante du sélénium et dont l'action permet d'éliminer le H₂O₂ produit, elle permet également la conversion des hydroperoxydes lipidiques en des alcools non toxiques et de ce fait, participe à l'interruption de la chaîne de peroxydation lipidique (**Di Giacomo et al., 2023**). L'action du GSH-px dépend aussi de la disponibilité en glutathion réduit (GSH) et en nicotinamide adénine dinucléotide phosphate H (NADPH) ce qui démontre bien que le système antioxydant endogène agit en interdépendance (**Belabas et Fatma, 2017**).

➤ **Glutathion réductase (GRD) (EC : 1.6.4.2)**

C'est une flavoenzyme homodimérique ; chaque sous-unité contient du FAD au niveau de son site actif, la (GRD) permet de régénérer le GSH à partir du GSSG (**Defraigne et Pincemail, 2008**). La glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH qui réduit d'abord le FAD en FADH₂. Le FADH₂ est ensuite une source d'électrons sur un pont disulfide –S—S– de l'enzyme qui réduit à son tour le GSSG en GSH (**Couto et al., 2016**).

I.1.4.3- Système antioxydant non enzymatique

Les antioxydants non enzymatiques sont des composés principalement apportés par l'alimentation. Notre comportement alimentaire joue un rôle important dans la faculté de l'organisme à lutter contre les effets néfastes du stress oxydant. Les études mettent en évidence les effets bénéfiques d'une alimentation riche en fruit et légumes.

➤ **La vitamine E**

C'est une vitamine liposoluble présente en grande quantité dans les huiles végétales à l'instar de l'huile d'olive, de palme et de tournesol (**Couto et al., 2016**). La vitamine E est en réalité formée de huit composés chimiques différents regroupés en deux sous-ensembles en fonction de la présence de groupements de substitution et de doubles liaisons. Nous trouvons donc le sous-ensemble des tocophérols (α -, β -, γ -, ou δ -tocophérol) et des tocotrienols (α -, β -, γ -, ou δ -tocotrienol).

Elle va agir comme antioxydant contre les ROS (en parallèle de la vitamine C et du glutathion) et plus particulièrement dans l'inhibition de la peroxydation lipidique. La chaîne carbonée augmente en effet le caractère lipophile de la molécule et ainsi facilite la pénétration dans les bicouches lipidiques, et permet une action directe intracellulaire (**Baudin, 2020**).

L' α -tocophérol est considéré comme un antioxydant de référence servant d'étalon pour les nouvelles molécules que l'on voudrait évaluer comme antioxydants.

➤ **La vitamine C**

La vitamine C est un antioxydant retrouvé chez les plantes et animaux mais ne peut être synthétisé par l'Homme, il est donc apporté par l'alimentation (**Chimou, 2019**). L' α -tocophérol peut être régénéré lors de la réduction du radical tocophéryle par la vitamine C ou acide ascorbique. Ce dernier est le plus fréquemment présent sous forme d'ascorbate et est considéré comme l'antioxydant le plus important des fluides extracellulaires (**Zheng et al., 2024**). C'est un piègeur très efficace de l'ensemble des ERO. Il réagit particulièrement avec les peroxydes aqueux en formant le radical ascorbyl ce qui protège les lipoprotéines et les

membranes de la peroxydation lipidique (Chayma et Djihane, 2021). Elle peut aussi directement réagir avec les espèces oxygénées activées tels que $\text{HO}^\bullet$ ou $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour les neutraliser (Haleng *et al.*, 2007).

➤ Les oligo-éléments

Ils sont impliqués dans la protection contre les espèces radicalaires. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique, nous avons comme oligo-éléments ici le zinc, le cuivre, le manganèse, le fer. Nous pouvons donc dire que la superoxyde dismutase cytosolique (SOD cytosolique) a besoin de cuivre et de zinc, la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD mitochondriale) du manganèse, le glutathion peroxydase de sélénium et le fer de la catalase. Il faut noter que certains oligo-éléments tels que le fer lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite Fe^{2+} peuvent avoir une action pro-oxydante par l'intermédiaire des réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Buldak *et al.*, 2014).

➤ Les Composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent une grande variété de composés tels que les anthocyanes, les flavonoïdes, les tanins. Ils sont retrouvés dans les plantes et sont des composés ubiquistes. Ils réduisent les radicaux hydroxyles, superoxydes et pyroxyles. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils possèdent des propriétés chélatrices (Briber, 2020). La figure 3 représente la régulation de la production des ERO par les antioxydants.

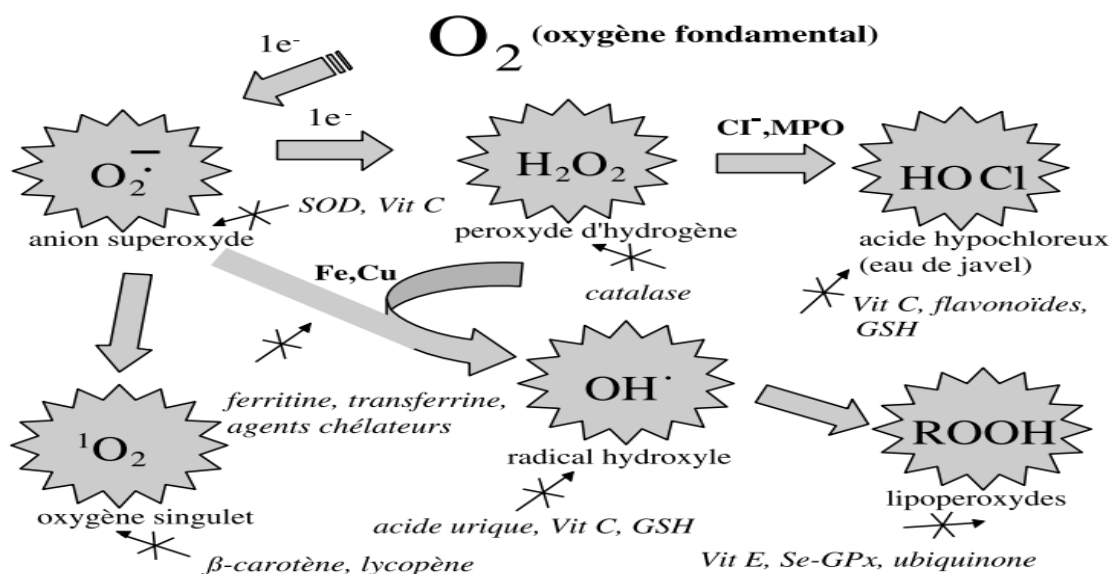


Figure 3 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemail *et al.*, 2002)

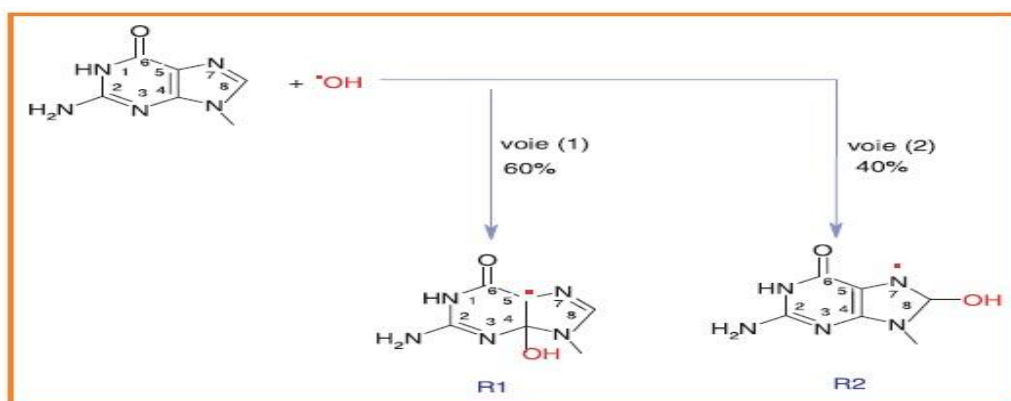
I.1.5- Conséquences biologique du stress oxydant

La production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (EOR) provoque des lésions sur les molécules biologiques à savoir : acides nucléiques, les lipides et les protéines.

I.1.5.1-Acide nucléique

L'ADN est une cible privilégiée pour les EOA. La guanine, par exemple, peut réagir avec le radical hydroxyle pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) (Figure 4) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (**Baudin., 2020**).

L'ARN est plus exposé aux dommages oxydatifs que l'ADN en raison de sa nature simple brin, de l'absence d'un mécanisme de réparation actif pour l'ARN oxydé et de sa moindre protection par les protéines par rapport à l'ADN (**Phaniendra et al., 2015**). Il est prouvé que l'ARN oxydé cause des erreurs dans la traduction, menant finalement à la production de protéines anormales. Ces protéines peuvent être responsables de la présence de maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (**Nie et al., 2013**).

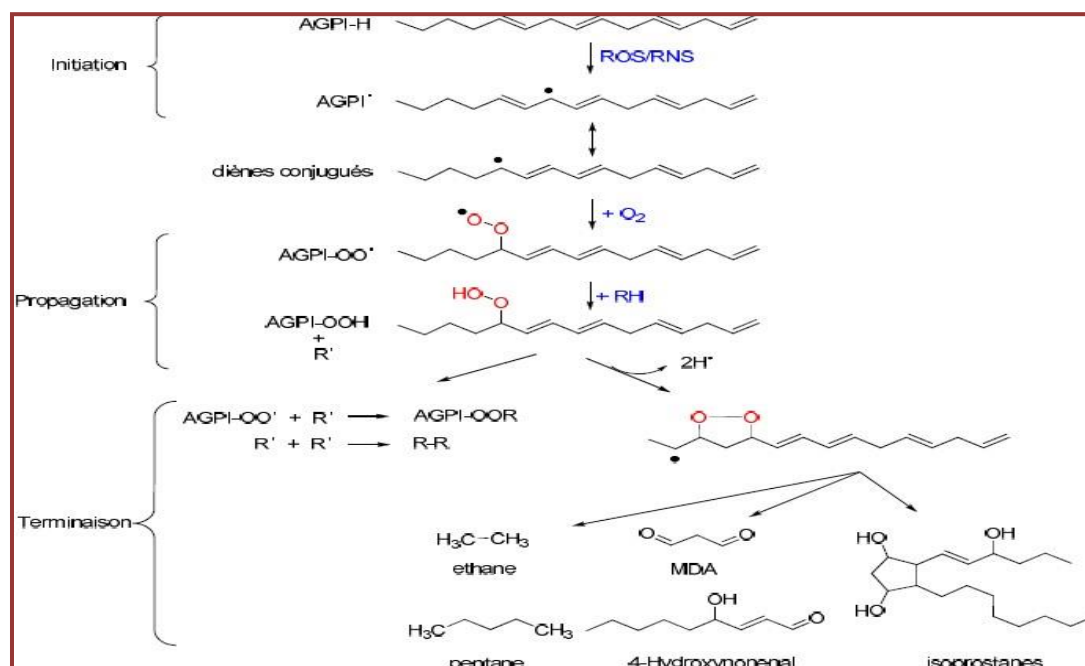


Deux radicaux libres sont formés : R1 (centré sur l'atome de carbone 5) et R2 (centré sur l'atome d'azote 7). Ce dernier (R2) donne naissance à la 8-oxoguanine, un des principaux marqueurs du stress oxydant au niveau de l'ADN

Figure 4 : Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine (**Chimou, 2019**)

I.1.5.2- Oxydation des lipides

La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne des lipides par des ROS. Ce mécanisme cible principalement les acides gras polyinsaturés. Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxy ($\text{ROO}\cdot$), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par le glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonénal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues (Haleng *et al.*, 2007). La figure 5 représente les étapes de la peroxydation lipidique.



AGPI : Acides Gras polyinsaturés, EOR: Espèces oxygénées réactives, MDA : Malondialdéhyde

Figure 5 : Étapes de la peroxydation lipidique (Chimou, 2019)

I.1.5.3-Oxydation des protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non reconnaissance d'un

récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et le compartiment extracellulaire (Payet, 2023).

I.1.6-Maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydatif joue un rôle essentiel dans la pathogenèse des maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, cancers, diabète et maladies neurodégénératives (Liguori *et al.*, 2018). Il est également admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, et la maladie d'Alzheimer. Il est donc logique de penser que la prise d'anti oxydants peut retarder, voir prévenir, l'apparition de telles maladies.

I.1.6.1-Stress oxydatif et cancers

Le développement du cancer chez l'homme est un processus complexe qui comprend des changements cellulaires et moléculaires. Les dommages oxydatifs à l'ADN sont les principales caractéristiques de la cancérogenèse.

Les radicaux hydroxyles peuvent se lier à l'ADN et produire de la 8-OH déoxyguanosine (8-OHdG), ce qui augmente par conséquent le risque de mutation. Le 8-OHdG peut également initier une mutagenèse induisant le cancer en transformant des paires GC en paires TA lors de la réplication de l'ADN (Jorgensen *et al.*, 2024). Par conséquent, les molécules 8-OHdG peuvent être utilisées comme indicateurs pour la détection des radicaux libres lors de la mutagenèse de l'ADN (Jorgensen *et al.*, 2024). Il faut également noter que la prolifération accrue des cellules cancéreuses fait intervenir des niveaux élevés d'ATP qui conduisent à l'accumulation de EOA, de préférence au stade initial de la genèse d'un cancer. Il existe un état de stress oxydatif constant dans les cellules cancéreuses induit par des changements métaboliques et un dysfonctionnement mitochondrial. En effet, dans des circonstances normales, l'augmentation des niveaux de EOA stimule la mort cellulaire, mais les cellules cancéreuses surmontent cela en activant de nombreux oncogènes, qui induisent ensuite l'expression du facteur 2 lié au facteur nucléaire érythroïde 2 (NRF2). NRF2 est le principal régulateur de la survie cellulaire qui augmente la progression du cancer en protégeant les cellules cancéreuses des dommages causés par les ROS et l'ADN (Ngo *et Duennwald*, 2022)

I.1.6.2-Stress oxydatif et maladies cardiovasculaires

L'hypertension est considérée comme l'une des maladies chroniques les plus répandues dans le monde, est causée en partie par le stress oxydatif (grand responsable de la dysfonction endothéliale) ; Cette dysfonction se caractérise par un détachement des cellules endothéliales de la membrane cellulaire endothéliale, d'une capacité réduite des cellules endothéliales environnantes à réparer les dommages et d'une synthèse de l'oxyde nitrique (NO) diminuée (**Petramala et al, 2014**).

L'implication du stress oxydant dans les pathologies cardiovasculaires a été initialement révélée par l'oxydation des lipoprotéines de basses densités (LDL), les LDL, dont la modification biochimique qui en résulte leur confère un pouvoir athérogène (**Payet, 2023**) ; Les LDL (lipoprotéines de basse densité) sont déposés dans la paroi vasculaire où ils sont soumis à un stress oxydatif ; elles seront ensuite absorbées par les macrophages, ce qui conduit à la formation des cellules spumeuses caractéristiques de l'athérosclérose (**Shyamal et Maulik, 2015**).

I.1.6.3- Stress et obésité

L'obésité est liée à un état de stress oxydant défini par un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par rapport aux systèmes de défense antioxydantes. La production d'ERO par le tissu adipeux peut se faire par activation de la NADPH oxydase, enzyme qui catalyse la production de radical superoxyde. Ceci pourrait perturber la production d'adipokines telles que l'adiponectine, mais aussi de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), l'interleukine 6(IL-6), le facteur chimiotactique des monocytes (MCP-1) favorisant le développement d'un syndrome métabolique, avec une hyperglycémie, dyslipidémie et hypertension (**Bonnefont-Rousselot, 2014**).

I.1.6.4- Stress et maladies neuro-dégénératives

Le stress oxydant est impliqué dans les mécanismes de mort cellulaire lors des maladies neurodégénératives tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et d'autres maladies neurodégénératives (**Chen et al., 2012**). Les maladies neurodégénératives se caractérisent par une perte cellulaire progressive dans des cellules neuronales vulnérables spécifiques, souvent associé à des agrégats de protéines cytosquelettique formant des inclusions dans les neurones et ou les cellules gliales ; le dépôt de protéines agrégées anormales et la perturbation de l'homéostasie des ions métalliques sont fortement liés au stress oxydant par la toxicité des espèces réactives de l'oxygène qui contribue au mauvais

repliement des protéines, à l'activation des cellules gliales, au dysfonctionnement mitochondrial et à l'apoptose cellulaire (**Chen *et al.*, 2012**).

I.1.6.5- Stress et microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe composé de l'ensemble des microorganismes présents dans le tube digestif (champignons, bactéries, archées, virus). Il est indispensable pour le maintien de l'homéostasie intestinale et a un rôle majeur dans la physiologie digestive ; il a notamment un rôle d'effet barrière, il joue sur la modulation du système immunitaire, la dégradation des fibres, la transformation des acides gras, synthèse de vitamine B et K (**Altwegg et Michon, 2020**). Une modification de la composition du microbiote intestinal par un taux élevé de radicaux libres augmente les bactéries pathogènes et diminue les bactéries bénéfiques conduisant à une dysbiose (**Sun *et al.*, 2024**). Cette dysbiose par dérégulation de la réponse immunitaire causant une inflammation par activation des cytokines pro-inflammatoires, augmentation de la perméabilité membranaire, va conduire à une insulino-résistance, augmentation des radicaux libres qui seront à l'origine de l'apparition des maladies chroniques comme diabète, cancers, maladies cardiovasculaires, des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) tels que la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) deux types de MICI (**Casati *et al.*, 2019 ; Sun *et al.*, 2024 ; Semenova *et al.*, 2024**). Le stress oxydant est considéré comme un facteur principal dans la pathogenèse des MICI et pourrait être un participant important dans les processus de lésions cellulaires et tissulaires (**Semenova *et al.*, 2024**).

I.1.7-Induction du stress oxydant

Le stress oxydant peut-être induit par des agents chimiques ou l'alimentation

I.1.7.1- Les agents chimiques

La doxorubicine encore connue sous le nom de adriamycine est un anticancéreux et est capable d'induire un stress oxydant ; Elle augmente les biomarqueurs hépatiques de l'oxydation des protéines et des lipides ainsi que les espèces oxygénées réactives mitochondriales et les enzymes antioxydantes hépatiques (**Tremblay, 2018**).

Le peroxyde d'hydrogène est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant ; il possède la capacité de traverser les membranes biologiques et donc peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production (**Garait, 2006**). Le peroxyde d'hydrogène induit un stress oxydatif cellulaire en augmentant la production et l'attaque des radicaux libres sur les cellules et en, affaiblissant le système de défense antioxydants du corps (**Okagu *et al.*, 2021**)

Le chlorure de fer (FeCl_3) est responsable de l'induction des dommages oxydatifs dans la cellule en augmentant la lipoperoxydation, le taux de protéines carbonylées et en affaiblissant les défenses antioxydantes de l'organisme comme la catalase, le glutathion peroxydase et réductase, superoxyde dismutase (**Deepali et Luna, 2018**).

I.1.7.2-L'alimentation hypercalorique

Une consommation excessive en lipides va induire un déséquilibre du contenu plasmatique en acide gras et favoriser l'hyperglycémie, des conditions responsables de l'augmentation du stress oxydant. Cette importante quantité d'acides gras plasmatiques s'accompagne d'une accumulation d'acyl-coA à chaîne longue dans les tissus due à une altération de l'oxydation des lipides (**Garait, 2006**). L'alimentation riche en glucides peut provoquer une augmentation de la glycémie, du poids corporel, d'acides gras (**Gregersen et al., 2012**). L'hyperglycémie aura pour conséquence la survenue d'un stress oxydant, elle sera responsable de l'augmentation de la glycolyse qui par accroissement du potentiel de la membrane mitochondriale augmente la formation de radicaux libres (**Auberval, 2010**).

I.1.8-Moyens de lutte contre le stress oxydatif

I.1.8.1- Médicaments

Les compléments alimentaires tels que la vitamine C et E sont utilisés pour la prise en charge du stress oxydant (**Haleng et al., 2007**). La dexrazoxane dotée de propriétés à la fois chélatrices du fer et antioxydante ; elle est depuis quelques années recommandée pour son utilisation clinique dans la cardiotoxicité produite par les agents anticancéreux de type anthracycline. Son mode d'action repose principalement sur sa capacité à mobiliser le fer du complexe anthracycline-fer (**Chimou, 2019**).

I.1.8.2-L'alimentation

Pour maintenir l'équilibre pro-oxydants et antioxydants, une alimentation variée est nécessaire. On trouve de nombreux antioxydants dans l'alimentation, que ce soit dans les fruits, les légumes ou les boissons. De mauvaises habitudes alimentaires ont un impact sur la santé de l'Homme conduisant à l'apparition de certaines maladies. Nous pouvons donc dire que l'apport d'antioxydants exogènes peut diminuer l'apparition de certaines maladies du au stress oxydatif (**Desmier, 2016**). De manière générale, une alimentation saine contient des acides gras insaturés tels que les acides gras mono insaturés et les acides gras polyinsaturés, les protéines, vitamines, fibres alimentaires, minéraux et d'autres composants bénéfiques pour

la santé, tous ces composants présentent une capacité antioxydante réduisant ainsi le stress oxydatif (**Tan et al., 2018**).

Les fruits et légumes regorgent d'antioxydants endogènes. Les antioxydants exogènes disponibles dans les aliments ou les suppléments nutritionnels à savoir : les tocophérols, les composés phénoliques, l'acide ascorbique, les flavonoïdes et les non-flavonoïdes, les caroténoïdes, participent au renforcement des antioxydants endogènes. Malgré le fait que certains composants alimentaires ne puissent pas éliminer les radicaux libres, ils favorisent l'activité endogène et par conséquent peuvent être classés et étiquetés comme antioxydants. Les antioxydants endogènes jouent un rôle important dans le maintien des processus cellulaires normaux et par conséquent, contribuent à la santé et au bien être en général. Il est à noter que les antioxydants endogènes peuvent ne pas suffire dans les cas où il y'a induction d'un stress oxydatif, et les antioxydants alimentaires peuvent être nécessaires pour maintenir des activités cellulaires normales. (**Vinha et al., 2023**).

I.1.9- Quelques plantes antioxydantes

I.1.9.1- *Zingiber officinale* Roscoe

De son nom commun gingembre, est une plante de la famille des Zingibéraceae. Le gingembre est une épice locale très connue au Cameroun, il est transformé en poudre ou en jus destiné à la consommation locale et très appréciée des consommateurs (**Mendi et al., 2009**). Du fait de sa composition en éléments bioactifs, le gingembre s'est vu être ces dernières années utilisées dans la prise en charge de nombreuses maladies. On lui attribue des propriétés antioxydantes, antibactérienne, anticancéreuse et antiinflammatoire (**Alogo, 2019**).

Environ 40 composés antioxydants ont été exposés dans le gingembre. Les gingérols ont été identifiés comme étant capables d'influencer le stress oxydatif grâce à la stimulation de la superoxyde dismutase, la catalase, glutathion peroxydase et des actions du glutathion (**Chakraborty et al., 2012**). La figure 6 présente le gingembre jaune.



Figure 6 : Rhizomes de *Zingiber officinale* R. (jaune)

I.1.9.2- *Curcuma longa* L

Curcuma longa L. (curcum) est une plante vivace atteignant un mètre. Les rhizomes principaux sont de forme ovoïde, épais, écailleux, se ridant par dessiccation (**Figure 7**). Ces rhizomes sont d'une couleur jaune orangé en section, gris brunâtre en surface. Une odeur aromatique se dégage après section du rhizome (**Perry, 2008**). Il est utilisé pour ses couleurs, en tant que colorant alimentaire au même titre que deux autres épices naturelles que sont le safran et le paprika. Ces couleurs très caractéristiques du curcuma sont dues à un groupe de pigments naturels que l'on appelle « curcuminoïdes » (**Alogo, 2019**).

Curcuma longa L. a fait l'objet de préparations thérapeutiques en vertu de ses propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, hépato-protectrices, anti-cancérigènes, cardiovasculaires, gastro-intestinaux, et anti-inflammatoires rapportées à travers les siècles dans différentes parties du monde (**Akram et al., 2010**). Les propriétés antioxydantes du curcuma s'expliquent par l'effet de la curcumine sur la régulation de la peroxydation lipidique qui joue un rôle primordial dans les inflammations, les maladies cardiaques et les cancers. Les curcuminoïdes maintiendraient l'activité d'enzymes antioxydantes et réduisant ainsi cette peroxydation lipidique (**Singh, 2011**).



Figure 7 : Rhizomes du *Curcuma longa* L. (orange)

I.1.9.3- *Citrus sinensis*

Communément appelé oranger, *C. sinensis* appartient au règne des *Plantae*, C'est un arbre fleurissant à feuilles persistantes, à hauteur généralement de 9-10 m avec de grandes épines sur les branches (**Milind et Chaturvedi, 2012**). *C. sinensis* est consommée partout dans le monde comme une excellente source de vitamine C (**Etebu et Nwauzoma, 2014**).

La peau et le jus de *Citrus sinensis* (*C. sinensis*) sont une grande source de composés bioactifs tels que les caroténoïdes, les flavonoïdes, les polyphénols, flavones, anthocyanes, acides hydroxycinnamiques, tanins, saponines, les limonoïdes, la pectine, les minéraux (le potassium, le calcium, le magnésium, le manganèse et le cuivre) et certaines vitamines (A, B et C) (**Najneen et al., 2016**) (**Harish et Chauhan, 2016**). En effet, des études *in vitro* ont montré que les extraits aqueux des feuilles et écorces de *C. sinensis* grâce à leurs richesses en composés phénoliques, flavonoïdes et alcaloïdes, ont des propriétés antiradicalaires et réductrices (**Azantsa et al., 2017**). La figure 8 présente un arbre de *Citrus sinensis*.

I.2-Généralités sur *Aframomum angustifolium*

I.2.1-Classification

Noms vernaculaires : graine de paradis, cardamome de madagascar, poivre de guinée, maniguette, longoza (malgache), malaguette (**Rakotonirina, 2019**).

Notre plante d'étude est classée suivant le tableau 1 ci-dessous :

**Tableau I : Classification botanique d'*Aframomum angustifolium*
(Rakotonirina, 2019)**

Domaine	<i>Biota</i>
Règne	<i>Plantae</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Sous-classe	<i>Lilidae</i>
Ordre	<i>Zingiberales</i>
Famille	<i>Zingiberacea</i>
Genre	<i>Aframomum</i>
Espèce	<i>Angustifolium</i>

I.2.2-Description de la plante

Aframomum angustifolium, se présente comme une grande plante herbacée vivace, de 1,5 à 4 m de haut, issue de rhizomes étendus. Elle possède des grandes feuilles simples, alternes et caduques, de couleur verte et des fleurs en forme de trompette, de couleur jaune ou rosée qui s'organisent en épis. Groupées en inflorescences de 4 à 10 fleurs apparaissant à la base des pousses feuillées, les fleurs ont des pétales rouges, un labelle jaune ou orange pâle. Les fruits sont ovoïdes à subglobuleux, de 7 à 9,5 cm de long, y compris le calice persistant, rouge à maturité. La tige est très rigide surtout quand sa hauteur atteint 1,50 m à 2 m. La plante a une odeur fruitée, avec des notes d'abricot, épicée et sucrée, légèrement poivrée. Les graines ressemblent à celles du poivre et de la cardamone par leur goût épicé, piquant avec un arrière-goût légèrement âcre (Rakotonirina, 2019).

I.2.3-Répartitions géographiques

Aframomum angustifolium est un membre de la famille des Zingiberaceae communément appelée Longoza est présent dans les forêts tropicales humides, les forêts soterraines et les forêts saisonnièrement sèches en Afrique (Ebbohimen *et al.*, 2017). C'est une plante tropicale qui pousse en Côte d'Ivoire, au Cameroun, au Gabon, à Madagascar et République Démocratique du Congo. A Madagascar l'on en trouve principalement dans les sous-bois et les forêts tropicales. En RD. Congo, il est répandu dans la forêt secondaire et les zones humides de la forêt tropicale (Inkoto *et al.*, 2021).

I.2.4-Utilisations traditionnelles

Traditionnellement, les espèces d'*Aframomum* sont utilisés pour traiter, l'abcès, les œdèmes, la dysenterie, cataractes, migraines et maux de dents entre autres. Les graines sont utilisées comme expulseur de vers en République démocratique du Congo et le porte-greffe est donné pour soulager les douleurs post-partum au Libéria. L'usage médicinal de cette famille botanique comme laxatif, vermifuge, antidiarrhéique et comme tonique pour la stimulation sexuelle ainsi que comme antiulcéreux, antimicrobien, antinociceptif (Ebhoimen *et al.*, 2017).

I.2.5-Etudes antérieures sur *Aframomum angustifolium*

Aframomum angustifolium est une plante qui a suscité de nombreuses recherches notamment pour son potentiel thérapeutique à savoir :

- L'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* peut accélérer la réparation *in vivo* de la toxicité hépatique et rénale induite par le bromate chez les rats Wistar (Ebhoimen et Okolie, 2021).
- Les extraits d'éther et de méthanol sont riches en différents principes actifs (triterpénoïdes, caroténoïdes, hydrates de carbone, flavonoïdes et des coumarines). Les tanins, les alcaloïdes basiques et les sucres réducteurs sont présents uniquement dans l'extrait de méthanol (Anywar et Kirimuhuzya, 2015).
- La co-administration de l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium* avec du bromate peut réduire sa néphrotoxicité d'une manière dose-dépendante et cet extrait contient des composés bioactifs (alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, tanins, acide ascorbique et l'alpha-tocophérol) (Ebhoimen et Okolie, 2021)
- L'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* protège contre les effets secondaires liés à l'utilisation du tamoxifène chez les rats atteints d'un cancer du sein notamment l'hyperplasie de l'endomètre, les effets délétères sur le foie et les reins, les troubles métaboliques et le stress oxydant (Makamwe *et al.*, 2023).

MATERIEL ET METHODES

II.1-Matériel

Un ensemble de matériel a été nécessaire pour la réalisation de cette étude. Celui-ci incluait le matériel végétal, le matériel animal et le matériel de laboratoire.

II.1.1- Matériel végétal

Le matériel végétal était constitué des graines de fruits d'*Aframomum angustifolium* de nom vernaculaire Ndong en Bulu (photo 1).

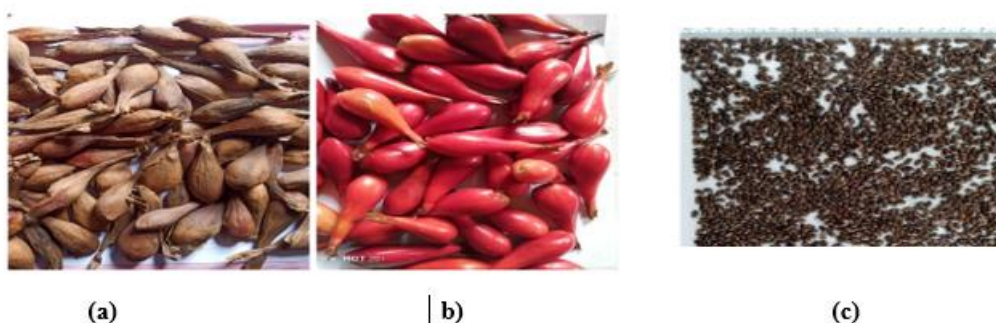


Photo 1: Fruits secs (a) ; frais (b) et graines *A. angustifolium* (c) (Photographiée par Ossele, 2023)

II.1.2- Matériel animal

Le dispositif animal était constitué de trente (30) rats mâles de souches *Wistar* pesant entre 180-200 g, obtenus au Département de biologie et physiologie animale de l'Université de Yaoundé I. Les rats ont été acclimatés pendant une semaine à température ambiante et avaient libre accès à l'eau. Ils étaient maintenus dans un environnement contrôlé sous un cycle de 12h à la lumière, 12h à l'obscurité. Par la suite, ils ont été disposés dans des bassines en plastique couvertes de grillages, contenant de la litière, constituée de copeau de bois blanc renouvelable tous les deux jours pour assurer de bonnes conditions hygiéniques. Le traitement des rats a été fait selon les directives du comité d'éthique dont la clairance a été obtenue (**No : BTC-JIRB2024-111**) (**Annexe 5**). Les rats étaient nourris régulièrement à l'aide d'une diète normale composée comme suit pour 100g d'aliment :

- Farine de maïs : 32g
- Farine de poissons : 9,5 g
- Lait : 10,5 g
- Sel : 1g
- Farine d'os 2g

- Farine de blé 19,5g
- Farine de palmiste 6g
- Polyvitamine 2g
- Cellulose 1g
- Eau 16,2 mL



Photo 2: Rat mâle de souche wistar (Photographiée par Ossele, 2023)

II.1.3. Matériel de laboratoire

❖ Appareils

- Spectrophotomètre, balance à précision, micropipettes, centrifugeuse, pipettes pasteur, blender, étuve ventilée, bain marie, congélateur, pH-mètre, évaporateur rotatif

❖ Consommables

- Eau distillée, NaCl (0,9%), Formol 10%, méthanol, éthanol, dichlorométhane, hexane diazépam et kétamine, réactifs TBA, solution de NED, tampon phosphate.

II.2-Methodes

II.2.1- Collecte et traitement des échantillons

Les fruits d'*Aframomum angustifolium* ont été récoltés au mois d'Août 2023 dans la région de l'ouest plus précisément à Baham. L'identification de la plante a été faite à l'Herbier National du Cameroun en comparaison à l'échantillon N° 44827/HNC. Les fruits ont été acheminés au Laboratoire de Nutrition et Biochimie Nutritionnelle de l'Université de Yaoundé I. Après séchage (jusqu'à obtention du poids constant) à l'ombre dans un endroit aéré, la coque a été enlevée. Par la suite, ces graines ont été broyées à l'aide d'un Blender. La poudre ainsi obtenue a été stockée dans un récipient propre sec et à température ambiante. La

figure 6 représente le procédé d'obtention de la poudre des graines d'*Aframomum angustifolium*.

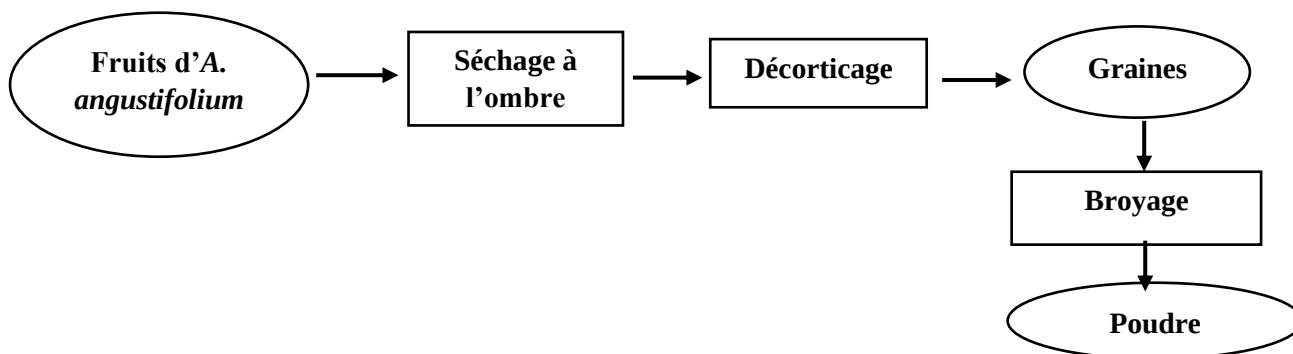


Figure 8 : Obtention de la poudre des graines d'*Aframomum angustifolium*

➤ **Préparation de l'extrait éthanolique**

Milles cent trente-un gramme (1131 g) de poudre des graines d'*Aframomum angustifolium* ont été délayés dans 4,524 litres d'éthanol 95% (rapport 1:4 (m/v), puis le mélange a été macéré pendant 48h à température ambiante (25°C). Après la macération, le mélange a été filtré à l'aide du papier filtre Wattman N°03. Le filtrat obtenu a été concentré à l'évaporateur rotatif à la température de 45°C et séché à l'étuve (50°C) pendant 2 jours. L'extrait brut obtenu a été nommé extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* (EEA) et a été utilisé pour la préparation des fractions et pour le gavage des rats dans l'expérimentation *in vivo*. La figure 7 représente le diagramme d'obtention de l'extrait éthanolique (Makamwe *et al.*, 2023).

• **Calcul du rendement d'extraction**

Le rendement d'extraction du matériel végétal a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de l'extrait (g)}}{\text{Masse de la poudre } A. \text{ angustifolium (g)}} \times 100$$

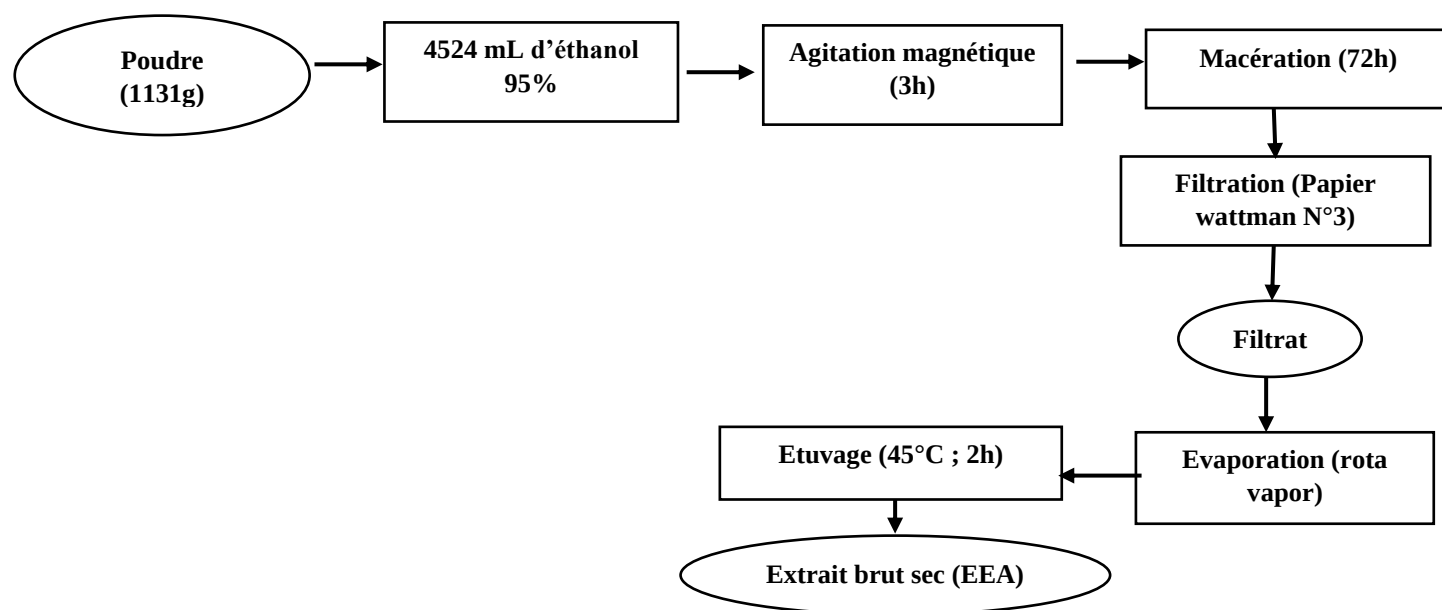


Figure 9 : Diagramme d'obtention de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions

➤ **Préparation des fractions à l'hexane, au dichlorométhane et au méthanol**

Soixante-neuf gramme (69g) d'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* a été fractionné suivant la technique de partition solide-liquide à l'aide de trois solvants de polarité croissante (Ganfon *et al.*, 2019).

- ❖ L'extrait brut a été introduit dans un bécher de 1000 mL et délayé dans cinq cent millilitres (500mL) d'hexane puis agité pendant 10 min et laissé au repos durant 45 min. Par la suite, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier Wattman N°3. Le filtrat obtenu a été concentré dans un évaporateur rotatif de type Heidolph VV2000 à une température 69°C. Ce processus a été répété jusqu'à épuisement de l'extrait (qui se caractérise par une décoloration progressive du mélange extrait-solvant lorsqu'on répète l'opération) pour obtenir la fraction à l'hexane (FHEX).
- ❖ La fraction résiduelle a été délayé dans cinq cent millilitres (500mL) de dichlorométhane puis agité pendant 10 min et laissé au repos durant 45 min. Par la suite, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier Wattman N°3. Le filtrat obtenu a été concentré dans un évaporateur rotatif de type Heidolph VV2000 à une température 39,8°C. Ce processus a été répété jusqu'à épuisement de l'extrait pour obtenir la fraction au dichlorométhane (FDCM)

- ❖ La fraction résiduelle a été délayée dans cinq cent millilitres (500mL) de méthanol puis agité pendant 10 min et laissé au repos durant 45 min. Par la suite, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier Wattman N°3. Le filtrat obtenu a été concentré dans un évaporateur rotatif de type Heidolph VV2000 à une température 64,6°C. Ce processus a été répété jusqu'à épuisement de l'extrait (décoloration progressive du mélange solvant-extrait brut suite à la répétition successive du processus) pour conduire à la fraction au méthanol (FMETH).

Le rendement d'extraction des fractions a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Rendement Fraction (\%)} = \frac{\text{Masse de la fraction après évaporation (g)}}{\text{Masse de l'extrait brut (g)}} \times 100$$

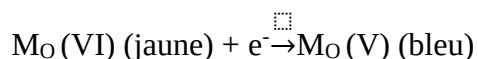
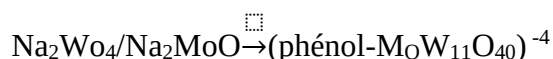
II.2- Détermination de la teneur en quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions

II.2.1- Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des composés phénoliques totaux a été effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu tel que décrit par (Singleton et Rossi, 1965).

➤ Principe

Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin, du réactif d'acide phosphotungstique phosphomolybdique (Folin-Ciocalteu) par les groupements oxydables des composés phénoliques pour former un complexe bleu-coloré dont l'absorbance est mesurée à 750 nm.



➤ Réactifs

- Carbonate de sodium (7,5%)
- Acide gallique
- Réactif de Folin-ciocalteu (0,2N)
- Ethanol (95%)

➤ Mode opératoire

À 30 µL d'extrait ou fraction (4 mg/mL) ont été ajoutés 1 mL de solution de Folin (0,2 N) et 1 mL de carbonate de sodium. L'absorbance a été mesurée à 750 nm après 30 minutes d'incubation à température ambiante. L'acide gallique a été utilisé comme standard à différentes concentrations (0, 100, 200, 400, 800 et 1000 µg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

➤ Expression des résultats

La concentration en polyphénols totaux a été calculée et exprimée en microgramme d'équivalents acide gallique par milligramme d'extrait (µg d'EqAg/mg Ex) à partir de la courbe d'étalonnage.

$$X = (Y * V_t) / (V_p * m * a)$$

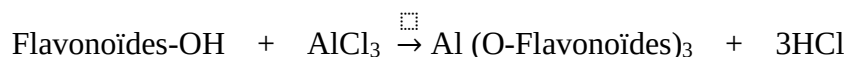
X= concentration en composés phénoliques, Y= densité optique, V_t= volume total d'extrait sec préparé, V_p = volume prélevé d'extrait sec préparé, m= masse de l'extrait sec, a= coefficient d'étalonnage.

II.2.2- Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage flavonoïdes totaux a été effectué par la méthode décrite par (Bahorun *et al.*, 1996)

➤ Principe

Les flavonoïdes réagissent avec le trichlorure d'aluminium et l'acétate de potassium pour former un complexe de couleur rosâtre qui absorbe à 420 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes contenue dans l'échantillon.



➤ Réactifs

- Acétate de potassium (1M)
- AlCl₃ (10% p/v)
- Quercétine
- Ethanol (95%)

➤ Mode opératoire

A 1 mL d'échantillon ou de standard préparé dans l'éthanol à la concentration de 4 mg/mL a été ajouté 1 mL d'AlCl₃ (10%), 1 mL d'acétate de potassium (1 M) et 5,6 mL d'eau distillée. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 420 nm. L'étalonnage a été faite avec la quercétine aux concentrations (0, 500, 600, 700, 800 et 1000 µg/mL).

➤ Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes a été calculée et exprimée en microgramme d'équivalents quercétine par milligramme d'extrait (µg d'EqQ/mg Ex).

$$X = (Y * V_t) / (V_p * m * a)$$

X= concentration en flavonoïdes, Y= densité optique, V_t= volume total d'extrait sec préparé, V_p = volume prélevé d'extrait sec préparé, m= masse de l'extrait sec, a= coefficient d'étalonnage.

II.2.3- Dosage des alcaloïdes

➤ Principe

Les alcaloïdes contenus dans l'échantillon réagissent avec le chlorure de fer, le chlorure d'hydrogène et le 1,10-Phénantroline pour former une solution de couleur rouge qui absorbe à 510 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'alcaloïdes présents dans le milieu (Singh et al. 2004).

➤ Réactifs

- Chlorure de fer III (0,025 M)
- Chlorure d'hydrogène (0,5 M)
- 1,10 Phénanthroline (0,05 M)
- Ethanol (95 %)

➤ Mode opératoire

Cent milligrammes (100 mg) de poudre d'extrait ou de fraction ont été soumis à l'extraction dans 10 mL d'éthanol 95%, ensuite filtrés et centrifugés à 5000 tr/min pendant 10

minutes. Dans le surnageant obtenu, 1 mL a été prélevé auquel ont été ajoutés 1 mL de $[\text{FeCl}_3 (0,025\text{M}) + \text{HCl} (0,5\text{M})]$ et 1 mL de 1,10 phénanthroline (0,05M) préparé dans de l'éthanol. Le mélange obtenu a été incubé au bain marie pendant 30 minutes avec maintien de la température à $70 \pm 2^\circ\text{C}$. L'absorbance de la coloration rouge du complexe formé a été lue à 510 nm contre le blanc. La Quinine a été utilisée comme standard à différentes concentrations (0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06 et 0,1 mg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

➤ Expression des résultats

La teneur en alcaloïdes a été déterminée à partir de l'équation de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage (Annexe 2) établie avec la quinine et exprimée en microgramme d'équivalents quinine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g d'EqQui/mg Ex}$).

$$X = (Y * V_t) / (V_p * m * a)$$

X= concentration en alcaloïdes, Y= densité optique, V_t = volume total d'extrait sec préparé, V_p = volume prélevé d'extrait sec préparé, m= masse de l'extrait sec, a= coefficient d'étalonnage.

II.3- Détermination de l'activité antioxydante *in vitro*

L'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et ses fractions a été réalisée suivant le test d'évaluation de la capacité antioxydante totale, le test du pouvoir réducteur, la capacité de piégeage du radical libre acide 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline 6sulfonique (ABTS⁺).

II.3.1-Test d'évaluation de la capacité antioxydante totale

➤ Principe

En milieu acide, le molybdène MO (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} est réduit en molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate / Mo (V) qui absorbe à 695 nm. (Prieto *et al.*, 1999).



➤ Réactifs

- Acide ascorbique
- H_2SO_4 (0,6M)

- Molybdate d'ammonium (4mM)
- Phosphate de sodium (28mM)

➤ Mode opératoire

Un volume de 0,3 mL d'extrait méthanolique à différentes concentrations (0,5 ;6,25 ;7,5 ;8,75 et 10 mg /mL) a été mélangé avec 3mL de solution du réactif (0,6M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4Mm de molybdate d'ammonium). Les tubes ont été visés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm contre le blanc contenant 3mL de la solution du réactif et 0,3 mL du méthanol et incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. L'acide ascorbique a été utilisé comme étalon.

➤ Expression des résultats

La capacité antioxydante totale a été exprimée en milligrammes d'équivalents acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EEA/g Ex)

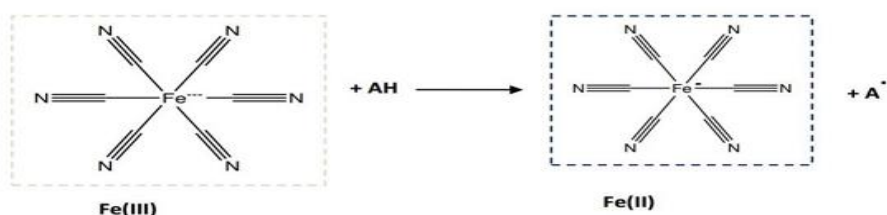
$$X = (Y \cdot V_t) / (V_p \cdot m \cdot a)$$

X= Capacité antioxydante totale, Y= densité optique, V_t = volume total d'extrait sec préparé, V_p = volume prélevé d'extrait sec préparé, m= masse de l'extrait sec, a= coefficient d'étalonnage.

II.3.2-Test d'évaluation du pouvoir réducteur du fer

➤ Principe

En milieu acide et en présence du chlorure ferrique, l'antioxydant transforme le ferricyanure de potassium $K_3[Fe(CN)_6]$ en un précipité bleu de ferrocyanure de potassium qui absorbe à 700nm (Ou *et al.* 2001).



➤ **Réactifs**

- Ferrocyanure de potassium $K_3[Fe(CN)_6]$
- Tampon phosphate (0.2 M ; pH 6.6)
- Acide trichloroacétique (10%)
- Chlorure ferrique (0,1%)

➤ **Mode Opératoire**

Un millilitre (1mL) de l'extrait ou fraction à différentes concentrations a été mélangé avec 2,5 mL) d'une solution de tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium à 1%. L'ensemble a été incubé au bain marie à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 mL d'acide trichloroacétique ont été ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min à 25°C. Un surnageant de 2,5 mL a été combiné avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution de chlorure ferrique. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été faite à 700 nm contre le blanc préparé, en remplaçant l'extrait par l'eau distillée.

➤ **Expression des résultats**

Les pourcentages de réduction du fer seront calculés par la formule suivante :

$$\% \text{réduction du fer} = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100$$

A_0 : absorbance du tube blanc

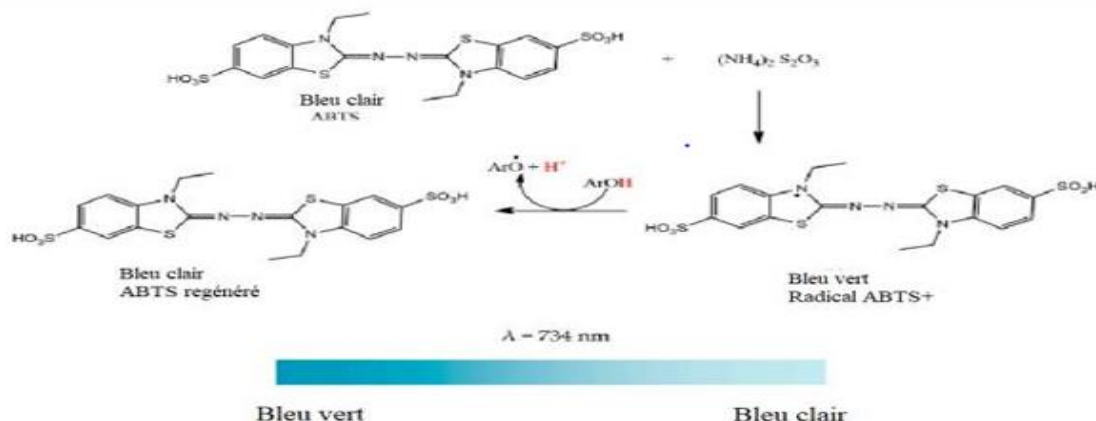
A_1 : absorbance du tube de l'essai

L'évolution du pourcentage de réduction en fonction de la concentration en extrait a permis de déterminer les CE_{50} .

II.3.3-Test de piégeage du radical libre ABTS⁺

➤ **Principe**

En réagissant avec le permanganate de potassium, l'ABTS forme le radical ABTS⁺ de couleur bleue à verte, l'ajout d'un antioxydant réduit ce radical et provoque la décoloration du mélange. Cette décoloration est mesurée par spectrophotométrie à 734 nm et est proportionnelle à l'activité des antioxydants présents dans l'échantillon (**Re et al.,1999**).



➤ **Réactifs**

- ABTS (7,4 mM)
- Permanganate de potassium (4,9 mM)
- Tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,1 mM)

➤ **Mode opératoire**

Un volume de 100μL d'extrait ou de fraction (1,2,3,4 et 5 mg/mL) préparé dans de l'éthanol a été ajouté à 1000μL de la solution ABTS⁺. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, l'absorbance a été lu à 734 nm contre le contrôle constitué de la solution ABTS⁺.

➤ **Expression des résultats**

Les résultats ont été exprimées en pourcentage de piégeage du radical ABTS⁺ selon la formule suivante :

$$\text{Piégeage du radical ABTS}^+(\%) = \frac{Ac - Ae}{Ac} \times 100$$

Ac : Absorbance control ; Ae : Absorbance échantillon

II .4- Evaluation de l'activité antioxydante *in-vivo*

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vivo* a été faite sur un modèle des rats mâles de souche *Wistar*.

II.4.1- Protocole expérimental

Après acclimatation, les rats ont été randomisés et divisés en deux (02) lots, l'un constitué de 5 rats qui constituait le groupe témoin normal (TN), l'autre de 25 rats était subdivisé en 05 groupes à savoir : le groupe témoin positif (TP), le groupe essai 1 (EEA), le groupe essai 2

(FDCM), le groupe essai 3 (FMETH) et le groupe référence (VITE). L'expérimentation animale a été effectuée sur une période de 16 jours allant du jour 0 au jour 16 (jour de sacrifice). Les conditions d'expérimentation ont été en accord de l'OCDE.

Au jour 0, les groupes d'animaux du lot 02 ont été pesés à l'aide d'une balance et le stress oxydant a été induit selon le protocole décrit par **Okagu et al., 2020** à l'aide de l'eau oxygénée à la dose unique de 2 ml/kg de poids corporel (pc) de 3% de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par injection intrapéritonéale. Du jour 1 au jour 15, les rats du lot 1 et ceux du lot 02 déjà intoxiqués par l'eau oxygénée ont reçu différents traitements par gavage œsophagien à savoir :

- Le groupe TN recevait de l'eau distillée
- Le groupe TP recevait de l'eau distillée
- Le groupe essai 1 (EEA) recevait 300 mg/kg/J/pc de l'extrait éthanolique
- Le groupe essai 2 (FDCM) recevait 150 mg/kg/J/pc de la fraction au dichlorométhane
- Le groupe essai 3 (FMETH) recevait 150 mg/kg/J/pc de la fraction au méthanol
- Le groupe référence (VITE) recevait 10 mg/kg de poids corporel de vitamine E

II.4.2- Sacrifice des animaux

A la fin de l'expérience, les animaux, soumis au préalable à un jeun, ont été sacrifiés par anesthésie à l'éther et le sang a été recueilli dans les tubes EDTA pour la préparation du plasma. Le cœur, le foie, le rein ont été prélevés par dissection pour la préparation des homogénats et conservation dans le formol 30% pour les analyses ultérieures. Dans un environnement stérile le contenu intestinal a été raclé du jejunum au rectum puis collecté dans les tubes coniques étiquetés, conservés à -20°C afin de quantifier les bactéries.

II.4.2.1- Préparation du plasma, des homogénats d'organes, de l'hémolysât d'érythrocytes, de l'inoculum bactérien

- **Réactifs**
 - NaCl 0,9 % (9g de NaCl dans 1 L d'eau désionisée) ;

II.4.2.1.1. Préparation du plasma

Immédiatement après récupération du sang dans les tubes EDTA pour la préparation du plasma, les tubes ont été laissés au repos à température ambiante (25 °C) pendant 4 heures, puis centrifugés pendant 10 min à 1500 g à 25 °C. Le plasma (surnageant) a été collecté, aliquoté puis conservé dans des tubes Eppendorf à -20°C pour les dosages des paramètres biochimiques d'intérêts.

II.4.2.1.2. Préparation de l'hémolysât d'érythrocytes

Après centrifugation du sang total, un volume de 100 µL de culot a été introduit dans des tubes coniques. Le culot a été lavé dans 2 ml d'une solution de NaCl (0,9%) et centrifugé à 1500 g pendant 10 min à température ambiante. Ce processus a été répété 2 fois. L'hémolyse des érythrocytes est réalisée en ajoutant 2 ml d'eau distillée.

Le mélange est centrifugé à 1500 g pendant 10 min à 25 °C. Le surnageant (hémolysât) a été récupéré, aliquoté et conservé à -20 °C.

II.4.2.1.3. Préparation des homogénats d'organes

Les organes (foie, cœur et reins) ont été prélevés par dissection, ensuite lavés dans la solution de NaCl (0,9%), essorés, pesés et broyés séparément dans un mortier. Le broyat a été homogénéisé dans 10 % (poids/volume) de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4. Puis a été centrifugé à 1500 g pendant 5min. Les homogénats ainsi obtenus ont été aliquotés et conservés à -20°C pour le dosage ultérieur des paramètres biochimiques d'intérêts.

II.4.2.1.4- Prélèvement du contenu intestinal

Dans un environnement stérile le contenu intestinal a été raclé du jéjunum au rectum puis collecté dans les tubes coniques étiquetés, conservés à -20°C afin de quantifier les bactéries.

II.4.2.1.5-Préparation de l'inoculum bactérien

L'eau peptonée a été utilisée pour la préparation de l'inoculum. Cette eau était constituée en mélangeant 5g de peptone et 5g de NaCl dans 500 mL d'eau minérale. L'ensemble a été porté à ébullition pendant 50 minutes.

Un gramme (1g) du contenu intestinal a été dissout dans 9 mL d'eau peptonée dans les tubes à essai suivie des dilutions en cascade jusqu'à 10⁻¹². Ces tubes ont ensuite été bouchés à l'aide du coton.

II.4.2.2-Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique et de ses fractions sur le microbiote intestinal

Ceci s'est fait par quantification des bactéries de la flore intestinale, contenues dans l'inoculum.

II.4.2.2.1 Préparation des milieux de culture

Il s'agissait des milieux Salmonella & Shigella (SS), Eosine Methylene Blue (EMB) Perfringens, B-media, M17 et Man Regosa Sharpe (MRS). Les constituants des différents

milieux (**Annexe 5**) ont été pesés et mixés à 500 mL d'eau minérale préalablement chauffée (100°C). Ensuite le mélange a été autoclavé pendant 50 minutes et refroidi.

II.4.2.2.2 Ensemencement et incubation

➤ Ensemencement

L'ensemencement consistait à mettre une quantité d'échantillon (inoculum) dans la boîte de pétrie. Dans cette étude deux types d'ensemencement ont été utilisés :

➤ En surface

L'ensemencement s'est fait en une couche et consistait à mettre 100 µl d'inoculum dans une boîte de pétrie avant d'introduire le milieu de culture. Ce type d'ensemencement a été utilisé pour les bactéries : *Escherichia coli* (sur milieu EMB), *Salmonella* et *Shigella* (sur milieu SS) (**Ayoub, 2018**).

➤ En profondeur ou immersion

Ce type d'ensemencement a été utilisé pour les bactéries anaérobies et s'est fait en double couche. Pour se faire l'on a introduit une quantité de milieu de culture dans la boîte de Pétrie puis laissé sécher, ensuite on a introduit 1000 µl d'inoculum et une seconde couche de milieu de culture y a été ajouté et laissé reposer. Ce type d'ensemencement a été utilisé pour la croissance des Bactéroïdes (B-media), des Bifidobactéria (MRS), des *Clostridium Perfringens* (sur milieu Perfringens), des Lactobacilles (MRS) et des Lactocoques (M17) à la seule différence que pour les trois premières bactéries ont été introduites dans la jarre car elles sont des anaérobies strictes (**Ayoub, 2018**).

➤ Incubation

L'incubation s'est faite dans différentes conditions :

- Dans l'incubateur à 37°C pendant 24 et 48 h pour la croissance des souches *E Coli*, *Salmonella* et *Shigella*
- A la température ambiante pendant 24 et 48 h pour la croissance des Lactobacilles, Lactocoques
- Dans la jarre pendant 24 et 48 h, permettant de maintenir l'anaérobiose pour la croissance de Bactéroïdes, Perfringens et bifidobactérie.

II.4.2.2.3- Comptage microbien

Le comptage s'est fait pour toutes les boîtes de pétrie. Il consistait à diviser la boîte de pétrie en quatre et à compter le nombre de colonies par quadrant (**Servais et al., 1992**). Les différentes colonies étaient distinguées par leur coloration sur les milieux spécifiques (Tableau II).

Les résultats exprimés en unité formant colonie par millilitre (UFC/mL) étaient calculés selon la formule :

$$C_x = (N \times D) / V$$

Où C_x représente la concentration de la bactérie x (UFC/mL), N la charge bactérienne, D le nombre de dilution et V le volume de l'inoculum.

II.5-Dosages des paramètres biochimiques

Les dosages biochimiques effectués ici étaient ceux des marqueurs du système antioxydant et pro-oxydant.

II.5.1- Dosages des marqueurs du système antioxydant

Les dosages des marqueurs du système antioxydant ont été réalisés à travers le dosage de la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion.

II.5.1.1- Evaluation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

➤ Principe

La méthode est basée sur le fait que la SOD présente dans l'échantillon inhibe l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome de couleur rose et qui absorbe à 480 nm (**Misra et Fridovich, 1972**).

➤ Réactifs

- Tampon carbonate (0,05 M ; pH 10,2) : 4,3 g de Na_2CO_3 , 10 mL H_2O et 4,2 g de NaHCO_3 ont été dissouts dans 900 mL d'eau distillée, le pH a été ajusté à 10,2 et le volume complété à 1000 mL avec de l'eau distillée ;
- Adrénaline (0,3 mM) : 0,006 g d'adrénaline ont été dissouts dans un volume d'eau et le volume a été complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

➤ Mode opératoire

Un volume de 0,2 mL d'échantillon a été ajouté à 2,5 mL de carbonate de sodium. La réaction a commencé après ajout de 0,3 mL d'adrénaline fraîchement préparé dans le tampon. Après mélange, la DO a été lue à 480 nm à 0s, 30s, 60s, 90 et 120 secondes. La cuve de référence contenait 2,5 mL de tampon ; 0,3 mL de substrat d'adrénaline et 0,2 mL d'eau distillée.

➤ **Expression des résultats**

Une unité de SOD est la quantité de SOD nécessaire pour entraîner 50% d'inhibition de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome pendant une minute.

$$\Delta DO \text{ min} = \frac{DO2 - DO1}{2}$$

DO1= DO à t = 0s ; DO2= DO à t =120s ;

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\Delta DO \text{ du blanc} - \Delta DO \text{ échantillon}) / \Delta DO \text{ du blanc}] \times 100 ;$$

50 % d'inhibition = 1 unité ; X % inhibition = y unités ; SOD unité/mL = y*5.

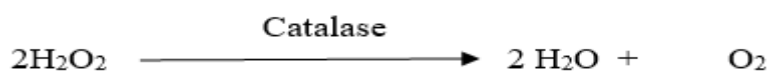
$$\text{SOD unités/mg protéines} = \frac{\text{SOD unité/mL}}{\text{Protéines mg/mL}}$$

Voir annexe 3 pour la méthodologie de dosage des protéines totales.

II.5.1.2- Détermination de l'activité de la catalase

➤ **Principe**

Cette méthode est basée sur le fait que la catalase présente dans l'échantillon réduit le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Le H₂O₂ restant après action de la catalase se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu vert d'acide perchlorique instable. Ce dernier va ensuite être décomposé par la chaleur pour former un complexe vert qui absorbe à la longueur d'onde de 620nm. L'activité de la catalase proportionnelle à la DO est déterminée grâce à la courbe d'étalonnage (Sinha, 1972).



➤ **Réactifs**

- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (0,2 M) ;
- Tampon phosphate (0,01M pH 7,0) ;

- Dichromate de potassium (5 %) ;
- Dichromate - acide acétique (10mM) : mélanger 100 mL de dichromate de potassium avec 300 mL d'acide concentré.

➤ **Mode opératoire**

- **Préparation des tubes pour l'étalonnage de la catalase**

Tableau II : Étalonnage de la catalase

N° tubes	1	2	3	4
H ₂ O ₂ (µL)	0	20	40	80
H ₂ O (µL)	1000	980	960	920
Volume dichromate / acide acétique (mL)	1	1	1	1
Mésurer les absorbances à 620 nm				

- **Préparation des tubes essai et témoin**

Dans un tube à essai, ont été introduits successivement 50 µL d'échantillon et 700 µL de tampon phosphate. A ce mélange, l'on a ajouté 200 µL de peroxyde d'hydrogène (50 mM). Le chronomètre a été déclenché après ajout de 2 mL de Dichromate/ acide acétique et la réaction arrêtée après 60s. Les tubes témoins ont été simultanément effectués et tous les tubes ont été chauffés à 100°C pendant 10min. Après refroidissement, la DO a été lue à 620 nm.

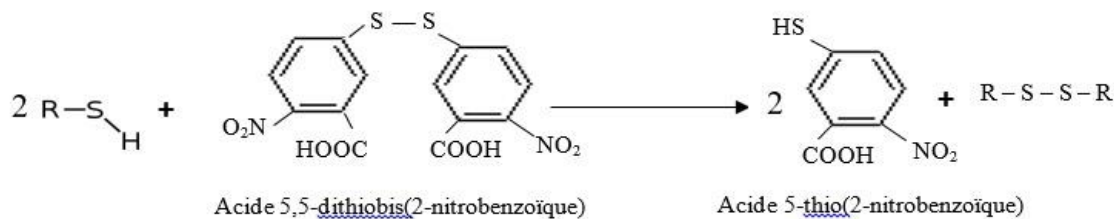
➤ **Expression des résultats**

L'activité de la catalase est exprimée en mM de peroxyde d'hydrogène consommés/min/mg de protéines en utilisant la courbe d'étalonnage en annexe 2. Le dosage des protéines a été réalisé conformément au protocole décrit en annexe3.

II.5.1.3- Dosage du glutathion

➤ **Principe**

Elle est basée sur la mesure des groupements thiols par le suivi de la concentration en DTNB (acide 5-thio(2nitro-benzoïque)) coloré en jaune, formé par réduction du DTNB (acide 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (**Ellman,1959**)).



R = Radical protéique variable

➤ **Réactifs**

- Acide dinitro-2,2'-dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB)
- Tampon tris-HCl (0,1 M ; pH 6,5)
- Réactif de Ellman : préparé en dissolvant 4,96 mg de DTNB dans 250 ml de tampon tris-HCL.

➤ **Mode opératoire**

Des tubes à hémolyse en plastique contenant des volumes de 100 µL d'échantillon et 900 µL de réactif d'Ellman ont été homogénéisés et incubés à température ambiante pendant 30 minutes. Les densités optiques ont été lues à 412 nm contre le blanc.

➤ **Expression des résultats**

Les concentrations en glutathion en µM ont été calculées en utilisant la loi de Beer Lambert :

DO = densité optique de l'échantillon ; ϵ = coefficient d'extinction moléculaire du DTNB (DTNB = $1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ; l = longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1 cm

Les concentrations en glutathion ont été exprimées en µmol/mg de protéine

II.5.2- Dosages des marqueurs du système pro-oxydant

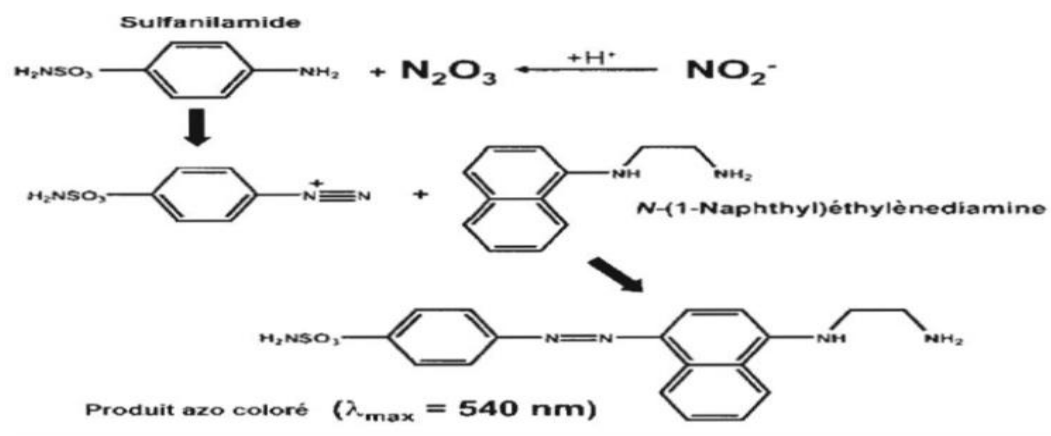
Les dosages des marqueurs du statut pro-oxydant ont été réalisés par le dosage du radical NO et le dosage du malondialdéhyde (MDA)

II.5.2.1- Dosage du radical oxyde nitrique (NO•)

➤ **Principe**

Cette méthode est basée sur la réaction entre le nitrite (un des composés primaires stables et non volatile de l'oxydation du NO) et un réactif de Griess. Par la réaction de diazotation, le nitrite réagit avec l'acide sulfanilique (sulfanilamide) pour former un sel de diazonium en milieu acide (Acide phosphorique). Ce sel réagit ensuite avec le

Dichlorure de N-1- Naphthylethylène diamine (NED) pour former un composé azo coloré rose-rouge. La coloration est mesurée à 540nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de nitrites présents dans l'échantillon. (Griess, 1879)



➤ Réactifs

- NED (0,1 % dans l'eau distillée) ;
- Sulfanilamide (1 % dans 5 % d'acide phosphorique) ;
- Standard (0,1 M de nitrite dans l'eau distillée).

➤ Mode opératoire

Un volume de 100 µL d'échantillon a été ajouté à 100µL d'une solution de sulfanilamide. Le mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après incubation, 100 µL de solution de NED ont été ajoutés puis incubés de nouveau 10 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La lecture de la densité optique s'est faite à 540 nm.

➤ Expression des résultats

La concentration en radical oxyde nitrique a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Concentration de NO } (\mu\text{M}) = \frac{\text{DO}}{\varepsilon L}$$

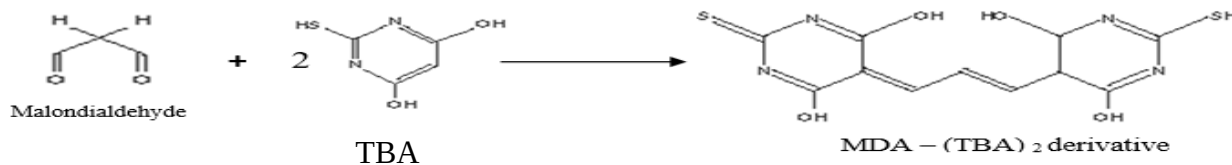
Avec L=1 cm et ε=39500 M⁻¹.cm⁻¹

II.5.2.2- Dosage d'un marqueur de la peroxydation lipidique : Malondialdéhyde (MDA)

➤ Principe

Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur le stress oxydant induit par l'eau oxygénée chez le rat

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm (Yagi, 1976).



➤ Réactifs

Pour 100 mL de réactif :

- Acide trichloroacétique (TCA) (20% p/v) ;
- Acide thiobarbiturique (TBA) (0,375% p/v) ;
- HCl (1 N) ;
- Butylhydroxytoluène (BHT) (0,01% p/v).

➤ Mode opératoire

Dans des tubes à essai en verre et à vis ont été introduits 100 μ L d'échantillon, 400 μ L de réactif TBA (Annexe 1) lesquels ont été fermés hermétiquement, le mélange a été chauffé au bain-marie à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction, les tubes ont été centrifugés à 1500g pendant 5 minutes et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm.

➤ Expression des résultats

La concentration du MDA a été déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

- ❖ Dans le plasma : Concentration MDA (mol/L) = $\text{DO} / \epsilon \cdot \text{L}$
- ❖ Dans les homogénats : Concentration MDA (mol/L/g de foie) = $\text{DO} \cdot \text{V} / \epsilon \cdot \text{L} \cdot \text{v} \cdot \text{P}$

v : Volume d'échantillon

V : Volume du surnageant obtenu après centrifugation de l'homogénat

P : Poids de l'organe broyé (g)

II.6- Analyses statistiques des résultats

L'analyse statistique des données a été effectuée par le logiciel IBM/SPSS 20.0 pour Windows en utilisant le test ANOVA 1 facteur, suivi d'un test post Hoc « LSD » au seuil de significativité de 5% pour comparer les moyennes. Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne $\pm$ écart type. Le logiciel Microsoft Office Excel 2016 a été utilisé pour les représentations graphiques et le logiciel XLSTAT a permis d'effectuer les analyses en composantes principales (ACP) pour la classification de l'extrait et ses fractions en fonction des différentes variables étudiées.

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1-Résultats

III.1.1-Rendement d'extraction

➤ Rendement de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium*

L'extraction éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* dans un mélange p/v a permis d'obtenir l'extrait éthanolique avec un rendement de 6.98%.

➤ Rendement des fractions

- La fraction à l'hexane était obtenue avec un rendement de 50,72%
- La fraction au dichlorométhane était obtenue avec un rendement de 8,69%
- La fraction au méthanol était obtenue avec un rendement de 30,43%

III.1.2.1-Teneurs en composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions

Le Tableau III présente les teneurs en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions. La fraction au méthanol présentait de manière significative les meilleures concentrations en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux. Les concentrations les plus faibles ont été enregistrées au niveau de la fraction à l'hexane ($p < 0,05$).

Tableau III : Teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes totaux de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions.

Échantillons	Composés phénoliques totaux ($\mu\text{g d'EqAg/mg Ex}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g d'EqQ/mg Ex}$)
EEA	30,46 $\pm$ 1,71 ^a	6,67 $\pm$ 0,46 ^a
FDCM	26,16 $\pm$ 2,37 ^a	6,62 $\pm$ 1,54 ^a
FMETH	82,58 $\pm$ 9,52 ^b	11,23 $\pm$ 1,11 ^b
FHEX	5,26 $\pm$ 0,28 ^c	1,47 $\pm$ 0,60 ^c

Les valeurs suivies des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)

EEA= Extrait éthanolique ; FDCM= Fraction au dichlorométhane ; FMETH= Fraction au méthanol ; FHEX= Fraction à l'hexane ; mgEx : milligrammes d'extrait sec

III.1.2.2-Teneurs en alcaloïdes de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions.

Les résultats présentés dans le Tableau IV ressortent les concentrations en alcaloïdes de l'extrait éthanolique d'*A. angustifolium* et ses fractions. Notons qu'en fractionnant l'EEA, la fraction au méthanol présentait la teneur la plus élevée en alcaloïdes comparativement à EEA et FDCM. Celle à l'hexane, avait la plus faible teneur en alcaloïdes. Par ailleurs, des différences significatives ont été relevées entre les différents échantillons (extrait et ses fractions), sauf au niveau de l'extrait éthanolique et la fraction au DCM ($p < 0,05$).

Tableau IV : Teneurs en alcaloïdes de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et de ses fractions.

Echantillons	Alcaloïdes ($\mu\text{g d'EqQui/mgEx}$)
EEA	7,42 $\pm$ 3,68 ^a
FDCM	10,35 $\pm$ 0,96 ^a
FMETH	14,63 $\pm$ 0,00 ^b
FHEX	2,04 $\pm$ 0,38 ^c

Les valeurs suivies des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$).

EEA= Extrait éthanolique ; FDCM= Fraction au dichlorométhane ; FMETH= Fraction au méthanol ; FHEX= Fraction à l'hexane ; mgEx : milligrammes d'extrait sec

Suite à l'insolubilité et à des très faibles teneurs en composés phénoliques, flavonoïdes et alcaloïdes, la fraction à l'hexane a été mise de côté pour la suite des travaux.

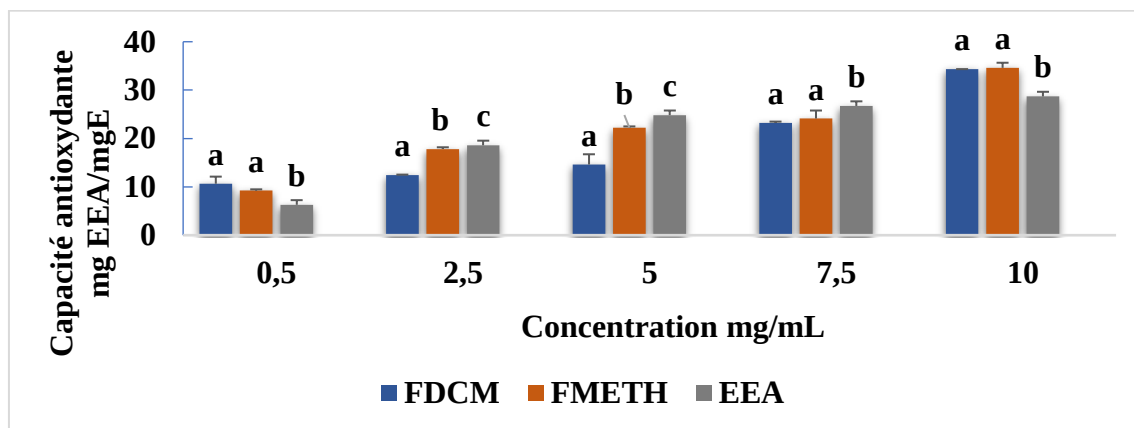
III.1.3- Potentiel antioxydant *in vitro* de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions

Il s'agit du test de la capacité antioxydante totale, le piégeage du radical ABTS et la réduction du fer pour l'extrait éthanolique et ses fractions.

III.1.3.1-Capacité antioxydante totale (CAT) de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions.

La figure 10 présente les résultats de la capacité antioxydante totale (CAT) de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions. A la plus petite concentration testée (0,5mg/mL), la fraction au DCM avait la meilleure CAT (10,64 $\pm$ 1,47 EEA/mgE), suivie de celle au méthanol. Aux concentrations 2,5 et 5mg/mL l'EEA et la

fraction au méthanol présentaient les meilleures CAT et à la plus grande concentration testée (10mg/ml), les fractions avaient un meilleur potentiel antioxydant que l'extrait éthanolique. L'analyse statistique a révélé une différence significative avec la fraction au dichlorométhane à la concentration 0,5 mg/ mL ; une différence significative de l'EEA aux concentrations 2,5 et 5mg/ mL ; et à la plus grande concentration, une différence significative entre FMETH et EEA.

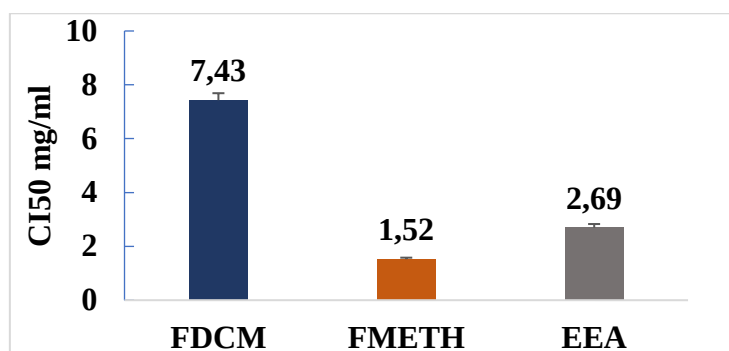


Les différentes lettres (a, b, c) correspondent à une différence significative entre les différents échantillons ($P < 0,05$). EEA= Extrait éthanolique ; FDCM= Fraction au dichlorométhane ; FMETH= Fraction au méthanol

Figure 10 : Capacité antioxydante totale de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions

III.1.3.2-Piégeage du radical ABTS⁺ par l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions

L'évaluation de l'activité antiradicalaire du radical ABTS⁺ exprimée en concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions, représentant la concentration en antioxydant nécessaire pour faire décroître la concentration initiale du radical ABTS⁺ de 50% a permis de noter que la FMETH présentait la meilleure CI₅₀ (CI₅₀= 1,52 mg/ml) suivie de l'EEA (CI₅₀= 2,69 mg/ml). Celle au FDCM avait la plus petite CI₅₀ (CI₅₀= 7,43 mg/ml). Les valeurs de CI₅₀ obtenues ont été présentés dans la figure 11 ci-dessous.

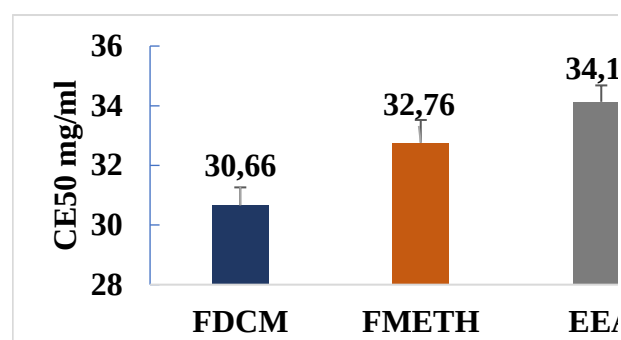


EEA= Extrait éthanolique ; FDCM= Fraction au dichlorométhane ; FMETH= Fraction au méthanol

Figure 11 : Test de piégeage du radical ABTS de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions

III.1.3.3-Réduction du fer de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions

Dans le même ordre d'idée de vérifier le potentiel antioxydant des extraits, l'activité réductrice du Fer a été déterminée et les résultats sont consignés dans la Figure 12 sous forme de concentration efficace 50 (CE₅₀). Il en ressort que la fraction au dichlorométhane a montré la meilleure capacité de réduction du fer (30,66 mg/ml), suivi de la fraction au méthanol (32,76mg/ml).



EEA= Extrait éthanolique ; FDCM= Fraction au dichlorométhane ; FMETH= Fraction au méthanol

Figure 12 : Concentration efficace 50 de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions

III.1.4-Potentiel antioxydant *in vivo* de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions

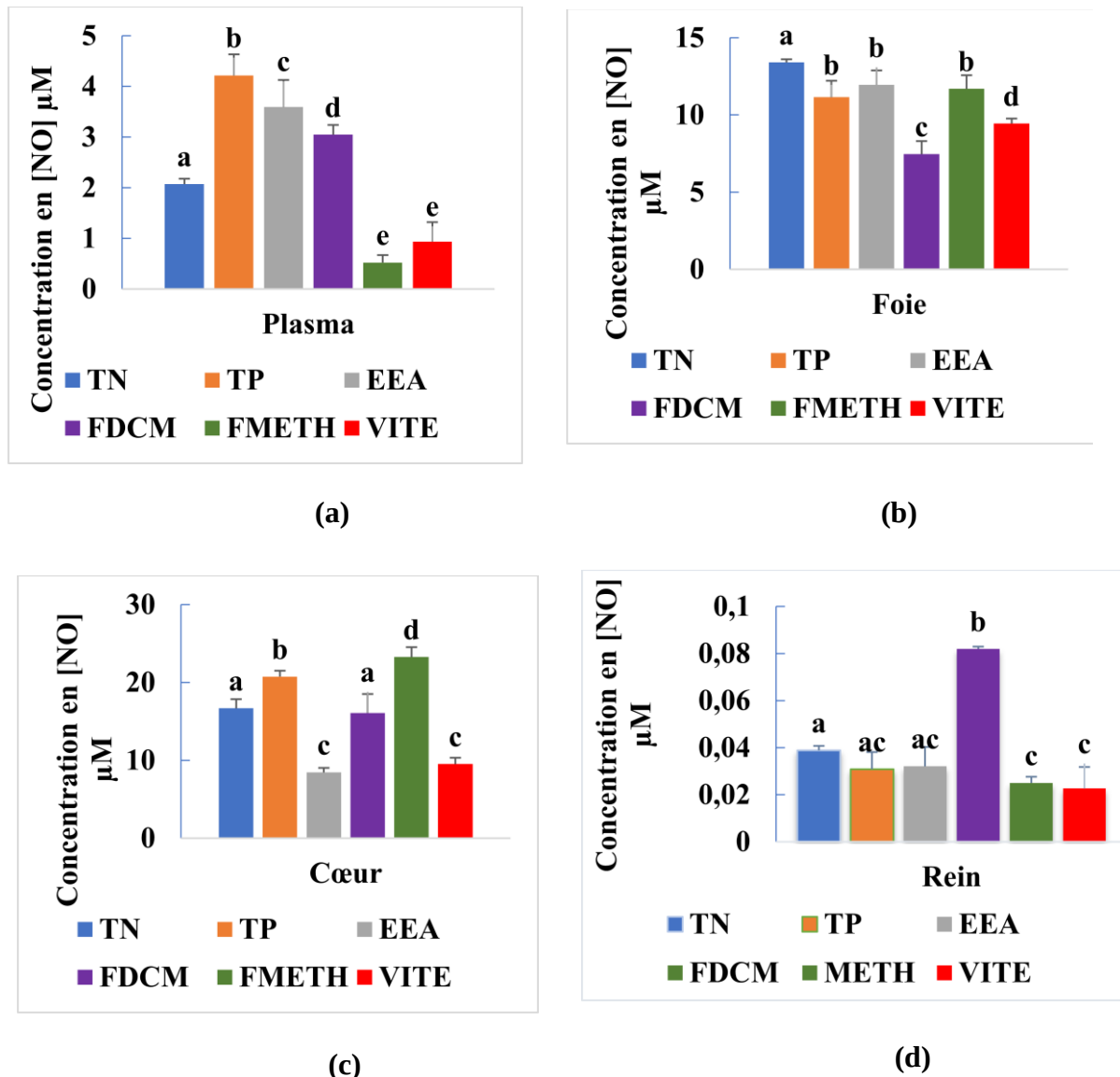
L'étude des activités antioxydantes *in vivo* de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions au dichlorométhane et au méthanol chez les rats a été réalisée par l'évaluation de leurs effets sur les marqueurs du système pro-oxydant tels

que l'oxyde nitrique, malondialdéhyde, et les marqueurs enzymatiques à savoir la catalase et la superoxyde dismutase ; ainsi que sur un marqueur non enzymatique (le glutathion).

III.1.4.1- Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur quelques marqueurs du statut pro-oxydant chez les rats.

➤ Effet de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur la concentration en oxyde nitrique (NO•)

La Figure 11 représente l'effet de l'extrait éthanolique et ses fractions sur le taux de NO• dans le plasma, le foie, le cœur et le rein des rats. Au niveau du plasma et du cœur respectivement, l'induction du stress a entraîné une augmentation significative du taux de NO• dans le groupe TP ($4,21 \pm 0,41 \mu\text{M}$, $p < 0,0001$; $20,74 \pm 0,76 \mu\text{M}$, $p = 0,001$) par rapport au groupe TN ($2,06 \pm 0,10$; $16,67 \pm 1,17 \mu\text{M}$) ; tandis qu'au niveau hépatique, une diminution significative ($p = 0,002$) du taux de NO• dans le groupe TP ($11,14 \pm 1,06 \mu\text{M}$) par rapport au groupe TN ($13,39 \pm 0,20 \mu\text{M}$) a été observée. L'administration de l'extrait éthanolique, de la fraction au dichlorométhane et de la fraction au méthanol a entraîné une diminution significative du taux de NO• dans le plasma ($3,59 \pm 0,53 \mu\text{M}$, $p < 0,0001$; $3,04 \pm 0,19 \mu\text{M}$, $p = 0,001$; $0,52 \pm 0,14 \mu\text{M}$, $p < 0,0001$) respectivement par rapport au groupe TP. Au niveau cardiaque, la réduction est observable avec le groupe EEA ($8,45 \pm 0,57 \mu\text{M}$, $p < 0,001$) et le groupe FDCM ($16,07 \pm 2,44 \mu\text{M}$, $p < 0,0001$) qui a d'ailleurs une valeur similaire à celle du groupe VITE, molécule de référence. Pour ce qui est de l'effet du traitement sur le foie, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre les groupes traités (EEA et FMETH) comparé au groupe TP. Par contre le groupe FDCM a causé une baisse significative ($p < 0,0001$) comparé au groupe TP. Au niveau du rein, seule la fraction au dichlorométhane a entraîné une augmentation significative du taux de NO• comparé à tous les autres groupes. Comparativement à EEA, FMETH et FDCM ont présenté une meilleure réduction radical NO•.



Valeurs exprimées sous forme de moyenne $\pm$ Ecart type; TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EEA : extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* ; FDCM : fraction au dichlorométhane ; FMETH : fraction au méthanol ; VITE : vitamine E. Les différentes lettres (a, b, c, d) correspondent à une différence significative entre les différents groupes ($P < 0,05$).

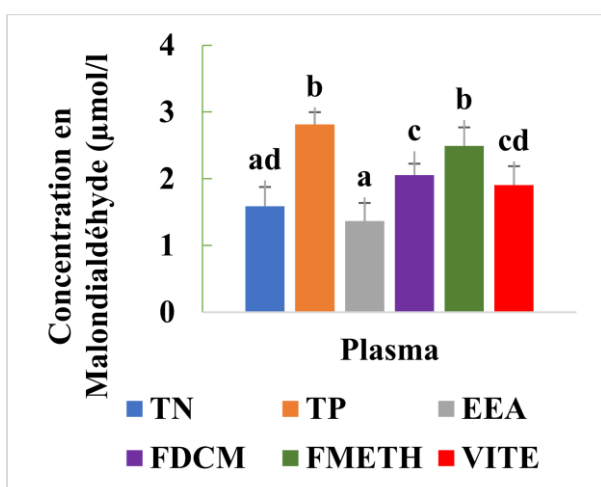
Figure 13 : Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et les fractions sur la concentration en radical oxyde nitrique chez les rats dans (a) Plasma, (b) Foie, (c) Cœur, (d) rein chez les rats

➤ **Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur la concentration en malondialdéhyde (MDA)**

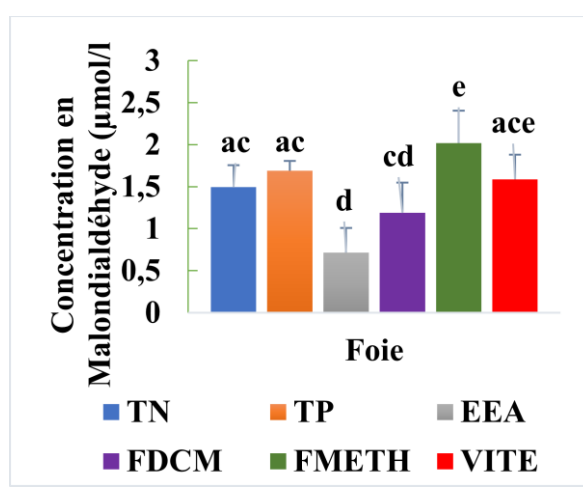
La Figure 14 présente l'effet de l'extrait éthanolique et de ses fractions sur la concentration en MDA dans différents compartiments (plasma, foie, cœur, rein) chez les rats. Au niveau plasmatique, cardiaque et rénal le stress induit a entraîné une augmentation significative ($p < 0,0001$) du taux de MDA chez le groupe TP ($2,81 \pm 0,18$; $6,86 \pm 1,12$; $4,78 \pm 0,90 \mu\text{mol/l}$) par rapport au groupe TN ($1,58 \pm 0,29$; $1,02 \pm 0,45$; $0,89 \pm 0,18 \mu\text{mol/l}$). Le

Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur le stress oxydant induit par l'eau oxygénée chez le rat

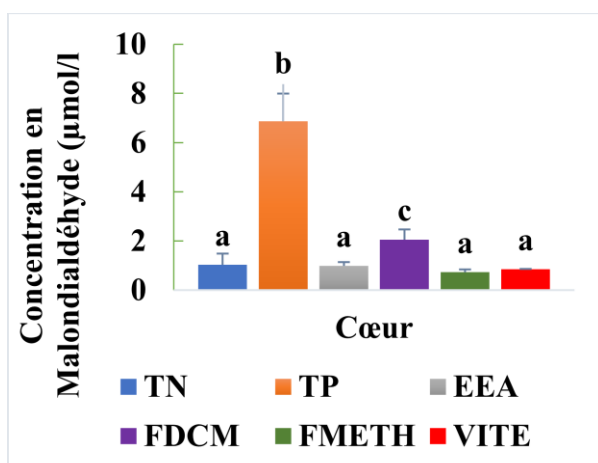
traitement des rats à l'extrait éthanolique et ses fractions (FDCM et FMETH) a entraîné dans l'ensemble, une diminution significative ($p < 0,0001$; $p = 0,001$) du taux de MDA dans le plasma (excepté avec le groupe FMETH), dans le cœur ($p < 0,0001$) et le rein par rapport au groupe TP. L'EEA était le plus efficace dans le plasma ($1,36 \pm 0,26 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,0001$) et le foie ($0,71 \pm 0,29 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,0001$). Dans le cœur, l'EEA ($0,98 \pm 0,15 \mu\text{mol/l}$), FMETH ($0,72 \pm 0,11 \mu\text{mol/l}$) et VITE ($0,84 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$) présentaient la même efficacité. Par contre au niveau du rein, FDCM ($1,95 \pm 0,36 \mu\text{mol/l}$) et VITE ($1,83 \pm 0,56 \mu\text{mol/l}$) exhibaient la même efficacité. Comparativement aux fractions, on a noté des taux de MDA plus faible dans le groupe extrait.



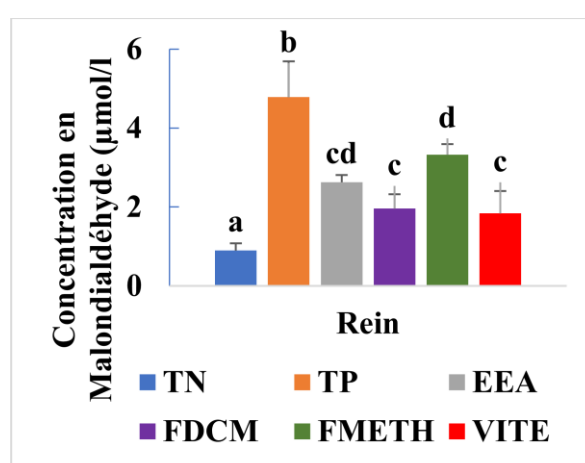
(a)



(b)



(c)



(d)

Valeurs exprimées sous forme de moyenne $\pm$ Ecart type ; TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EEA : extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* ; FDCM : fraction au dichlorométhane ; FMETH : fraction au méthanol ; VITE : vitamine E. Les différentes lettres (a, b, c, d) correspondent à une différence significative entre les différents groupes ($P < 0,05$).

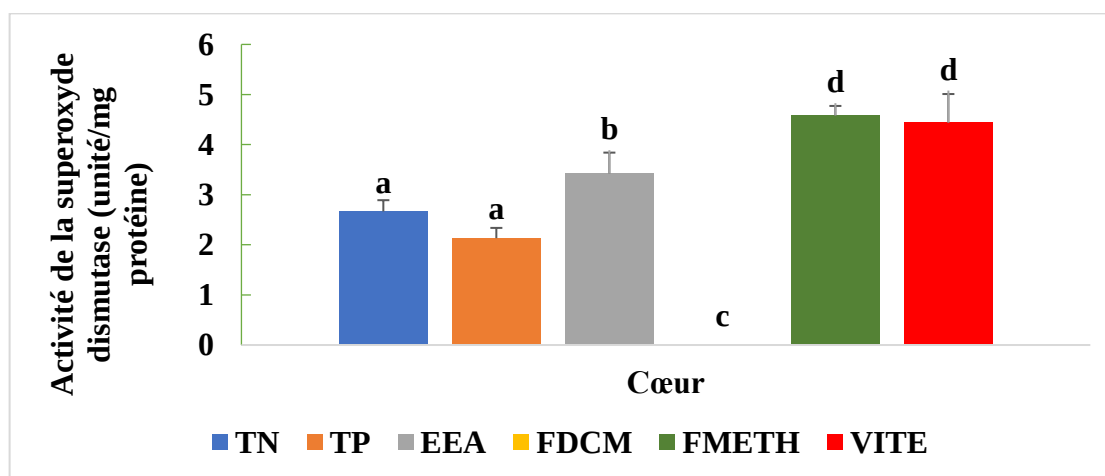
Figure 14 : Effet de l'extrait éthanolique et les fractions sur la concentration en malondialdéhyde (MDA) dans le (a) plasma, (b) foie, (c) cœur, (d) rein chez les rats.

III .1.4.2-Effet de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et les fractions sur quelques marqueurs enzymatiques chez les rats.

Les marqueurs enzymatiques du statut antioxydant évalués étaient : la superoxyde dismutase, catalase.

➤ Effet de l'extrait éthanolique et des fractions sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) au niveau du cœur

L'effet de l'extrait éthanolique et des fractions sur l'activité de la SOD chez les rats a été résumé dans la Figure 15. L'induction du stress oxydant n'a pas entraîné une diminution ($p > 0,05$) de l'activité de la SOD chez le groupe TP ($2,13 \pm 0,20$ unités/mg de protéines) comparé à ceux du groupe TN. Toutefois, l'administration de l'extrait éthanolique ($3,42 \pm 0,41$ unités/mg de protéines) et la fraction au méthanol ($4,58 \pm 0,19$ unités/mg de protéines) a entraîné une augmentation ($p < 0,0001$) de l'activité de cette enzyme par rapport au groupe TP ($2,13 \pm 0,20$ unités/mg de protéines). Cependant, la vitamine E a entraîné une augmentation significative ($p = 0,002$) de l'activité de la SOD et son effet était similaire à celui de FMETH. Comparativement à l'extrait éthanolique, FMETH a présenté une meilleure activité sur la SOD.

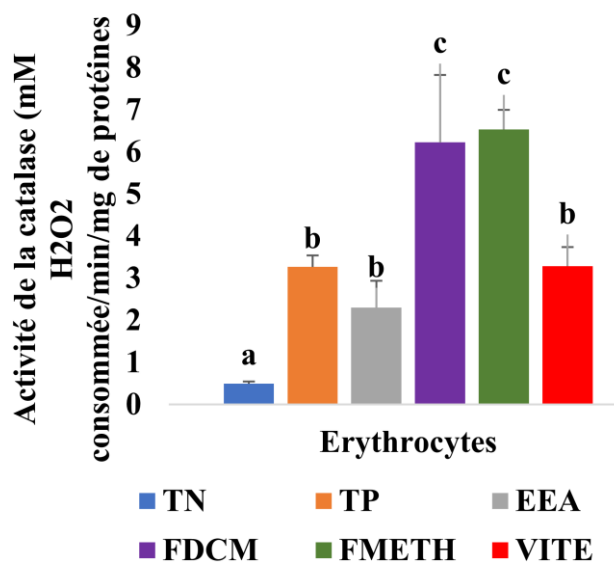


Valeurs exprimées sous forme de moyenne $\pm$ Ecart type ; TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EEA : extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* ; FDCM : fraction au dichlorométhane ; FMETH : fraction au méthanol ; VITE : vitamine E. Les différentes lettres (a, b, c, d) correspondent à une différence significative entre les différents groupes ($P < 0,05$).

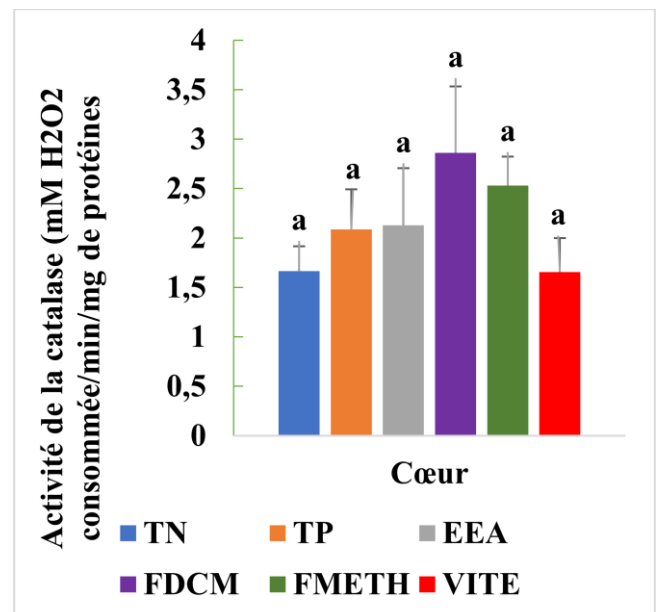
Figure 15 : Effet de l'extrait éthanolique et ses fractions sur l'activité de la SOD chez les rats

➤ Effet de l'extrait et des fractions sur l'activité de la catalase

Les résultats consignés dans la Figure 16 montre que l'induction par l'administration du peroxyde d'hydrogène a entraîné une augmentation significative ($p < 0,0001$) de l'activité de la catalase dans les érythrocytes des rats du groupe TP comparativement au groupe TN. Dans le cœur, aucune différence ($p > 0,05$) n'a été observée dans les différents groupes. Le traitement des rats avec la fraction au dichlorométhane ($6,21 \pm 1,60$ mM H₂O₂ consommés/mg de protéines) et la fraction au méthanol ($6,52 \pm 0,46$ mM H₂O₂ consommés/mg de protéines) a significativement ($p < 0,0001$) boosté l'activité de cet enzyme comparativement aux autres groupes au niveau des érythrocytes. Comparativement à EEA, FDCM et FMETH ont présenté une meilleure activité de la catalase.



(a)



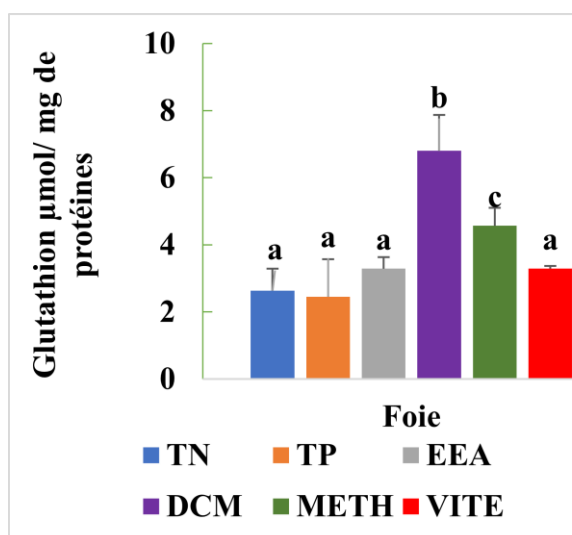
(b)

Valeurs exprimées sous forme de moyenne $\pm$ Ecart type ; TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EEA : extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* ; FDCM : fraction au dichlorométhane ; FMETH : fraction au méthanol ; VITE : vitamine E. Les différentes lettres (a, b, c, d) correspondent à une différence significative entre les différents groupes ($P < 0,05$).

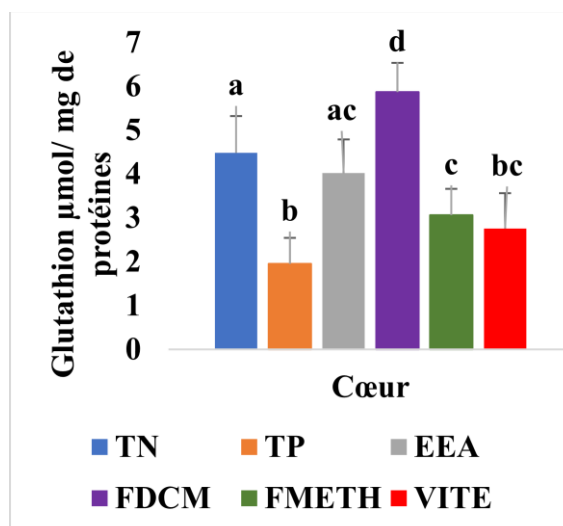
Figure 16 : Effet de l'extrait et ses fractions sur l'activité de la catalase dans (a) les érythrocytes, (b) le cœur chez les rats

III .1.4.3-Effet de l'extrait éthanolique et ses fractions sur le glutathion (marqueur non enzymatique)

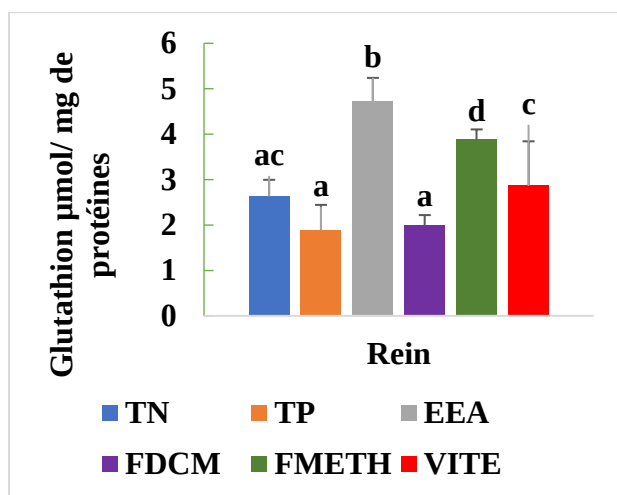
Le glutathion est un marqueur non enzymatique du système de défense antioxydant endogène. Il ressort que de son évaluation que l'administration du peroxyde d'hydrogène a entraîné une diminution ($p < 0,0001$) de son taux dans le cœur et mais pas ($p > 0,05$) dans le plasma et les reins chez le groupe TP par rapport au groupe TN. Toutefois, le traitement à l'EEA ($1,38 \pm 0,21$ $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines), la FDCM ($3,25 \pm 0,28$ $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines) et FMETH ($1,02 \pm 0,18$ $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines) ont entraîné une augmentation ($p < 0,0001$ pour EEA et FDCM ; FMETH $p = 0,015$;) de ce marqueur dans le plasma avec une meilleure efficacité de la fraction au dichlorométhane. Dans le cœur, l'EEA ($4,02 \pm 0,76$ $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines) et la FDCM ($5,86 \pm 0,66$ $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines) ont entraîné une augmentation ($p < 0,05$) du taux de glutathion. Tandis que dans les reins, ce sont plutôt l'EEA ($4,73 \pm 0,50$ $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines), FMETH ($3,87 \pm 0,22$ $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines) et la VITE ($2,86 \pm 0,97$ $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines) qui ont entraîné son augmentation. Dans le foie, FDCM ($6,79 \pm 1,07$ $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines) et FMETH ($4,56 \pm 0,53$ $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines) ont provoqué respectivement l'augmentation significative ($p < 0,0001$; $p = 0,001$) de ce marqueur. Comparativement à EEA et FMETH FDCM a obtenu une meilleure efficacité sur le glutathion (figure 17).



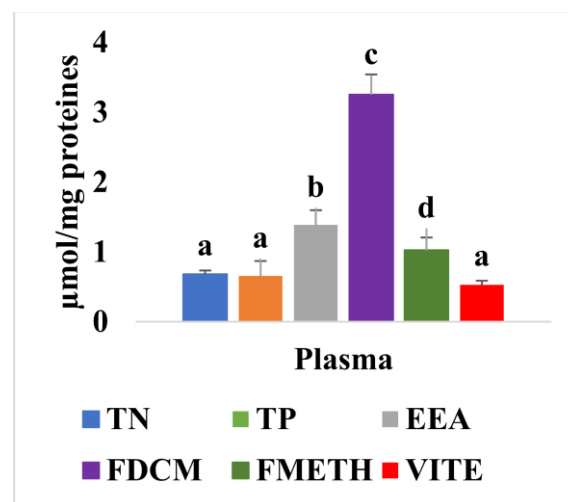
(a)



(b)



(c)



(d)

Valeurs exprimées sous forme de moyenne $\pm$ Ecart type ; TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EEA : extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* ; FDCM : fraction au dichlorométhane ; FMETH : fraction au méthanol ; VITE : vitamine E. Les différentes lettres (a, b, c, d) correspondent à une différence significative entre les différents groupes ($P < 0,05$).

Figure 17 : Effet de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur l'activité du glutathion dans (a) foie, (b) cœur, (c) rein (d) plasma chez les rats

III.1.4.4- Effet de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur la flore intestinale

➤ Effet de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur les bactéries commensales

L'effet de l'extrait éthanolique et ses fractions sur la flore intestinale a été consigné dans le Tableau V. Il en ressort que l'administration de l'eau oxygénée a entraîné une modification de la flore intestinale marquée par une baisse du taux de *Lactobacillus*, de bactéroïdes comparativement au groupe TN. Le traitement avec l'extrait et ses fractions a entraîné une augmentation de la quantité de bactéroïdes avec des valeurs supérieures même à celles obtenues dans le groupe TN. La valeur la plus élevée était obtenue avec l'EEA par rapport aux fractions. Chez les *Lactobacillus*, FMETH a le mieux augmenter ces bactéries par rapport à EEA et FDCM.

Tableau V: Effet de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur les bactéries commensales

	TN	TP	EEA	FDCM	FMETH	VITE
Bactéroïdes (UFC/ml)	5,869	5,778	6,926	6,681	6,322	5,416
Lactobacillus (UFC/ml)	5,639	5,301	3,380	3,480	4,570	5,419
Clostridioles (UFC/ml)	ND	ND	1,00	ND	2,736	ND

Valeurs exprimées sous forme de moyenne ; TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EEA : extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* ; FDCM : fraction au dichlorométhane ; FMETH : fraction au méthanol ; VITE : vitamine E. UFC : unité formant colonie ; ND : non déterminé

➤ Effet de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur les bactéries pathogènes

Concernant les bactéries pathogènes, l'induction du stress à l'eau oxygénée a entraîné la diminution de la quantité de *shigella spp*, et une augmentation de coliformes totaux dans le

Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur le stress oxydant induit par l'eau oxygénée chez le rat

groupe TP comparé au groupe TN. Le traitement des animaux à l'extrait éthanolique et ses fractions a entraîné une diminution de la quantité de coliformes totaux. La valeur la plus basse étant observée avec le groupe FMETH.

Tableau VI: Effet de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur les bactéries pathogènes.

	TN	TP	EEA	FDCM	FMETH	VITE
Coliformes totaux (UFC/ml)	4,389	5,872	3,706	3,653	3,220	2,00
<i>Shigella</i> sp (UFC/ml)	2,434	2,00	3,103	3,204	3,045	4,240
<i>Salmonella</i> (UFC/ml)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Valeurs exprimées sous forme de moyenne $\pm$ Erreur standard sur la moyenne ; TN : Témoin négatif ; TP : Témoin positif ; EEA : extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* ; FDCM : fraction au dichlorométhane ; FMETH : fraction au méthanol ; VITE : vitamine E. UFC : unité formant colonie ; ND : non déterminé

III.1.4.4. Analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée dans le but de classer les extraits en fonction de leurs activités antioxydantes. La figure 18 représente le cercle de corrélation entre les différentes variables notamment les composés phénoliques, flavonoïdes, alcaloïdes totaux ; l'activité antioxydante *in vitro* (capacité antioxydante totale, test du pouvoir réducteur (FRAP), piégeage des radicaux DPPH° et °OH) et l'activité antioxydante *in vivo* (MDA, SOD, CAT, Glutathion), l'effet sur le microbiote (bactéroïdes, coliformes totaux). Il en ressort de cette figure que, ces variables concourent à la formation du système

Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur le stress oxydant induit par l'eau oxygénée chez le rat

d'axe (F1xF2) à 76,29%. L'axe F1 à lui seul explique 43,71% des variables observées et le second axe F2 explique 32,58%.

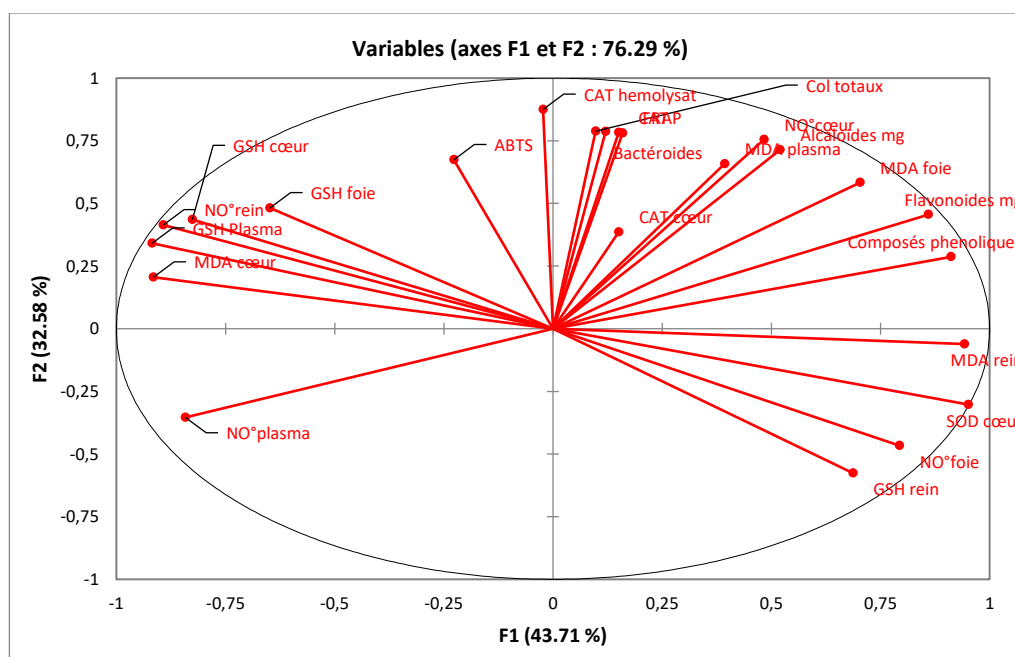


Figure 18 : Cercle de corrélation entre les variables (axes F1 et F2)

Le tableau VII donne la contribution des différentes variables étudiées à la formation du système d'axe (F1xF2). Il apparaît que, les variables telles que la teneur en composés phénoliques totaux, flavonoïdes, le NO (plasma, foie et rein), MDA (rein, cœur et foie), Glutathion (plasma, cœur, foie et rein) et SOD cœur contribuent à la formation de l'axe F1. Tandis que les variables telles que l'activité antioxydante totale, la teneur en alcaloïdes, le pouvoir réducteur du fer, NO cœur, MDA (plasma) participent à la formation de l'axe F2.

Tableau VII : Pourcentage (%) de contribution des différentes variables étudiées à la formation du système d'axe (F1xF2).

	F1	F2
Composés phénoliques	8,2707	1,0980
Flavonoïdes	7,3526	2,7663
Alcaloïdes	2,6876	6,7914
CAT	0,2246	8,1665
ABTS	0,5132	6,0617
FRAP	0,2527	8,1298
NO°plasma	7,0505	1,6704

Effet de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions sur le stress oxydant induit par l'eau oxygénée chez le rat

NO°foie	6,2673	2,9057
NO°cœur	2,3257	7,6076
NO°rein	7,9211	2,2873
MDA plasma	1,5354	5,7755
MDA foie	4,9227	4,5439
MDA cœur	8,3295	0,5643
MDA rein	8,8353	0,0497
CAT érythrocytes	0,0052	10,2176
CAT cœur	0,2251	1,9844
SOD cœur	8,9927	1,2202
GSH foie	4,1811	3,0991
GSH cœur	6,7843	2,5316
GSH rein	4,6964	4,4309
GSH Plasma	8,3874	1,5522
Col totaux	0,0946	8,2908
Bactéroïdes	0,1443	8,2551

La figure 19 présente le cercle de corrélation entre les échantillons et les variables que la fraction au méthanol a présenté une corrélation positive avec la teneur en composé phénoliques, flavonoïdes, alcaloïdes, capacité antioxydante totale, le test de réduction du fer, test de piégeage de ABTS⁺, NO, cœur, MDA (foie), catalase érythrocytes (CAT hem), bactéroïdes, coliformes totaux et une corrélation négative avec la SOD cœur, MDA rein; la fraction au dichlorométhane a présenté une corrélation positive avec glutathion (foie, plasma et cœur), NO rein, MDA cœur. Quant à l'extrait éthanolique, on a observé une corrélation positive avec le glutathion rein, NO foie, SOD cœur et une corrélation négative avec le NO plasma.

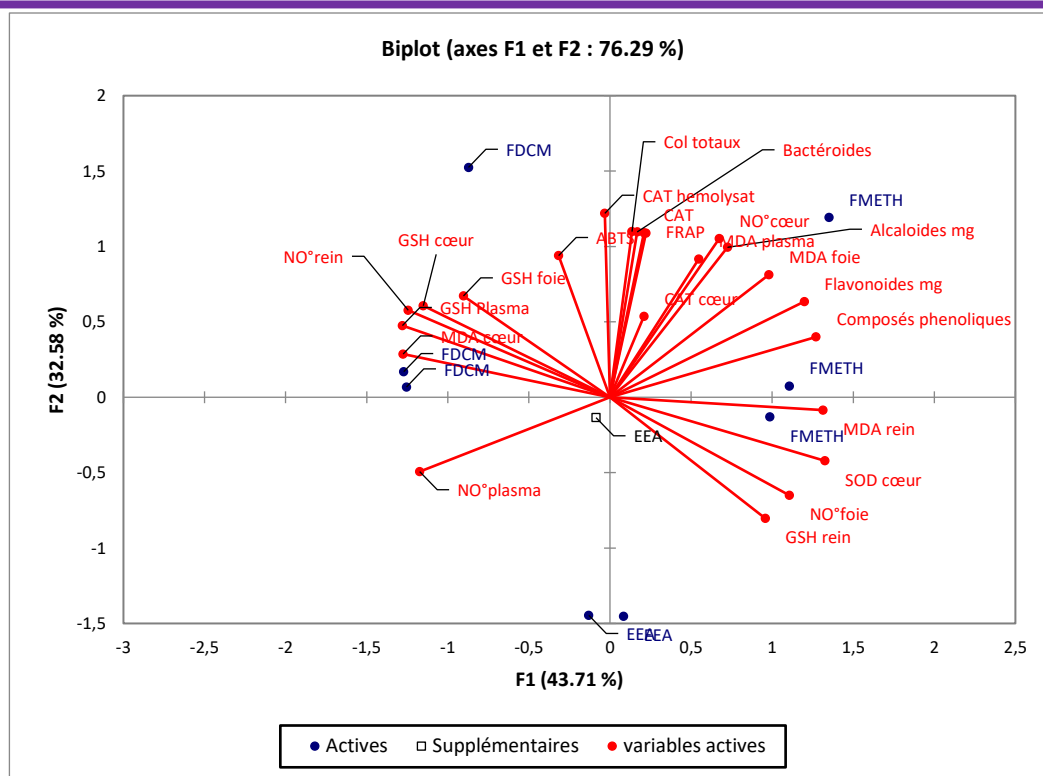


Figure 19 : Analyse en composante principale de l'extrait éthanolique et de ses fractions

III.2- Discussion

Le stress oxydant constitue un facteur déterminant dans l'installation d'une altération du microbiote intestinal conduisant à l'évolution de nombreuses maladies chroniques (**Briber, 2020 ; Sun et al., 2024**). La plante *Aframomum angustifolium* à travers ses composés phytochimiques offrent des solutions prometteuses. Les études entreprises sur les graines de cette plante se sont tournées vers l'extrait éthanolique mais pas son fractionnement qui pourrait augmenter son activité antioxydante et ainsi réduire les conséquences du stress oxydant. Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales avec pour objectif de comparer les propriétés antioxydantes et l'effet sur le microbiote intestinal de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions.

Les teneurs en composés phénoliques totaux, flavonoïdes totaux, alcaloïdes totaux étaient plus élevée dans la fraction au méthanol (Tableau III, IV). Ce résultat pourrait se justifier par la nature du solvant. Le choix d'un solvant est fondé sur plusieurs paramètres physico-chimiques notamment sa polarité, sa pureté, la solubilité des constituants cibles (**Tahouo, 2016**). La teneur en composés bioactifs est fortement liée à la polarité du solvant (**Rakotononirina, 2019**). En effet, les structures chimiques des métabolites secondaires tels que les composés phénoliques (flavonoïdes) et les alcaloïdes, possèdent de nombreux

groupements fonctionnels (-OH ; -CO, -NH₂) qui leur confèrent une meilleure solubilité dans les solvants polaires tels que le méthanol, l'éthanol, le dichlorométhane dont le méthanol étant le plus polaire de par son groupement OH dans sa structure chimique. Les solvants apolaires comme l'hexane vont extraire les composés apolaires (carbones, lipides, huiles essentielles) (**Tahouo, 2016**), ce qui justifierait les faibles teneurs en composés bioactifs obtenus avec la fraction à l'hexane.

La capacité antioxydante totale est la capacité d'un extrait à protéger les cellules de l'attaque contre les radicaux libres. Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique possédait la meilleure capacité antioxydante totale pour trois concentrations (2,5 à 7,5 mg/ml) (**Figure 8**). Le potentiel antiradicalaire a été évalué à travers le test de piégeage du radical libre ABTS⁺ c'est à dire la capacité de l'échantillon à donner des électrons et protons pour stabiliser un radical. Les résultats obtenus révèlent que la fraction au méthanol présentait la meilleure CI50 (1,52 mg/ml) (**Figure 11**). La capacité réductrice des composés est un indicateur majeur de leur potentielle activité antioxydante (**Dar et al., 2017**). Dans cette étude elle a été évaluée par le pouvoir réducteur des ions ferriques et les résultats ont montré que la fraction au dichlorométhane a obtenu la meilleure CE50 (30,66 mg/ml) (**Figure 10**). Ces activités pourraient être dû au fort taux en composés bioactifs contenus dans la plante qui ont montré des capacités de donneurs d'électrons et protons (**Tonga et al., 2022**). Les flavonoïdes par leurs groupements hydroxyles ont la capacité de céder un hydrogène afin de stabiliser les radicaux libres (**Montesano et al., 2020**), ce qui fait d'eux des réducteurs et inactivateurs d'oxydants (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**). La meilleure activité antioxydante totale observée au niveau de l'extrait éthanolique comparé aux fractions se justifierait par l'action synergique des métabolites secondaires (composés phénoliques et alcaloïdes) présents dans l'extrait brut d'éthanol (**Jin Gan et al., 2017**). Comparativement à l'extrait éthanolique, les fractions au méthanol et au dichlorométhane ont obtenu les meilleurs CI50 et CE50 (Figure 9 et 10) respectivement pour le test de piégeage du radical ABTS⁺ et le test de réduction du fer, cela pourrait être dû au fractionnement qui permettrait de simplifier un extrait brut en le rendant moins complexe et ainsi obtenir des concentrés de métabolites secondaires d'intérêt aux activités antioxydantes spécifiques (**Roucham, 2021**).

L'effet de l'extrait éthanolique et des fractions d'*Aframomum angustifolium* sur les marqueurs pro-oxydants et le système de défense antioxydant a été évalué suite à l'administration de l'eau oxygénée à la dose de 2ml/kg de pc de 3% de peroxyde d'hydrogène chez des rats wistar. En effet, le peroxyde d'hydrogène est une molécule qui possède une

grande capacité de diffusion à travers les tissus et donc un plus grand potentiel d'action (**Gagné, 2008**). Par ailleurs, il peut réagir avec le Fe^{2+} pour générer des radicaux hydroxyles qui sont très réactifs par la réaction de Fenton et réagit notamment avec les phospholipides des membranes et les protéines (**Liguori et al., 2018**).

La peroxydation lipidique aboutit à des dérivés dont le principal est le malondialdéhyde (MDA) (**Dar et al., 2017 ; Cordiano et al., 2023**). À cet effet, les valeurs obtenues pour le dosage du MDA ont permis de relever une augmentation significative de la concentration en MDA dans le plasma, cœur, rein du groupe de rat ayant reçu l'eau oxygénée, ce qui confirme l'oxydation des lipides plus précisément celle des acides gras insaturés (**Cordiano et al., 2023**). D'autre part, l'administration de l'extrait éthanolique et ses fractions a entraîné une diminution significative de la concentration en MDA au niveau du cœur, plasma (uniquement pour le groupe extrait éthanolique et la fraction au dichlorométhane), foie (extrait éthanolique et fraction au méthanol), rein (uniquement les groupes recevant les différentes fractions) (**Figure 16**). Cette diminution significative de la MDA observée dans le plasma, foie, cœur, rein pourrait être dû aux composés phénoliques qui sont capables de chélater les ions métalliques tels que le fer, le cuivre en inhibant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) (**Santos-Sanchez et al., 2019**). Le radical oxyde nitrique ($\text{NO}^\bullet$) est une espèce oxygénée réactive ayant un certain pouvoir oxydant mais aussi une molécule ayant plusieurs rôles dans une variété de système cellulaires et physiologiques (**Gagné, 2008**). Le niveau de $\text{NO}^\bullet$ significativement élevé dans le groupe recevant l'eau oxygénée, confirme qu'il y'a eu installation d'un stress oxydant au niveau du plasma et du cœur. Par contre sa diminution chez les groupes recevant l'extrait éthanolique, la fraction au dichlorométhane et la fraction au méthanol pourrait être due au fait que l'extrait et les fractions possèdent des flavonoïdes qui sont capable de transférer un proton sur le radical $\text{NO}^\bullet$ pour le stabiliser et empêcher sa toxicité pour l'organisme (**Eboh, 2014**).

La catalase et la superoxyde dismutase (SOD) sont des enzymes antioxydantes responsables de la dismutation du peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxyde (**Bensakhria, 2018**). La diminution de l'activité de la catalase chez les rats du groupe TP au niveau des érythrocytes et la diminution significative de l'activité de la superoxyde dismutase du groupe TP au niveau du cœur pourrait être due à l'inhibition de ces enzymes par un excès de substrat. Toute fois l'augmentation significative de l'activité de la catalase au niveau de l'hémolysât chez les groupes recevant la fraction au dichlorométhane et la fraction au méthanol ou l'augmentation significative de l'activité de la superoxyde dismutase dans les

groupes recevant l'extrait éthanolique et ceux recevant les différentes fractions serait due aux composés phénoliques, flavonoïdes contenus dans l' extrait et les fractions qui stimuleraient l'activité de la catalase et de la superoxyde dismutase.

Le principal antioxydant thiol est le tripeptide glutathion (GSH) qui est un antioxydant intracellulaire qui est également un cofacteur de la glutathion peroxydase (GPx) et de la glutathion réductase (**Kwom et al., 2019**). Une faible concentration de GSH exacerbe les agressions oxydatives, entraînant une augmentation des dommages membranaires et cellulaires (**Okagu et al., 2020**). A cet effet l'administration de l'eau oxygénée chez les rats a induit une diminution significative au niveau du cœur et non significative au niveau du rein et foie de la concentration en GSH chez le groupe TP par rapport au groupe TN (**Figure 17**). Cependant l'administration de l'extrait éthanolique (rein et cœur), de la fraction au dichlorométhane (foie, cœur et rein) et la fraction au méthanol (foie et cœur) a entraîné une augmentation significative de la concentration en GSH au niveau du cœur et du rein. La même observation a été faite au niveau hépatique avec l'administration de l'extrait éthanolique et la fraction au dichlorométhane. Cette augmentation de la concentration en GSH serait due aux composés phénoliques, flavonoïdes, alcaloïdes qui peuvent moduler l'homéostasie du glutathion en stimulant les enzymes clés (glutamate cystéine ligase) impliquées dans son métabolisme ou en régulant l'expression des gènes par la modulation des voies de transduction du signal (**Di Giacomo et al., 2023**).

Pour tous les paramètres analysés *in vivo* les fractions (méthanol et dichlorométhane) présentaient de meilleures activités comparativement à l'extrait éthanolique. Cela pourrait s'expliquer par le fractionnement qui permettrait de concentrer les principes actifs dans les fractions spécifiques permettant ainsi de potentialiser son activité antioxydante (**Abdullahi et al., 2021**).

Afin de connaître l'effet de l'extrait éthanolique et ses fractions sur une des conséquences du stress oxydant nous nous sommes intéressés à son effet sur le microbiote intestinal. Le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans de nombreux aspects de la santé humaine, un déséquilibre de la flore intestinale par un état de stress oxydant pourrait avoir plusieurs conséquences. Dans cette étude, l'induction du stress oxydant par l'administration de l'eau oxygénée a entraîné une diminution de la quantité de bactéries bénéfiques et une augmentation des coliformes totaux (bactéries pathogènes) par rapport au groupe TN, ceci pourrait être dû aux propriétés antimicrobiennes du peroxyde d'hydrogène, cette propriété donne au peroxyde d'hydrogène d'éliminer à la fois les bactéries bénéfiques et pathogènes

perturbant ainsi l'équilibre normal du microbiote intestinal (Ebel, 2014). Par ailleurs, l'augmentation des *bactéroides* dans le groupe recevant l'extrait éthanolique et les différentes fractions par rapport au groupe TP pourrait être dû à l'effet prébiotique des composés phénoliques qui améliorent la croissance des bactéries bénéfiques (Aravind *et al.*, 2021). Cependant, la quantité de *lactobacillus* n'a pas augmenté par rapport au groupe TP, ceci pourrait être dû à la non sensibilité des *lactobacillus* face aux composés bioactifs contenus dans les différentes fractions d'*Aframomum angustifolium*. Concernant les bactéries pathogènes, une charge élevée de coliformes totaux chez le groupe TP a été notée ceci pourrait être dû au stress oxydant qui induit la pathogénèse de certaines bactéries pathogènes (Zhang *et al.*, 2022). L'extrait éthanolique et ses fractions ont permis de diminuer la charge de coliformes totaux ; ceci pourrait s'expliquer par la capacité des composés bioactifs contenu dans l'extrait et les fractions à inhiber la prolifération des bactéries pathogènes. Par contre, la charge des bactéries *shigella spp*, n'a pas augmenté par rapport au TN ceci pourrait s'expliquer par une résistance de ces bactéries au stress oxydant et également le temps d'exposition à l'eau oxygénée.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Au terme de cette étude dont l'objectif était d'évaluer les propriétés antioxydantes de l'extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* et ses fractions et l'effet sur le microbiote intestinal, il en ressort que :

- Les graines d'*Aframomum angustifolium* contiennent des composés bioactifs. Cependant, la fraction au méthanol a présenté les meilleures teneurs en composés bioactifs ($82,58 \pm 9,52 \mu\text{g d'EqAg/mg Ex}$), ($11,23 \pm 1,11 \mu\text{g d'EqQ/mg Ex}$), ($14,63 \pm 0,00 \mu\text{g d'EqQui/mgEx}$).
- L'extrait éthanolique et ses fractions (FDCM et FMETH) ont permis d'augmenter l'activité des marqueurs du statut antioxydant notamment CAT ($2,29 \pm 0,63 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ consommés/mg de protéines pour l'extrait éthanolique ; $6,21 \pm 1,60 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ consommés/mg de protéines pour FDCM ; $6,52 \pm 0,46 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ consommés/mg de protéines pour FMETH) ; SOD ($3,42 \pm 0,41$ unités/mg de protéines pour l'extrait éthanolique ; $4,58 \pm 0,19$ unités/mg de protéines pour FMETH) , Glutathion et de diminuer les marqueurs du statut pro-oxydant ($\text{NO}^\bullet$, MDA) avec une meilleure activité des fractions par rapport à l'extrait.
- L'extrait éthanolique et ses fractions ont permis la diminution de la quantité de coliformes totaux et l'augmentation de la quantité de bactéroïdes au niveau du microbiote intestinal avec un meilleur effet de la fraction au méthanol. L'Analyse en composantes principales a montré que la fraction au méthanol avait les meilleures activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et l'effet sur le microbiote. Les composés bioactifs y contenu pourrait être utilisé dans la gestion du stress oxydatif.

PERSPECTIVES

- Analyser le profil des composés bioactifs de l'extrait éthanolique et de ses fractions par HPLC ;
- Etudier la toxicité des fractions
- Faire une étude plus prolongée en augmentant le temps d'exposition au peroxyde d'hydrogène et le temps de l'expérimentation sur le microbiote intestinal

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abdelazim, A., & Abomughaid, M. (2024).** Oxidative stress : an overview of past research and futur insight. *All Life*. 17(1):1-17.
2. **Abdullah, E., Kolo, I., Abdebayo, O., & Majekodumi, O.(2011).** Antimycobacterial friedelane- terpenoid from the roast bark of terminalia avicennioides. *American Journal of Chemistry*. 1(2) : 52-55.
3. **Altwegg, R., & Michon, A. (2020).** La dysbiose intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Revue Francophone des Laboratoires*. Vol 2020(527):47-54.
4. **Anywar, G., & Kirimuhuzya, C. (2015).** Phytochemical profile and antibacterial activity of crude extracts of the pod of *Aframomum angustifolium* (Sonn.) K. Schum. *European Journal of Biological Research*. 5(2):36-41.
5. **Aravind, M., Wichienchot, S., Tsao, R., & Chakkaravarthi, S. (2021).** Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Research International*. 142:1-19.
6. **Auberval, N. (2010).** Prevention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Thèse de doctorat en Physiologie et Biologie des organismes, populations, interactions. *Université de Strasbourg*, 244 pages.
7. **Ayoub, B. (2018).** Milieux de culture et techniques d'ensemencement. *Science magazine*,1-15.
8. **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., & Gazin, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel Forschung*. 46:1086-1089.
9. **Baudin, B. (2020).** Marqueurs d'oxydation des acides nucleiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2020(522):56-61.
10. **Belaich, R., & Boujraf, S. (2016).** Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des Maladies Métaboliques*. 10(1):38-42.
11. **Bensakhria, A. (2018).** Stress Oxydatif. *Toxicologie générale*, 70-86
12. **Bonnefont-rousset. (2014).** Obésité et stress oxydant. *Springer*. 9(1):8-13.

13. **Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calaminha*. *Nature et Technologie*. 9: 14-19.
14. **Briber, N. (2020).** Activité antioxydante et antibactérienne de la plante *Allium cepa*. Memoire de Master. *Université Mohamed Seddik Ben Yahia*. 46 pages.
15. **Buldak, L., Labuzek, K., Buldak, J., KozáowskiM, M., achnik, G., Liber, S., Suchy, D., Dulawa-buldack, A., & Okopien, B. (2014).** Metformin affects macrophages' phenotype, improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase, and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacological Report*. 66(3):418-429.
16. **Casati, M., Ferri, E., Azzolino, D., Cesari, M & Arosio, B. (2019).** Gut microbiota and physical frailty through the mediation of sarcopenia. *Experimental Gerontology*. 124(1):1-7.
17. **Chaudhary, M., Janmeda, P., Docea, A., Yeskaliyeva, B., Razis, A., Modu, B., Calina, D., & Sharifi-Rad. (2023).** Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in Chemistry*. 11: 1-24.
18. **Chayma, L., & Djihane, M. (2021).** Effet preventif de la vitamin C contre le stress oxydatif. Memoire de Master. *Universite Center of Abdalhafid boussof-Mila*. 60 pages.
19. **Chen, X., Guo, C., & Kong, J. (2012).** Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*. 7(5):376-385.
20. **Chimou, L. (2019).** Evaluation de l'activité de l'extrait aqueux d'écorces de *citrus sinensis* contre le stress oxydant induit par une diète hypercalorique chez les rats wistar. Mémoire de Master. *Université de Yaoundé I*, 49 pages.
21. **Cordiano, R., Di Gioacchino, M., Mangifesta, R., Panzera, C., Gangerni, S., & Minciullo, P. (2023).** Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy oriented disease, An update. *Molecules*. 28(16):1-22.
22. **Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016).** The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical and Biology*. 95:27-42.
23. **Dar, R., Brahman, P., Khurana, N., Wagay, J., Lone, Z., Ganaie, M., & Pitre, K. (2017).** Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol

- by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Arabian Journal of Chemistry*, 10:1119-1128.
24. **Deepali, M., & Luna, S. (2018).** Dietary supplementation of spirulina ameliorates iron-induced oxidative stress in indian knife fish *Notopterus Notopterus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 61:71-78.
25. **Defraigne, J., & Pincemail J. (2008)** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue Médicale de Liège*. 63 : Synthèse 2008 :10-19
26. **Desmier, T. (2016).** Les antioxydants de nos jours : Définition et applications. Thèse d'exercice. *Université de Limoges*. 88 pages.
27. **Di Giacomo, C., Malfa, G., Tomasello, B & Bianchi, S. (2023).** Natural compounds and glutathione : Beyond mere antioxydants. *Antioxidants*. 12(7):1-17.
28. **Dieng, S., Fall A., Diatta-Badji, K., Sarr, A., Sene Moussa., Mbaye, A., Diatta, W., & Bassene, E. (2017).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-ethanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumach. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 11(2):768-776
29. **Djeffal, A. (2014).** Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate <<méthomyl>> chez le rat wistar : stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et ou en vitamine C. Thèse de doctorat en biochimie appliqué. *Université Badji Mokhtar-Annaba*. 148 pages.
30. **Ebhohimen, I., Ebhomielen, J., Edemhanria, L., Osagie, A., & Omoruyi, J. (2020).** Effect of ethanol extract of *Aframomum angustifolium* seeds on potassium bromate induced liver and kidney damage in wistar rats. *Global journal of pure and applied sciences*. 26:1-8.
31. **Ebhohimen, I., Edemhanrhia, L., Ekozin, A., & Okolie, P. (2017).** Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Capacity of Aqueous and Ethanol Extracts of *Aframomum angustifolium* Seed. *Tropical Journal of Natural Product Research*. 1(3):125-128.
32. **Eboh, A. (2014).** Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences*. 2(1):110-118.
33. **Ellman, G. (1959).** "Tissue sulfhydryl group". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82:70-77.
34. **Gagné, J. (2008).** La céruloplasmine et l'oxyde nitrique dans la protection des cellules cardiaques. Mémoire de Master en Chimie. *Université du Québec, Montréal*. 96 pages.

35. **Gan, J., Feng, Y., He, Z., Li & Zhang, H. (2017).** Corrélation entre l'activité antioxydante des alcaloïdes et des phénols de Maca (*Lipidium meyenii*). *Hindawi*. 1-11.
36. **Ganfon H., Houvohefsou, J-P., Assanhou, A., Bankole, H & Gbenou, J. (2019).** Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique et des fractions Qnogeissus leiocarpa (DC) Gueill et perr (*Combrataceae*). *International Journal of Biology and Chemical Sciences*. 13 (2) : 643-651.
37. **Garait, B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la glisodin. Thèse de doctorat. *Université de Joseph Fourier*. 159 pages.
38. **Ghoumrani, L., & Hassania, S. (2014).** L'effet du stress oxydant sur le système immunitaire. Mémoire de master. *Université de Guelma, Algérie*. 57 pages.
39. **Gregersen, S., Samocha-Bonet, D., Heilbronn, L., & Campbell, L. (2012).** Inflammatory and oxidative stress responses to high-carbohydrate and high-fat meals in healthy humans. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012:1-8.
40. **Griess, P. (1879).** Comments on the treatise of the HH. Weselsky and benedict about some azo compounds. *Report of the German Chemical Society*. 12(1)426-428.
41. **Guinard, P. (2023).** Lutte contre le stress oxydant grâce à des mimes bio-inspirés de la Ni SOD. Thèse de doctorat en Chimie inorganique. *Université de Grenoble Alpes*.
42. **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J-O., Charlier, C., & Chapelle, J. (2007).** Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*. 62(10):628-638
43. **Hauck, A & Bernlohr, D. (2016).** Oxidative stress and lipotoxicity. *Journal of Lipid Research*. 57:1976-1986.
44. **Hellal Z., (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Master. *Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou*. 85 pages.
45. **Inkoto, C., Koto-Te-Nyiwa, N., Bokungu, P., Masengo, C., Iteku, J., Tshilanda, D., Tshibangu, D., Pius, T., & Mpiana, P. (2021).** Phytochemistry and Pharmacology of *Aframomum angustifolium* (Sonn.) K. Schum (Zingiberaceae): A Mini Review. *South Asian Research Journal of Natural Products*. 5(1):21-36.
46. **Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, Rhodesd J & Valko M. (2011).** Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*. 31:95-107.

47. **Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S., Alwasel, S., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023).** Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress and antioxidant: chronic diseases and aging. *Archives Toxicology*. 97:2499-2574.
48. **Jorgensen, A., Brandslund, I., & Ellervik, C. (2024).** Oxidative stress induced damage to RNA and ADN and mortality in individuals with psychiatric illness. *Jama Psychiatry*. 81(5): 516- 520.
49. **Kiran, T.R., Otlu, O., & Karabulut, A. (2023).** Oxidative stress and antioxidants in health and disease. *Journal of Laboratory Medecine*. 47(1):1-11.
50. **Lakhdari, C., & Guerni, I. (2020).** Impact d'extraction et de fractionnement sur l'activité antioxydante d'*Equisetum arvense* . Mémoire de Master. *Université de Biskra*. 48 pages.
51. **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*. 13(1):757-772.
52. **Mahmoud, A., & Fenghour, M. (2016).** Etude de l'effet protecteur d'un produit de la ruche, la gelée royale sur le stress oxydatif et l'inflammation induite par le formaldéhyde chez le rat. Mémoire de Master, *Université des Freres Mentouri Constantine*. 63 pages.
53. **Makamwe, I., Ntentie, F., Mbong, M., Kengne, A., Tienoue, M., Takuissu, R., Ngankam, A., Zingue, S., & Oben, J. (2023).** The ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds protects against tamoxifen-induced side effects in rats with breast cancer. *Advances in Traditional Medecine*. 24(10):1-10.
54. **Manish, M., Kurt, J., & Phillip, R. (2006).** Inducible Nitric Oxide Synthase and apoptosis in Murine proximal Tubule Epithelial cells. *Toxicological Sciences*. 91(2):493-500.
55. **Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. (2022).** Free radicals properties, source and targets, antioxidants consumption and health. *Oxygen*. 2(2)48-78.
56. **Massilia, S. (2023).** Stress oxydatif et les maladies neurodégénératives. Mémoire de Master. *Université Mouloud Mammeri*, 50 pages.
57. **Mellit, S., & Moussaoui, I. (2021).** Etude in vitro de l'activité antioxydante de quelques souches de bactéries lactiques. Mémoire de Master. *Université Mohamed Seddik Benyahia-Jifel*, 47 pages.

58. **Misra, H., & Fridovich, I. (1972).** The role of superoxide ion in the antioxygenation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. 247:3170-3175.
59. **Montesano, D., Albrizio, S., & Zengin, G. (2020).** Antioxidants The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety — Chemistry, Applications, Strengths and limitations. *Antioxydants*. 9(709) :1-40.
60. **Ngo, V., & Duennwald, M. (2022).** Nrf2 and oxidative stress: A general overview of mechanisms and implications in human disease. *Antioxidants*. 11(12): 1-27.
61. **Nie, B., Gan, W., Shi, F., Hu, G., Chen, L., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., & Cai, J. (2013).** Age-Dependent Accumulation of 8- Oxoguanine in the DNA and RNA in Various Rat Tissues. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.vol. 2013, pp.1-9.
62. **Ou, B., Hampsch-woodill, M., Prior & R.L. (2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent prob. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4619-46266.
63. **Ouznadj, A. (2020).** Stress nitrosant et pathologies. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2020(522):39-46.
64. **Payet, V. (2023).** Etude bibliographique du stress oxydant et de son implication en pathologie des carnivores domestiques. Thèse d'exercice. *Université Paul Sabatier de Toulouse*. 121 pages.
65. **Petramala, L., Pignatelli, P., Carnevale, R., Zinamosca, L., Marinelli, C., & Settevendemmie, A. (2014).** Oxidative stress in patients affected by primary aldosteronism. *Journal of Hypertension*. 32(10):2022-2029.
66. **Phaniendra, A., Jestadi, D., & Periyasamy, L. (2015).** Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30(1):11-26.
67. **Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269:337 – 341.
68. **Rakotonirina, F. (2019).** Etudes chimique et toxicologique des extraits de fruits d'*Aframomum angustifolium* (zingiberaceae). Mémoire de master en Biochimie. *Université d'Antananarivo*. 1-46.

69. **Ransy, C., Vaz, C., Lombes, A., & Bouillard, F. (2024).** Use of H₂O₂ to cause oxidative stress, the catalase issue. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(23): 1-14
70. **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxydant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:1231-1237.
71. **Rezaire, A. (2012).** Activité antioxydante, et Caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oecarpus batoua* (patawa). Thèse de doctorat en phytochimie. *Université des Antilles et de la Guyane*. 193 pages.
72. **Roucham, Z. (2021).** Etude phytochimique bioguidée des extraits antiparasitaires (*Trichomonas vaginalis* et *Giardia intestinalis*) de quelques Asteracea de la pharmacopée traditionnelle du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat en Biochimie. *Université Kasdi-Merbah Ouargla*. 138 pages.
73. **Santos-Sanchez, N.F., Salas-coronado, R., Villanueva-Canongo, C., & Hernandez-Carlos, B. (2019).** Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Interchopen*.
74. **Semenova, N., Garashchenko, N., Kolesnikov, S., Darenskaya, M., & Kolesniskova, L. (2024).** Gut microbiome interactions with oxidative stress: mechanisms and consequence for health. *Pathophysiology*. 31: 309-330.
75. **Servais, P., & Laurent, R. (1992).** Mesure de la biomasse bactérienne dans l'eau de distribution. *Journal of water science*. 5(4):1-486.
76. **Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N.V., Zucca, P., Varoni E.M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P.V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M.E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A.O., Setzer, W.N., Calina, D., Cho, W.C & Sharifi-Rad, J. (2020).** Mode de vie, stress oxydatif et antioxydants : va-et-vient dans la physiopathologie des maladies chroniques. *Frontiers in physiology*. 11(694):1-21.
77. **Shyamal, K & Maulik, k. (2015).** Oxydative stress in cardiovascular diseases. *Journal of the Practice of Cardiovascular Sciences*. Vol 1(1), pp. 15-18.
78. **Singh, S., Vats, P., Suri, S., Shyram, R., Ranganathan, S., & Sritharan, K. (2004).** Effect of an antidiabetic extract of catharantus roseus on enzymatic activities in spectozotocin induced diabetes rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 76:269-277.

79. Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.
80. Sinha, A. (1972). "Colorimetric assay of catalase". *Analytical Biochemistry*. 47(2):389-394.
81. Starlin, T & Gopalakrishnan, V. (2013). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of tylophora pauciflora wight and arnan in vitro study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 6(4):68-71.
82. Sun, Y., Wang, X., Li, L., Zhang, C., Zhang, Y. Yang, X., Li, M., & Yang, C. (2024). The role of gut microbiota in intestinal disease : from an oxidative stress perspective. *Frontiers in Microbiology*. 15:1-14.
83. Tahouo, S. (2016). Procédures d'extraction globale des composés phytochimiques pour l'évaluation analytique des médicaments à base de plantes. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université Felix Houphouët-Boigny, 110 pages.
84. Tan B, Norhaizan M & Liew W. (2018). Nutrients and Oxidative Stress: Friend or Foe? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018:1-24.
85. Tchokouadjeu, G. (2021). Propriétés antidiabétiques *in vitro* des grains d'*Aframomum angustifolium*. Mémoire de Master. Université de Yaoundé I. 58 pages.
86. Tonga, J., Kamdem, M., Pagna, J., Fonkui, T., Tata, C., Fotsing, M., Nkengfack, E., Mmutlane, E., & Ndinteh, D., (2022). Antibacterial activity of flavonoids and triterpenoids isolated from the stem bark and sap of *Staudtia kamerunensis* Warb. (*Myristicaceae*). *Arabian Journal of Chemistry*. 15(10): 1-7.
87. Tremblay, A. (2018). Etude *in vitro* de l'induction de stress oxydatif par la doxorubicine dans les cellules de sertoli immatures et spermatogonies. Mémoire de Master. Université du Québec. 113 pages.
88. Tumilaar, S., Hardianto, A., Dohi, H., & Kurnia, D. (2024). A comprehensive review of free radicals, oxidative stress, and antioxidants: overview, clinical applications, global perspectives, future directions, and mechanisms of antioxidant activity of flavonoid compounds. *Journal of chemistry*. 2024(1): 1-21.
89. Vide, J. (2018). Effets potentiels et mécanisme d'action antioxydant et anti-inflammatoire d'un apport nutritionnel de spirulines enrichies en silicium. Thèse de doctorat en alimentation et nutrition. Université Montpellier. 138 pages.

90. **Vinha, A., Sousa, C., & Costa, C. (2023).** Oxidative stress, antioxydant and biomarkers : appreciation for analytical methods for health promotion. *International Academic Research Journal of Internal Medicine and Public Health*, 4(3):47-55.
91. **Yagi, K. (1976).** Simple Fluorometric Assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemistry Medicine*. 15 : 212-216.
92. **Zheng, H., Xu, Y., Liehn, E., & Rusu, M. (2024).** Vitamin C as scavenger of reactive oxygen species during healing after myocardial infarction. *International Journal of Molecular Sciences*. 25(6):1-20.
93. **Etebu, E & Nwauzoma, A. (2014).** A review on sweet orange (*Citrus Sinensis* Osbeck): Health, diseases, and management. *American Journal of Research*. Vol.2 (2): 33-70.
94. **Azantsa, B., Djuikoo, I., Takuissu, G., Kuikoua, W., Temdemnou, E., Ngondi, J., & Oben, J. (2017).** Antioxidant Activity of Leaves' Extracts of *Citrus Sinensis*: Determination of Radical Scavenging Capacity, Antiradical Power, Total Polyphenols and Flavonoids Content. *American Journal of Pharmacy and Health Research*. Vol 5(5):2321-3647.
95. **Milind, P & Chaturvedi, D. (2012).** Orange range of benefits. *International Research Journal of Pharmacy*. Vol. 3 (7):59-63.
96. **Najneen, A., Tasnim, A., Nusrat, A., & Sharmin, A. (2016).** Phytochemical screening, cytotoxic and hypoglycemic activity of methanolic extract of *Citrus sinensis* peel. *International Research Journal of Pharmacy*. Vol. 7(3) :44-48.
97. **Harish, R & Chauhan, J. (2016).** Antioxidant and Cytoprotective Action of Aqueous Extract of *Citrus Sinensis* Fruit Peel against Endosulfan Induced Damage on *Saccharomyces Cerevisiae*. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*. Vol. 4 (1):954-960.
98. **Akram, M., Ahmed, A., Afzal, A., Khan, U., Abdul, H., Mohiuddin, E., & Asif, M. (2010).** review article: curcuma longa and curcumin. *Romanian Journal of Biology-Plant Biology*, 55 (2): 65-70.
99. **Chakraborty, D., Mukherjee, A., Sikdar, S., Paul, A., Ghosh, S., & Khuda-Bukhsh, A.R. (2012).** [6]- Gingerol isolated from ginger attenuates sodium arsenite induced oxidative stress and plays a corrective role in improving insulin signalling in mice. *Toxicology Letters*. **210**: 34-43.

100. **Mendi, S., Nain, C., Imélé, H., Ngoko, Z., & Mbofung, C.M. (2009).** Microflora of fresh ginger rhizomes and ginger powder produced in the North-West Region of Cameroon. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 4 (1) : 251 – 260.
101. **Perry, M C. (2008).** Evaluation de la curcumine comme agent anti-cancéreux dans le traitement des tumeurs cérébrales. Thèse de doctorat. Université Montréal, Canada.
102. **Singh, M., & Singh N. (2011).** “Curcumin counteracts the proliferative effect of estradiol and induces apoptosis in cervical cancer cells.” *Molecular Cell Biochemistry*, 347(1-2) :1-11.
103. **Alogo Nigoumi, G.R. (2021).** Etude du potentiel antioxydant des extraits hydroéthanoliques de deux *Zinziberaceae*: *Zinziber officinale* R et *Curcuma longa* L. Memoire de Master. Université de Yaoundé I.57 pages.

ANNEXES

Annexe 1: Préparation des solutions

✚ Préparation de la solution ABTS⁺

Solution 1 : Elle a été obtenue en dissolvant 19 mg d'ABTS dans 5 ml d'eau distillée ;

Solution 2 : Elle a été obtenue en dissolvant 3,871 mg de permanganate de potassium dans 5 ml d'eau distillée ;

Solution de travail : Elle a été obtenue en mélangeant les 2 solutions. Puis le mélange a été laissé à l'obscurité 12 à 16h avant utilisation. Cette solution a été diluée avec le tampon phosphate afin d'avoir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm.

✚ Préparation de la solution de TBA

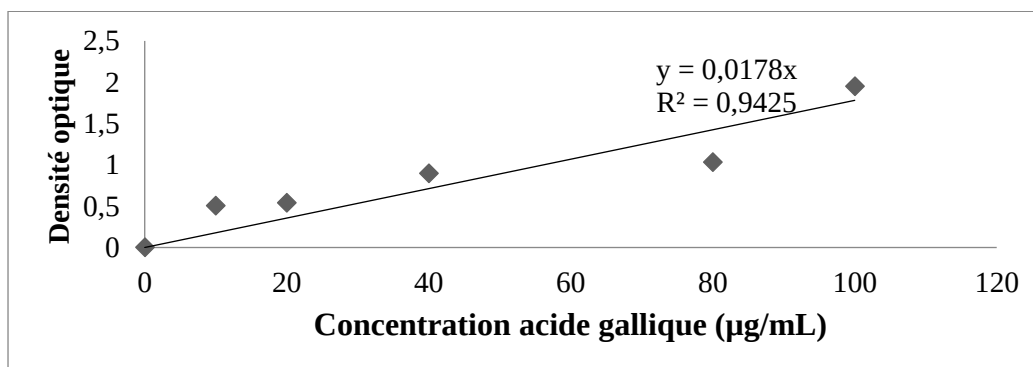
Trois cent soixante-quinze milligrammes (375 mg) de TBA, 20 g de TCA, 0,01 g de BHT, 25 mL de HCl (1N) et 50 mL d'eau distillée ont été introduits dans un bécher. La solution obtenue a été chauffée à 40°C dans un bain-marie jusqu'à solubilisation complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 mL. Le volume a été complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

✚ Préparation de la solution tampon phosphate (0,01M ; pH7,0)

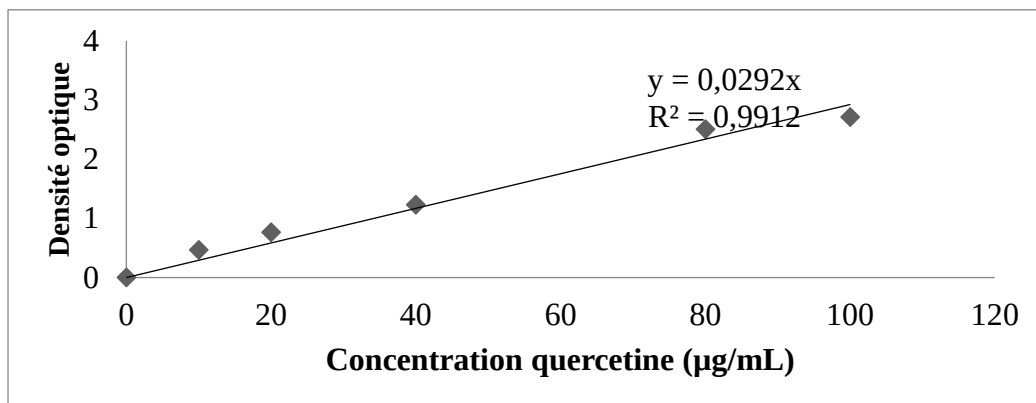
0,0038 g de phosphate disodique (Na_2HPO_4) et 0,0061g de phosphate monosodique (NaH_2PO_4) ont été dissouts et homogénéiser dans 80 mL d'eau distillé puis le pH a été ajusté avec du NaOH (0,4 N ; m= 5,6 g).

Annexe 2: Différentes courbes d'étalonnage

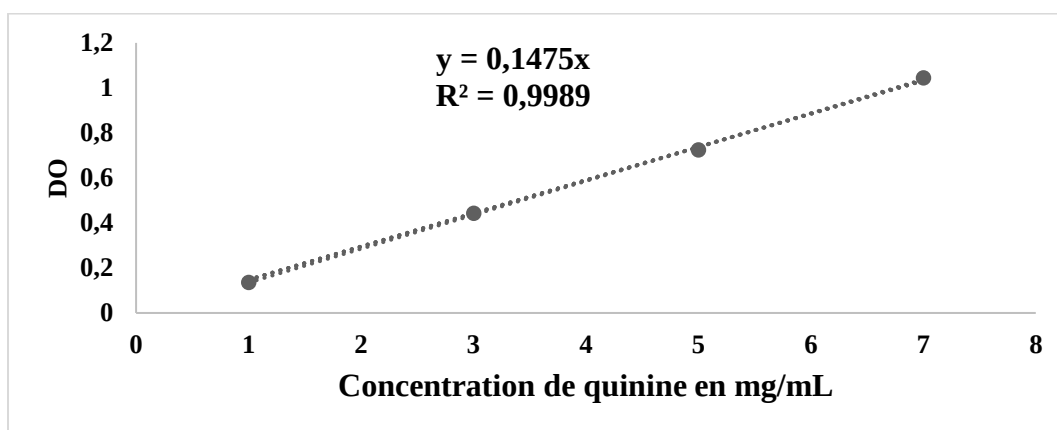
✚ Courbe d'étalonnage des composés phénoliques



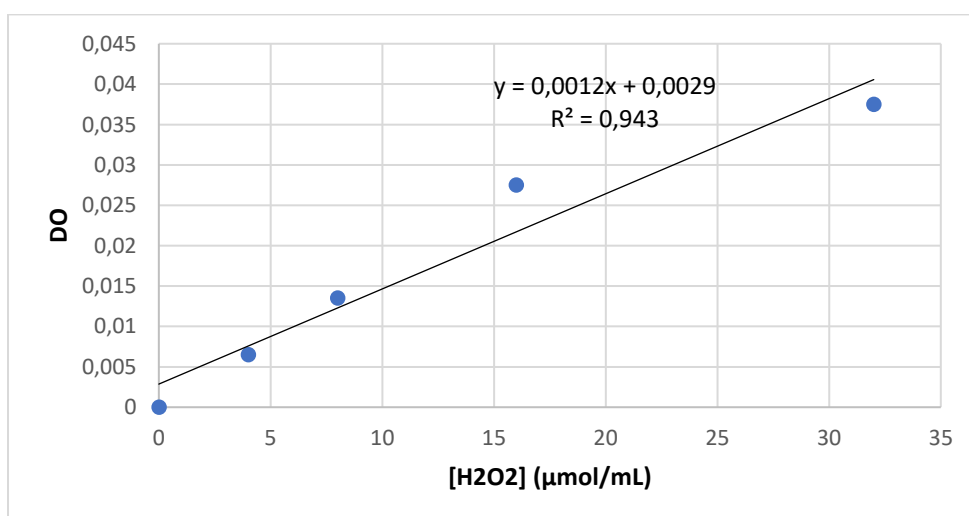
✚ Courbe d'étalonnage des flavonoïdes



✚ Courbe d'étalonnage des alcaloïdes



✚ Courbe d'étalonnage de la catalase



Annexe 3: Dosages des protéines totales (Gornall, 1949)

➤ Principe

Cette méthode est basée sur la réaction entre le tartrate alcalin (réactifs de biuret) et la solution protéique en présence du sel cuivrique, avec pour formation un complexe bleu-insoluble qui absorbe à 540 nm dont la coloration est proportionnelle à la quantité des protéines.

➤ Réactifs

- BSA 5mg/mL
- NaCl 0,9%
- Réactif de biuret

➤ Préparation des réactifs(500mL)

Solution A : CuSO_4 (sulfate de cuivre penta-hydrate) 0,74g +3g de tartre double Nak dissous dans 100mL d'eau distillée

Solution B : NaOH(15g) dissous dans 100mL d'eau distillée

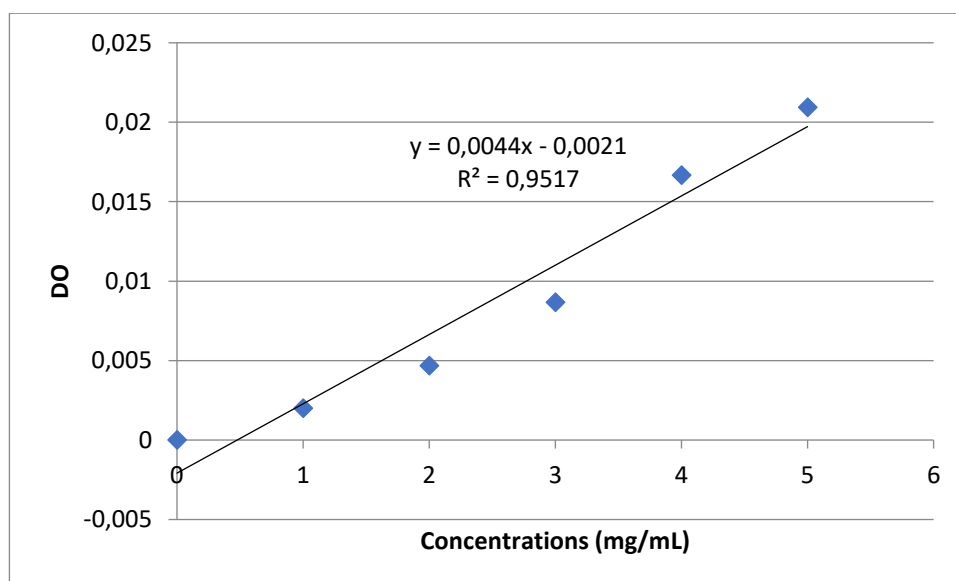
➤ Mode opératoire

50 μ L d'échantillon sont ajoutés à 950 μ L de NaCl et 200 μ L de réactif de biuret. Les tubes sont par la suite homogénéisés et incubés à température ambiante pendant 30min à l'abri de la lumière. Les absorbances sont lues à 540nm.

➤ Expression des résultats

La concentration en protéines totales est obtenue à partir de la droite de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage réalisée avec le BSA

✚ Etalonnage du BSA



Annexe 4: préparation de milieux de cultures

- **SS agar** pour l'identification de *salmonella* et *shigella*

SS agar : 28,5g

- **Eosine Méthylène Bleu** pour identification *Escherichia coli*

EMB agar : 18,5g

- **M17** pour identification des *lactocoques*

Cycloheximide: 2ml

M17 agar : 24,125g

- **Man Regosa Sharpe** Pour identification des *bifidobactéria*

L cysteine: 25mg *

Tween: 0, 5 ml

Cycloheximide*: 2ml

MRS broth: 26g

- **Man Regosa Sharpe** Pour identification des *lactobacilles*

Tween: 0, 5 ml

Cycloheximide*: 2ml

MRS broth: 26g

- **Perfringens** Pour identification de *clostridium*

Gentamicine*: 0,2mg

Perfringens agar :

- **Plate Count Agar** Pour identifier la **plupart des bactéries**

Peptone : 2,5g

Extrait de levure : 1,25g

Agar : 9g

Tous les composés avec (*) se mettent après que les milieux soient sortis de l'autoclave.

Les milieux EMB, SS et PCA se préparent la veille de la manipulation et le reste des milieux se prépare le jour de la manipulation.

Annexe 5 : Considérations éthiques

Centre de Recherche et Formation Doctorale, Science de la Vie, Santé et Environnement (CRFD-SVSE)
Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environmental Sciences
University of Yaoundé I (UYI)



Joint Institutional Review Board for Animal & Human Bioethics (JIRB)
Email: jirbsecretariat@gmail.com

15 April 2024

OSSELE ANNE SYGRID

University of Yaoundé 1, Cameroon
Faculty of Science, Department of Biochemistry

Ethical Clearance Reference N°: BTC-JIRB2024-111 (please use this reference number for all correspondences)

Protocol Title: "Effet protecteur de l'extrait éthanolique d'*Aframomum angustifolium* contre le stress chez le rat induit par l'eau oxygénée."

Investigator(s) Name(s): OSSELE ANNE SYGRID, MSc Student, Pr. MBONG Angie Mary-Ann & Pr. Oben Julius, Supervisors.

The proposed research protocol and related documents have been reviewed and deliberated by the JIRB of the Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environment Sciences (CRFD-SVSE) at the Biotechnology Centre, University of Yaoundé 1, on the 23rd February 2024.

The JIRB is satisfied with the current version of the research protocol and supporting documents and agrees that there is no objection on ethical grounds to the proposed study. The JIRB is therefore pleased to approve it on the consideration that the research team will strictly abide by the conditions of the approval below:

- Investigators must strictly follow the plan of the approved protocol. Any changes to the approved protocol will require prior JIRB approval.
- Must be promptly reported to the JIRB: (1) Any deviations from or changes to the protocol that are made to eliminate immediate hazards to the fauna or study participants; (2) All risks that may be rare or remote and especially those that may entail serious consequences or compromise potential benefits or that would affect the conduct of the research.
- Must prepare and submit a standard progress report of the research to the JIRB at completion or one year from the date of issuance of the approval letter and thereafter, on an annual basis.
- Must notify the JIRB when the research is completed. Failure to submit an annual progress report on the study may affect the conditions of approval.

The current ethical clearance is for one-year renewable, on the condition that a progress report is submitted to the JIRB. While the JIRB has given its approval for this study on a satisfactory ethical basis, it is necessary for the investigators to obtain research permit from the Ministry of Scientific Research and Innovation (MINRESI, Cameroon).

Sincerely,

Professor Jude D. Bigoga, M.Sc, Ph.D.
JIRB Chair
Faculty of Science, University of
Yaoundé I, Cameroon



**Professor Frederic Nico Njayou, M.Sc.,
Ph.D.**
Coordinator for Animal Research Bioethics
Faculty of Science, University of Yaoundé
I, Cameroon