

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTES DES SCIENCES

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

UNITÉ DE RECHERCHE DOCTORALE
DE SCIENCES DE LA VIE

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
SCHOOL FOR LIFE SCIENCE-HEALTH
AND ENVIRONMENT

DOCTORATE TRAINING UNIT OF LIFE
SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DES SCIENCES ALIMENTAIRES ET METABOLISME
LABORATORY FOR FOOD SCIENCE AND METABOLISM

Étude des propriétés antioxydantes et antihyperglycémiantes des extraits aqueux et hydroéthanolique d'hysope (*Hyssopus officinalis* L.)

Mémoire présenté comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biochimie

Option : Sciences des Aliments et Nutrition

Par :

DJABON Falonne Bodrase

Matricule : 17A2084

Licencié-ès Sciences

Sous la direction de :

KOTUE TAPTUE Charles, PhD

Maitre de Conférences,

Université de Yaoundé 1



Année académique 2022/2023

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	i
DEDICACE	v
REMERCIEMENTS.....	vi
LISTE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ANNEXES	xi
RESUME	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	3
I. STRESS OXYDATIF ET ANTIOXYDANTS.....	3
I.1. Définition	3
I.2. Sources du stress oxydatif	4
I.2.1. Sources endogènes	4
I.2 .2. Sources exogènes	4
I.3. Radicaux libres.....	5
I.3.1. Sources de production et formation des radicaux libres.....	6
I.3.2. Espèces réactives de l’oxygène	6
Une augmentation du niveau du radical	7
I.4. Antioxydants	9
I.4.1. Définition	9
I.4.2. Classification des antioxydants.....	9
I.4.3. Utilisation des antioxydants.....	14
I.4.4. Mode d’action des antioxydants.....	14
I.4.5. Effets du stress oxydatif sur l’organisme	15
I.4.6. Stress oxydatif comme facteur de risque des maladies chroniques Rôle du stress oxydatif dans le développement des maladies chroniques	16

I.5. Stress oxydatif et hyperglycémie	17
I.5.1. Stress oxydant comme cause de l'hyperglycémie	17
I.5.2. Stress oxydant comme conséquence de l'hyperglycémie	17
I.5.3. Impact de l'hyperglycémie sur le potentiel antioxydant	17
I.5.4. Relation entre l'hyperglycémie et peroxydation lipidique	18
I.5.5. Prise en charge du stress oxydatif et de l'hyperglycémie	18
II. Généralités sur les composées phénoliques.....	19
II.1. Définition et sources.....	19
II. 2. Structure et exemple de composé phénolique	19
II.3. Classification des composés phénoliques	19
II.4. Biosynthèse des composés phénoliques	20
II.5. Importance des composés phénoliques.....	21
II.5.3. Composés phénoliques, stress oxydatif et hyperglycémie	22
III. Généralité sur les lamiacées	22
III.1. <i>Hyssopus officinalis</i> L. (hysope).....	22
III.1.1. Historique et description de <i>Hyssopus officinalis</i> L.	22
III.1.2. Classification	24
III.1.3. Compositions chimiques et molécules bioactives.....	24
III.1.4. Quelques propriétés d'hysope	24
III.1.5. Activité antioxydante	25
III.1.6. Synthèse des travaux antérieurs sur <i>Hyssopus officinalis</i> L.....	25
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	26
II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	26
II.1.1. Matériel végétal.....	26
II.1.2. Matériel animal.....	26
II.2. ECHANTILLONNAGE ET ANALYSES.....	26
II.2.1. Collecte des échantillons	26
II.2. 3. Extraction hydro-éthanolique (70/30 ; V/V).....	28
II.2.4. Dosage des composés phénoliques totaux des différents extraits.	29

II.2.5. Activité antioxydante <i>in vivo</i> sur les rats mâles	30
II.2.5.1. Protocole expérimental du test préventif du stress oxydatif chez les rats	30
II.2.5.2. Préparation du sérum	31
II.2.5.3. Dosage des protéines totales	31
II.2.5.4. Dosage du superoxyde dismutase (SOD)	32
II.2.5.5. Dosage de la catalase.....	33
II.2.5.6. Dosage du glutathion	34
II.2.5.7. Dosage du Malondialdéhyde (MDA)	35
II.2.6. Evaluation des propriétés antihyperglycémiques des extraits aqueux et hydroéthanolique d'hysope <i>in vivo</i>	36
II.2.6.1. Effets des différents extraits aqueux et hydro-éthanolique sur les rats normoglycémiques	36
II.2.6.3 Etude de l'effet des extraits aqueux et hydro-éthanolique chez les rats ayant préalablement reçu une concentration de glucose (Test de glucotolérance curatif)	38
II.2.7. Evaluation de l'effet non insulinosensibilisateur : Aptitude des extraits à agir sur la capture du glucose par les levures <i>in vitro</i>	39
II.3. Analyse Statistique.....	39
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	40
III.1. RESULTATS	40
III .1.1. Rendement des différentes extractions aqueuses et hydro-éthanoliques d'<i>Hyssopus officinalis</i> L.	40
III.1.2. Teneur en composés phénoliques totaux des différents extraits	40
III.1.3. Etude des propriétés antioxydantes <i>in vivo</i>.....	41
III.1.3. 1. Evolution pondérale des animaux.....	41
III.1.3. 2. Prises alimentaires et hydriques	42
III.1.3. 3. Evaluation du poids des organes des rats	43
III.1.3.1. Effet des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'<i>Hyssopus officinalis</i> L. sur les taux de protéines totales.....	44

III.1.3.2. Evamuation de l'effet des différents extraits aqueux et hydroéthanolique <i>d'Hyssopus officinalis</i> L. sur le Malondialdehyde.	44
III.1.3.3. Evaluation de l'effet des différents extraits aqueux et hydroéthanolique <i>d'Hyssopus officinalis</i> L. sur la Superoxyde dismutase	45
III.1.3.4. Evaluation de l'effet des différents extraits aqueux et hydroéthanolique <i>d'Hyssopus officinalis</i> L. sur la catalase.....	46
III.1.3.5. Evaluation de l'ffet des différents extraits aqueux et hydroéthanolique <i>d'Hyssopus officinalis</i> L. sur le glutathion.	47
III.1.4. Evaluation des propriétés antihyperglycemiantes des extraits aqueux et hydroéthanolique <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	48
III.1.4.1 . Evaluation de l'effet des extraits aqueux et hydroéthanolique sur la glycémie <i>in vivo</i>	48
III.1.4.1.1. Evaluation de l'activité normoglycémique	48
III.1.4.1.2. Evaluation de l'activité préventive de la glucotolerance des extraits aqueux et hydro-éthanolique d' <i>Hyssopus officinalis</i> L.	49
III.1.4.1 .3. Evaluation de l'activité curative de la glucotolerance des extraits aqueux et hydro-éthanolique <i>d'Hyssopus officinalis</i> L.	50
III.1.4.2 . Evaluation de la capacité des extraits à stocker le glucose <i>in vitro</i>	51
III.2. DISCUSSION	53
CONCLUSION	57
RECOMMANDATIONS.....	57
PERPECTIVES	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57
REFERENCES	58
ANNEXES	a

DEDICACE

À

Ma Chère Maman: CHAZOU Majoly

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche est le fruit de la persévérance, de la rigueur scientifique et les exigences d'un travail de recherche bien fait sont souvent au-delà des seules capacités de l'étudiant. Qu'il me soit permis d'adresser mes sincères remerciements à tous ceux et celles qui y ont participé :

À l'Éternel Tout Puissant, lui qui est l'universel dispensateur de toutes choses et de toutes grâces.

Au Pr KOTUE Charles, pour m'avoir intégré dans le Laboratoire des Sciences Alimentaires et Métabolisme, d'avoir accepté, et veillé au bon déroulement de ce travail. Merci pour les conseils mis à ma disposition. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Au Pr FOKOU Elie, Coordonnateur du Laboratoire des Sciences Alimentaires et Métabolisme (LabSAM) pour m'avoir accepté dans son Laboratoire.

Au Chef de Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I, **Pr MOUNDIPA FEWOU Paul** et à tous les enseignants du Département pour l'encadrement, les enseignements et les orientations reçus tout au long de mon parcours académique.

Aux enseignants et encadreurs du LabSAM : **Pr KANSCI, Pr ACHU, Pr DJUIKWO, Dr MANANGA, Dr BEBBE, Dr SAHA, Dr MIAFO, Dr FOGANG, Dr MBOUCHE, Dr DJOUHOU, Dr KUAGNY, Dr MAPTOUOM** pour leurs observations, encouragements, remarques et précieux conseils en vue de l'amélioration de la qualité de ce travail.

Au **Dr DONGMO Blaise** pour son grand apport dans cette étude.

Aux aînés de Laboratoire : LEUMENI, TATFO, YIAGNIGNI, MVOGO, MAFOGANG, HANKOU, DJOTE, MBASSI, KIDJE, GHOMSI, TALLA, NANTCHOUANG, KOUANDJOUA, NOAH, EYILI, CHOFOR pour les conseils, encouragements et accompagnement lors des manipulations et de la rédaction de ce mémoire.

À tous mes promotionnaires, mes cadets et mes amis pour la bonne ambiance vécue, la solidarité pendant l'année académique et la conduite de ces travaux.

Aux personnes à qui je dois beaucoup et qui ont crues en moi : **Papa ZOUBEROU, Papa OSSAH Jean Paul, Mr DONKOU Bayard, Mr TCHAPNGANG Achille, Mr MESSI Simon, Mr NJINKIO Borgia, Mr EKOMO Arthur, Mr KAMGA Jules, Mr DONGMO Cédric, Mr MENGUE Willie, Mr NDIWUM Promise**, leurs rigueurs, soutiens et encouragement ont contribué inéluctablement à l'atteinte de notre objectif.

LISTE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
SOD	: Superoxyde Dismutase
CAT	: Catalase
GPX	: Glutathion Peroxydase
MDA	: Malondialdehyde
AG	: Acide Gallique
EOR	: Espèces Oxygénées Réactives
H2O2	: Eau Oxygénée
NADPH	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (réduit)
FAO	: Food and Agriculture Organization
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
EDTA	: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Structure des squelettes des composés phénoliques.....	20
Tableau II : Taxonomie <i>Hyssopus officinalis</i> L.....	24
Tableau III : Protocole expérimental de l'induction du stress oxydatif chez les rats.	31
Tableau IV : Protocole expérimentale du test normoglycemie provoqué par voie orale en présence ou en absence des extraits aqueux et hydroéthanolique d' <i>Hyssopus officinalis</i> L.	37
Tableau V : Protocole expérimentale du test de glucotolérance préventif provoqué par vois orale en presence ou en absence d'extraits aqueux et hydroéthanolique d' <i>Hyssopus officinalis</i> L.	38
Tableau VI : Rendement des differents extraits aqueux et hydro-éthanolique d' <i>Hyssopus</i> <i>officinalis</i> L.	40
Tableau VII : Récapitulatif du poids (g) des organes des rats soumis au stress oxydatif par le naphtalène.	43

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Stress oxydatif	3
Figure 2 : Place centrale du stress oxydant au sein des pathologies	4
Figure 3 : Sources endogènes et exogènes du stress oxydatif.....	5
Figure 4 : Principales espèces oxygénées réactives.....	7
Figure 5 : Principales enzymes antioxydantes: La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S- transférase (GST). En rouge est entouré le glutathion, sous sa forme réduite GSH et oxydée GSSG.....	11
Figure 6 : Relation entre l'hyperglycémie et le stress oxydant.....	18
Figure 7 : Principales voies de biosynthèses des composés phénoliques depuis la phénylalanine issue de la voie du shikimate.....	21
Figure 8 : Plante d'hysope <i>Hyssopus officinalis</i> L.	23
Figure 9 : Feuilles séchées d' <i>Hyssopus officinalis</i> L.	26
Figure 10 : Photographie des rats blancs mâles de souche WISTAR.....	26
Figure 11 : Protocole de l'extraction aqueuse par épuisement	27
Figure 12 : Protocole de l'extraction hydro-éthanolique (70%) par épuisement	28
Figure 13 : Mécanisme réactionnel du dosage des protéines totales entre le tartrate double et les ions cuivriques.....	32
Figure 14 : Mécanisme réactionnel du dosage du glutathion entre le DTNB et les groupements... 34	
Figure 15 : Mécanisme réactionnel du principe du dosage du MDA.....	35
Figure 16 : Teneurs en composés phénoliques totaux des différents extraits.....	41
Figure 17 : Variation pondérale des rats soumis au stress oxydatif par le naphthalène.....	42
Figure 18 : Prises alimentaires et hydriques des rats soumis au stress oxydatif par le naphthalène et ayant reçus les différents extraits.	43
Figure 19: Effet des extraits aqueux et hydro-éthanolique d' <i>Hyssopus officinalis</i> L. sur le taux de protéines totales dans le sérum des rats.....	44
Figure 20 : Evaluation de l'effet préventif des extraits aqueux et hydro-éthanoliques d' <i>Hyssopus officinalis</i> L. sur l'activité du MDA.	45

Figure 21 : Evaluation de l'effet préventif des extraits aqueux et hydro-éthanolique d' <i>Hyssopus officinalis</i> L. sur l'activité de la superoxyde dismutase.....	46
Figure 22 : Evaluation de l'effet préventif des extraits aqueux et hydro-éthanolique d' <i>Hyssopus officinalis</i> L. sur l'activité de la catalase.	47
Figure 23 : Evaluation de l'effet préventif des extraits aqueux et hydro-éthanolique d' <i>Hyssopus officinalis</i> sur l'activité du glutathion.	48
Figure 24 : Effet des extraits aqueux et hydro-éthanoliques d' <i>Hyssopus officinalis</i> L. sur la normoglycémie induite chez les rats de la souche Wistar à la dose de 3g/kg.....	49
Figure 25 : Effet des extraits aqueux et hydro-éthanoliques d' <i>Hyssopus officinalis</i> L. sur la glucotolérance préventive induite chez les rats de la souche Wistar à la dose de 3g/kg.	50
Figure 26 : Effet des extraits aqueux et hydro-éthanolique d' <i>Hyssopus officinalis</i> L. sur la glucotolérance curative induite chez les ratsde souche Wistar à la dose de 3g/kg.	51
Figure 27 : Capacité d'absorption du glucose des différents extraits aqueux et hydro-éthanolique d' <i>Hyssopus officinalis</i> L. par le test de la levure de bière.....	52

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des réactifs	a
Annexe 2 : Préparation des solutions	a
Annexe 3 : Différentes courbes d'étalonnage.....	b
Annexe 4 : Tableaux des modes opératoires des différents tests effectués	c
Annexe 5 : Récapitulatif des éléments des critères zootechniques	e
Annexe 6 : Paramètres biochimiques de l'effet préventif du stress oxydatif provoqué par le naphtalène	f
Annexe 7 : Evaluation de l'activité normoglycémique des extraits	f
Annexe 8 : Tableau récapitulatif de l'activité préventive des extraits sur la glucotolérance	f
Annexe 9 : Tableau récapitulatif de l'activité curative des extraits sur la glucotolérance	g
Annexe 10 : Valeurs de la Capacité d'absorption du glucose des différents extraits par le test de la levure de bière.....	g
Annexe 11 : Photographies de quelques Appareilles utilisés lors des travaux.....	g
Annexe 12 : Clairance d'Ethique.....	h

RESUME

Le stress oxydatif et l'hyperglycémie sont les facteurs majeurs de la pathogénicité du diabète. Cette étude porte donc sur l'évaluation du potentiel antioxydant et anti-hyperglycémique des différents extraits aqueux et hydro-éthanolique des feuilles d'hysopé (*hyssopus officinalis* L.). Pour cela, la teneur en composé phénolique totale a été effectuée par la méthode colorimétrique. L'évaluation de l'activité antioxydante *in vivo* a été effectuée sur les rats mâles de souche Wistar stressés par gavage au naphthalène (110mg/Kg) à travers le dosage des paramètres biochimiques tels que le malondialdéhyde (MDA), le glutathion (GSH), la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) par la méthode colorimétrique. Par ailleurs l'évaluation de l'activité anti-hyperglycémiant *in vivo* par les tests normoglycémique, de glucotolérances préventive et curative; et la capacité *in vitro* des extraits a stockée du glucose ont été effectuées en utilisant un appareil de marque *One Touch*. Les résultats obtenus ont montré une variabilité des teneurs en composés phénoliques totales dans les quatre extraits. L'extrait hydro-éthanolique a la teneur la plus élevée ($64,789 \pm 0,0 \text{ mgEAG/gE}$). Cependant des trois méthodes d'extractions aqueuses, la macération a eu la teneur la plus grande ($60,642 \pm 0,0 \text{ mgEAG/gE}$), suivie de l'infusion ($48,132 \pm 0,1 \text{ mgEAG/gE}$) et enfin la décoction ($42,620 \pm 0,02 \text{ mgEAG/gE}$). Quant à l'activité antioxydante, tous les extraits ont permis de diminuer les taux du malondialdéhyde. Tous les extraits ont eu une augmentation non significative ($p > 0,05$) sur les activités de la superoxyde dismutase, de la catalase et sur le taux du glutathion. Cependant l'extrait obtenu par infusion (IH) a augmenté significativement leurs activités ($p < 0,05$) comparativement aux autres extraits. En ce qui concerne l'activité anti-hyperglycémiant *in vivo* l'extrait obtenu par macération aqueuse (MH) au bout de 2 heures, a présenté une meilleure activité sur la prévention de l'hyperglycémie ($78,75 \text{ mg/dL}$, $p < 0,05$) chez les rats traités comparativement au témoin négatif donc l'activité était de 94 mg/dL , $p < 0,05$. Après induction de l'hyperglycémie, au bout de 2 heures, cet extrait a conservé une meilleure activité comparativement au témoin négatif qui a fait baisser significativement la glycémie $p < 0,05$ de $76,20$ à $70,20 \text{ mg/dL}$.

Les extraits aqueux et hydro-éthanolique d'hysopé possèdent des composés phénoliques, et peuvent être utilisés dans la gestion de quelques facteurs de pathogénicité du diabète tels que le stress oxydatif et de l'hyperglycémie.

Mots clés : Activité antioxydante, activité anti-hyperglycémiant, composés phénoliques, extraits aqueux, extraits hydro-éthanolique, *hyssopus officinalis* L.

ABSTRACT

Oxidative stress and hyperglycaemia are major factors in the pathogenicity of diabetes. This study therefore focuses on the evaluation of the antioxidant and anti-hyperglycaemic potential of different aqueous and hydro-ethanolic extracts of hyssop (*hyssopus officinalis* L.) leaves. For this purpose, the total phenolic compound content was carried out by the colorimetric method. The evaluation of the in vivo antioxidant activity was carried out on male rats of Wistar strain stressed by naphthalene gavage (110mg/Kg) through the determination of biochemical parameters such as malonedialdehyde (MDA), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) by colorimetric method. Furthermore, the evaluation of the anti-hyperglycaemic activity in vivo by normoglycaemic, preventive and curative glucotolerance tests; and the in vitro capacity of the extracts to store glucose were carried out using a One Touch brand device. The results obtained showed a variability in the contents of total phenolic compounds in the four extracts. The hydroethanol extract had the highest content ($64.789 \pm 0.0 \text{ mgEAG/gE}$). However, of the three aqueous extraction methods, maceration had the highest content ($60.642 \pm 0.0 \text{ mgEAG/gE}$), followed by infusion ($48.132 \pm 0.1 \text{ mgEAG/gE}$) and finally decoction ($42.620 \pm 0.02 \text{ mgEAG/gE}$). As for antioxidant activity, all extracts decreased malondialdehyde levels. All extracts had a non-significant ($p > 0.05$) increase in superoxide dismutase, catalase and glutathione activities. However, the extract obtained by infusion (IH) significantly increased their activities ($p < 0.05$) compared to the other extracts. Regarding the anti-hyperglycaemic activity in vivo, the extract obtained by aqueous maceration (MH) after 2 hours, presented a better activity on the prevention of hyperglycaemia (78.75 mg/dL , $p < 0.05$) in treated rats compared to the negative control whose activity was 94 mg/dL , $p < 0.05$. After induction of hyperglycaemia, after 2 hours, this extract retained better activity compared to the negative control which significantly lowered blood glucose $p < 0.05$ from 76.20 to 70.20 mg/dL .

Aqueous and hydroethanol extracts of hyssop possess phenolic compounds, and can be used in the management of some pathogenic factors of diabetes such as oxidative stress and hyperglycaemia.

Keywords : Antioxidant activity, anti-hyperglycaemic activity, phenolic compounds, aqueous extracts, hydro-ethanolic extracts, *hyssopus officinalis* L.



INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'industrialisation et le développement des nouvelles technologies au fil du temps a induit des modifications considérables du mode de vie des individus, notamment sur le plan alimentaire **(Wang Y, 2008)**. En effet, les habitudes alimentaires actuelles de la plupart des individus accroissent le risque d'apparition de maladies métaboliques qui surviennent le plus souvent en raison de la défaillance d'un organe ou d'une voie métabolique importante. Toutes ces perturbations contribuent généralement à une augmentation anormale de la production des espèces oxygénées réactives dans l'organisme, qui au fil du temps, induisent l'apparition de diverses pathologies liées au stress oxydatif telles que les maladies dégénératives, cardiovasculaires et le diabète qui se caractérise par une hyperglycémie chronique résultant d'une sécrétion insuffisante et/ou d'une action inefficace de l'insuline dans l'organisme **(Güngör et al., 2018)**. En effet le stress oxydatif est un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants en faveur des pro-oxydants **(Senlin et al., 2020)**. Ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes physiologiques de défense, et est fonction de plusieurs paramètres tels que l'âge, l'alimentation, l'état sanitaire de l'individu et l'environnement **(Ligouri et al., 2018)**. Le stress oxydatif est également responsable de l'oxydation des molécules biologiques telsque l'ADN, les protéines, les lipides et les glucides **(Valko et al., 2006)**.

Pour faire face à ces dommages, un système de défense antioxydant exogène et endogène permet à l'organisme de restaurer l'équilibre. Le système antioxydant endogène ou enzymatique est coordonné par les antioxydants synthétisés par l'organisme à savoir : la super oxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase **(Mercan, 2010)**. Le système antioxydant exogène ou non enzymatiques est coordonné par les antioxydants provenant de l'alimentation, il s'agit en occurrence, des vitamines (A, C et E), l'ubiquinone, les caroténoïdes, les composés phénoliques et quelques oligo-éléments comme le sélénium et le zinc **(Senlin et al., 2020)**. Toutefois, la population utilise très souvent des formulations enrichies en antioxydants synthétiques et certains médicaments dans la gestion du stress oxydatif et l'hyperglycémie. Cependant, ces produits sont très onéreux et présentent le plus souvent des effets indésirables et délétères sur la santé des individus d'où la nécessité qu'il soit substitué par des formulations à base des extraits de substances naturelles ayant des propriétés antioxydantes avérées comme les composés phénoliques **(Mercan, 2010)**. En effet, les substances naturelles de manière générale présentent des effets bénéfiques importants sur la santé des individus, du fait de leur richesse en composés phénoliques, c'est le cas des capsules des extraits de composés phénoliques de *Psidium guajava* (Goyavier) **(Chang E et Young C., 2018)**, d'*Azadirachta indica* (Neem) **(Khan et al., 2014)** Aloe vera (Issongo) **(Bouyahya, 2016)**, qui ont des effets bénéfiques contre les maladies cardiovasculaires, le diabète, la tension artérielle. Certaines plantes de la famille des *lamiaceae* sont connues comme d'importantes

sources de composés phénoliques c'est le cas d'*Hyssopus officinalis* L. qui est une espèce largement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique (Vlase *et al.*, 2014) ayant fait l'objet d'étude antérieure. En effet, il a été démontré que les extraits d'*Hyssopus officinalis* L. sont doués des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques, antibactériennes et antivirales du fait des composés phénoliques dont-ils regorgent notamment les acides phénoliques, les flavonoïdes et certaines oligoéléments (Vlase *et al.*, 2014). Les travaux effectués récemment par (Tijana *et al.*, 2021) en Serbie ont montré une activité antioxydante de l'extrait méthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. De même Rehab *et al.*, (2020) en Égypte ont également montré que l'extrait méthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. a un effet hypoglycémiant positif sur des rats diabétiques. Toutefois, au regard de ces travaux antérieures, il est important de relever qu'ils n'impliquent qu'une seule technique d'extraction, de même qu'un seul type de solvant, notamment le méthanol qui est par ailleurs toxique pour l'organisme. Nous nous sommes donc proposer d'aller plus loin en étudiant l'influence des extraits hydroéthanolique et aqueux obtenu par macération, infusion et décoction des feuille d'hysope du Cameroun sur le stress oxydatif et l'hyperglycémie.

Hypothèse

Les extraits aqueux et hydro-éthanoïques des feuilles *Hyssopus officinalis* possèdent des propriétés antioxydantes et anti-hyperglycémiantes.

Objectif général

Évaluer les propriétés antioxydantes et anti-hyperglycémiantes des extraits aqueux et hydro-éthanoliques des feuilles d'*Hyssopus officinalis*.

Objectifs spécifiques

- Déterminer les teneurs en composés phénoliques totaux des extraits aqueux et hydro-éthanolique des feuilles d'hysope ;
- Déterminer le potentiel antioxydants *in vivo* sur les activités de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase, du glutathion et du Malone dialdéhyde (MDA) ;
- Déterminer le potentiel anti-hyperglycémiant par le test normoglycémie, de glucotolérance préventive et curative *in vivo* ; et par le test *in vitro* de stockage du glucose par ces différents extraits.



CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

I. STRESS OXYDATIF ET ANTIOXYDANTS

I.1. Définition

Le stress oxydatif est un phénomène défini comme un état où l'équilibre entre la défense antioxydante de la cellule et les oxydants est perturbé par un excès d'oxydants, entraînant la régénération des espèces oxygénées réactives (**Kumar *et al.*, 2017**). La présence d'oxydants entraîne également des modifications oxydatives du système biologique au niveau moléculaire (liaisons insaturées des lipides, protéines, ADN), ce qui provoque des dommages et accélère finalement la mort cellulaire (**Sanchez, 2017**). Ce phénomène se produit lorsque les substances oxydantes sont formées ou accumulées de manière excessive suite à l'échec des mécanismes de défense internes (**Pogson *et al.*, 2006**). Ces anomalies sont impliquées dans la genèse de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'obésité, le cancer, les maladies dégénératives, cardiovasculaires, le processus de vieillissement (**Senlin *et al.*, 2020**). L'illustration du stress oxydatif est clairement représentée par la figure 1 ci-après.

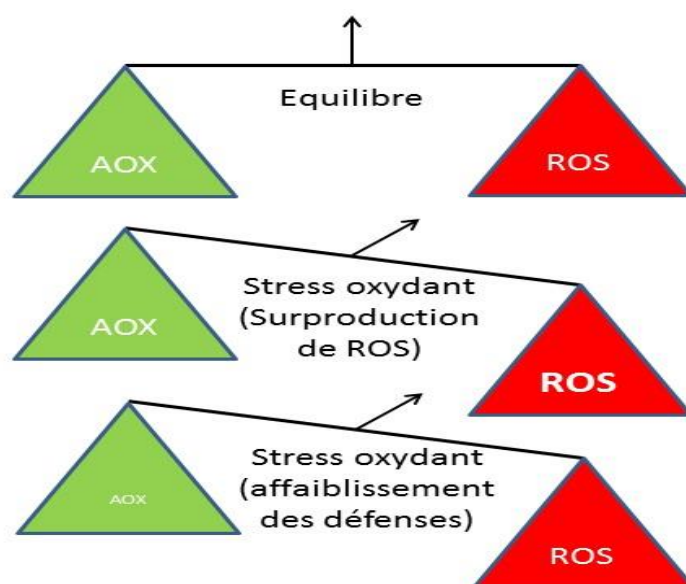


Figure 1 : Stress oxydatif (**Scandalios, 2002**).

En effet, l'accumulation d'entités oxydées hautement réactives est généralement cytotoxique. Ainsi, l'installation chronique d'un stress oxydant, comme c'est le cas dans de nombreuses pathologies peut à terme, provoquer d'importantes altérations cellulaires et tissulaires (Figure 2).

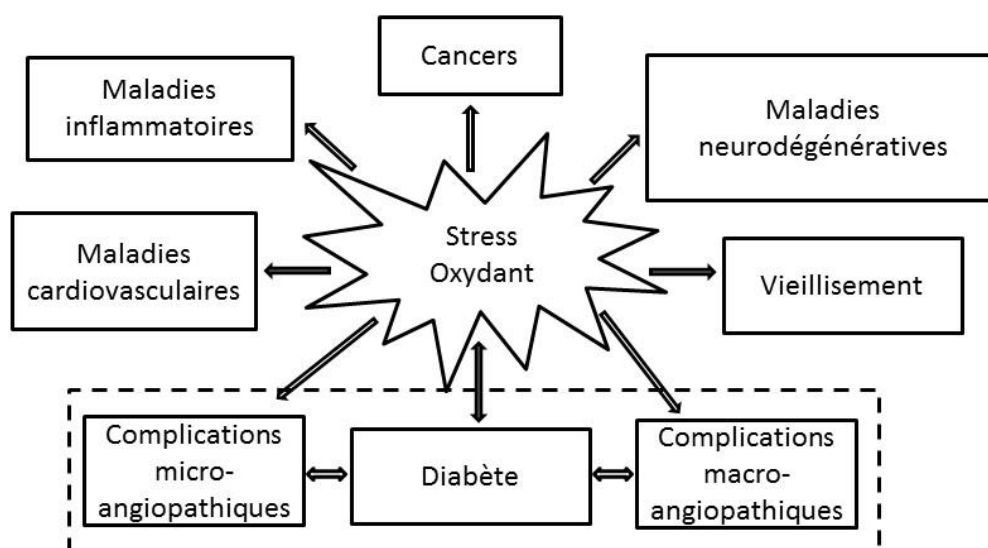


Figure 2 : Place centrale du stress oxydant au sein des pathologies (Scandalios, 2002).

I.2. Sources du stress oxydatif

I.2.1. Sources endogènes

Les sources intracellulaires et extracellulaires endogènes des espèces oxygénées réactives comprennent les mitochondries, les peroxysomes et l'activation des cellules inflammatoires. Les mitochondries sont la principale source des ROS intracellulaires où 1 à 2 % des électrons libérés de la chaîne de transfert d'électrons (ETC) entraînent la formation de superoxyde au cours de la phosphorylation oxydative normale (Alpay *et al.*, 2015). Les peroxysomes sont les seconds organites intracellulaires source de ROS dans la cellule. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) sont formés dans les peroxysomes par l'intermédiaire d'oxydases peroxysomales, dont l'acyl-CoA oxydase et la xanthine oxydase (Corton *et al.*, 2018). Les cellules inflammatoires, y compris les neutrophiles et les macrophages, sont également des sources endogènes de ROS. Les cellules phagocytaires sont également une source des ROS par l'intermédiaire de la voie de la NADPH oxydase (Xia *et al.*, 2007).

I.2 .2. Sources exogènes

Les ROS proviennent également des sources externes ou exogènes notamment de : l'alimentation (antibiotiques, alcool, café, aliments riches en protéines, glucides et lipides, faible consommation d'antioxydants), le CO_2 atmosphérique, les polluants (fumée de cigarette, pollution atmosphérique), les métaux occupationnels (métaux de transition tels que le mercure, le fer, le cadmium et le nickel) (Ligouri *et al.*, 2018). Les métaux lourds qui ont une grande affinité avec les rayonnements ionisants et les xénobiotiques cancérigènes tel que composés chlorés, les rayonnements, les ions métalliques, les barbituriques, les esters de phorbol, et certains composés proliférant les peroxysomes endommagent les cellules. Les dommages à l'ADN, les mutations, la mort

cellulaire et le cancer sont médiés par la formation de ROS (Klaunig *et al.*, 2004). Les produits chimiques environnementaux et pharmaceutiques peuvent générer des ROS dans les cellules, soit de manière indirecte soit par le métabolisme des composés, soit directement en activant une source endogène de ROS (Ulard *et al.*, 2019).

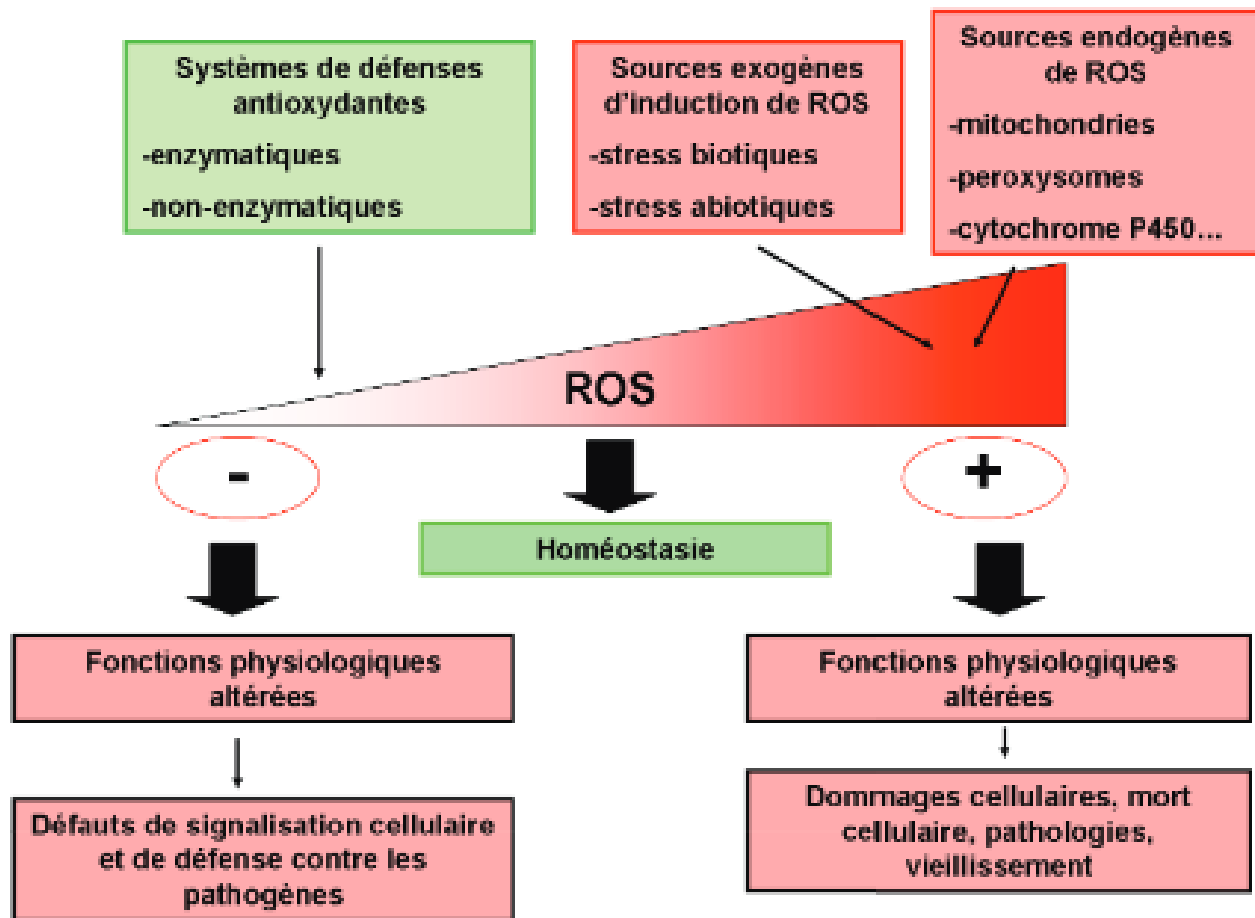


Figure 3 : Sources endogènes et exogènes du stress oxydatif (Ulard *et al.*, 2019).

I.3. Radicaux libres

Encore appelé Formes Réactives de l'Oxygène (FRO), les radicaux libres sont molécules très réactives issues de l'oxydation du dioxygène. Ce sont les sous-produits des réactions biochimiques qui se déroulent dans l'organisme, présentent dans certaines cellules et possédant en périphérie un électron célibataire (isolé et se libérant facilement) (Desmier, 2016). Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (molécules ioniques) et sont constitués de l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée), etc. Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de ré-apparier leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (Picchi, 2016). L'espèce agressée devient à son tour radicalaire, initiant de cette façon un processus de réaction en chaîne. Lorsque ces radicaux libres sont produits plus rapidement ils ne peuvent être neutralisés par les systèmes de défense antioxydant ce qui entraîne le développement du stress oxydatif.

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Favier, 2015).

I.3.1. Sources de production et formation des radicaux libres

Les êtres humains sont constamment exposés aux radicaux libres. En effet, les provenances des radicaux libres sont variées : la pollution environnementale excessive, le stress psychologique chronique, des efforts physiques intenses, la consommation de cigarettes et d'alcool, le rayonnement UV, les radiations ionisantes, les radiations cosmiques, le métabolisme cellulaire (activité mitochondriale, réactions enzymatiques), l'inflammation et les métaux toxiques (Ligouri *et al.*, 2018).

I.3.2. Espèces réactives de l'oxygène

Le terme "espèces réactives de l'oxygène" (ERO) décrit un groupe de molécules comportant au moins un atome d'oxygène et présentant une réactivité supérieure à celle de l'oxygène moléculaire (O_2). Ce groupe se compose de deux sous-classes : (I) les radicaux libres hautement réactifs, notamment l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), les radicaux alcoyle ($\bullet OOR$) et peroxyde ($\bullet OOH$) (Prousek *et al.*, 2007), et (II) les espèces non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) (Das *et al.*, 2014) l'ozone (O_3) et l'anion hypochlorite (OCl^-) (Aratani, 2018). Les ROS sont produits par presque tous les organismes et cellules, le précurseur commun de tous les ROS produits par les cellules, est produit par transfert d'électron unique vers O_2 . $O_2^{\bullet-}$ se dismute rapidement en H_2O_2 , soit spontanément en présence d'eau, catalysé par les superoxyde dismutases (Lambeth *et al.*, 2014).

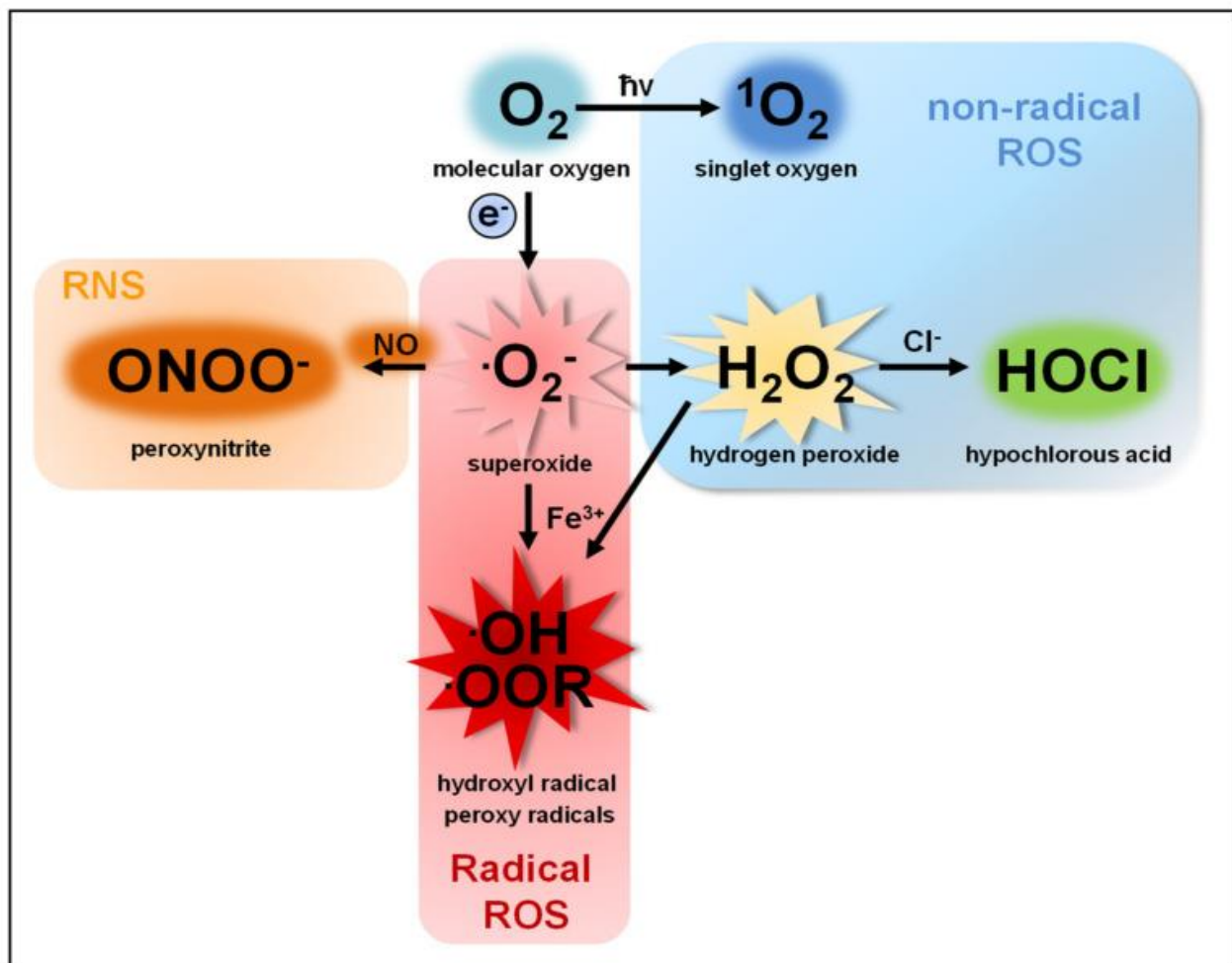
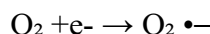


Figure 4 : Principales espèces oxygénées réactives (Hatz *et al.*, 2017).

✚ Espèces réactives de l'oxygène radicalaires

❖ Radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

L'anion superoxyde est généré par différents systèmes enzymatiques notamment désoxydases (NADPH oxydase dans la membrane lipidique et cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire mitochondriale). Cette réaction se fait grâce au transfert d'un électron du cofacteur enzymatique à l'oxygène (Lambert *et al.*, 2009).

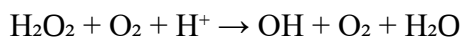


Une augmentation du niveau du radical $O_2^{\bullet-}$ est associée au stress oxydatif et aux dommages cellulaires, comme l'oxydation des protéines, des acides aminés et de l'ADN et/ou la peroxydation des lipides. De plus, **ce radical** peut inactiver de manière irréversible les protéines et ainsi contribuer à la signalisation cellulaire (Pizzino *et al.*, 2014). Le dioxygène (O_2) lui-même n'est pas très réactif, sauf avec les métaux de transition. Cependant, la phosphorylation oxydative dans les mitochondries le réduit en superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qui est converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et autres espèces réactives au pH physiologique (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010).

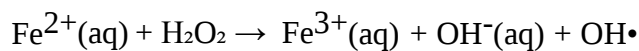


❖ Radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$)

Le radical hydroxyle est très toxique, il provient de la réaction très lente entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2



Le radical hydroxyle est une espèce radicalaire naturellement réactive et peut également provenir de la réduction du peroxyde d'hydrogène par un métal de transition comme par exemple l'ion ferreux. Cette réaction est appelée la réaction de Fenton (**Jacques *et al.*, 2004**).



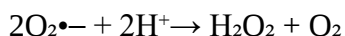
❖ Radical perhydroxyle ($\text{HO}_2\bullet$)

Il est issu de la protonation du radical superoxyde en milieu acide ($\text{pH} < 4,8$). Le radical perhydroxyle est plus réactif que le superoxyde car son potentiel standard d'oxydoréduction est plus élevé ainsi que ses constantes de vitesse, notamment vis-à-vis des acides gras polyinsaturés (acides linoléique, linolénique, arachidonique) (**Delattre *et al.*, 2005**).

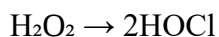
✚ Espèces réactives de l'oxygène non radicalaires

❖ Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

La double protonation de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut se dérouler dans des conditions favorables en milieu acide. Cette réaction est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) aboutissant à la formation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (**Ramirez *et al.*, 2008**).



Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 n'est pas un radical libre, et présente donc une plus grande stabilité par rapport aux radicaux libres. Toutefois il est considéré comme une espèce réactive d'oxygène car il intervient comme intermédiaire de synthèse d'autres radicaux libres. Ses propriétés physico-chimiques lui permettent de traverser la membrane lipidique, il joue donc un rôle important comme vecteur et diffuseur du stress oxydant. Le peroxyde d'hydrogène peut réagir dans les milieux intracellulaires avec des anions de chlore aboutissant à la formation d'acide hypochloreux (**Ramirez *et al.*, 2008**).



❖ Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

Il est produit en présence du rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il soit une espèce radicalaire, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (**Hennebelle, 2006**).

✚ Espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote proviennent de la réaction des ROS avec le monoxyde d'azote $\text{NO}\bullet$. Ces réactions sont catalysées par l'enzyme nitrate synthase (NO-synthase) dont il existe 3 types

: neuronale, endothéliale ou inductible. Dans des conditions physiologiques, l'oxyde d'azote est faiblement réactif. C'est l'action de l'anion superoxyde sur l'oxyde d'azote qui entraîne la formation de réactifs ayant une réactivité élevée (**Speckmann et al., 2016**).

I.4. Antioxydants

I.4.1. Définition

Un antioxydant est toute substance capable d'éliminer, retarder ou empêcher l'oxydation à l'état d'initiation ou de propagation d'une molécule. En effet, lors du métabolisme, les espèces réactives de l'oxygène se forment en marge des réactions bénéfiques. Ces radicaux libres ont la capacité d'oxyder diverses molécules et d'occasionner des dégâts de type dégénératifs impliqués dans de nombreuses pathologies (**Pszczola, 2001**). Afin que les effets délétères des ERO n'excèdent de façon incontrôlée l'organisme dispose d'un vaste réseau de défense comprenant les antioxydants. Cette protection est assurée à la fois par des composés naturels endogènes ou apportés par l'alimentation, et par les enzymes spécifiques se comportant comme des piègeurs de radicaux ou scavengers (**Mercan, 2010**).

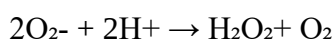
I.4.2. Classification des antioxydants

Antioxydants endogènes ou enzymatiques

Les principales enzymes anti-oxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST). Ce sont des enzymes dont les séquences sont très conservées au cours de l'évolution et qui agissent de manière coordonnée.

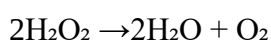
❖ Superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1)

La superoxyde dismutase (SOD) est une protéine métallique possédant une activité enzymatique lui permettant de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Chez l'homme il existe trois différentes classes de SOD, catalysant toutes la même réaction : la SOD à cuivre et à zinc que l'on trouve dans le cytosol et au niveau des liquides extracellulaires, la SOD à fer et la SOD à manganèse, dans les mitochondries. La réaction chimique catalysée par la SOD nécessite un milieu acide et va permettre d'agir simultanément avec 2 anions superoxydes aboutissant à la formation de dioxygène et de peroxyde d'hydrogène. Les SOD sont en général les premières défenses enzymatiques contre les ROS (**Hermes-Lima, 2005**).

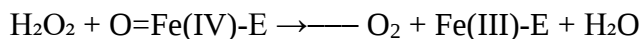
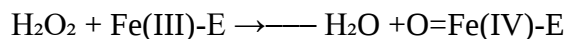


❖ Catalase (EC1.11.1.6)

La catalase est formée de quatre sous-unités, chaque sous-unité comporte un groupement ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de Fer à l'état Fe^{3+} et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de l' H_2O_2 .



Cette enzyme est constituée de quatre chaînes polypeptides, comportant chacune un atome de Fer sous forme ferrique (Fe^{3+}). Ces derniers constituent les sites actifs de cette enzyme. Le mécanisme de dismutation du peroxyde d'hydrogène est le suivant (**Pamplona et Costantini, 2011**).



La vitesse de réaction est uniquement dépendante de la vitesse limite avec laquelle les molécules parviennent au site actif de l'enzyme ce qui fait d'elle l'une des enzymes les plus efficaces connues (**Valko et al., 2006**).

❖ Glutathion peroxydase (EC 1.11.1.19)

La glutathion peroxydase (GSH-Px) est une enzyme à sélénium tétramérique permettant également la décomposition du H_2O_2 . Elle agit plus lentement que la catalase mais elle a une meilleure affinité pour le H_2O_2 que cette dernière. Elle se retrouve dans les liquides extracellulaires ainsi que dans les cellules, au sein du cytosol et des mitochondries (**Richard et al., 2017**). Cette enzyme constitue la voie majeure de dégradation des hydroperoxydes. Cette fonction anti-oxydante est d'autant plus importante qu'elle joue un rôle essentiel avec les superoxydes dismutases et la vitamine E (**Desmier et al., 2016**). Elle va donc assurer l'équilibre intra et extracellulaire de la balance pro-/antioxydants. Son activité principale est de permettre l'oxydation du glutathion par réaction de dimérisation avec la formation d'un pont disulfure. Cette réaction conduit à la génération de H_2 pouvant réduire les espèces environnantes. En présence de substrat de type ROOH, la réaction se traduit de la manière suivante avec la formation d'une molécule d'eau et d'une molécule d'alcool (**Richard et al., 2017**).



Le grand avantage de ce système est sa capacité à se régénérer. En effet, sous la dépendance du NADPH via le métabolisme des glucides, le glutathion réduit est capable d'être reformé et ainsi pouvoir être de nouveau disponible.

❖ Glutathion réductase ou GR (EC 1.8.1.7)

La glutathion réductase n'est pas une enzyme antioxydante à proprement parler, dans le sens où elle n'a pas d'action directe sur les ROS. En revanche, elle a un rôle très important dans réduction du glutathion, puissant antioxydant et co-substrat de la GPX. La GR permet la régénération du glutathion sous sa forme réduite via la consommation de NADPH, évitant ainsi la synthèse *de novo* du glutathion qui présente un coût énergétique plus élevé, dû à la consommation d'ATP (**Raman et Berry, 2011**).

❖ Glutathion S-transférase ou GST (EC 2.5.1.18)

La glutathion S-transférase ou GST a également une action indirecte sur la détoxification des ROS puisqu'elle permet le transport du GSH vers les compartiments cellulaires subissant des dommages oxydatifs. Elle permet la liaison du GSH à certains xénobiotiques ainsi qu'aux aldéhydes issus de la peroxydation lipidique. La GST a donc un rôle de transport intermembranaire, de liaison et de détoxification des cellules. Avec la GR et la GPX, elle joue un rôle central dans la détoxification des ROS par le GSH (**Tan et al., 1986**).

Les enzymes citées ci-dessus constituent les premières défenses antioxydantes ainsi que les défenses auxiliaires qui les soutiennent via la régénération du GSH et son transport. Il existe également d'autres défenses antioxydantes telles que les transferrines, les ferritines, les métallotionéines. Ces dernières sont des enzymes qui en se complexant aux métaux limitent leur disponibilité dans le processus de génération des radicaux libres. Enfin, les enzymes de réparation des molécules endommagées par les ROS peuvent également être considérées comme des défenses antioxydantes (méthionine sulfoxyde réductases, endonucléases, ADN glycosylases) (**Hermes-Lima, 2005**). Les principales enzymes antioxydantes sont représentées par la figure 5 ci-dessous.

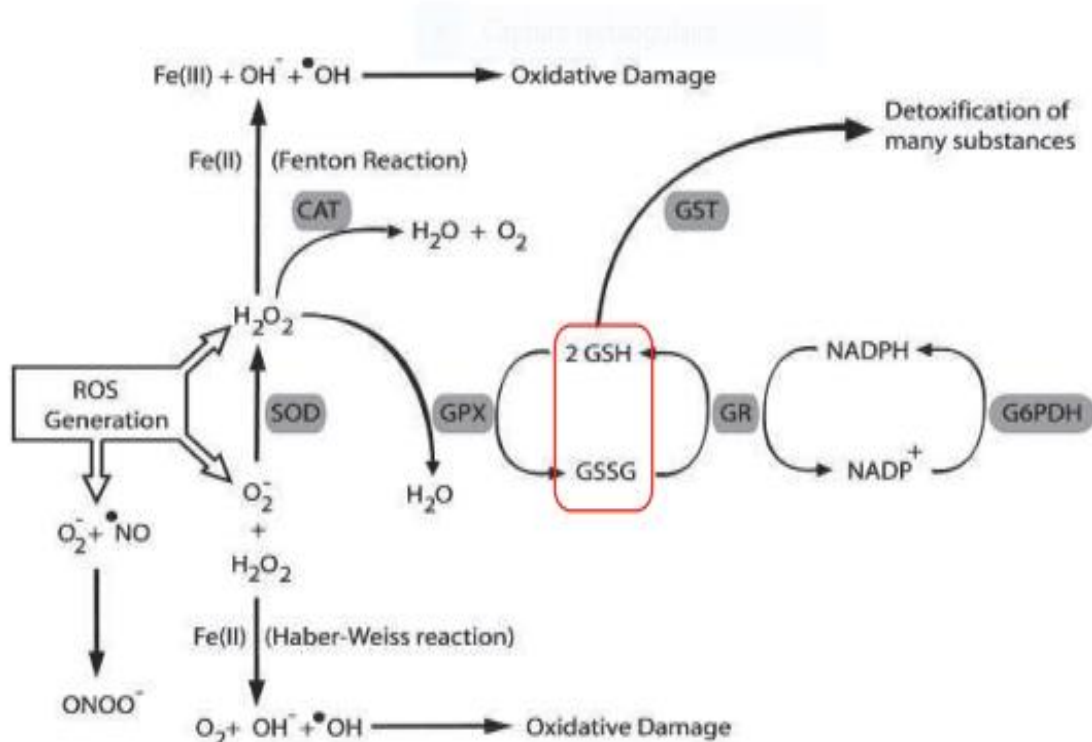


Figure 5 : Principales enzymes antioxydantes: La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST). En rouge est entouré le glutathion, sous sa forme réduite GSH et oxydée GSSG. (**Hermes-Lima, 2005**).

Antioxydants exogènes ou non enzymatiques

❖ Glutathion

Le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (γ -L-Glutamyl-L-cystéinyl-L-glycine). Le groupement amine de la cystéine est lié à la fonction acide en γ de l'acide glutamique. La fonction thiol de la cystéine porte les principales propriétés de ce peptide. On le retrouve dans de nombreux compartiments intracellulaires (cytosol, noyau, mitochondries) soit sous forme réduite (GSH) soit sous forme oxydée (GS-SG). Le rapport de concentration entre ces deux formes est en faveur de la forme réduite, ce qui est nécessaire à l'action antioxydante. Pour être actif, le glutathion ne nécessite pas forcément l'action de la GSH réductase citée ci-dessus (**Richard et al., 2017**).

Autres antioxydants

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.

1. Vitamines

❖ Vitamine E

La vitamine E est une vitamine liposoluble présente en grande quantité dans les huiles végétales (huile de palme, olive et tournesol). Elle est 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 tocopherols (α -, β -, γ -, ou δ -tocopherol) et des tocotrienols (α -, β -, γ -, ou δ -tocotrienol) (**Higdon et al., 2003**). Elle va agir comme antioxydant contre les ROS (en parallèle de la vitamine C et du glutathion) et de ce fait, elle est capable d'empêcher ou d'arrêter la propagation de la peroxydation lipidique. La vitamine E est produite dans les chloroplastes des plantes, en effet la chaîne carbonée augmente le caractère lipophile de la molécule et ainsi facilite la pénétration dans les bicouches lipidiques et permet une action directe intracellulaire. L' α -tocopherol est considéré comme un antioxydant de référence servant d'étalon pour les nouvelles molécules que l'on souhaite évaluer comme antioxydants (**Laliberté et al., 2008**).

Vitamine C

La vitamine C ou acide L-ascorbique est une molécule hydrophile que l'on retrouve dans de nombreux fruits comme les oranges, les citrons et les fraises. Son caractère hydrophile ne lui permet pas d'avoir une activité intracellulaire. Elle est synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, excepté chez certains mammifères tels que l'homme. C'est une molécule antioxydante capable de réagir directement avec tous les ROS réduisant de ce fait la peroxydation lipidique et les dommages

aux protéines et à l'ADN. La vitamine C a également un pouvoir antioxydant indirect en recyclant les caroténoïdes et son intérêt majeur en terme de pouvoir antioxydant réside en sa capacité à régénérer la vitamine E au sein de la membrane. Par ailleurs, la vitamine C permet le recyclage du Fe³⁺ en Fe²⁺ favorisant ainsi la réaction de Fenton et a donc de manière indirecte une action pro-oxydante (Fabre *et al.*, 2015).

❖ Vitamine A

La vitamine A est une vitamine liposoluble que l'on retrouve en grande quantité dans l'organisme surtout au niveau du foie, son lieu de stockage principal. On distingue deux groupes, à savoir les rétinoïdes (rétinol, trétinoïne...) et les provitamines A (principalement les α - et β -carotènes). Le β -carotène peut agir comme un inhibiteur de la peroxydation lipidique uniquement à une faible pression partielle en O₂. Il peut être oxydé tout comme un acide gras et ainsi avoir un effet pro-oxydant (Higdon *et al.*, 2003).

2. Oligo-éléments

Les oligo-éléments se définissent comme une classe de nutriments nécessaires, en quantité très faible, à la vie d'un organisme. L'apport par l'alimentation, en quantité raisonnable est crucial. En effet, ils n'agissent pas directement contre les ROS, mais ils sont nécessaires aux enzymes décrites précédemment. Un apport excessif en oligo-éléments peut entraîner de sérieux dysfonctionnements (Laliberté *et al.*, 2008).

❖ Sélénium

Le sélénium est un oligo-élément constituant des sélénoprotéines dont fait partie le principal antioxydant intracellulaire, la glutathion peroxydase. On le retrouve notamment dans le porc, le bœuf et le poisson. Il joue également le rôle de détoxification des métaux lourds comme le cadmium (Jomova *et al.*, 2011).

❖ Cuivre

Le cuivre est un des cofacteurs essentiels de la SOD étant donné sa facilité à passer de l'état réduit à l'état oxydé. On retrouve le cuivre surtout dans le foie, les huitres et le chocolat noir. Néanmoins, il joue également un rôle important dans l'initiation des réactions produisant des ROS de par ses propriétés de métal de transition, tout comme le fer (Laliberté *et al.*, 2008).

❖ Zinc

Le zinc est un cofacteur de la SOD. On retrouve le zinc dans les huitres, le foie de veau et la viande de bœuf. Le zinc a également comme fonction de protéger le groupement thiol des protéines. De plus, il peut lutter contre la formation des ROS induite par le fer ou le cuivre (Chen *et al.*, 2004).

3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont également des molécules liposolubles produites par les organismes photoautotrophes et qui doivent être acquis par l'alimentation chez les animaux. Leur potentiel antioxydant pour lutter contre la peroxydation lipidique a été démontré très tôt et ils sont capables de réagir avec les radicaux libres de trois manières : par le transfert d'électron, d'hydrogène ou la liaison avec le radical. Ils sont également capables de régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C (**Hermes-Lima, 2005**).

4. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques représentent une classe de métabolites secondaires exclusivement distribué dans le règne végétal et donc dans notre alimentation. Ce sont des composés possédant plus de deux groupes Hydroxyles –OH et au moins un noyau aromatique. Leur étude a été croissante ces dernières décennies en raison de leurs bienfaits sur la santé, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant mais aussi dans la prévention ou le traitement de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives (**Halliwell et Gutteridge, 2008**). Les polyphénols jouent un rôle important, ils sont capables d'interagir avec les métaux de transition, notamment avec le fer et le cuivre. En effet les ROS sont produits abondamment par réduction du dioxygène par Fe^{2+} ou Cu^{2+} aboutissant à la formation de superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et de radicaux oxydé (réaction de Fenton). Ainsi la formation de complexes chélateurs stables et inertes est un mécanisme antioxydant (**Chen et al., 2004**).

I.4.3. Utilisation des antioxydants

Les antioxydants sont très largement utilisés dans de nombreux domaines comme la diététique, l'agroalimentaire, la cosmétologie, le domaine de la médecine mais aussi dans l'industrie moderne. En effet, cette dernière requière l'utilisation d'antioxydants puissants qui permettent au produit fabriqué de ne pas se dégrader par oxydation. De la même façon, les durées de vie des graisses, plastiques, pétroles ou encore caoutchoucs ont été considérablement augmentées (**Desmier et al., 2016**).

I.4.4. Mode d'action des antioxydants

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

Suivant leurs mécanismes d'action les antioxydants peuvent être classés en trois types :

➤ **Antioxydants de type I**

L'action des antioxydants de type I repose sur leur capacité à inactiver les radicaux libres. Ils inhibent la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents (Belaiche, 1979).

➤ **Antioxydants de type II**

Ce type d'antioxydant prévient la formation des radicaux libres et peut intervenir par différents mécanismes. Les flavonoïdes (un énorme potentiel antioxydant naturel) rentrent dans cette catégorie d'antioxydants. Ils agissent en piégeant les radicaux libres et en complexant les métaux pro-oxydants (Roeding-Penman et Gordon, 1998).

➤ **Antioxydants de type III**

Ils regroupent les facteurs de l'environnement qui ont une action antioxydante en agissant sur le potentiel redox du milieu, la température, la pression en oxygène et la lumière. L'efficacité des antioxydants peut être augmentée par l'utilisation d'un mélange d'antioxydants de type I et II. L'association de ces deux types d'antioxydants permet d'inhiber les phases d'initiation et de propagation de l'oxydation des lipides (Frankel, 1998). Les Espèces Réactives de l'Oxygène réagissent avec de nombreuses molécules, ce qui entraîne certaines modifications de ces dernières. Elles perdent alors leur activité au sein de la cellule et cela a un impact sur le fonctionnement cellulaire.

I.4.5. Effets du stress oxydatif sur l'organisme

Les espèces réactives de l'oxygène constituent la plus importante source endogène de dommages à l'ADN. Elles peuvent lui induire de nombreuses modifications covalentes telles des lésions aux bases nucléotidiques (purines et pyrimidines), des cassures de brins, des pontages (cross-links) inter et intra brin et des pontages protéine-ADN (Wang, 2008).

 Dommages oxydatifs aux lipides

Alors que l'oxydation des lipides représente l'utilisation du substrat énergétique, la peroxydation des lipides est la dégradation des acides gras membranaires. Elle constitue par conséquent un indice de dommages oxydatifs effectués aux lipides. La peroxydation lipidique génère une variété de produits de décomposition relativement instables, principalement des aldéhydes α , β -insaturés tels le malondialdéhyde, le 4-hydroxy-2-nonénal, le 2-propénal et les isoprostanes qui peuvent être mesurés dans le plasma et l'urine comme marqueurs indirects de stress oxydatif (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

 Dommages oxydatifs aux protéines

Lorsque les radicaux libres réagissent avec des protéines saines, plus précisément avec le groupement caractéristique (chaîne latérale) des acides aminés, il en résulte la formation de groupement carbonyles. Le dosage plasmatique des protéines carbonylées est actuellement le

marqueur d'oxydation avancée des protéines le plus utilisé, aussi bien in vivo que in vitro, pour mesurer les dommages oxydatifs effectués aux protéines (**Dalle-Donne et al., 2006**). La grande stabilité chimique des protéines carbonylées en fait une cible intéressante pour les mesures en laboratoire.

I.4.6. Stress oxydatif comme facteur de risque des maladies chroniques Rôle du stress oxydatif dans le développement des maladies chroniques

La génération d'espèces réactives de l'oxygène et d'autres radicaux libres au cours du métabolisme cellulaire est un processus normal et nécessaire qui est idéalement compensé par un système antioxydant endogène élaboré. Toutefois, en raison de différentes situations environnementales et pathologiques ainsi que certaines habitudes de vie, un excès de radicaux libres peut s'accumuler, aboutissant à un stress oxydatif (**Willcox et al., 2004**). La conséquence majeure de ce dernier est le dommage qu'il cause aux bases des acides nucléiques, aux lipides et aux protéines, lequel peut sévèrement compromettre la santé et la viabilité d'une cellule ou induire une variété de réponses cellulaires par la génération d'espèces réactives secondaires et ultimement, mener à la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose. Un dommage oxydatif à une seule de ces biomolécules peut théoriquement, contribuer au développement d'une maladie (**Dalle-Donne et al., 2006**). Un nombre croissant d'évidences scientifiques suggère que le stress oxydatif est relié aux mécanismes pathophysiologiques primaires ou secondaires d'une multitude de maladies chroniques et aiguës. Cette relation est appuyée par des expérimentations qui ont démontré, in vitro, qu'il était possible de créer un processus dégénératif par le stress oxydatif (**Willcox et al., 2004**). Les ERO ont également été identifiées comme étant l'agent causal de la perte neuronale dans la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie, l'ischémie cérébrale, la commotion cérébrale, la maladie de Parkinson, la sclérose amyotrophique latérale et dans le processus de vieillissement du cerveau en soi (**Carney et Camey, 1994**). Bien que certaines maladies puissent être causées par des dommages oxydatifs aux protéines, à l'ADN ou aux lipides, le stress oxydatif peut parfois être une conséquence et non la cause du processus primaire du développement de la maladie. Toutefois, en tant qu'évènement secondaire, le stress oxydatif joue un rôle important dans la progression de nombreux problèmes de santé (**Willcox et al., 2004**). De même, il a été reconnu que plus d'une centaine de maladies sont associées aux radicaux libres, ces derniers contribuant au vieillissement cellulaire, à la mutagenèse, à la carcinogenèse, aux maladies coronariennes et autres pathologies cardio-vasculaires, à la dystrophie musculaire, à la neurodégénérescence et au diabète (**Zou et al., 2008**).

I.5. Stress oxydatif et hyperglycémie

I.5.1. Stress oxydant comme cause de l'hyperglycémie

Le stress peut affecter l'équilibre du diabète par l'effet hyperglycémiant des hormones de stress (**Sharma *et al.*, 2018**). Lors d'une situation de stress, le corps réagit en sécrétant des hormones de stress, soit les catécholamines (adrénaline, noradrénaline), le cortisol, le glucagon et l'hormone de croissance. Ces hormones occasionnent une élévation de la glycémie dans le but de procurer l'énergie nécessaire pour lui permettre d'agir physiquement (**Kumar *et al.*, 2017**).

I.5.2. Stress oxydant comme conséquence de l'hyperglycémie

Chez le patient diabétique, on observe une surproduction des espèces oxygénées réactives (EOR) d'une part et d'autre part, une diminution des antioxydants, ce déséquilibre génère un état de stress oxydatif à l'origine des complications micro et macro angiopathiques du diabète (**Asmat *et al.*, 2016**). Des concentrations anormalement élevées du glucose circulant peuvent induire un stress oxydatif par le biais de divers mécanismes (Figure 3). En effet, l'hyperglycémie peut entraîner une sur-activation de la chaîne des transporteurs d'électrons dans la mitochondrie, dont résulte une surproduction d'anions superoxydes. Toutefois, l'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale est la première cause de l'augmentation du stress oxydant. Le glucose, présent dans la circulation sanguine peut également interagir avec les molécules qui l'entourent à travers plusieurs mécanismes biochimiques parmi lesquels l'auto-oxydation du glucose, les produits avancés de glycation ou « *Advanced Glycation Endproducts* » (AGE), l'activation de la protéine kinase C, de la voie des polyols et la voie des hexosamines (**Li *et al.*, 2017**). En plus de l'hyperglycémie, d'autre mécanisme à l'instar de l'Hyperinsulinémie peut également induire le stress chez le diabète de type 2 (DT2) dans la mesure où l'insuline est capable d'induire la production du peroxyde d'hydrogène qui peut indirectement activer les réactions d'oxydation (**Keane *et al.*, 2015**).

I.5.3. Impact de l'hyperglycémie sur le potentiel antioxydant

L'hyperglycémie augmente non seulement la production accrue des espèces oxygénées réactives (EOR) mais réduit aussi le potentiel antioxydant. En effet, dans les conditions physiologiques normales, les systèmes de défenses antioxydants non enzymatiques et enzymatiques (superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) protègent l'organisme contre les effets délétères des radicaux libres. Toutefois, la production des radicaux libres au cours du diabète est due à la diminution de la disponibilité de ces antioxydants enzymatiques. Cette diminution peut entraîner une accumulation de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène capable de générer les radicaux hydroxyles (**Asmat *et al.*, 2016**).

I.5.4. Relation entre l'hyperglycémie et peroxydation lipidique

Le glucose est capable d'induire une lipoperoxydation par activation des lipoxygénases. De plus, une déplétion des systèmes protecteurs antioxydants conduit à une augmentation de la peroxydation lipidique au cours du diabète. En effet, les espèces oxygénées réactives générées par l'hyperglycémie induisent une augmentation de la peroxydation lipidique se traduisant par une élévation de la teneur en malondyaldehyde (MDA) aussi bien chez les patients que chez les animaux diabétiques (Asmat *et al.*, 2016). La molondialdehyde (MDA), produit final de la peroxydation lipidique se forme lorsque les ERO attaquent les acides gras polyinsaturés des lipides membranaires et les lipoprotéines (Chang et Young, 2018). Ces processus dégénératifs de la peroxydation lipidiques sont à l'origine de l'altération de l'activité enzymatique étant donné que la formation des peroxydes lipidiques au cours du diabète conduit à une inhibition des activités enzymatiques soit par oxydation directe par les radicaux libres, soit par modification chimique médiée par les produits finaux de la peroxydation lipidique tels que le MDA et le 4- hydroxynonenal (Asmat *et al.*, 2016).

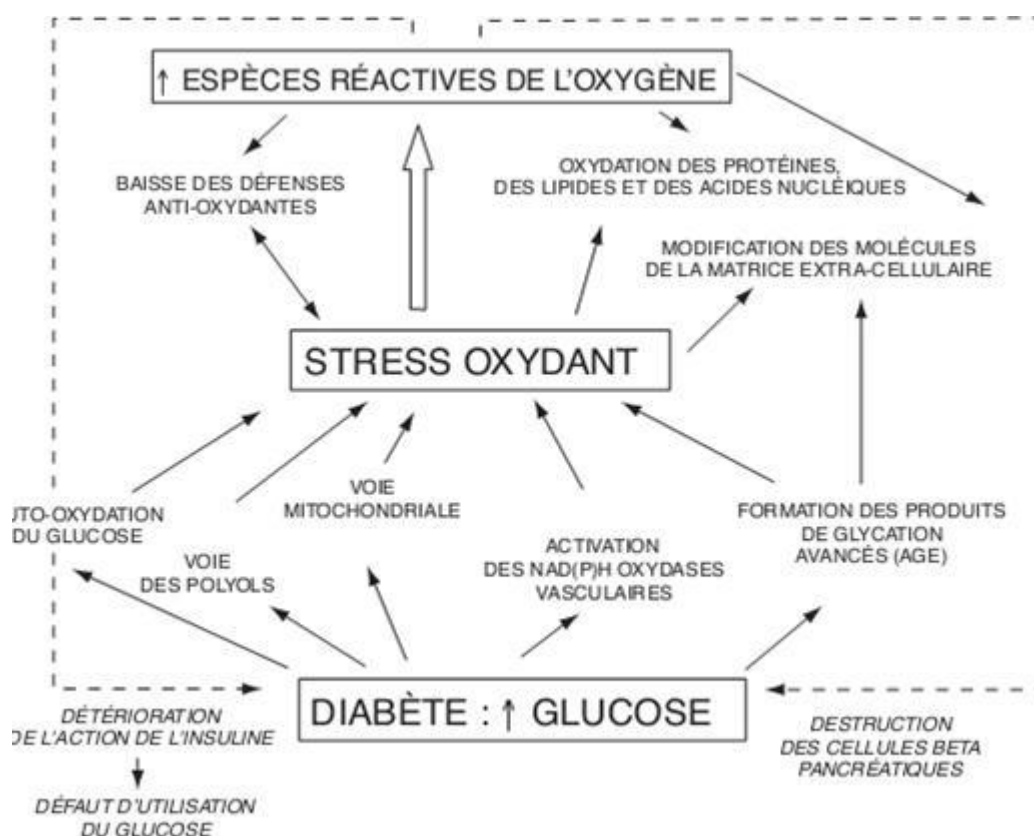


Figure 6 : Relation entre l'hyperglycémie et le stress oxydant (Bonnefont-Rousselot, 2004)

I.5.5. Prise en charge du stress oxydatif et de l'hyperglycémie

La population utilise couramment des formulations enrichies en antioxydants synthétiques et les médicaments dans la gestion du stress oxydatif et d'hyperglycémie. (Apema *et al.*, 2019). D'autres font recours aux plantes naturelles. Ces plantes sont riches en composés bioactifs (polyphénols, alcaloïdes, glycosides, flavonoïdes ...) et possèdent plusieurs activités biologiques (antidiabétique, antioxydant...) (Goet, 2007). Ces principes actifs naturels des plantes médicinales

sont capables de moduler le taux de glucose sanguin, renforcer le système oxydant afin de restaurer le déséquilibre provoqué par une hyperglycémie (Azantsa *et al.*, 2017). C'est le cas par exemple de *Psidium guajava* (Goyavier), *d'Azadirachta indica* (Neem), *Aloe vera* (Issongo) *Moringa oleifera* (Moringa) et *Citrus sinensis* (Citron), qui ont des effets bénéfiques contre la réduction de l'hyperglycémie postprandial et du stress oxydatif (Bouyahya, 2016).

II. Généralités sur les composées phénoliques

II.1. Définition et sources

Deux classes de composés organiques synthétisés naturellement sont connues sous le nom de métabolites primaires et de métabolites secondaires. Les métabolites primaires comprennent les glucides, les protéines et les lipides, qui sont essentiels aux organismes vivants (Zaynab *et al.*, 2019). Les métabolites secondaires ne sont pas essentiels et peuvent être obtenus à partir d'un large éventail des parties de plantes (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, grains et bois), les déchets agricoles, les fruits, les champignons, les algues et les microbes (Zainal-Abidin *et al.*, 2017).

II.2. Structure et exemple de composé phénolique

Les composants phénoliques sont des métabolismes secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acide phénolique simples : C_6H_5-OH) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés : $(C_6-C_3-C_6)_n$). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Macheix *et al.*, 2005).

II.3. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidins) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes. Ce sont des molécules biologiquement actives.

❖ Les flavonoïdes

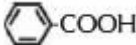
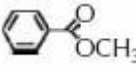
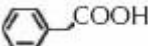
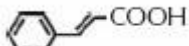
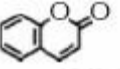
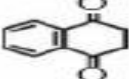
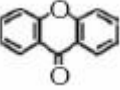
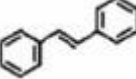
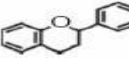
Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On distingue différents types de noyaux : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines, coumestanes, roténoïdes etc. Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base de quinze atomes de carbones constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3. Leur fonction essentielle semble être la coloration de la plante ou du fruit : la coloration jaune (pigments flavonols) ou rouge à bleue (pigment anthocyanes). Ces pigments protecteurs, contenus dans la peau et les pépins du raisin participent à la lutte contre les radicaux

libres, substances dont l'excès pour les humains prédispose à la dégénérescence cellulaire. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits, légumes, céréales et thé) (Lorrain *et al.*, 2013).

❖ Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxy phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxy-benzoïque et de l'acide hydroxy-cinnamique (Lorrain *et al.*, 2013). Les acides phénoliques, tels que l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide férulique, l'acide sinapique et l'acide gallique, sont contenus dans de nombreuses plantes agricoles et médicinales (Psotová *et al.*, 2003). Ils ont des effets prébiotiques, antioxydants, de chélation et anti-inflammatoires. Ils sont considérés comme non toxiques. Certains d'entre eux suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer. Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique (Psotová *et al.*, 2003). Ainsi, l'acide caféique et l'acide férulique limiteraient la formation du cancer des poumons chez les souris tandis que l'acide gallique empêcherait la formation du cancer oesophagien chez les rats (Hale, 2003).

Tableau I : Structure des squelettes des composés phénoliques (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	acétophénones	Gallacetophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acide phénylacétique	Acide hydroxyphénylacétique	
9	C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	Acide coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculitine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

II.4. Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être synthétisés soit par voie du shikimate qui est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le

métabolisme de la voie de phénylpropanoïdes. Soit par la voie de biosynthèse de flavonoïdes dont plus de 4000 ont été identifiés de nos jours, ou alors par la voie de phénylpropanoïdes qui commence par la phénylalanine qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes acide salicylique, des précurseurs de lignine qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Lecheheb et Chaabna, 2017).

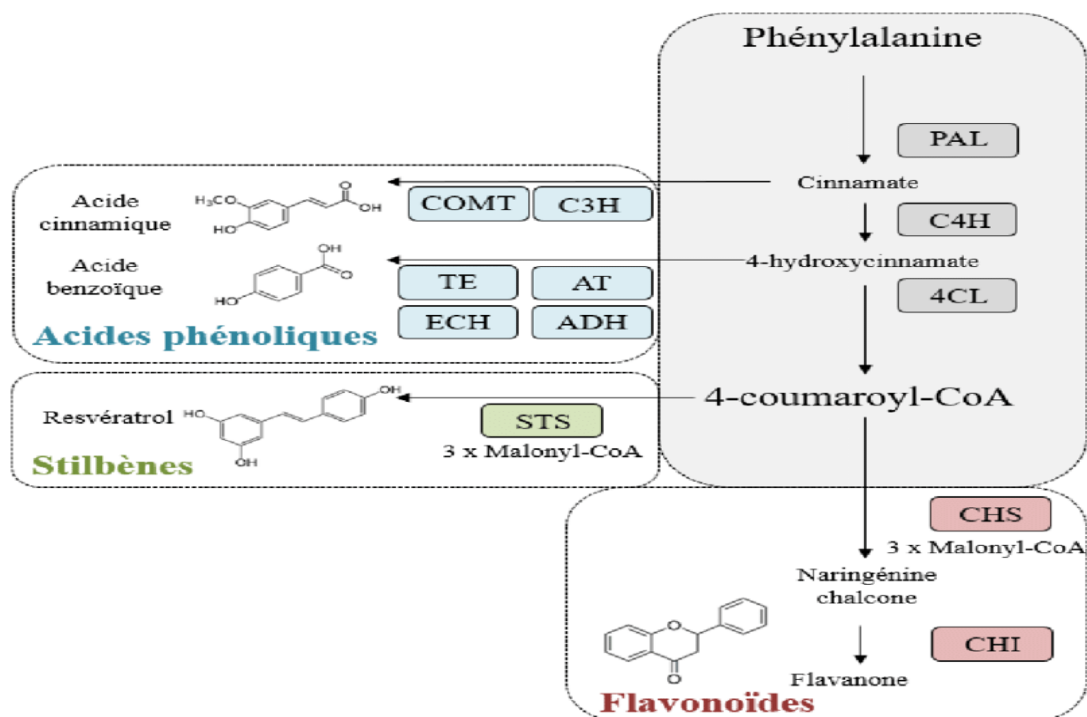


Figure 7 : Principales voies de biosynthèses des composés phénoliques depuis la phénylalanine issue de la voie du shikimate (Lecheheb et Chaabna, 2017).

II.5. Importance des composés phénoliques

II.5.1. Sur le plan alimentaire

Pour les nutritionnistes, l'intérêt des composés phénoliques a pris de l'ampleur depuis que certaines de ces substances se voient attribuer un certain nombre d'activités bénéfiques pour l'homme. Lors d'un stress oxydant, les défenses sont saturées et insuffisantes. Les apports exogènes d'antioxydants peuvent suppléer cette insuffisance. En effet, la vitamine E, C, les caroténoïdes et les polyphénols apportés par l'alimentation ont des effets directs sur les constituants cellulaires et circulants. De plus, les oligo-éléments comme le zinc, le sélénium, le manganèse ou le cuivre, apportés par le bol alimentaire, permettent de faire fonctionner des enzymes antioxydantes comme les superoxydes dismutases (Evans et Halliwell, 2019). La plupart des composés phénoliques proviennent des végétaux tels que des fruits, des légumes, des plantes ou des racines. La consommation d'aliments riches en composés phénoliques réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension, le diabète.

Ces composés phénoliques sont généralement présents dans les fruits, les jus et les légumes (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

II.5.2. Sur le plan pharmaceutique

Les propriétés pharmacologiques des composés phénoliques sont largement étudiées on leur reconnaît des activités Antivirales, Antispasmodiques, Anti-tumorales, antiagrégation plaquettaires, Antiallergiques, Anti-inflammatoires et Antimicrobiennes. Les composés phénoliques jouent un rôle important à la fois dans la protection contre le cancer et les maladies cardiovasculaires. L'action protectrice contre le cancer s'expliquerait par un mécanisme assez semblable à celui des prébiotiques par leur capacité à sélectionner un type particulier de microbiote, en particulier pour les cancers du système digestif (estomac, côlon, etc.). La supplémentation alimentaire en polyphénols limite l'absorption du fer mais améliore l'érythropoïèse. Les travaux plus anciens ont montré que les composés phénoliques sont capables de diminuer les facteurs de risque du diabète. En effet, ils l'obstruction des artères, ils jouent sur l'insulinorésistance et sur l'hypertension artérielle (**Senlin et al., 2020**).

II.5.3. Composés phénoliques, stress oxydatif et hyperglycémie

Les composés phénoliques sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés antidiabétiques, ainsi l'apport régulier pourrait diminuer le risque de diabète et ses complications en améliorant la sensibilité à l'insuline et en luttant contre l'hyperglycémie et le stress oxydatif. L'activité des composés phénoliques provient de leur capacité à donner un électron ou un hydrogène, et de délocaliser un électron impair à l'intérieur de leur structure aromatique. Ils protègent ainsi les molécules biologiques contre l'oxydation, par conséquent diminue le risque des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Apema et al., 2019**).

III. Généralité sur les lamiacées

Les Lamiacées sont des plantes vertes de la famille Lamiaceae chez les Lamiales. Avec plus de 7900 espèces, cette famille de plante est très diversifiée et géographiquement répartie dans le monde entier, sauf dans les régions polaires et les déserts (**Džamić A, 2019**). Les lamiacées sont essentiellement représentées dans le pourtour de la Méditerranée et le Sud-Ouest de l'Asie et dans les forêts tropicales. On y rencontre les lamiaceae du genre officinalis (*Hyssopus officinalis*) (**Tijana et al., 2021**) qui est connu et cultivé au Cameroun pour ses nombreuses propriétés et qui ont fait l'objet de cette étude.

III.1. *Hyssopus officinalis* L. (hysope)

III.1.1. Historique et description de *Hyssopus officinalis* L.

❖ Historique

L'hysope officinale (*Hyssopus officinalis*) de la famille des Lamiaceae dérivée du mot grec "azob" qui signifie "plante sacrée" est l'une des espèces végétales les plus importantes. Il est représenté par près de 70 espèces est très étendue et cultivés en Asie et en Europe, en Amérique du Nord et en Afrique (**Venditti et al., 2015**). L'hysope est un arbuste pérenne avec une longue histoire d'usage médicinale. Il est traditionnellement utilisé comme antitussif, carminatif, expectorant, et tonique ; bien qu'ayant un goût légèrement amer, l'hysope est souvent utilisée comme arôme de menthe et condiment dans les industries alimentaires (**Hajdari A et al., 2018**). *H. officinalis* a été documenté comme traitement contre les virus dans différents types d'infections comme les rhumes, la toux, les maux de gorge, la bronchite, l'asthme et le virus de l'immunodéficience humaine. Son huile est considérée comme un agent antimicrobien et a montré une puissante activité antivirale contre le VIH, en plus de ses effets antiprotozoaires, antifongiques, antileishmaniens et anticarcinogènes (**Tijana et al., 2021**).

❖ Description botanique

L'hysope, également connue sous le nom d'herbe sacrée est un petit arbrisseau d'une trentaine de centimètres, qui se rencontre sur tous les continents (il pousse jusqu'à 2000 m d'altitude) ; ses lieux favoris restant l'Europe méridionale, le Maghreb et le Cameroun. Ses nombreuses tiges carrées, ligneuses et dressées portent de délicates feuilles vertes lancéolées, légèrement brillantes qui dégagent une odeur forte et plaisante. De juillet à septembre, apparaissent les fleurs bleu violet, réunies en verticilles ; le tout forme un agréable petit buisson aromatique. L'hysope pousse spontanément dans des lieux plutôt secs comme les éboulis, les talus ou les terres légères (**Omidbeigi, 2006**). La figure 9 présente la plante d'hysope.



Figure 8 : Plante d'hysope *Hyssopus officinalis* L. (**Omidbeigi, 2006**).

III.1.2. Classification

❖ Classification botanique d'hysope *Hyssopus officinalis* L. (Omidbeigi, 2006).

Tableau II : Taxonomie *Hyssopus officinalis* L.

Règne	Plantae
Sous-règne	Viridiplantae
Superdivision :	Embryophyta
Division	Tracheophyta
Subdivision	Spermatophytina
Classe	Magnoliopsida
Superordre	Asteranae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Hyssopus L
Espèce	Hyssopus officinalis L

III.1.3. Compositions chimiques et molécules bioactives

Connues pour l'essence aromatique qu'elles recèlent, il est bon de ne pas omettre que ces plantes, outre cette petite fraction aromatique (0,3 à 1 % maximum), sont constituées de bien d'autres composants : du tanin (5 %), de la gomme, de la résine, de la choline (2 %), un principe amer, la marrubiine, un rhamno-glucoside du nom d'hyssopine, de l'acide malique, les diterpènes dont lactone ; triterpènes avec acides oléanolique et ursolique ; flavonoïdes (diosmoside) ; acides phénols (acide rosmarinique) ; choline ; des sels minéraux (soufre, potassium, silice) (Hideyuki *et al.*, 2004).

III.1.4. Quelques propriétés d'hysope

Les feuilles d'hysope peuvent être utilisées pour différents usages :

- **Usage culinaire** : L'hysope est une plante aromatique qui peut être utilisée pour agrémenter à des salades, des sauces ou encore des soupes. Les feuilles et les fleurs d'hysope peuvent également être séchées avant d'être employées comme aromates pour parfumer des huiles et des vinaigrettes (Păun G *et al.*, 2020).

- **Usage thérapeutique** : Les feuilles et fleurs séchées peuvent également être utilisées pour réaliser une infusion d'hysope. En phytothérapie, celle-ci est préconisée pour ses vertus thérapeutiques contre la toux et certaines affections pulmonaires telles que les bronchites (Poswal *et al.*, 2019).

III.1.5. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des substances actives contre le stress oxydatif, qui ont la capacité de stabiliser les effets néfastes des radicaux libres dans le tissu. Les antioxydants naturels contenus dans l'hysope tels que les acides phenoliques ; les flavonoides et les terpernoïdes ont été largement étudiés pour leurs propriétés protectrices contre le stress oxydatif (Vlase *et al.*, 2014).

III.1.6. Synthèse des travaux antérieurs sur *Hyssopus officinalis* L.

Suite à sa commercialisation à travers les pays d'Europe et d'Asie, *Hyssopus officinalis* L. a suscité un intérêt à la communauté scientifique. De nombreuses recherches se sont ainsi focalisées sur les propriétés d'*Hyssopus officinalis* L. et plusieurs études médicinales ont permis de démontrer les effets bénéfiques de cette espèce botanique sur la santé.

L'étude réalisée *in vitro* par Tijana *et al.*, (2020) a montré que *Hyssopus officinalis* L. possède une teneur élevée en composés bioactifs principalement les alcaloïdes, la présence des composés phénoliques et une activité antioxydant modérée de l'extraits méthanoïques.

L'étude réalisée *in vitro* par Omid, (2006) en Serbie a montré que les feuilles d'hysope réduisent la glycémie, renforcent les capacités de l'estomac, traitent l'asthme, éliminent les infections et guérissent les blessures.

L'étude effectué *in vivo* par Hiroyuki *et al.*, (2003) Au Japon a montré l'effet inhibiteur de l'alpha-glucose de l'extrait d'hysope sur l'absorption intestinale des hydrates de carbone et sur l'hyperglycémie chargé en hydrates de carbone.

L'étude effectué *in vitro* par Mariana *et al.*, (2021) en Serbie a montré que les extraits méthanoliques, d'*Hyssopus officinalis* L. possèdent une activité antioxydant.

Au vu des travaux antérieurs, peu d'étude ont été menés en Afrique Central notamment au Cameroun, sur les différents extraits aqueux (infusion, décoction et macération) et extrait hydro-éthanolique d'hysope et sur l'évaluation de la capacité antioxydante et antihyperglycémiant de ces extraits.



CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

II.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal était constitué des feuilles séchées d'hysope (*Hyssopus officinalis* L.)



Figure 9 : Feuilles séchées d'*Hyssopus officinalis* L.

II.1.2. Matériel animal

Il était constitué de 30 rats blancs mâles de souche Wistar âgés de 07 à 08 semaines environ et pesant entre 120 et 180g.



Figure 10 : Photographie des rats blancs mâles de souche WISTAR

II.2. ECHANTILLONNAGE ET ANALYSES

II.2.1. Collecte des échantillons

Les feuilles d'hysope ont été collectés auprès de l'entreprise « FEUILLE D'HYSOPE » à Messassi de la ville de Yaoundé et identifiées à l'herbier national au N°103406/HNC. Après collecte, ils ont été acheminés au Laboratoire des Sciences Alimentaires et Métabolisme (LabSAM) de l'Université de Yaoundé 1 où ils ont été séchés, broyés et pesés. Des poudres obtenues, nous avons procédé aux différentes extractions aqueuses (infusion, décoction et macération) et hydro-éthanolique.

II.2.2. Extraction aqueuse des composés phénoliques

Elle a été effectuée par les techniques d'infusion, de décoction et de macération.

➤ **Extraction aqueuse par infusion**

L'infusion est une méthode d'extraction qui repose sur la dissolution des principes actifs des parties d'un végétal (feuilles, graine, tige, racine etc.) dans un liquide initialement bouillant. L'extraction par infusion a été effectuée selon la méthode décrite par **Sofowora, (2010)**. Pour cela 300g de poudre d'hysope ont été solubilisés dans 1500 mL d'eau distillée bouillante (100°C). Le mélange a été laissé sous agitation magnétique pendant dix minutes par la suite ce mélange a été filtré avec du papier Watmann N°4. Le processus a été repris avec le même résidu jusqu'à clarification du solvant d'extraction. Le filtrat obtenu a été lyophilisé et le lyophilisat récupéré a été conservé à 4°C pour la des analyses ultérieures

➤ **Extraction aqueuse par décoction :**

La décoction est une méthode d'extraction qui repose sur la dissolution des principes actifs des parties d'un végétal (feuilles, graine, tige, racine etc.) dans un liquide maintenu bouillant. L'extraction par décoction a été effectuée suivant la méthode décrite par **Pierre et Lis, (2007)**. Pour cela 300g de poudre d'hysope ont été solubilisés dans 1500 mL d'eau distillée. Le mélange a été porté à ébullition à 100°C pendant cinq minutes et après refroidissement il a été filtré avec du papier Watmann N°4. Le processus a été repris avec le même résidu jusqu'à clarification du solvant d'extraction. Le filtrat obtenu a été lyophilisé et le lyophilisat récupéré a été conservé à 4°C pour la des analyses futures

L'ensemble des protocoles d'extraction par infusion et décoction a été résumé par la figure 12 suivante.

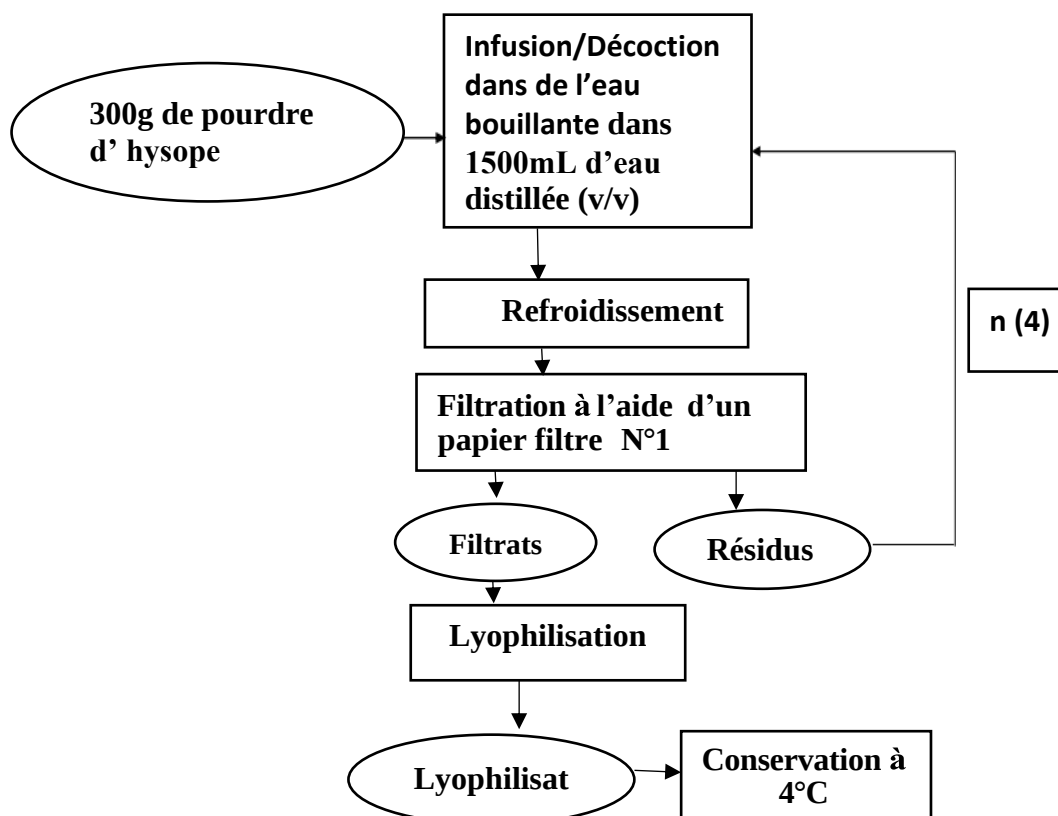


Figure 11 : Protocole de l'extraction aqueuse par épuisement (**Pierre et Lis, 2007**).

➤ **Extraction aqueuse par macération :**

La macération est une méthode d'extraction basée sur la dissolution des principes actifs des parties d'un végétal (feuilles, graine, tige, racine etc.) dans un solvant maintenu à froid. Elle a été effectuée suivant la méthode décrite par **Mukherjee *et al.*, (2014)**. Pour cela, 300 g de poudre ont été solubilisés dans 1500 mL d'eau distillée, le mélange a été agité pendant 12 heures et filtré avec du papier Watmann N°4. Le processus a été répété quatre fois avec le même résidu jusqu'à la clarification du solvant d'extraction. Le filtrat obtenu a été lyophilisé et le lyophilisat conservé à 4°C pour la suite des analyses. Le protocole de macération aqueuse est le même que celui de l'extraction hydro-éthanolique (figure 13) Avec comme solvant de l'eau distillée.

II.2. 3. Extraction hydro-éthanolique (70/30 ; V/V)

L'extraction des composés phénoliques a été effectuée suivant la méthode décrite par **Mukherjee *et al.*, (2014)**. Pour cela, 200 g de poudre d'hysope ont été solubilisés dans 1000 mL du mélange de solvant Eau/éthanol (70%). Le mélange a été agité pendant 1 heures et filtré avec du papier Watman N°1. Le processus a été répété quatre fois jusqu'à épuisement. Les filtrats obtenus ont été mélangés et portés au lyophilisateur à 50°C jusqu'à évaporation complète du solvant. Le filtrat obtenu a été lyophilisé et le lyophilisat conservé à 4°C pour la suite des analyses.

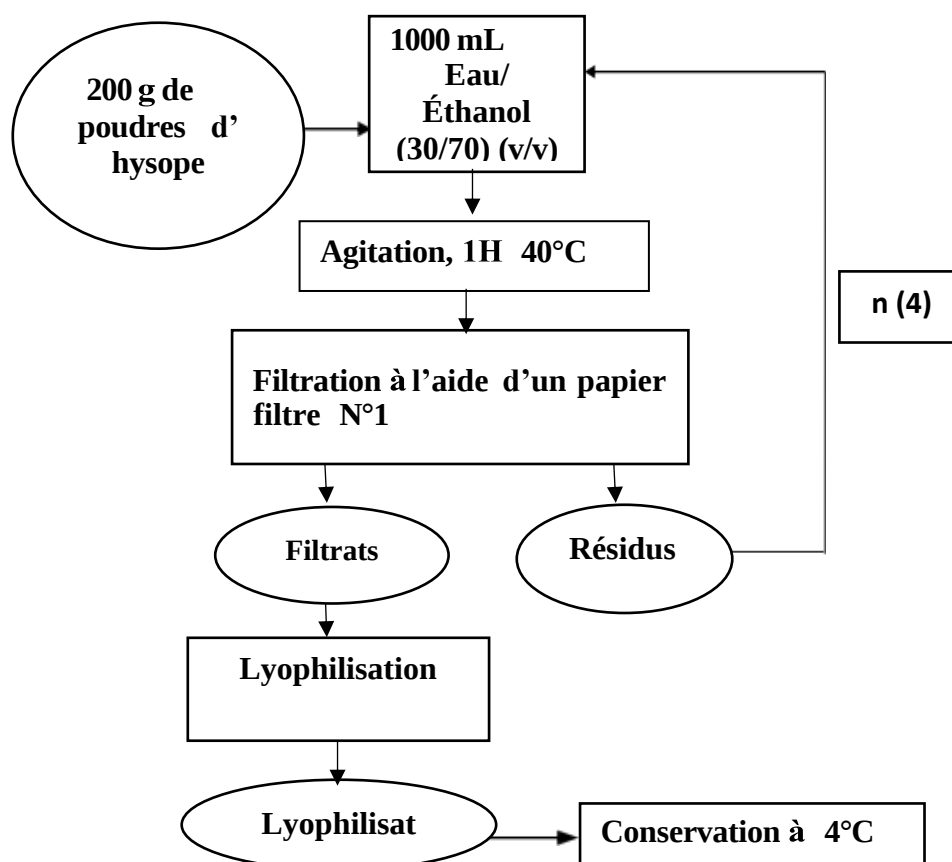


Figure 12 : Protocole de l'extraction hydro-éthanolique (70%) par épuisement (**Mukherjee *et al.*, 2014**)

Le rendement d'extraction pour chaque échantillon a été calculé à partir de la formule suivante

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de l'extrait sec final}}{\text{Masse de la matière sèche initiale}} \times 100$$

II.2.4. Dosage des composés phénoliques totaux des différents extraits.

Le dosage des composés phénoliques totaux a été effectué par la méthode de **Folin-Ciocalteu** tel que décrit par **Vinson *et al.*, (1998)**.

■ Principe

Il est basé sur la réduction en milieux alcalin du mélange phosphotungstique (WO_4^{2-})-phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation d'un mélange d'oxydes bleu-vert. Ce produit présente un maximum d'absorption à 765 nm. L'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans l'échantillon.

■ Mode opératoire

Un volume de 2mL de chaque extrait a été mélangé avec 2mL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 5min d'incubation, 2 mL de carbonate de sodium à concentration 10% y ont été ajoutés. Après 15min d'incubation du mélange réactionnel à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 765nm. Les essais ont été fait en triplicate et la teneur en composés phénoliques a été exprimée en mg EAG/g d'échantillon. Cette teneur a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant l'équation de régression (annexe 3). Le tableau décrivant les différentes étapes de ce processus se trouve à l'annexe 4.

■ Expression des résultats

Les manipulations ont été faites triplicate. Les teneurs en composés phénoliques ont été calculées à partir d'une courbe d'étalonnage (**DO= f(Cp)**) (annexe 3) obtenu de l'acide gallique pris comme standard en utilisant l'équation de la droite de régression linéaire suivante : **Y= aX + b**

Où Y représente les densités optiques (DO) des solutions ;

X représente les teneurs en composés phénoliques ;

(A) est la pente de la droite ;

(Cp) représente les concentrations pondérales. Les teneurs en composés phénoliques étaient exprimées en mgEAG/g de poudre d'échantillon.

II.2.5. Activité antioxydante *in vivo* sur les rats mâles

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

❖ Modèle animal

Le dispositif expérimental était constitué de trente cinq (35) rats mâles de souche *Wistar* âgés environ de 08 semaines et pesant en moyenne entre 150 et 200g. Ces animaux ont été élevés dans des cages en plastiques au Laboratoire d'Etudes Précliniques Animales et Pharmacotoxicologiques Approfondies de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I. Les rats ont été acclimatés pendant une semaine et ont eu libre accès à l'eau. Ils étaient nourris régulièrement à l'aide d'une diète normale composée comme suit : farine de maïs, farine d'arachide, farine de poisson, farine de blé et farine de soja. Après acclimatation, les rats ont été répartis en 7 groupes de 5 rats. Le naphthalène à la concentration de 110 mg/kg a été utilisé comme substance induisant le stress oxydatif chez ces rats. Il se présente sous forme de cristaux blanc de formule brute $C_{10}H_8$ et de masse molaire $128,1705 \pm 0,008$ g/mol. La manipulation a été effectuée sur une période de 15 jours allant du jour 1 (prise des paramètres) au jour 15 (jour du sacrifice). Les conditions d'expérimentation ont été en accord avec la ligne 420 de l'OCDE adoptée en 2001.

❖ Considération éthique

Pour mener ces travaux sur les rats une clairance éthique N°BTC-JIRB 2022-046 a été obtenue auprès de « Joint Institutional Review Board for Animal & Human Bioethics (JIRB) ».

II.2.5.1. Protocole expérimental du test préventif du stress oxydatif chez les rats

L'expérimentation a été effectuée selon le protocole décrit par Feudjio *et al.*, (2019). Les animaux ont été pesés à l'aide d'une balance et le gavés à l'aide d'une sonde à gavage œsophagienne préalablement stérilisée à raison d'une dose de 110mg/kg de naphthalène dilué dans de l'huile d'olive administrés chaque jour pendant deux semaines. Le volume administré a été calculé par la formule ci-dessous :

$$\text{Volume (mL)} = \frac{\text{Dose (mg/kg)} \times \text{Poids(Kg)}}{\text{Concentration Pondérale (mg/ml)}}$$

Les rats ont été divisés en 7 groupes de 5 rats chacun et traités comme décrit dans le tableau III. Un contrôle sain ayant reçu 1mL d'eau, un contrôle négatif ayant reçu 1mL d'eau + 110mg/kg de naphthalène après 2h, un contrôle positif ayant reçu 50mg/kg d'acide galique + 110mg/kg de naphthalène après 2h, les différents groupes tests ayant reçu respectivement IH, DH, MH, HEH + 110mg/kg de naphthalène après 2h.

Tableau III : Protocole expérimental de l'induction du stress oxydatif chez les rats.

Groupes	Gestion préventive
Contrôle sain	Administration de 1mL d'eau
Contrôle négatif	1mL d'eau + 110mg/kg de naphtalène après 2h
Contrôle positif	AG 50mg/kg + 110mg/kg de naphtalène après 2h
Extrait infusé	200mg/kg IH +110 mg/kg de naphtalène après 2h
Extrait décocté	200mg/kg DH +110 mg/kg de naphtalène après 2h
Extrait macéré	200mg/kg MH +110 mg/kg de naphtalène après 2h
Extrait hydroéthanolique	200mg/kg HEH+110 mg/kg de naphtalène après 2h

AG = Acide gallique ; IH= Infusion d'hysope ; DH= Decoction d'hysope ;
MH= Macération d'hysope ; HEH= Hydroéthanolique d'hysope

❖ Sacrifice des animaux

A la fin de l'expérimentation animale, les animaux, soumis au préalable à un jeun, ont été sacrifiés et le sang a été recueilli dans les tubes secs pour la préparation du sérum. Les reins et les foies ont été prélevés par dissection et conservés dans le formol pour des analyses ultérieures.

II.2.5.2. Préparation du sérum

Le sang collecté dans des tubes secs a été séparé par centrifugation pendant 30 min à 3000g. Le sérum a été récupéré, aliquoté puis conservé dans des tubes Eppendorf à 4 °C pour des analyses biochimiques ultérieure.

II.2.5.3. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines a été effectué suivant la méthode décrite par **Lowry et al., (1951)**.

■ Principe

En milieu basique, le tartrate double de sodium et de potassium forment avec les ions cuivriques un complexe bleu-violet absorbant à 750 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en protéine dans la solution.

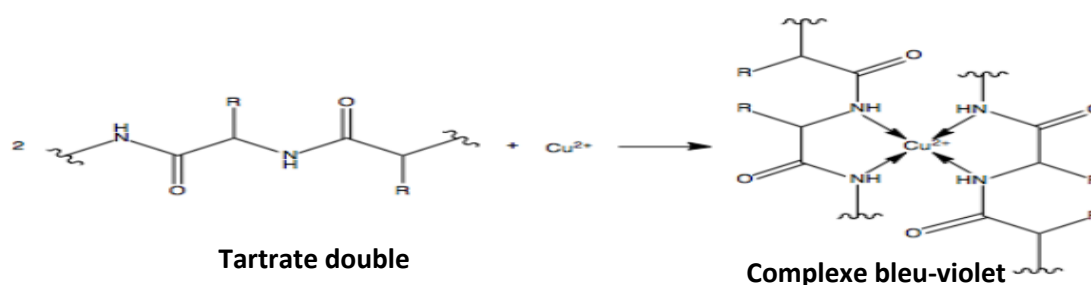


Figure 13 : Mécanisme réactionnel du dosage des protéines totales entre le tartrate double et les ions cuivriques (Lowry *et al.*, 1951).

■ Mode opératoire

Un volume de 100 μL de sérum, 300 μL d'eau distillée, 2 mL de réactif D (Sulfate de cuivre, NaOH, Tartare double de sodium et de potassium) ont été introduits dans chaque tube à essai. Dans le tube témoin, 400 μL d'eau distillée et 2 mL de réactif D ont été introduit. Après incubation des tubes pendant 10 min à température ambiante, 400 μL de réactif de Folin ont été ajoutés. L'ensemble des tubes a été incubé pendant 30 min et la densité optique a été lue à 750 nm contre le blanc. Le tableau décrivant les différentes étapes de ce processus se trouve à l'annexe 4. La concentration des protéines dans les tubes tests a été déterminée en se servant de la courbe d'étalonnage (annexe 3).

■ Expression des résultats

Les concentrations en protéines totales ont été déterminées à partir de la courbe d'étalonnage (annexe 4) du BSA ($\text{DO} = f(\text{Cp})$) en utilisant l'équation de la droite de régression linéaire suivante : $Y = aX$ (annexe 5)

Où (Y) représente les densités optiques (DO) des solutions ;

(X) représente la concentration pondérale (Cp) en BSA ;

(a) est la pente de la droite ;

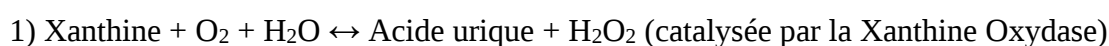
Les teneurs de protéines obtenues ont été exprimées en $\mu\text{g/mL}$.

II.2.5.4. Dosage du superoxyde dismutase (SOD)

La détermination de l'activité de la superoxyde dismutase a été effectuée suivant la méthode décrite par Misra et Fridovich, (1972).

■ Principe

La présence de SOD dans un échantillon inhibe l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome. L'activité enzymatique de la SOD est mesurée indirectement par la mesure du colorant Formazan formé. Le principe du dosage est basé sur les réactions suivantes :



2) INT 2-(4-iodophenyl) -3-(4-nitrophenyl) -5-phenyl-2H-tetrazolium chloride ($O_2^{\cdot-}$) $\rightarrow$ Colorant Formazan.

3) $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ (catalysée par la superoxyde dismutase).

L'augmentation de l'absorbance d'adrénochrome qui est proportionnelle à l'activité de la SOD a été notée entre 20 et 80 secondes à 480 nm.

■ Mode opératoire

Dans une cuve à spectrophotométrie, ont été introduits 134 μ L de sérum et 1666 μ L de tampon carbonate (0,05M, pH 10,2). Après avoir calibré le spectrophotomètre, on déclenche la réaction en ajoutant 0,2 mL d'adrénaline (0,3 mM) au mélange réactionnel. Ce mélange a été homogénéisé par inversion rapide de la cuve. L'augmentation de l'absorbance a été notée à 20 et 80 secondes à 480 nm. Dans la cuve du témoin, a été mis 1666 μ L de tampon carbonate, 0,2 mL de solution d'adrénaline et 134 μ L d'eau distillée. Le tableau décrivant les différentes étapes de ce processus se trouve à l'annexe 4.

❖ Calcul de la concentration en SOD

L'activité spécifique de la SOD a été évaluée en unité de SOD/mg de protéines. Une unité de la SOD a été définie comme la quantité de SOD nécessaire pour causer une inhibition de 50% de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome pendant 1min.

■ Expression des résultats

$\Delta Abs/min = (Abs_{80sec} - Abs_{20sec}) / 2$; (Abs= absorbance)

% inhibition = $100 - (\Delta Abs_{essai} / \Delta Abs_{blanc} \times 100 \text{ min}^{-1})$

50% d'inhibition = 1 unité

X% d'inhibition = Y unités

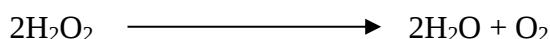
Activité spécifique de SOD = $X\% \times Fd / (50\% \times V)$ (unité de SOD/ mL de sérum), avec Fd comme facteur de dilution et V le volume utilisé.

II.2.5.5. Dosage de la catalase

La détermination de l'activité de la catalase a été effectuée selon la méthode décrite par Sinha, (1972).

■ Principe

Le peroxyde d'hydrogène qui est rompu en présence de la catalase se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu vert d'acide perchlorique instable, qui est ensuite détruit par la chaleur pour former un complexe vert absorbant à 570 nm. L'activité de la catalase est proportionnelle à la densité optique du complexe formé qui est déterminée par une courbe d'étalonnage. Ce principe est basé sur la réaction suivante :



■ Mode opératoire

Dans chaque tube à essai, 50 μL de sérum et 750 μL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5) ont été introduit. Le chronomètre a été déclenché après ajout de 200 μL de solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (50 mM) puis stopée 1 minute après par ajout de 2 mL de la solution de dichromate de potassium/acide acétique. Dans le tube témoin, a été introduit 800 μL de tampon phosphate (0,1M, pH 7,5). L'ensemble des tubes a été chauffé à 100°C pendant 10min et après refroidissement, la densité optique a été lue à 570 nm. Le tableau décrivant les différentes étapes de ce processus se trouve à l'annexe 4. La quantité de peroxyde d'hydrogène a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (annexe 3) et l'activité spécifique de la catalase a été exprimée en μM de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéine.

■ Expression des résultats

Les concentrations en catalase ont été déterminées à partir de la courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène ($\text{DO} = f(\text{C})$) en utilisant l'équation de la droite de régression linéaire suivante : $\text{Y} = \text{aX}$ (annexe 3).

Où (Y) représente les densités optiques (DO) des solutions ;

(X) représente les concentrations en peroxyde d'hydrogène ;

(a) est la pente de la droite ;

Les teneurs en catalase obtenues ont été exprimées en mM de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mL}$ de sérum.

II.2.5.6. Dosage du glutathion

La détermination de l'activité du glutathion a été effectuée selon la méthode décrite par Ellman, (1959).

■ Principe

L'acide 2,2-dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements SH du glutathion formant un complexe coloré jaune qui absorbe à 412 nm.

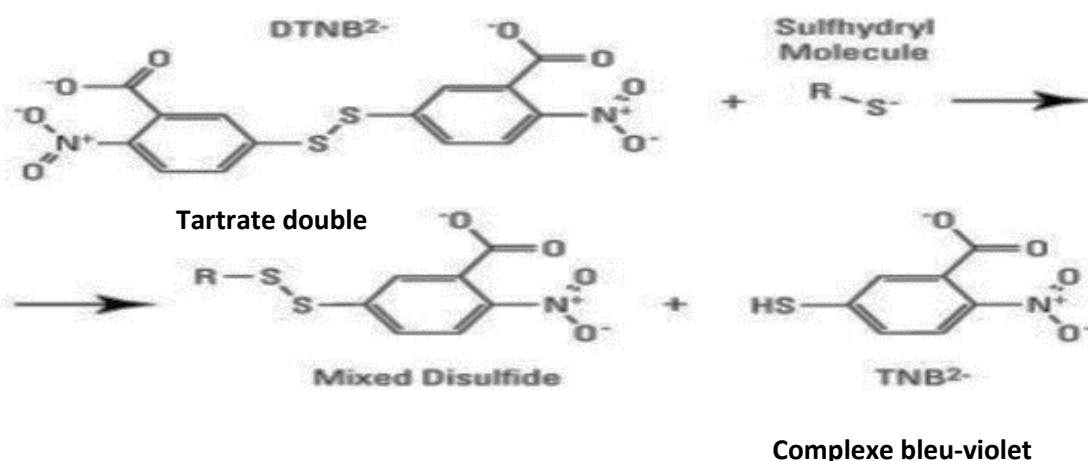


Figure 14 : Mécanisme réactionnel du dosage du glutathion entre le DTNB et les groupements (-SH) du glutathion

■ Mode opératoire

Dans un tube à essai 0,02 mL sérum et 3 mL de réactif d'Ellman ont été introduit. Après agitation au vortex, nous avons laissé la coloration se développer pendant 60. Dans le tube contrôle, a été introduire 0,02 mL de tampon Tris- HCL 50 mM, KCL 150 mM, pH 7,4 et 3 mL de réactif d'Ellman. L'absorbance de chaque tube a ensuite été lue à 412 nm contre le blanc. Le tableau décrivant les différentes étapes de ce processus se trouve à l'annexe 4.

■ Expression des résultats

Les concentrations en groupement -SH ont été déterminées en utilisant la formule suivante :

$$[\text{GSH}] = \frac{\text{DO essai}}{\epsilon \cdot L \cdot \text{Cp} \cdot V}$$

Où (ϵ) représente le coefficient d'extinction molaire du TNB = $1,36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

(L) représente la longueur de la cuve (1cm)

(Cp) représente la teneur en protéines totales

(V) représente le volume prélevé pour le dosage

Les résultats obtenus ont été exprimés en $\mu\text{mol/g}$ de protéines.

II.2.5.7. Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

La détermination de l'activité de la MDA a été effectuée selon la méthode décrite par **Ohkawa *et al.*, (1979)**.

■ Principe

La méthode utilisée pour le dosage du MDA est celle d'**Ohkawa *et al.*, (1979)**. Elle repose sur la réaction en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules de TBA, pour former un pigment rose absorbant à 532 nm, extractible par le butanol.

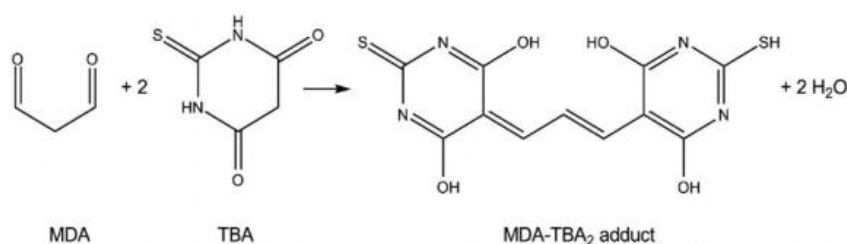


Figure 15 : Mécanisme réactionnel du principe du dosage du MDA

■ Mode opératoire

Un volume de 200 μL de sérum ou d'eau distillée a été introduit dans les tubes essai et blanc respectivement. Ensuite, 200 μL de SDS 8,1%, puis 1500 μL d'acide acétique 20%, pH 3,5 ajusté avec le NaOH 10N, 1500 μL de réactif de TBA 0,8% et 600 μL d'eau distillée ont été ajoutés dans chacun des tubes et fermés hermétiquement. Les tubes ont été passés au vortex pendant 30 secondes. Le mélange a été chauffé au bain marie bouillant pendant 60 min et la réaction a été stoppée avec de

l'eau froide. Après refroidissement dans un bain d'eau froide pendant 30min en laissant les tubes ouverts, 1 mL d'eau distillée et 4 mL de butanol ont été rajouté et les tubes ont été passé au vortex pendant 30 secondes. L'absorbance du surnageant (phase organique) a été obtenue après centrifugation du mélange à 1000g/min pendant 10min et lue à 532nm contre le blanc. Le contenu a été exprimé en nmole/mg de protéines. Le tableau décrivant les différentes étapes de ce processus se trouve à l'annexe 4.

■ Expression des résultats

Les concentrations en Malonedialdéhyde ont été calculées à partir de la formule suivante :

$$[\text{MDA}] = \frac{\text{DO essai}}{\epsilon \cdot L \cdot \text{Cp} \cdot V}$$

Où (ϵ) représente le coefficient d'extinction molaire = $1,56 \cdot 10^5 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}$

(L) représente la longueur de la cuve (1cm)

(Cp) représente la teneur en protéines totales

(V) représente le volume prélevé pour le dosage

Les résultats obtenus ont été exprimés en $\mu\text{mol/g}$ de protéines

II.2.6. Evaluation des propriétés antihyperglycémiques des extraits aqueux et hydroéthanolique d'hysope *in vivo*

II.2.6.1. Effets des différents extraits aqueux et hydro-éthanolique sur les rats normoglycémiques

Il a été effectué par la méthode décrite par **Moukette *et al.*, (2017)** pour tester l'effet des différents extraits sur les rats normaux.

■ Principe biochimique du dosage du glucose avec le glucomètre OneTouch et les bandelettes

Le principe du test OneTouch est basé sur le fait que le glucose de l'échantillon de sang est mélangé à des produits chimiques spéciaux dans la bandelette de test et qu'un petit courant électrique est produit. L'intensité de ce courant varie en fonction de la quantité de glucose présente dans l'échantillon sanguin. Le lecteur mesure le courant, calcule le taux de glucose dans le sang, affiche les résultats et les stocke dans la mémoire (**Olaniru *et al.*, 2019**).

■ Mode opératoire

Pour cette étude, 30 rats ont été utilisés et repartis en 6 groupes de 5 rats traité comme suit

Tableau IV : Protocole expérimentale du test normoglycémie provoqué par voie orale en présence ou en absence des extraits aqueux et hydroéthanolique d'*Hyssopus officinalis* L.

Groupes	Description
1	Témoin négatif : qui reçoit de l'eau distillée (10 ml/kg PC).
2	Témoin positif : Rats traités avec la metformine (substance de référence) à la dose de 120mg/kg de PC.
3	Rats traités avec IH à la dose de 200 mg/kg de PC.
4	Rats traités avec DH à la dose de 200 mg/kg de PC
5	Rats traités avec MH à la dose de 200 mg/kg de PC
6	Rats traités avec HEH à la dose de 200 mg/kg de PC

IH= Infusion d'hysope ; DH= Decoction d'hysope ; MH= Macération d'hysope ; HEH= Hydroéthanolique d'hysope

Après 18 heures de jeûne dans le but d'accélérer la vidange gastrique. La glycémie est relevée 30 minutes plus tard après traitement et par intervalle de 30 minutes pendant 90 minutes à l'aide d'un glucomètre. Les queues des rats ont été piquées à l'aide d'une lancette à sang stérile pour obtenir des gouttes de sang. Les premières gouttes ont été essuyées à l'aide d'un coton et la deuxième goutte a été utilisée pour mesurer le taux de glucose. Une goutte de sang a été déposée sur la pointe de la bande réactive, l'autre extrémité étant insérée dans le glucomètre jusqu'à ce que la fenêtre de confirmation soit complètement recouverte de sang (par migration).

■ Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme de variations glycémiques qui est la représentation des glycémies en fonction du temps.

II.2.6.2. Etude de l'effet des extraits aqueux et hydro-éthanolique sur la capacité du pancréas à réguler la glycémie : (Glucotolérance préventif)

■ Principe

Un test de glucotolérance préventif a été effectué suivant la méthode décrite par **Etame-Loe et al., (2018)** dans le but d'évaluer la capacité régulatrice de l'organisme vis-à-vis d'une surcharge glucidique (sécrétion de l'insuline) ou la rapidité avec laquelle le glucose est éliminé du sang. Ce test est utilisé pour évaluer le diabète, la résistance à l'insuline, l'altération de la fonction des cellules bêta, l'hypoglycémie réactive, l'acromégalie et d'autres troubles du métabolisme des glucides. Ainsi l'évolution de la glycémie au cours du temps des rats ayant reçu les extraits à ceux ayant reçu un hypoglycémiant de référence (la Metformine) et l'eau ont été comparés.

■ Protocole expérimental

Trente (30) rats mâle blanc Wistar de poids compris entre 150-200g ont été repartis en 6 groupes de 5 rats et mis à jeûne 18h à la veille et traités comme suit (Tableau V) :

Tableau V : Protocole expérimentale du test de glucotolérance préventif provoqué par vois orale en presence ou en absence d'extraits aqueux et hydroéthanolique d' *Hyssopus officinalis* L.

Groupes	Description
1	Témoin négatif : Rats normaux ayant reçus de l'eau distillée+glucose (3g/kg de PC)
2	Témoin positif : Rats normaux traités avec 120mg/kg de PC de metformine+glucose (3g/kg de PC)
3	Rats normaux traités avec 200mg/kg de PC de IH+glucose (3g/kg de PC)
4	Rats normaux traités avec 200mg/kg de PC de DH+glucose (3g/kg de PC)
5	Rats normaux traités avec 200mg/kg de PC de MH+glucose (3g/kg de PC)
6	Rats normaux traités avec 200mg/kg de PC de HEH+glucose (3g/kg de PC)

IH= Infusion d'hysope ; DH= Decoction d'hysope ; MH= Macération d'hysope ; HEH= Hydroéthanolique d'hysope

■ Mesure de la glycémie

Une légère incision a été faite au niveau du bout distal de la queue permettant de collecter le sang pour la détermination de la glycémie. Une glycémie de base a été mesurée avant administration des différents produit (extraits et glucose) à l'aide d'un glucomètre de marque *One Touch* et des bandelettes réactives. Juste après la glycémie de base, l'extrait a été administré par gavage 30 min avant administration du glucose. Par la suite, la glycémie a été successivement déterminée aux instants 30min, 60min, 90min et 120min. Tous les animaux ont été maintenus à jeûne durant toute l'expérience.

■ Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme de variations glycémiques qui est la représentation des glycémies en fonction du temps.

II.2.6.3 Etude de l'effet des extraits aqueux et hydro-éthanolique chez les rats ayant préalablement reçu une concentration de glucose (Test de glucotolérance curatif)

■ Mode opératoire

Un test d'hyperglycémie provoquée par voie orale a été effectué suivant la méthode décrite par **Etame-Loe et al., (2018)**. L'échantillonnage est le même que pour les rats prétraités. Cependant, dans

cette série d'expérience, les différents lots de rats reçoivent les différents extraits (200mg/kg de PC) ou la metformine (120 mg/kg de PC) 30 minutes après l'induction de l'hyperglycémie par gavage de 3g/kg de PC de glucose. La glycémie des rats de chaque groupe est mesurée juste avant l'administration du glucose puis à des intervalles de 30 minutes, pendant 2 heures.

■ Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme de variations glycémiques qui est la représentation des glycémies en fonction du temps.

II.2.7. Evaluation de l'effet non insulinosensibilisateur : Aptitude des extraits à agir sur la capture du glucose par les levures *in vitro*

L'effet a été réalisé par la méthode de **Cirillo V, (1962)**.

■ Principe

Il repose sur l'entrée du glucose dans les cellules de levures à travers leur membrane il s'ensuit une diminution de la quantité de glucose dans le milieu réactionnel. Le glucose restant sera dosé à l'aide du réactif de glucose.

■ Mode opératoire

Les cellules de la levure ont été préparées selon la méthode de **Cirillo (1962)**. 4g de la levure de boulangerie commerciale a été lavé par centrifugation répétée (3000g, 5min) dans de l'eau distillée jusqu'à ce que le surnageant fluide était claire et une suspension de 10% (v/v) a été préparée dans de l'eau distillée. Différentes concentrations des extraits ont été ajoutées à 1mL de la solution de glucose à 25mM et incubés pendant 10min à 37°C. La réaction a été initiée par addition de 100µL de la suspension de levure. Chaque tube est homogénéisé à l'aide du vortex et incubé à 37°C pendant 60min. Les tubes ont été ensuite centrifugés à (3000g, 5min) et le glucose dans le surnageant a été estimé en mesurant l'absorbance à 520nm.

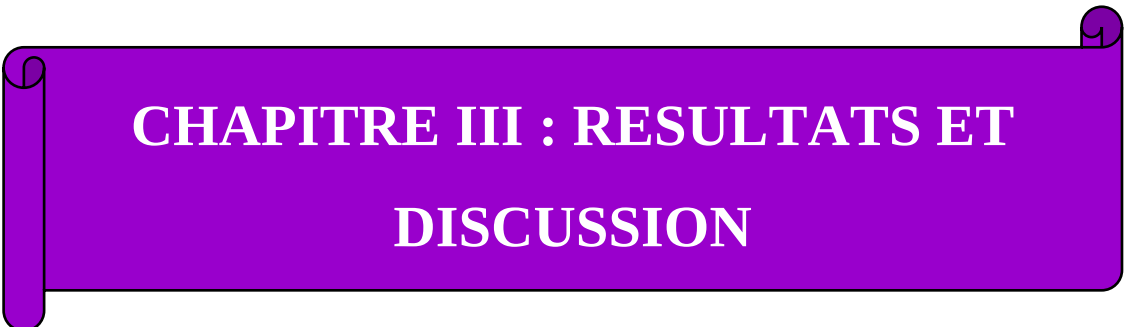
■ Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme de variation de capture qui est la représentation de l'absorption du glucose en fonction de la concentration en extrait.

II.3. Analyse Statistique

L'analyse des données a été effectuée par le logiciel IBM/SPSS 20.0 pour Windows en utilisant le test ANOVA suivi du pos hoc test turkey pour comparer les moyennes. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard avec un seuil de significativité de 5%. Le logiciel Microsoft Office Excel 2016 a été utilisé pour les calculs et les représentations graphiques.

Cette méthodologie a permis d'obtenir un certain nombre de résultats.



CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III .1.1. Rendement des différentes extractions aqueuses et hydro-éthanoliques d'*Hyssopus officinalis* L.

Le tableau VI ci-contre présente les rendements des différentes extractions des feuilles d'*Hyssopus officinalis* L.

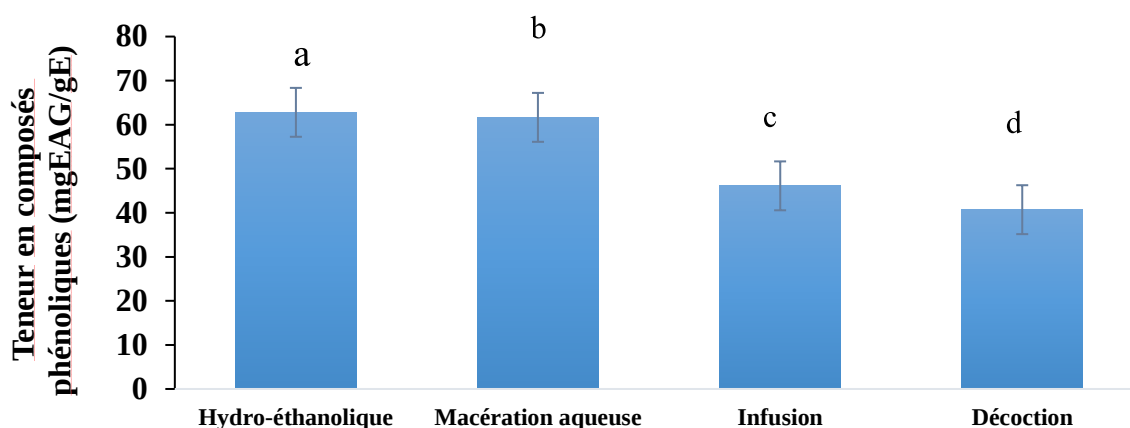
L'extrait hydro-éthanolique a présenté le rendement le plus élevé (21% m/m). Cependant, des trois méthodes d'extraction aqueuse utilisées la méthode par infusion a présenté le plus grand rendement d'extraction (9 % m/m).

Tableau VI : Rendement des différents extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* L.

Extraits d'hysope	Masses d'extraits en g	Rendement en %
Infusion	18,2	9,1
Décoction	17	5,66
Macération	13 ,6	4,5
Hydro-éthanolique	63	21

III.1.2. Teneur en composés phénoliques totaux des différents extraits

Les résultats des teneurs en composés phénoliques des différents extraits sont représentés par la figure 17. Ils ont montrés que les teneurs en composés phénoliques variaient de $48,132 \pm 0,1$ à $42,620 \pm 0,0$ mgEAG/gE respectivement pour les extraits issus de l'infusion et de la décoction. Quant aux teneurs en composés phénoliques des extraits issus des macérations aqueuse et hydroéthanolique, elles variaient de $60,642 \pm 0,0$ à $64,789 \pm 0,0$ mgEAG/gE respectivement. Cependant les valeurs obtenues étaient significativement différentes ($P < 0,05$) entre elles.



Différents extraits des feuilles d'*Hyssopus officinalis* L.

Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

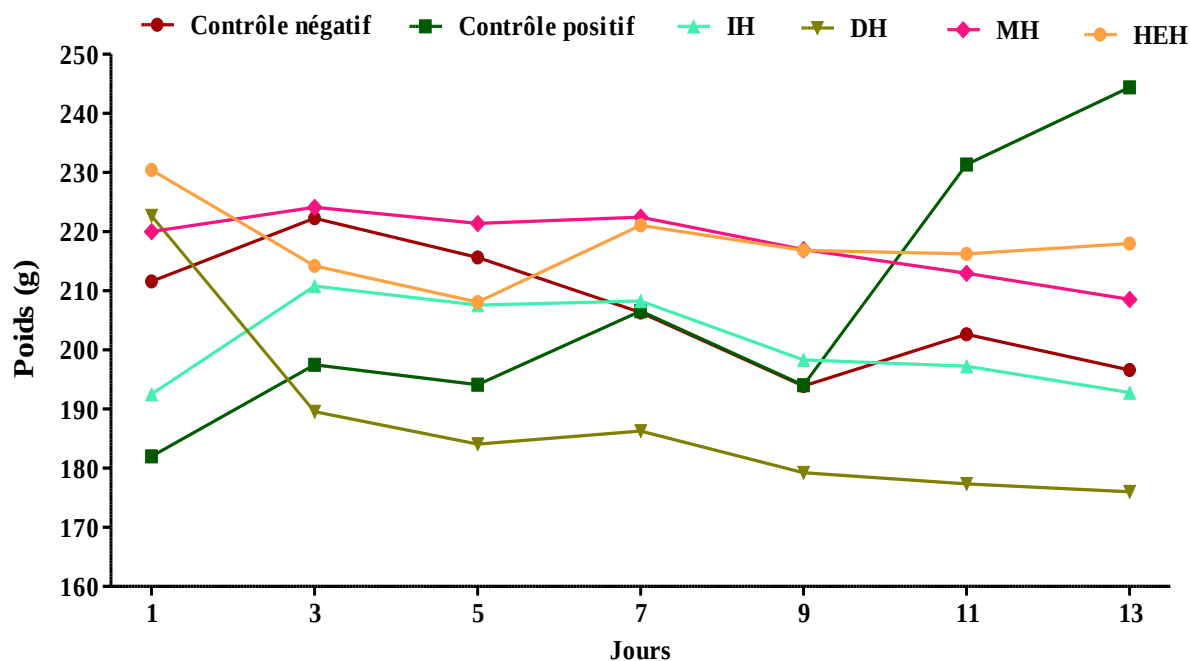
Figure 16 : Teneurs en composés phénoliques totaux des différents extraits

III.1.3. Etude des propriétés antioxydantes *in vivo*

L'étude des propriétés antioxydantes *in vivo* des différents extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. chez les rats a été faite à travers leurs effets sur les taux de protéines totales, de malondialdéhyde, de glutathion et sur les activités de la superoxyde dismutase et de la catalase. Au cours de l'expérimentation, l'évaluation de quelques paramètres, a également été prise en compte à savoir l'évolution pondérale, la prise alimentaire, prise hydrique et l'évaluation du poids des organes tels que : le cerveau, le foie, le cœur, le poumon, la rate et les reins.

III.1.3. 1. Evolution pondérale des animaux

La courbe de la figure 17 ci-dessous présente l'évolution pondérale des rats soumis au stress oxydatif par le naphthalène et précédée de l'administration des extraits de la plante et de l'acide gallique utilisé comme référence. On a noté une régression de l'évolution du poids dans tous les groupes de rats excepté le groupe contrôle positif ayant reçu l'acide gallique.

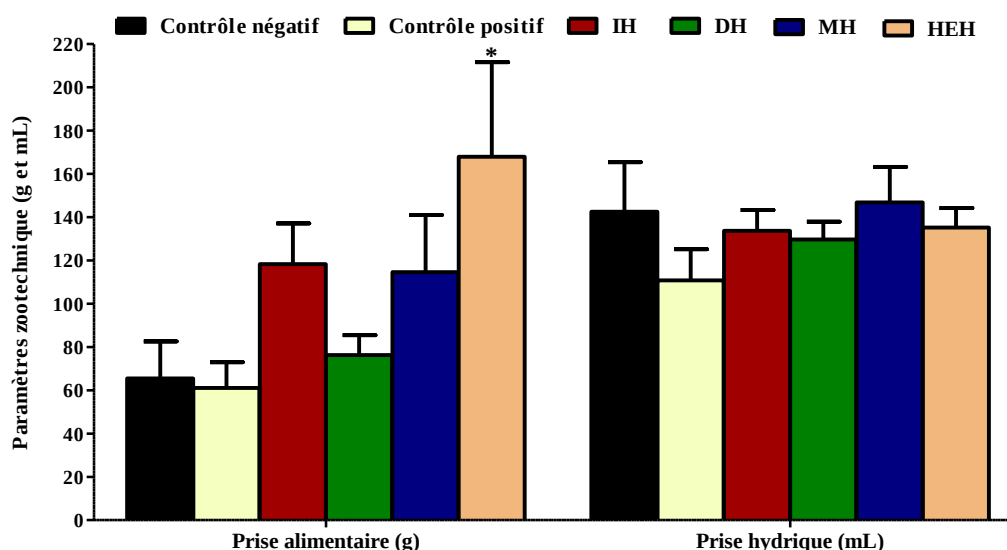


IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope

Figure 17 : Variation pondérale des rats soumis au stress oxydatif par le naphtalène.

III.1.3. 2. Prises alimentaires et hydriques

L'administration des extraits suivie de celle du naphtalène après 2 heures, entraîne une augmentation non significative des prises alimentaires et hydriques dans les groupes ayant reçus les extraits issus de l'infusion (IH), de la décoction (DH) et de la macération (MH). Par ailleurs une augmentation significative ($p < 0,05$) de la prise alimentaire du groupe ayant reçu l'extrait hydroéthanolique (HEH) a été observé comparativement aux autres groupes. Cependant on a noté une diminution non significative ($p > 0,05$) des prises alimentaires et hydriques par le groupe utilisé comme contrôle positif ayant reçu l'acide gallique.



*IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope. * affectées représente la significativité ($p < 0,05$).*

Figure 18 : Prises alimentaires et hydriques des rats soumis au stress oxydatif par le naphthalène et ayant reçus les différents extraits.

III.1.3. 3. Evaluation du poids des organes des rats

Le tableau VII ci-dessous présente l'analyse comparative du poids des organes (cerveau, foie, cœur, poumon, rate et reins) des rats soumis au prétraitement des extraits aqueux et hydroéthanolique suivi de l'administration du naphthalène 2 h après. On n'a pas observé de modification majeure de la structure des organes. Aucune différence significative ($p > 0,05$) du poids n'a été relevée entre les différents groupes de rats.

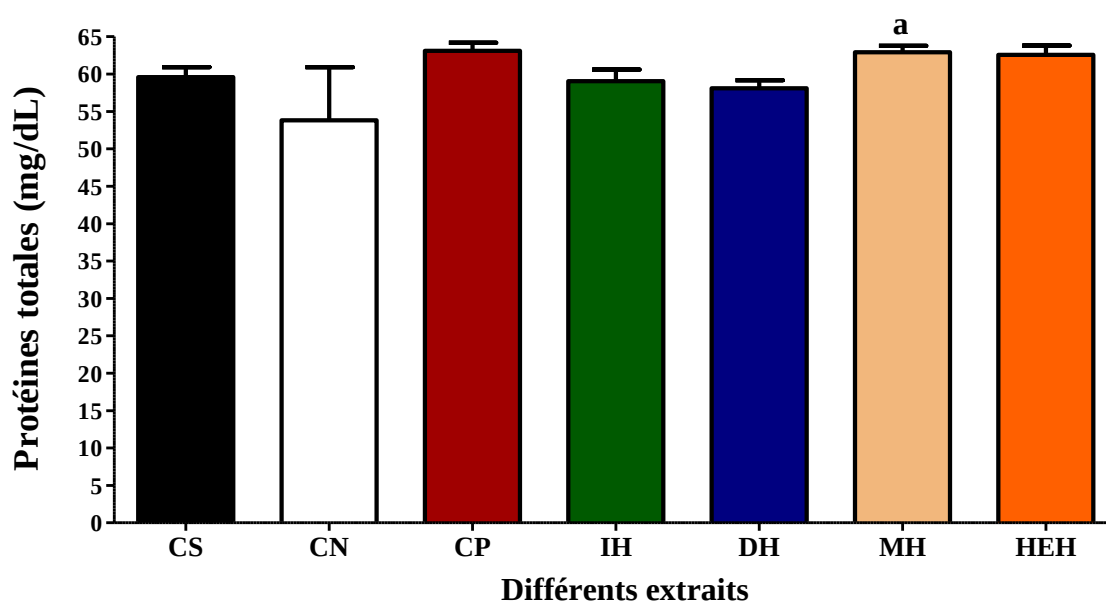
Tableau VII : Récapitulatif du poids (g) des organes des rats soumis au stress oxydatif par le naphthalène.

Groupe	Cerveau	Foie	Cœur	Poumon	Rate	Rein	
						Gauche	Droit
CN	0,88 ± 0,48	3,58 ± 0,22	0,46 ± 0,16	1,45 ± 0,79	0,35 ± 0,01	0,47 ± 0,25	0,44 ± 0,20
CP	0,65 ± 0,08	3,72 ± 0,20	0,35 ± 0,04	0,81 ± 0,08	0,37 ± 0,01	0,33 ± 0,05	0,35 ± 0,02
IH	0,66 ± 0,16	3,59 ± 0,42	0,34 ± 0,07	1,37 ± 0,22	0,36 ± 0,08	0,34 ± 0,03	0,31 ± 0,01
DH	0,83 ± 0,11	3,46 ± 0,17	0,36 ± 0,05	1,17 ± 0,17	0,36 ± 0,13	0,36 ± 0,09	0,35 ± 0,07
MH	0,72 ± 0,12	3,27 ± 0,38	0,38 ± 0,02	1,00 ± 0,06	0,38 ± 0,11	0,33 ± 0,04	0,35 ± 0,02
HEH	0,77 ± 0,12	3,74 ± 0,53	0,35 ± 0,04	0,87 ± 0,11	0,36 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,35 ± 0,02

CN= Contrôle négatif, CP= Contrôle positif, IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH=Hydroéthanolique d'hysope.

III.1.3.1. Effet des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. sur les taux de protéines totales

Les taux de protéines totales obtenus après administration des extraits de feuilles d'*Hyssopus officinalis* L. suivi de celle du naphthalène 2 h après chez les groupes de rats sont représentés par la figure 19 ci-contre. Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les taux de protéines obtenus avec le groupe contrôle sain (CS) ($59,60 \pm 2,9 \text{ mg/dL}$) n'ayant reçu que de l'eau distillée et le groupe contrôle négatif (CN) ($53,81 \pm 10,0 \text{ mg/dL}$) n'ayant reçu que du naphthalène. Après administration des différents extraits il y'a eu une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux de protéines sérique ($62,94 \pm 1,8 \text{ mg/dL}$) chez le lot de rats ayant reçu l'extrait obtenu par macération aqueuse.



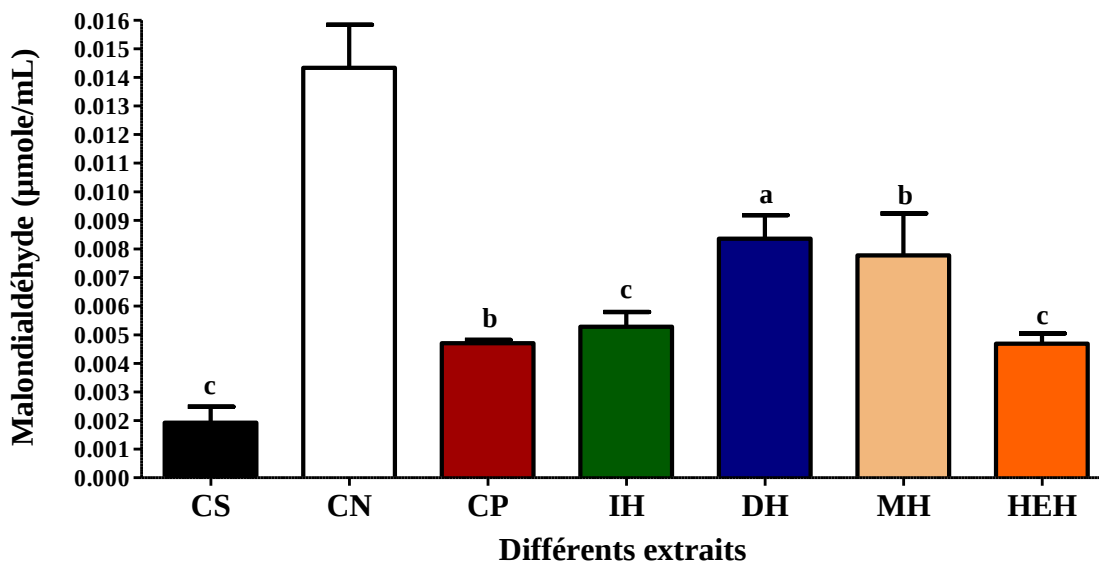
CS= Contrôle sain, CN= Contrôle négatif, CP= Contrôle positif, IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope. Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Figure 19: Effet des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. sur le taux de protéines totales dans le sérum des rats

III.1.3.2. Evamuation de l'effet des différents extraits aqueux et hydroéthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. sur le Malondialdehyde.

L'effet préventif des différents extraits sur le MDA est représenté par la figure 20 suivante. Les résultats obtenus ont montré que le naphthalène a induit significativement ($P < 0,05$) une augmentation du taux de MDA chez le groupe contrôle négatif (CN) comparativement au groupe contrôle sain (CS) n'ayant reçu que de l'eau distillée. Pour les groupes des rats ayant reçu l'administration des extraits, on a observé une diminution significative ($P < 0,05$) chez tous les groupes. Cette diminution était plus prononcée chez les groupes ayant reçu les extraits obtenus par infusion (IH) ($0,50 \pm 0,20 \mu\text{mole/L} \times 10^{-2}$) et hydroéthanolique (HEH) ($0,50 \pm 0,0 \mu\text{mole/L} \times 10^{-2}$). Ces deux valeurs restent

significativement inférieure à celle du groupe contrôle positif (CP) ($0,60 \pm 0,2 \mu\text{mole/L} \times 10^{-2}$) traité avec l'acide gallique utilisé comme référence.

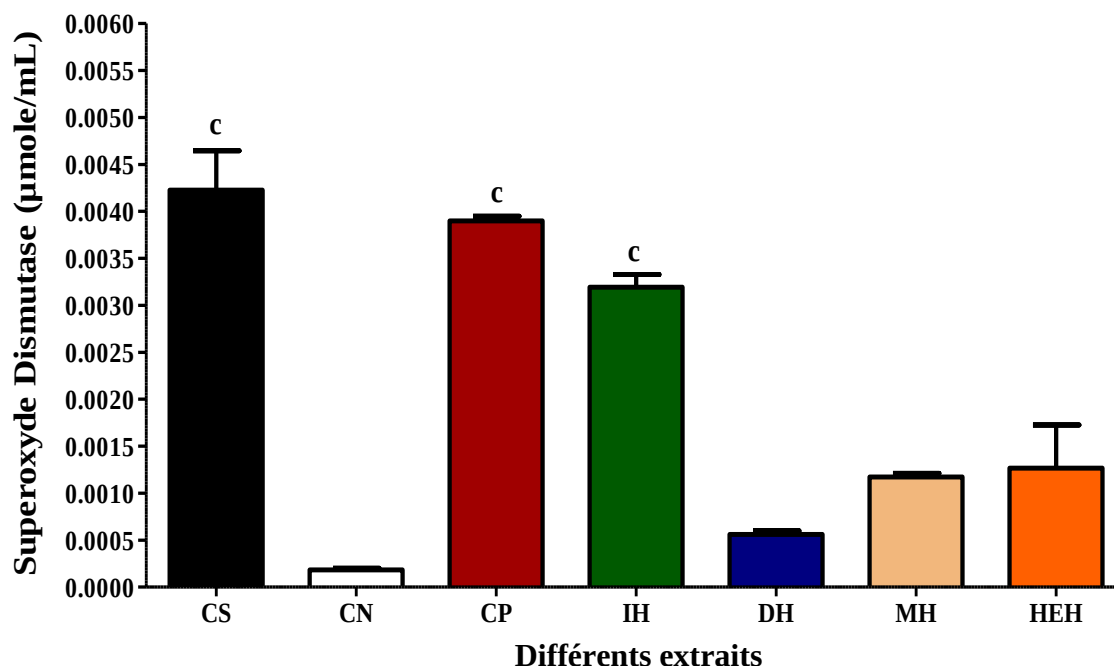


CS= Contrôle sain, CN= Contrôle négatif, CP= Contrôle positif, IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope. Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Figure 20 : Evaluation de l'effet préventif des extraits aqueux et hydro-éthanoliques d'*Hyssopus officinalis* L. sur l'activité du MDA.

III.1.3.3. Evaluation de l'effet des différents extraits aqueux et hydroéthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. sur la Superoxyde dismutase

L'effet préventif des différents extraits sur l'activité de SOD est représenté par la figure 21 ci-contre. Les résultats obtenus ont montré que le naphthalène a induit significativement ($P < 0,05$) une diminution de l'activité de la SOD chez le groupe contrôle négatif (CN) comparativement au groupe contrôle sain (CS) n'ayant reçu que de l'eau distillée. Pour les groupes des rats ayant reçu l'administration des extraits, on a observé une augmentation non significative ($p > 0,05$) chez les groupes ayant reçu les extraits issus de la décoction (DH), de la macération (MH) et de l'hydroéthanolique (HEH). Par ailleurs une augmentation significative ($P < 0,05$) a été observée chez le groupe ayant reçu l'extrait issu de l'infusion (IH) ($0,32 \pm 0,0 \mu\text{mole/L} \times 10^{-2}$). Cette valeur reste légèrement inférieure à celle du groupe contrôle positif (CP) ($0,39 \pm 0,0 \mu\text{mole/L} \times 10^{-2}$) traité avec l'acide gallique utilisé comme référence.

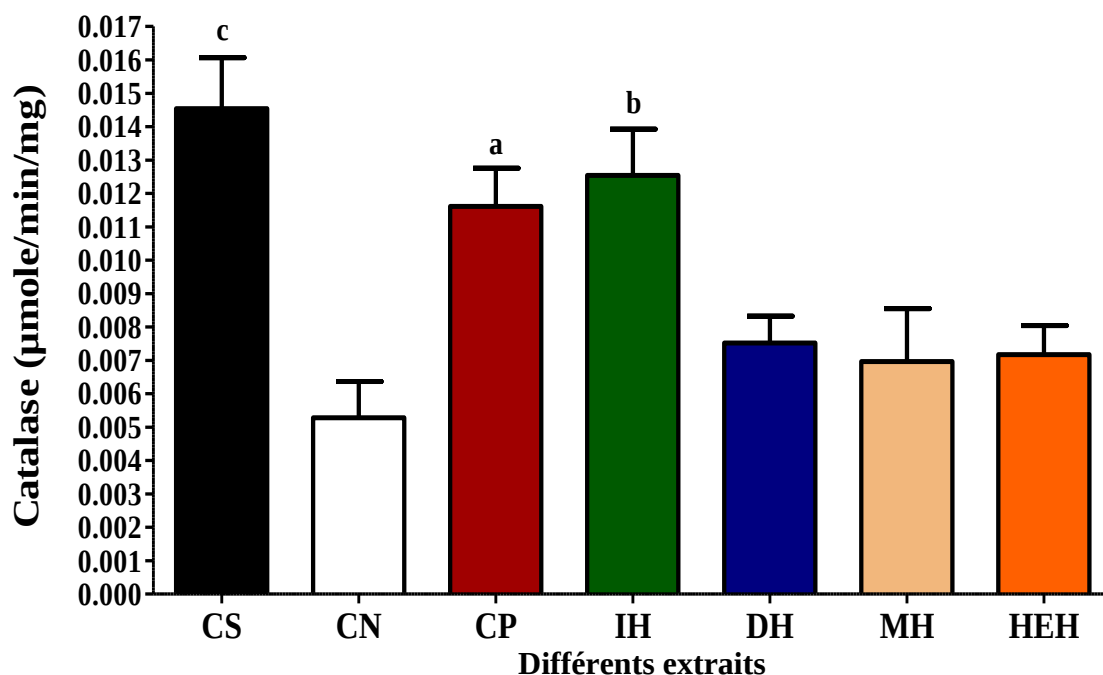


CS= Contrôle sain, CN= Contrôle négatif, CP= Contrôle positif, IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope. Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Figure 21 : Evaluation de l'effet préventif des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. sur l'activité de la superoxyde dismutase.

III.1.3.4. Evaluation de l'effet des différents extraits aqueux et hydroéthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. sur la catalase

La figure 22 ci-contre présente l'effet préventif des différents extraits sur l'activité de la catalase. Les résultats observés ont montré une diminution significative ($P < 0,05$) de cette activité chez le groupe contrôle négatif (CN) comparativement au groupe contrôle sain (CS) n'ayant reçu que de l'eau distillée. Pour les groupes des rats ayant reçu l'administration des extraits, on a observé une augmentation non significative ($p > 0,05$) chez les groupes ayant reçu les extraits issus de la décoction (DH), de la macération (MH) et de l'hydroéthanolique (HEH). Par ailleurs une augmentation significative ($P < 0,05$) chez le groupe ayant reçu l'extrait obtenu par infusion (IH) ($0 (1,00 \pm 0,0) \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg} \times 10^{-2}$) a été observée. Cette valeur reste significativement supérieure ($P < 0,05$) à celle du groupe ayant reçu l'acide gallique utilisé comme contrôle positif (CP) ($1,00 \pm 0,2 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg} \times 10^{-2}$) traité avec l'acide gallique utilisé comme référence.

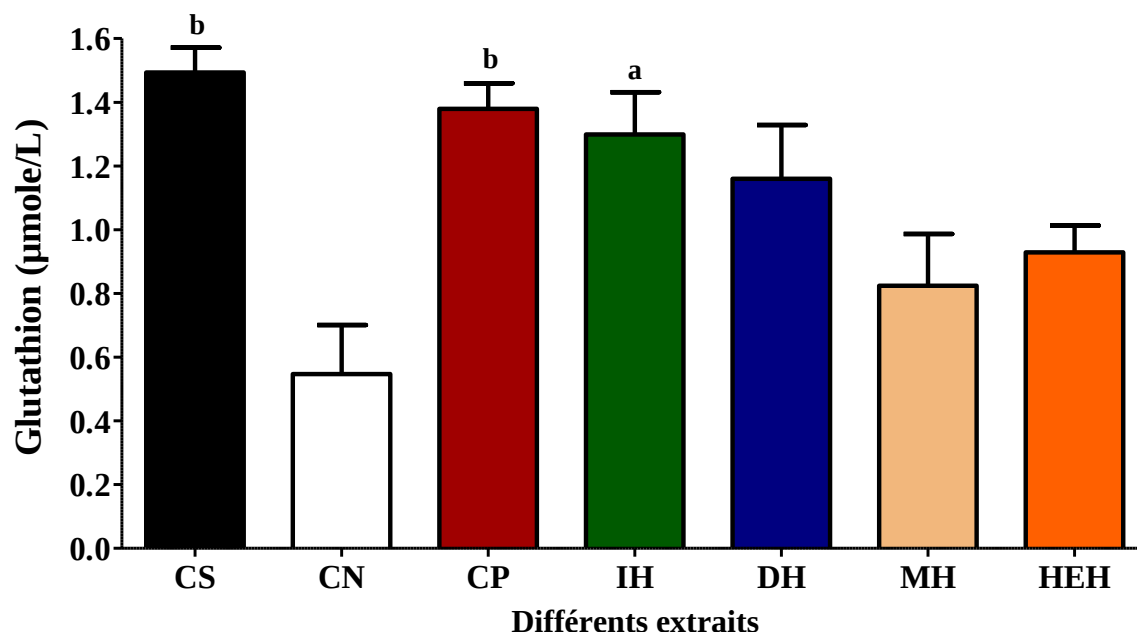


CS= Contrôle sain, CN= Contrôle négatif, CP= Contrôle positif, IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope. Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Figure 22 : Evaluation de l'effet préventif des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. sur l'activité de la catalase.

III.1.3.5. Evaluation de l'effet des différents extraits aqueux et hydroéthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. sur le glutathion.

L'effet préventif des différents extraits sur le glutathion est représenté par la figure 23 ci-contre. Les résultats obtenus ont montré une diminution significative ($P < 0,05$) de ce taux chez le groupe contrôle négatif (CN) comparativement au groupe contrôle sain (CS) n'ayant reçu que de l'eau distillée. Pour les groupes des rats ayant reçu l'administration des extraits, on a observé une légère augmentation de ce taux sans aucune différence significative ($p > 0,05$) chez les groupes ayant reçu les extraits issus de la décoction (DH), de la macération (MH) et de l'hydroéthanolique (HEH). Par ailleurs on a relevé une augmentation significative ($P < 0,05$) chez le groupe ayant reçu l'extrait obtenu par infusion (IH) ($1,30 \pm 0,2$) µmole/L). Cette valeur est significativement inférieure à celle obtenue avec l'acide gallique utilisé comme contrôle positif (CP) ($1,38 \pm 0,1$ µmole/L).



CS= Contrôle sain, CN= Contrôle négatif, CP= Contrôle positif, IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope. Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

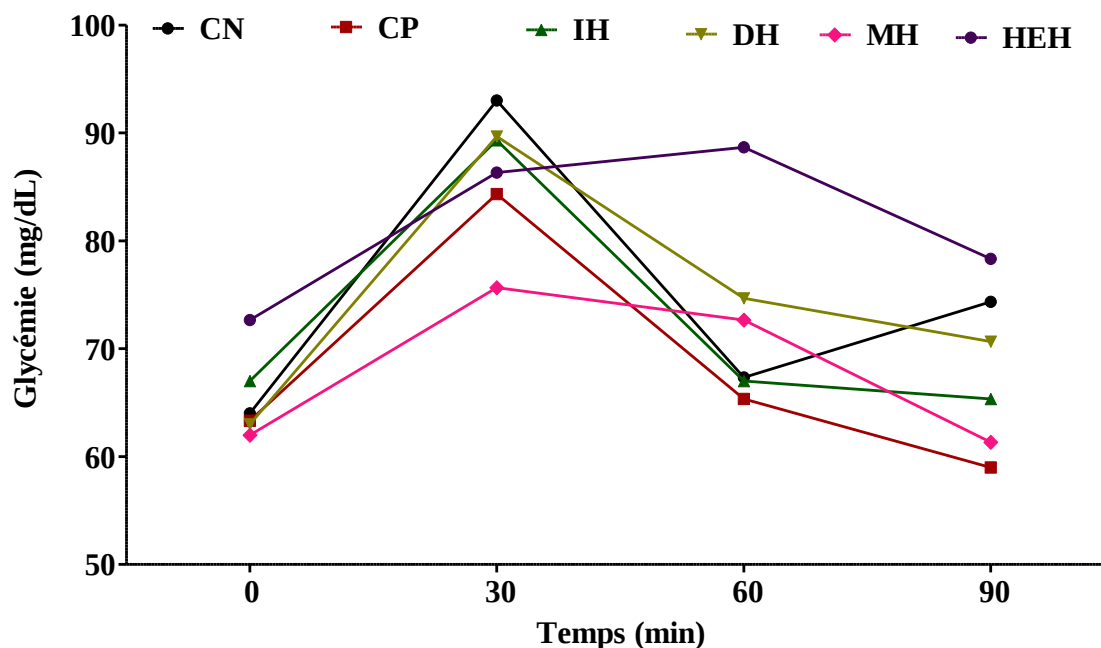
Figure 23 : Evaluation de l'effet préventif des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* sur l'activité du glutathion.

III.1.4. Evaluation des propriétés antihyperglycémiantes des extraits aqueux et hydroéthanolique *in vivo* et *in vitro*

III.1.4.1 . Evaluation de l'effet des extraits aqueux et hydroéthanolique sur la glycémie *in vivo*

III.1.4.1.1. Evaluation de l'activité normoglycémique

La figure 24 ci-dessous ressort l'évaluation de l'activité normoglycémique des extraits des feuilles d'hysope en fonction du temps. Les glycémies obtenues ont été exprimées en (mg/dL). Les résultats ont montrés que 30 min après l'administration des différents extraits, on a observé une augmentation non significative du glucose sanguin ($p > 0,05$) dans tous les groupes. Ce pendant les valeurs sont plus élevées dans les groupes ayant reçu les extraits issus de l'infusion (IH) et de la décoction (DH). En outre ces valeurs sont inférieure à celle obtenue avec le groupe contrôle négatif (CN) n'ayant reçu que de l'eau distillée. Toutes ces valeurs diminuent progressivement jusqu'à 90 min. Cette diminution est beaucoup plus prononcée avec l'extrait obtenu par macération (MH) ($75,67 \pm 8,0$ mg/dL).

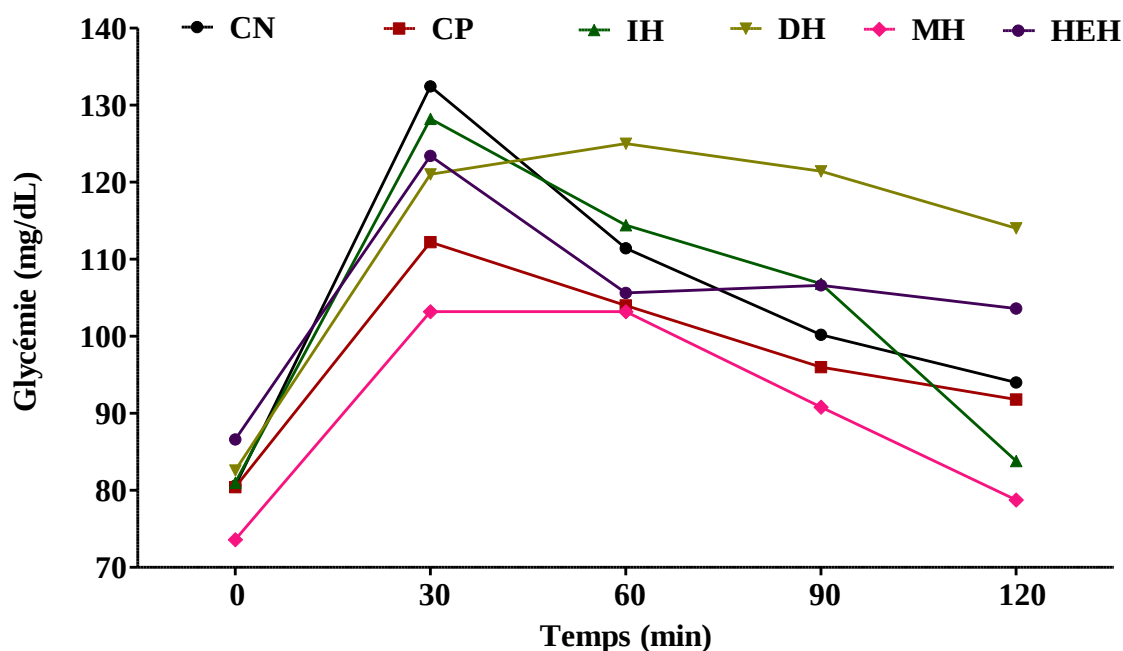


CN= Contrôle négatif, CP= Contrôle positif, IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope

Figure 24 : Effet des extraits aqueux et hydro-éthanoliques d'*Hyssopus officinalis* L. sur la normoglycémie induite chez les rats de la souche Wistar à la dose de 3g/kg.

III.1.4.1.2. Evaluation de l'activité préventive de la glucotolérance des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* L.

La figure 25 ci-dessous représente l'évolution de la glycémie en fonction du temps. 3g/kg de PC de glucose ont été administrés après que les rats aient reçu les différents extraits. Les résultats obtenus ont montrés qu'au bout de 30 min la glycémie a augmentation significativement ($p < 0,05$) dans tous les groupes. Ce pendant les valeurs sont significativement plus élevées ($P < 0,05$) dans les groupes ayant reçu les extraits issus de l'infusion (IH) et de l'hydroéthanolique (HEH). En outre ces valeurs sont inférieures à celle obtenue avec le groupe contrôle négatif (CN) n'ayant reçu que de l'eau distillée. Toutes ces valeurs diminuent progressivement jusqu'à 120 min. Cette diminution est beaucoup plus prononcée avec l'extrait obtenu par macération (MH) ($78,75 \pm 22,0$ mg/dL).

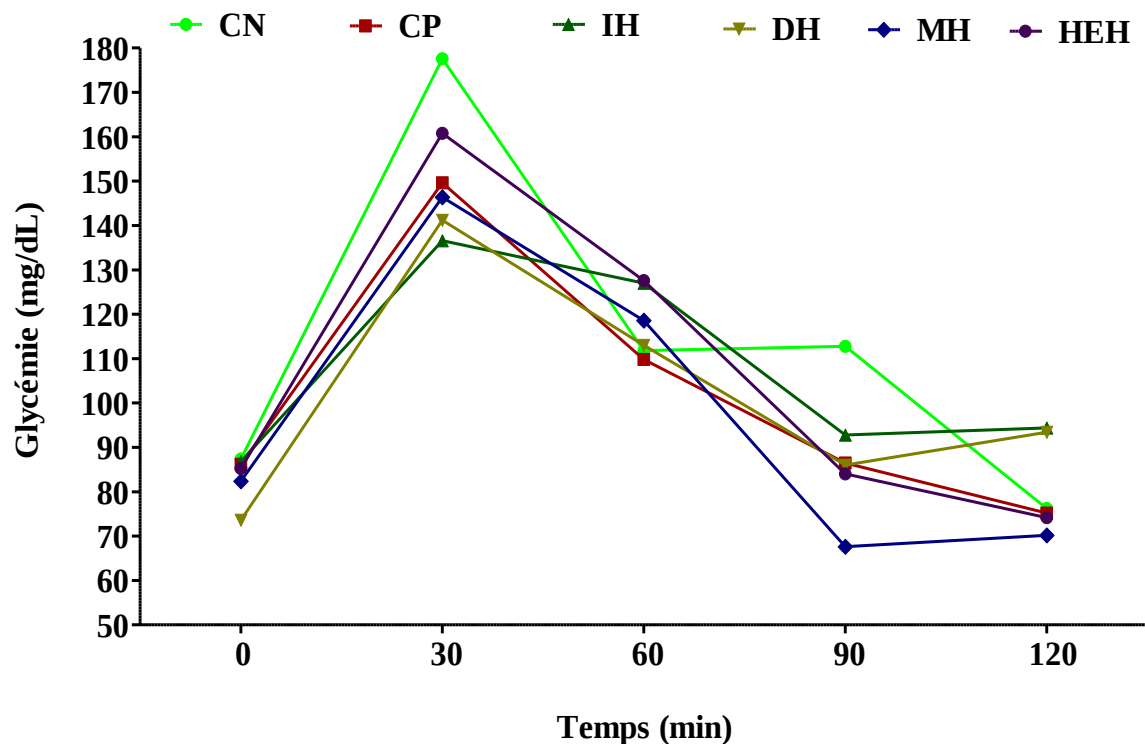


CN= Contrôle négatif, CP= Contrôle positif, IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope

Figure 25 : Effet des extraits aqueux et hydro-éthanoliques d'*Hyssopus officinalis* L. sur la glucotolérance préventive induite chez les rats de la souche Wistar à la dose de 3g/kg.

III.1.4.1 .3. Evaluation de l'activité curative de la glucotolerance des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* L.

La figure 25 ci-dessous représente l'évolution de la glycémie en fonction du temps. Les différents extraits ont été administrés après que les rats aient reçu 3g/kg de PC de glucose. Les résultats obtenus ont montrés qu'au bout de 30 min la glycémie a augmentation significativement ($p < 0,05$) dans tous les groupes. Ce pendant les valeurs sont significativement plus élevées ($P < 0,05$) dans les groupes ayant reçu les extraits issus de la macération (MH) et de l'hydroéthanolique (HEH). En outre ces valeurs sont inférieures à celle obtenue avec le groupe contrôle négatif (CN) n'ayant reçu que de l'eau distillée. Toutes ces valeurs diminuent progressivement jusqu'à 120 min. Cette diminution est beaucoup plus prononcée avec l'extrait obtenu par macération (MH) ($70,20 \pm 13,0$ mg/dL).

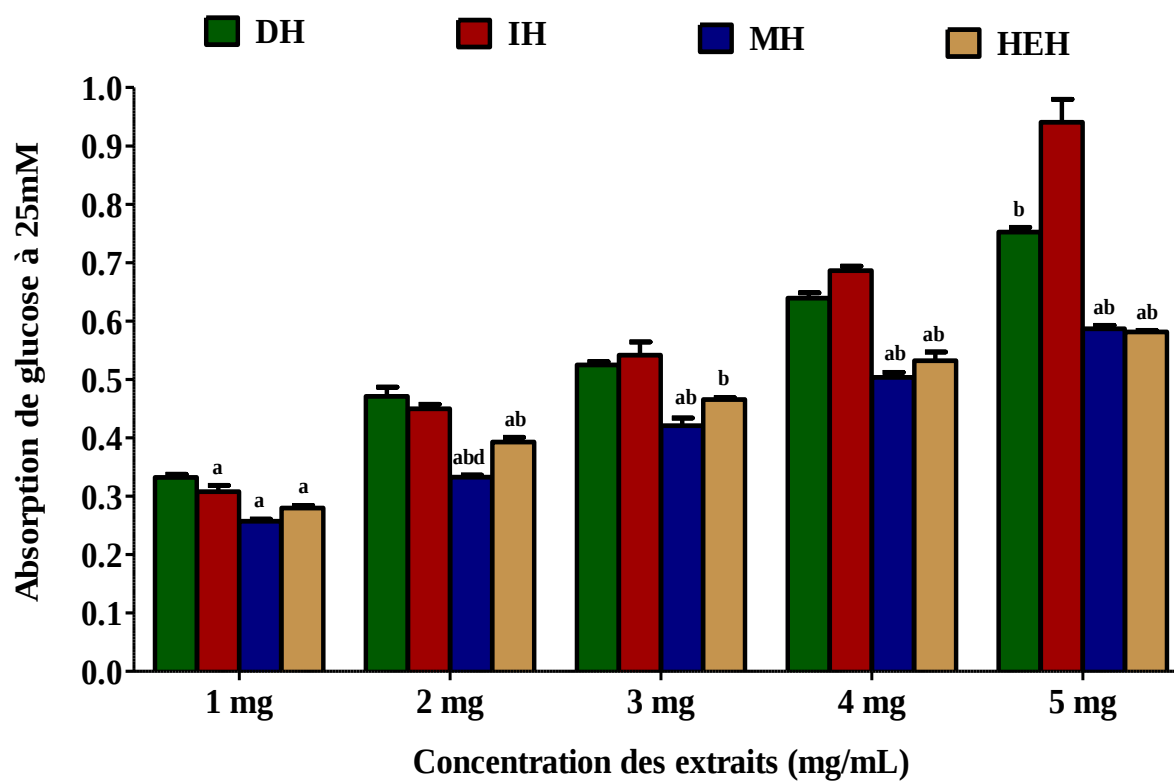


CN= Contrôle négatif, CP= Contrôle positif, IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope

Figure 26 : Effet des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. sur la glucotolérance curative induite chez les rats de souche Wistar à la dose de 3g/kg.

III.1.4.2 . Evaluation de la capacité des extraits à stocker le glucose *in vitro*

La figure 25 ci-dessous représente la capacité de séquestration du glucose par les différents extraits réalisés *in vitro*. Les résultats obtenus ont montrés que le maximum de séquestration du glucose a été observé à 5 mg de chaque extrait. Il en ressort que le pouvoir de captation du glucose est significativement plus élevé ($P < 0,05$) avec les extraits issus de l'infusion (IH) suivi de la décoction (DH).



IH= Infusion d'hysope, DH= Décoction d'hysope, MH= Macération d'hysope, HEH= Hydroéthanolique d'hysope. Les valeurs affectées des lettres différentes sur la même colonne sont significativement différentes ($p < 0,05$)

Figure 27 : Capacité d'absorption du glucose des différents extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* L. par le test de la levure de bière.

III.2. DISCUSSION

Le stress oxydatif demeure un facteur déterminant dans le déclenchement et l'évolution de plusieurs maladies chroniques telles que le cancer, l'hypertension artérielle et le diabète dont l'un des facteurs de la pathogénicité est l'hyperglycémie. De nos jours, l'utilisation des extraits bioactifs riches en composés phénoliques demeurent une approche de solution efficace afin de protéger l'organisme contre les effets néfastes des radicaux libres. Les plantes de la famille des *Lamiaceae* à travers leurs extraits offrent des voies propices pour solutionner ce problème de santé. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du potentiel antioxydant et anti-hyperglycémique *in vivo* des extraits aqueux et hydro-éthanolique des feuilles d'*Hyssopus officinalis* L. L'extraction par les solvants organiques est la méthode la plus utilisée pour la préparation des extraits de plantes. Cependant, les différents extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles d'hysope ont été obtenus par les techniques d'extraction telles que : la décoction, l'infusion, la macération aqueuse et hydroéthanolique. 21% d'extrait a été obtenu par macération hydro-éthanolique suivie de l'infusion (9,1%), de la décoction (5,66%) et en fin la macération aqueuse (4,5%). En effet il a été démontré que le solvant hydroéthanolique permette d'extraire les principes actifs solubles à la fois dans l'eau et l'éthanol et assure une meilleure stabilité des principes actifs extraits (**Chabrier, 2010**). Le dosage des composés phénoliques a permis de déterminer la teneur en composés phénoliques des différents extraits d'hysope. Les teneurs moyennes obtenues sont de l'ordre de de $9,73 \pm 0,3 \text{ mgEAG/gE}$, $10,93 \pm 0,0 \text{ mgEAG/gE}$, $9,6 \pm 0,0 \text{ mgEAG/g}$, et $12,66 \pm 0,4 \text{ mgEAG/gE}$ respectivement pour la macération aqueuse, la décoction, l'infusion et la macération hydro-éthanolique avec une différence significative ($p < 0,05$) noté entre ces différentes valeurs. Les extraits obtenus par macération hydro-éthanolique et aqueuse ont présenté les teneurs en composés phénoliques les plus élevés comparés aux extraits obtenus par infusion et décoction. Cependant la meilleure teneur en composé phénolique ($12,66 \pm 0,4 \text{ mgEAG/gE}$) a été obtenue avec l'extrait hydro-éthanolique. Ceci peut s'expliquer par le fait que les composés phénoliques ont une très grande solubilité dans les solvants alcooliques. En effet, **Ouzid et al. (2018)** ont montré que le type de solvant joue un rôle important dans le rendement d'extraction des composés phénoliques. Toutefois ces résultats obtenus sont largement inférieurs à $69,7 \text{ mgEAG/gE}$ obtenu par **Rerah et al. (2020)** en Égypte sur l'extrait m éthanolique (70%) de la poudre des feuilles d'hysope officinale. En effet il a été démontré que la teneur en composés phénoliques dans une plante est liée à divers facteurs tels que : le climat spécifique aux régions de provenance de la plante, l'altitude et la nature du sol, de la région de provenance de la plante, la variété, la maturité et les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, et également la température de récolte (**Brada et al., 2007**).

Afin de connaitre l'effet des différents extraits aqueux et hydro-éthanolique d'hysope dans l'organisme, l'expérimentation *in vivo* a été réalisée sur les rats mâles de souche wistar âgés de 8

semaines, stressés par le naphthalène et les activités des enzymes antioxydantes telles que : la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase, ont été mesurées. D'autres marqueurs tels que les taux de malonedialdéhyde (MDA) et de glutathion ont été déterminés. Le naphthalène a été utilisé pour induire le stress oxydatif. Sa toxicité est principalement due à un déséquilibre prooxydant et antioxydant qui est associé à une production accrue de radicaux libres au cours de son métabolisme et à une perturbation de l'équilibre redox intracellulaire entraînant le développement d'un stress oxydatif (**Vuchetich et al., 1996**). Dans la présente étude, il a été observé une augmentation significative du taux de MDA dans le sérum des rats du groupe contrôle négatif, et une baisse suite à l'administration des extraits. Le stress oxydatif observé serait dû à la génération d'intermédiaires comme la semiquinone, l'hydroquinone et la quinone qui stimulent la production de divers radicaux comme le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, et l'anion superoxyde pendant le métabolisme du naphthalène dans la cellule (**Pandya et al., 2000**). Les résultats présentés dans cette étude révèlent que tous les extraits ont réduit efficacement le taux du MDA en inhibant la production d'espèces oxygénées réactives avec leur effet de piégeage des radicaux libres ou en améliorant la capacité antioxydante des cellules. Ce pendant les valeurs sont largement inférieures à celles obtenues (19 $\mu\text{mol/mL}$ sérum) par **Farahmandfar et al., (2014)** qui ont administré l'extrait obtenu de l'infusion de la mélisse officinale (*Mellisa officinalis* L.) chez les rats stressés par le naphthalène pendant deux semaines. La superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) sont deux enzymes antioxydantes qui catalysent respectivement la dismutation de l'anion superoxyde et une réduction du peroxyde d'hydrogène (**Santos-sánchez et al., 2007**) dont le dosage de leur activité renseigne sur le taux des radicaux libres et les formes actives de l'oxygène dans la cellule. Les valeurs obtenues dans la gestion préventive indiquent pour l'activité de la superoxyde dismutase une diminution significative ($p < 0,05$) de son activité chez les rats du groupe contrôle négatif, ceci serait due à une augmentation du radical anion superoxyde au cours de son métabolisme. La réduction de l'activité de la catalase chez les animaux suite à l'administration du naphthalène pourrait être due à une accumulation accrue du peroxyde d'hydrogène, ce qui entraînerait une augmentation de la peroxydation lipidique. Elle pourrait aussi s'expliquer par l'apport insuffisant de NADPH nécessaire à l'activation de la catalase pour sa régénération à partir de sa forme inactive (**Anhe et al., 2013**). Par conséquent, il est clair qu'une insuffisance de production de NADPH pendant le stress pourrait altérer l'activité de la catalase. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus lors de l'étude réalisée par **Farahmandfar et al., (2019)** sur l'extrait infusé (0,80 $\mu\text{mol/mL}$ sérum) de mélisse (*Mellisa officinalis* L) sur les rats soumis au stress oxydatif par le naphthalène. Le taux de glutathion est l'un des marqueurs qui renseigne sur le niveau de stress oxydant au niveau des cellules. En effet un taux élevé de ce dernier indique une surproduction des radicaux libres dans les cellules (**Gawel et al., 2004**). Le glutathion est un tripeptide constitué de glycine, acide glutamique et cystéine qui par

sa fonction thiol neutralise les radicaux libres et les formes actives de l'oxygène, cette action entraîne une déplétion accrue au niveau de la cellule. Ce dernier agit comme cofacteurs des enzymes de détoxification telles que la glutathion peroxydase (Gpx) et la glutathion -S- transférase (GST) (**Valko et al., 2014**). Les résultats obtenus révèlent une protection contre le stress par une augmentation significative ($p < 0,05$) de la concentration du glutathion, ce qui indique l'augmentation des niveaux de glutathion réduit et la diminution des niveaux de peroxydes. les valeurs obtenues sont inférieures à celles de l'étude réalisée par **Farahmandfar et al., (2019)** sur l'extrait infusé (0,80 $\mu\text{mol/mL}$ sérum) de mélisse (*Mellisa officinalis* L) sur les rats soumis au stress oxydatif par le naphthalène. Par ailleurs, une augmentation des niveaux de SOD, catalase et glutathion a été observée chez les rats auxquels on a administré les différents extraits. L'augmentation de l'activité de ces antioxydants surtout dans l'extrait obtenu par infusion peut être due aux différents composés présents dans l'extrait.

Afin d'expliquer les effets antihyperglycémiqes des extraits aqueux et hydro-éthanolique d'*Hyssopus officinalis* observés chez les rats en hyperglycémie, trois mécanismes ont été évalués : la normoglycémie, la glucotolérance préventive et curative. Il est connu que pour diminuer l'hyperglycémie, il serait intéressant de réduire après la prise alimentaire l'activité de certaines enzymes avec pour conséquence une réduction de l'absorption des glucides à jeun (**Yoona et al., 2016**). Les différents extraits ont agi essentiellement en limitant le pic glycémique suite à une administration du glucose, ce qui rend compte du fait que les extraits agissent principalement en réduisant l'absorption du glucose (**figure 25**). Concernant le test normoglycémique l'administration par voie orale des extraits aqueux et hydro-éthanolique de la plante à la dose 200mg/kg s'est accompagnée d'une baisse de la glycémie. Les résultats ont montré une tendance vers une augmentation du glucose sanguin les 30 min qui suivaient l'administration des extraits et la metformine utilisée comme le médicament de référence. En effet cette dose fait varier la glycémie dans tous les groupes au bout de 60 minutes, puis elle est baissée après 90 min, de manière beaucoup plus marqué dans le groupe MH ($61,33 \pm 5,6$ mg/dL). Il est donc constatable que chez les rats normoglycémiques, la plante agit au niveau intestinal plus précisément sur l'absorption du glucose. D'autre part, il se pourrait qu'elle stimule la sécrétion d'insuline. Ce résultat est inférieur et meilleur par rapport à celui obtenue par **Rehab et al., (2020)** (80 mg/dL) en Égypte qui ont montré l'effet hypoglycémiant d'*Hyssopus officinalis* L. L'évaluation de l'activité préventive de glucotolerance a permis de montrer la capacité des extraits à réguler la glycémie. De ce fait tous les extraits ont efficacement prévenu l'hyperglycémie postprandiale et de façon plus significative chez MH ($78,75 \pm 22,0$ mg/dL), et donc meilleure à 87mg/dL que celle obtenue par **Rehab et al., (2020)** en Égypte qui ont montré l'effet hypoglycémiant d'*Hyssopus officinalis* L. Ainsi, la réduction de la glycémie observée chez les rats traités avec les extrait pourraient s'expliquer par une stimulation de la sécrétion de l'insuline par le pancréas et/ou, probablement, par une augmentation de l'utilisation périphérique

du glucose en présence de l'extrait (**Yasodha et al., 2008**). L'évaluation de l'activité curative de glucotolerance a permis de montrer la capacité des extraits à abaisser la glycémie, ainsi tous les extraits ont efficacement agit, cependant l'extrait macéré d'Hysope (MH) a présenté significativement ($p < 0,05$) la meilleure activité ($70,20 \pm 13,0$ g/L). Ce résultat est meilleur à celui (90 g/L) obtenu par **Hiroyoki, (2020)** en étudiant l'effet inhibiteur de l'extrait méthanolique d'hysope sur l'hyperglycémie post prandiale. Les résultats ont montré que les extraits inhibent la digestion du glucose *in vivo*. Cette activité serait liée à la présence des composés phénoliques dans les extraits. En effet, plusieurs études ont démontré l'habilité des composés phénoliques à interagir avec les enzymes digestives, mais aussi à réduire leurs activités en interagissant avec les groupements thiol libres de la chaîne d'acides aminés des enzymes, ainsi que l'absorption des nutriments (**Rhenet, 2002**). L'absorption périphérique du glucose étant fortement diminuée en cas d'insulino-résistance (**Anuradha et al., 2015**). L'effet des extraits sur la capture cellulaire du glucose *in vitro* avec les cellules insulino-dépendantes (les cellules de levure) a été évalué. Les extraits ont stimulé l'absorption du glucose en situation normale. Le taux de capture est plus élevé à la dose de 5mg et l'extrait macéré d'Hysope (MH) a présenté la meilleure activité parmi tous les extraits, ceci pourrait être dû à la présence dans les extraits phénoliques des composés bioactifs capable d'induire la translocation des GLUT avec pour conséquence la réduction de la concentration de glucose dans le milieu réactionnel (**Gaikwad et al., 2014 ; Romli, 2016**). Ces effets observés pourraient être dû à la capacité des extraits à stimuler la translocation des transporteurs insulino-dépendant tels que GLUT1 (**Romli, 2016**).

**CONCLUSION,
RECOMMENDATION ET
PERSPECTIVE**

CONCLUSION

Au terme de cette étude dont l'objectif était d'évaluer les propriétés antioxydantes et anti-hyperglycémiques des extraits aqueux et hydro-éthanolique des feuilles d'hysope (*Hyssopus officinalis*), il en ressort que :

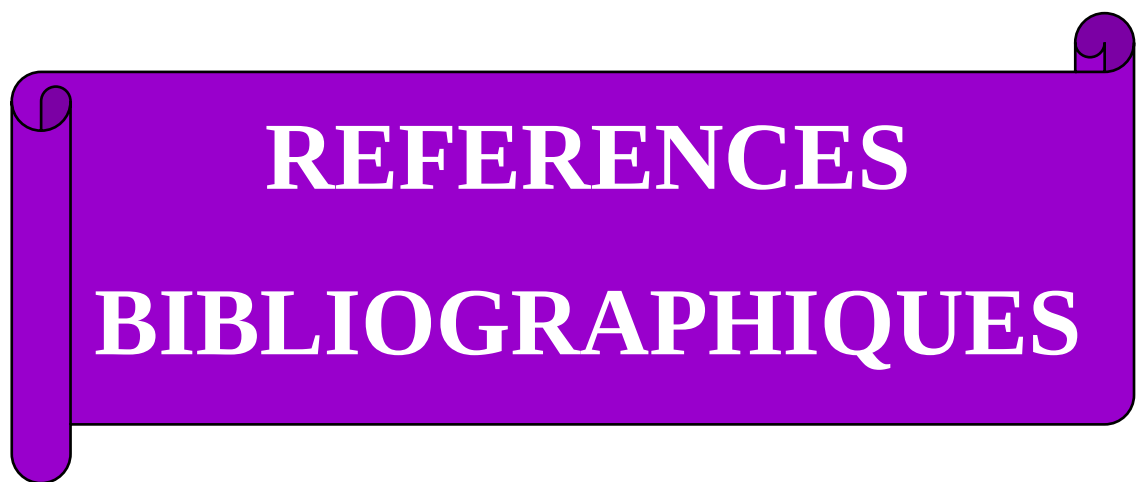
- La macération hydro-éthanolique est la meilleure technique d'extraction des composés phénoliques totaux ($64,789 \pm 0,0$ mgEAG/gE) ;
- De manière générale *in vivo*, l'extrait obtenu par infusion a présenté le meilleur profil antioxydant sur les différents marqueurs du stress oxydatif (malondialdéhyde, catalase, superoxyde dismutase et taux de glutathion) ;
- L'extrait obtenu par macération aqueuse (MH) a présenté la meilleure activité sur la baisse de la glycémie *in vivo*.

RECOMMANDATIONS

- Sensibiliser la population sur les bienfaits d'hysope et à une consommation après macération du fait de sa teneur élevée en composés phénoliques;
- Encourager les pouvoirs publics à financer des études visant à vulgariser les feuilles d'hysope de manière à aider dans la lutte contre le diabète.

PERPECTIVES

- Analyser le profil des composés bioactifs des différents extraits par la HPLC-SM.
- Evaluer l'effet des extraits sur la captation du glucose par d'autres méthodes.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

- Anhe F., Desjardins Y., Pilon G., Dudonne S., Genovese M., Lajolo F. et Marette A. (2013).** Polyphenols and type 2 diabetes. *Prospective review Pharma Nutrition*. 1 :105-114.
- Asmat U., Abad K. et Ismail K. (2016).** Diabetes mellitus and oxidative stress. *Saudi Pharmaceutical Journa*. 24:547–553.
- Alpay M., Backman L., Cheng X., Dukel M., Kim W., Lingbao A. et Brown Kl. (2015).** Oxidative stress shapes breast cancer phenotype through chronic activation of ATM-dependent signalling. *Breast Cancer Research and Treatment*. 151(1):75-87.
- Aratani Y. (2018).** Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of biochemistry and biophysics*. 640 :47–52.
- Bouyahya Abdelhakim (2016).** Alicaments : des aliments aux médicaments, quel apport pour la santé ? *Annales des Sciences de la Santé*. 1(4) : 1-3.
- Carney LM. et Camey AM. (1994).** Role of protein oxidation in aging and in age-associated neurodegenerative diseases. *Life Sciences*. 55:2097-2103.
- Chang E. et Young C. (2018).** Lipid Peroxidation and Antioxidant Activities of the Aqueous Rhizome Extract of *Rheum officinale* Baillon. *Journal of Food Quality*. 1-7.
- Chen D., Daniel KG., Kuhn DJ., Kazi A., Bhuiyan M. et Li L. (2004).** Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Frontiers in bioscience - a journal and virtual library*. 1 sept 9 :2618-31.
- Corton JC., Peters JM. et Klaunig JE. (2018).** The PPAR α -dependent rodent liver tumor response is not relevant to humans: Addressing mis-conceptions. *Archives of Toxicology*. 92(1): 83-119
- Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D. et Milzani A. (2006).** Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 52:601-623.
- Das K. et Roychoudhury A. (2014).** Reactive oxygen species (ros) and response of antioxidants as ros-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental. Science*. 2 :53.
- Delattre J., Beaudeau J. et Bonnefont-Rousselot D. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques. 1st edition. : Éditions Tec & doc. Paris. *Ecologia Mediterranea*. 200- 225.
- Dellapenna D. et Pogson BJ. (2006).** Vitamin synthesis in plants : tocopherols and carotenoids. *Annual reviews plant biology*. 57 :711–738.
- Desmier T. (2016).** Les antioxydants de nos jours : définition et applications. Thèse de doctorat

d'état, université de Limoges, France. 88.

Džamić A., Soković M., Novaković M., Jadranin M., Ristić M., Tešević V., Marin P. (2019). Composition, antifungal and antioxidant properties of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *pilifer* (Pant.) Murb. essential oil and deodorized extracts. *Industrial Crops and Products*. 51 :401–407.

lisabeth P. (2014). Chapitre 1 - La régulation de la glycémie et le diabète. *Universite Angers*, 125.

Ellman GL. (1959). "Tissue sulfhydryl group". *Arch Biochemistry Biophysic*. 82:70-77.

Fabre G., Bayach I., Berka K., Paloncýová M., Starok M., Rossi C., Duroux JL., Otyepka M. et Trouillas P. (2015). Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. *Chemical Communications*. 21 avr 51 (36) : 7713-6.

Favier A. (2003). Le stress oxydant : intérêt conceptuel dans la compréhension des mécanismes et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*, novembre-décembre. 108-115.

Farahmandfar R., Naeli MH., Naderi M., et Asnaashari M. (2019). Stabilizing corn oil using the lemon balm (*Melissa officinalis*) antioxidants extracted by subcritical water. *Journal of Food Science and Technology*. 56(2).

19. Fathiazad F et Hamedeyazdan S. (2011). A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and biological activities. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(8), 1959–1966.10.5897/AJPP11.527.

Fraternale D., Ricci D., Epifano F., Curini Massimo. (2004). Composition and antifungal activity of two essential oils of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Journal of essential oil research*. 16 (6):617-622

Feudjio AF., Biapa NP., Kodjio. N., Yembeu NL., Kengne FC., Nkwikeu NP., Pieme CA. et Telefo PB. (2019). Hydroethanolic extract of *Theobroma cacao* beans is nontoxic and attenuates oxydative stress induced by Naphtalene in Wistar rats. *Journal of Herbal Medicine Research (ISSN: 2474-106X)*.

Güngör Ç., Serkan Y., Oğuz K Aksaray. (2018). Role of nitric oxide and oxidative stress in pathophysiology of liver injury in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Derg.* 65:39-50.

Hajdari A., Giorgi A., Beretta G., Gelmini F., Buratti S., Benedetti S., Merkouri A., Mala X., Kabashi S., Pentimalli D., Pulaj B. et Mustafa B. (2018). Phytochemical and sensorial characterization of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman (Lamiaceae) by GC–MS,

HPLC–UV–DAD, spectrophotometric assays and e-nose with aid of chemometric techniques. *Journal European Food Research and Technology*. 244:1313–1327.

Hatz S., Lambert JD., Ogilby PR. (2007). Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: Addressing the issue of cell viability. *photochemistry and photobiology science*. 6:1106–1116.

Hermes-Lima M. et Zenteno-Savín T. (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*. 133:537-556.

Hideyuki M., Hiroyuki M., Chikako A., Midori A., Teruhiko Y. et Junya M. (2004). Isolation of α -glucosidase inhibitors from hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Phytochemistry*. January. 65 (1):91-97

Higdon J. (2004). Antioxidant Vitamins and Health: Cardiovascular Disease, Cancer, Cataracts, and Aging by Claude Fernand Bourgeois, 306 pages, hardcover, \$72. HNB Publishing, New York. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1 juill 80 (1):239-239.

Jomova K. et Valko M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 10 mai. 283 (2-3) :65-87.

Keane K., Cruzat F., Carlessi R., Bittencourt P. et Newsholme P. (2015). Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-15.

Kumar S., Kumar V., Rana M. et Kumar D. (2012). Enzymes inhibitors from plants: an alternate approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Communications*. 2:18-33.

Klaunig JE. et Kamendulis LM. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 44:239-67.

Laliberté J. et Labbé S. (2008). The molecular bases for copper uptake and distribution: lessons from yeast. *Medicine science*. mars 24 (3) :277-83.

Lambert J., Heath S., Even G., Campion D., Sleegers K., Hiltunen M. et Combarros O. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*. 41 :1094–1099.

Lambeth JD. et Neish AS. (2014). Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: A double-edged sword revisited. *Annual Review of Pathology*. 9:119–145.

Li C., Miao X., Li F., Wang S., Liu Q., Wang Y. et Sun J. (2017). Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-15.

- Lecheheb N. et Chaabna C. (2017).** Valorisation et pouvoir antioxydant des composés phénoliques des feuilles de blé dur (*triticum durum*) : GTA dur et CIRT. Mémoire Master en Sciences Biologiques. Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé. Université des Frères Mentouri Constantine, (Algérie). 94 : 20-80
- Leugoue YS. (2013).** Ealuation des Proprietes Antidiabétiques Et antioxydantes Des Extraits D'*Erigeron floribundus* (Kunth). Université de yaoundé I Département De Biochimie. 1-55.
- Ligouori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D. et Abete P. (2018)** Oxidative stress, aging. 13:757-772
- Lowry OH., Rosebrough NJ., Lewis AF. et Randall JR. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. 193 (1) :265-275.
- Macheix J., Fleuriot A. et Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Edition presses polytechnologiques et universitaire romandes*. 1 : 4 5.
- Marieb E. (2019).** Anatomie et Physiologie Humaines (11e Edition). *benjamin / cummings publishing company*. 1 :31-30.
- Martin S. et andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie*. 51 :304-315.
- Mercan D. (2010).** Le stress oxydatif in A. R. L. Lausanne. 1- 53.
- Misra HP. et Fridovich I. (1972).** The role of superoxide ion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. 247: 3170-3175.
- Ohkawa H., Ohishi N. et Yagi K. (1979).** Assay for lipid peroxidases in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analysis Biochemichal*. 85 :351-358.
- Omidbeigi, R. (2006).** Production and Processing of Medicinal Plants. Iran. *Astan Quds Razavi*.
- Ouzid, Y., Smail-Saadoun N. et Houali K. (2018).** Comparative study of in vitro antioxidant, activity of foliar endophytic fungi and leaves extracts of *Peganum harmala* of Dayate aiat (Laghout, Algeria). *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 10 (1):147-157.
- Pamplona R. et Costantini, D. (2011).** Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 301:843-863.
- Pandya U., Saini MK., Jin GF., Awasthi S., Godley BF. et Awasthi YC. (2000).** Dietary

- curcumin prevents ocular toxicity of naphthalene in rats. *Toxicology Letters*. 115 (3) :195–204.
- Păun G., Litescu SC., Neagu, E., Tache, A. et Radu GL. (2020).** Evaluation of Geranium spp., Helleborus spp. and Hyssopus spp. polyphenolic extracts inhibitory activity against urease and α -chymotrypsin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 29:28–34
- Picchi A. (2006).** Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the pre-diabetic metabolic syndrome. *Circulation Research*. 99: 69-77.
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D. et Bitto A. (2017).** Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Poblete-Aro C., Russell-uzmán J., Parra P., Soto-Muñoz M., Villegas-González B., Cofré-Bolados C. et Herrera-Valenzuela T. (2015).** Oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Biological Chemistry*. 9:92-109
- Prousek J. (2007).** Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry*. 79: 2325–2338.
- Pszczola DE. (2001).** Antioxidants: from preserving food quality to quality of life. *Food technologie*. 55:51-59
- Raman AV. et Marla J B. (2011).** Selenoproteins in cellular redox regulation and signaling. Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates. *Molecular Aspects of Cell Signaling*. 14 :195-208.
- RamirezDC., Gomez-Mejiba SE., Corbett JT., Deterding LJ., Tomer KB. et Mason RP. (2008).** Cu/Zn-Superoxide Dismutase-driven Free Radical Modifications: Copper-and Carbonate Radical Anion-initiated Protein Radical. Chemistry. *Biochemical Society*. 10 :1-25.
- Richard MJ., Belleville F., Chalas J., Ceballos-Picot I., Vitoux D., Boyer MJ., Chaudière J. et Favier A. (2017).** Les glutathion peroxydases : intérêt de leur dosage en biologie clinique. *Annales de biologie clinique*. 24 avr 55 (3) :195-208.
- Romli, H. (2016).** Prise En Charge Et Traitement Du Diabete De Type 2. *These de Doctorat En Pharmacie*. 41.
- Sanchez.C. (2017).** Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetical Systems Biotechnology*. 2 :1322.
- Senlin L., Huiru L., Xiaoding X., Phei ES. et Lei Z. (2020).** Nanocarrier-mediated antioxidant delivery for liver diseases. *Theranostics*. Jan 1.10 (3):1262-1280.

- Sharma A., Quittner-Strom E., Lee Y., Joshua J., Sarah M., Xinxin Y., Li J., Lu J., Cai Z., Chen S., Wang M., Zhang Y., Peason M., Dorn A., McDonald J., Gordillo R., Yan H., Thai D., Wang Z., Unger R. et Holland W. (2018).** Glucagon receptor antagonism improves glucose metabolism and cardiac function by promoting AMP-mediated protein kinase in diabetic mice. *Cell reports*. 22:1760-17773.
- Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M., Raviv Z., Keinan N. et Arbel N. (2010).** a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *National Center for Biotechnology Information*. 31:227–285.
- Sinha AK. (1972).** Colorimetric assay of catalase. *Annals of Clinical Biochemistry*. 47:389-394.
- Speckmann B., Steinbrenner H., Grune T. et Klotz L. (2016).** Peroxynitrite: From interception to signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 595 :153-160.
- Tan KH., Meyer DJ., Coles B. et Ketterer B. (1986).** Thymine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes. *FEBS Letters*. 207 :231-233.
- Ulard A., Hoffschir F., de Boisferon FH., Luccioni C. et Bravard A. (2003).** Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in in-herited radiosensitivity. *Free Radical Biology and Medicine*. 35 (1):68-77
- Vlase L., Benedec D., Hanganu D., Gheldiu AM., Toma VA. et Oniga I. (2014).** Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*. 77 :60-71
- Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 10 mars;160 (1) :1-40.
- Venditti A., Bianco A., Frezza C., Conti F., Bini L., Giuliani C., Bramucci M., Quassinti L., Damiano S. et Lupidi G. (2015).** Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *Aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy. *Industrial Crops and Products*. 77:353–363.
- Vinson JA., Yong Hao., Xeuhui Su. et Ligia Zubik. (1998).** Phenol antioxidant qauntity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemestry*. 46:3630-3634.
- Vors C., Nazare J., Michalski M., Caville M. (2014).** Intérêt de la phase postprandiale pour la santé de l’Homme- Obésité. 9: 31- 41.

- Wang Y (2008).** Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chemical research in toxicology*. 21, 276-281.
- Willcox Lk., Ash SL. et Catignani GL (2004).** Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44, 275-295.
- Xia C., Meng Q., Liu LZ., Rojanasakul Y., Wang XR. et Jiang BH. (2007).** Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Research*. 67(22):10823-30.
- Yoona K., Jennifer B. et peter M. (2016).** Polyphenols and glycemic control. *Nutrients*. 8(17): 1-27.
- Zainal-Abidin MH., Hayyan M., Hayyan A. et Jayakumar NS. (2017).** New Horizons in the Extraction of Bioactive Compounds Using Deep Eutectic Solvents: A Review. *Analytica Chimica Acta*. 979:1–23
- Zaynab M., Fatima M., Sharif Y., Zafar., M. HAli H. et Khan K.A. (2019).** Role of Primary Metabolites in Plant Defense against Pathogens. *Microbial Pathogenesis*.137:103-728.
- Zou Y., Qian Zl., Li Y., Kim MM., Lee SH. et Kim SK. (2008).** Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from *Ishige okamurae* in Free Radical Mediated Oxidative Systems. . *Journal of Agricultural and Food Chemestr*



ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des réactifs

- Préparation du réactif de Folin- Ciocalteu

Environ 25 ml de réactif ont été prélevés de la solution stock de normalité 2 N et introduit dans une fiole jaugée de 200 ml. Le volume a ensuite été complété jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Annexe 2 : Préparation des solutions

- **Préparation de la solution de glucose**

La dose d'administration du glucose était de 3g/kg de poids corporel (3g/kg de PC). Pour 30 rats utilisés, 45g de glucose ont été pesés, dissout dans 100ml d'eau distillée et le volume a été complé à 150ml à l'eau distillée.

- **Préparation de la solution de metformine**

La dose d'administration de la metformine était de 120mg/kg de PC. Pour 5 rats utilisés, 2g de metformine ont été pesés, dissout dans 1ml d'eau distillée et le volume a été complé à 50ml à l'eau distillée.

- **Préparation du standard acide gallique**

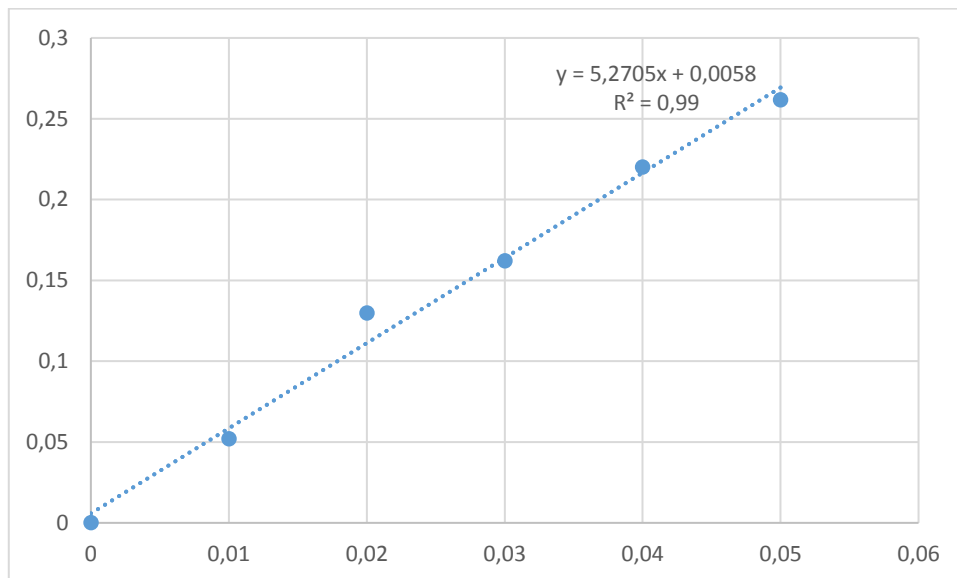
Environ 10 mg d'acide gallique ont été dissous dans 10 ml de solvant éthanol-eau pour l'obtention d'une solution mère de concentration 1 mg/ml.

- **Préparation des extraits**

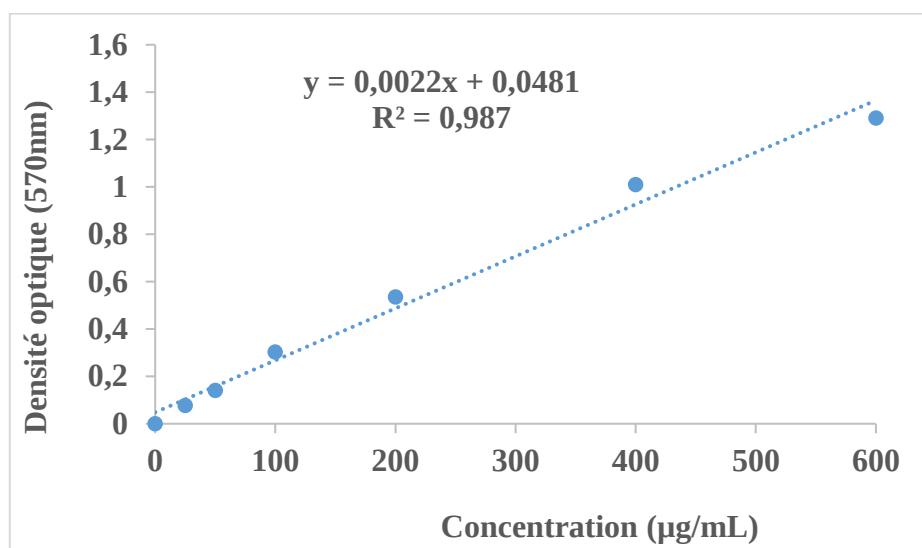
La dose d'administration pour chaque extrait (IH, DH, MH, HEH) est de 200mg/kg de PC. Pour 20 rats utilisés, 1g de chaque extrait ont été pesés, dissout dans 1ml d'eau distillée et le volume a été complé à 50ml à l'eau distillée. Le volume d'administration a été de 5 mL/kg de poids corporel.

Annexe 3 : Différentes courbes d'étalonnage

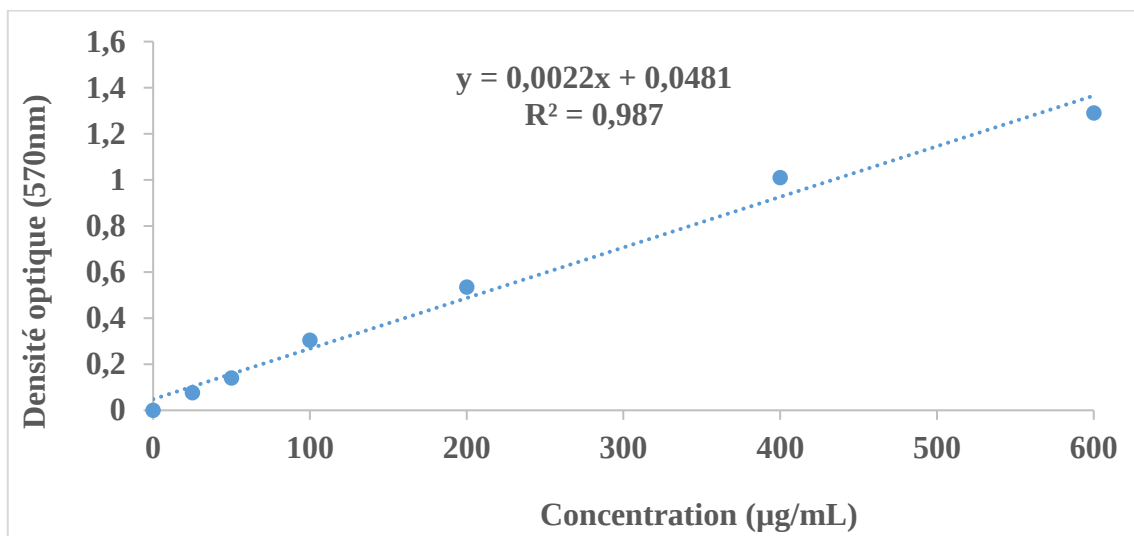
- Composés phénolique



- Dosage des protéines totales



- Dosage de la catalase



Annexe 4 : Tableaux des modes opératoires des différents tests effectués

A. Mode opératoire du dosage des composés phénoliques

	Blanc	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube4	Tube5	Tubex
Acide gallique (1mg/ml) (µL)	/	10	20	30	40	50	/
Solvant (ml)	50	40	30	20	10	0	/
Echantillon (ml)	/	/	/	/	/	/	2
Réactif de Folin (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Agiter et incuber pendant 5min à l'obscurité et à température ambiante							
Na ₂ CO ₃ 10% (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Agiter et incuber à température ambiante à l'obscurité pendant 15min puis lecture de l'absorbance à 765nm.							

B. Mode opératoire du dosage des protéines totales

	Etalonnage						Essai
Tubes	0	1	2	3	4	5	6
BSA (100µg/mL) (µL)	0	80	160	240	320	400	0
Echantillon (µL)	0	0	0	0	0	0	100
Eau distillée (µL)	400	320	240	160	80	0	300
Réactif D (mL)	2	2	2	2	2	2	2
Incubation des tubes pendant 10 min à T°C ambiante							
Réactif de Folin-Ciocalteu (µL)	400	400	400	400	400	400	400

**Etude les propriétés antioxydantes et anti-hyperglycémiantes des extraits aqueux
et hydro-éthanolique des feuilles d'*Hyssopus officinalis*.**

Incubation des tubes à l'obscurité pendant 30 min et lecture de la densité optique à 710 nm contre le blanc.

C. Mode opératoire du dosage du MDA

Tubes	Blanc	Essai
Sérum (µL)	/	50
Eau distillée (µL)	50	/
SDS 0,8% (µl)	200	200
Acide acétique 20%, pH 3,5 ajusté avec le NaOH 10N (µl)	1500	1500
Réactif de TBA 0,8% (µL)	1500	1500
Eau distillée (µL)	600	600

Passer les tubes au vortex pendant 30 secondes.

Le mélange est chauffé au bain marie bouillant pendant 60 min.

Refroidissement dans un bain d'eau froide pendant 30min, rajouter ensuite 1 mL d'eau distillée et 4 mL de butanol, puis passer les tubes au vortex pendant 30 secondes.

Lecture de l'absorbance du surnageant obtenu après centrifugation à 1000g/min pendant 10 min à 532nm.

D. Protocole pour la détermination de l'activité de la SOD

Tube	Essai	Blanc
Sérum (µL)	50	-
Eau distillée(µl)	-	50
Tampon carbonate 0,05M pH 10,2(mL)	1,5	1,5
Solution d'adrénaline fraîchement préparée 0,3mM(mL)	0,3	0,3

Le mélange est rapidement homogénéisé par inversion et placé au spectrophotomètre. La variation de l'absorbance à 480nm est déterminée toutes les 20 à 80 secondes contre le blanc.

**Etude les propriétés antioxydantes et anti-hyperglycémiantes des extraits aqueux
et hydro-éthanolique des feuilles d'*Hyssopus officinalis*.**

A. Mode opératoire pour la détermination de l'activité de la catalase.

	Etalonnage						Essai	Blanc
Tubes	0	1	2	3	4	5	6	7
Tampon phosphate (0,1M ; pH 7,5) (μL)	80	60	40	20	10	0	750	80
H ₂ O ₂ , 40mM (μL)	0	10	20	40	60	80	200	200
Sérum (μL)	0	0	0	0	0	0	50	0
Eau distillée (μL)	0	0	0	0	0	0	0	80
Incubation des tubes pendant 1 min à température ambiante								
K ₂ Cr ₂ O ₇ /CH ₃ COOH, 10mM (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Chauffage des tubes au bain-marie à 100°C pendant 10min, ensuite refroidissement des tubes et centrifugation à 3000tr/5min, enfin lecture de la densité optique à 570nm contre le blanc.								

F. Mode opératoire du dosage du Glutathion

Tubes	Blanc	Essai
Echantillon à analyser (μL)	/	50
Réactif d'Ellman (mL)	2	2
Tampon Tris-Hcl 50 mM, KCL 150 mM, pH 7,4 (μL)	50	/
Incubation pendant 60min à température ambiante et lecture de l'absorbance à 412nm contre le blanc.		

Annexe 5 : Récapitulatif des éléments des critères zootechniques

Groupes	Prise alimentaire (g)	Prise hydrique (mL)
CN	65,44 ± 38,27	142,50 ± 56,10
CP	61,04 ± 26,69	61,04 ± 26,69
IH	118,34 ± 42,05	133,67 ± 23,55
DH	76,24 ± 20,75	129,67 ± 20,26
MH	114,58 ± 59,14	146,83 ± 40,19
HEH	167,88 ± 97,83*	135,17 ± 22,16

Annexe 6: Paramètres biochimiques de l'effet préventif du stress oxydatif provoqué par le naphthalène

Groupes	Glutathion ($\mu\text{mole/L}$)	Catalase ($\mu\text{mole/min/mg}$) $\times 10^{-2}$	SOD ($\mu\text{mole/L}$) 10^{-2}	MDA ($\mu\text{mole/L}$) $\times 10^{-2}$	Protéines totales (mg/dL)
CS	$1,49 \pm 0,18^b$	$1,50 \pm 0,30^c$	$0,42 \pm 0,09^c$	$0,20 \pm 0,08^c$	$59,60 \pm 2,98$
CN	$0,55 \pm 0,27$	$0,50 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,002$	$2,00 \pm 0,02$	$53,81 \pm 10,06$
CP	$1,38 \pm 0,16^b$	$1,00 \pm 0,20^a$	$0,39 \pm 0,01^c$	$0,60 \pm 0,20^b$	$63,11 \pm 1,88$
IH	$1,30 \pm 0,26^a$	$1,00 \pm 0,03^b$	$0,32 \pm 0,03^c$	$0,50 \pm 0,20^c$	$59,04 \pm 3,12$
DH	$1,16 \pm 0,38$	$0,80 \pm 0,20$	$0,06 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,01^a$	$58,11 \pm 2,39$
MH	$0,82 \pm 0,36$	$0,70 \pm 0,40$	$0,12 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,10^b$	$62,94 \pm 1,88^a$
HEH	$0,93 \pm 0,17$	$0,70 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,09$	$0,50 \pm 0,05^c$	$62,57 \pm 2,47$

Annexe 7 : Evaluation de l'activité normoglycémique des extraits

Groupe	0	30	60	90
C N	$64,00 \pm 8,72$	$93,00 \pm 19,08$	$67,33 \pm 19,01$	$74,33 \pm 18,04$
Metformine	$63,33 \pm 2,52$	$84,33 \pm 20,50$	$65,33 \pm 16,20$	$59,00 \pm 7,81$
IH	$67,00 \pm 14,53$	$89,33 \pm 17,62$	$67,00 \pm 8,49$	$65,33 \pm 16,20$
DH	$63,00 \pm 3,61$	$89,67 \pm 14,84$	$74,67 \pm 10,21$	$70,67 \pm 18,15$
MH	$62,00 \pm 7,00$	$75,67 \pm 8,02$	$72,67 \pm 2,52$	$61,33 \pm 5,69$
HEH	$72,67 \pm 4,51$	$86,33 \pm 6,35$	$88,67 \pm 8,02$	$78,33 \pm 12,74$

Annexe 8 : Tableau récapitulatif de l'activité préventive des extraits sur la glucotolérance

Groupes	Temps (min)				
	0	30	60	90	120
CN	$80,60 \pm 9,63$	$132,40 \pm 26,46$	$111,40 \pm 20,79$	$100,20 \pm 21,14$	$94,00 \pm 28,77$
Metformine	$80,40 \pm 5,81$	$112,20 \pm 17,38$	$104,00 \pm 22,28$	$96,00 \pm 25,10$	$91,80 \pm 13,88$
IH	$81,00 \pm 13,34$	$128,20 \pm 24,98$	$114,40 \pm 11,70$	$106,80 \pm 12,93$	$83,80 \pm 15,48$
DH	$82,60 \pm 13,89$	$121,00 \pm 10,49$	$125,00 \pm 4,95$	$121,40 \pm 8,20$	$114,00 \pm 21,01$
MH	$73,60 \pm 10,64$	$103,20 \pm 13,16$	$103,20 \pm 17,74$	$90,80 \pm 11,56$	$78,75 \pm 22,02$
HEH	$86,60 \pm 13,89$	$123,40 \pm 14,38$	$105,60 \pm 7,77$	$106,60 \pm 11,57$	$103,60 \pm 12,72$

Annexe 9 : Tableau récapitulatif de l'activité curative des extraits sur la glucotolérance

Groupe	Temps (minutes)				
	0	30	60	90	120
CN	87,40 ± 8,85	177,60 ± 4,16	111,80 ± 24,83	112,80 ± 58,43	76,20 ± 25,82
Metformine	86,20 ± 9,01	149,60 ± 14,26	109,80 ± 12,36	86,50 ± 6,76	75,20 ± 8,17
IH	86,80 ± 2,28	136,60 ± 15,37	127,00 ± 26,41	92,80 ± 11,34	94,40 ± 16,68
DH	73,60 ± 11,35	141,20 ± 6,57	113,00 ± 15,84	86,00 ± 18,01	93,40 ± 26,05
MH	82,40 ± 8,62	146,40 ± 32,41	118,60 ± 39,34	67,60 ± 12,46	70,20 ± 13,03
HEH	85,20 ± 6,91	160,80 ± 26,47	127,60 ± 16,32	84,00 ± 28,42	74,20 ± 14,79

Annexe 10: Valeurs de la Capacité d'absorption du glucose des différents extraits par le test de la levure de bière.

Extraits	Dose des extraits (mg/mL)				
	1mg	2mg	3mg	4mg	5mg
DH	0,33 ± 0,01	0,47 ± 0,03	0,52 ± 0,01 ^a	0,64 ± 0,02 ^b	0,75 ± 0,01 ^b
IH	0,26 ± 0,01 ^a	0,45 ± 0,01 ^a	0,54 ± 0,04	0,69 ± 0,01	0,94 ± 0,07
MH	0,26 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,01 ^{abd}	0,42 ± 0,02 ^{abd}	0,50 ± 0,02 ^{abc}	0,59 ± 0,01 ^{ab}
HEH	0,26 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,01 ^{ab}	0,47 ± 0,01 ^{ab}	0,53 ± 0,03 ^{ab}	0,58 ± 0,01 ^{acb}

Annexe 11 : Photographies de quelques Appareils utilisés lors des travaux



Spectrophotomètre
Colorimétrique



Centrifugeuse TD4



Mixeur



Scelleuse



Balance

**Etude les propriétés antioxydantes et anti-hyperglycémiantes des extraits aqueux
et hydro-éthanolique des feuilles d'*Hyssopus officinalis*.**

Annexe 12 : Clairance d’Ethique

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



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

02 December 2022

Djabon Falonne Bodrase
University of Yaoundé 1, Faculty of Science
Department of Biochemistry

Ethical Clearance Reference N°: BTC-JIRB2022-046 (please use this reference number for all correspondences)

Protocol Title: « Etude des propriétés antioxydantes et ant-hyper-glycémiques *in vivo* des extraits aqueux et hydro-éthanoliques des feuilles d'hysopé (*Hyssopus officinalis* L.) »

Investigator(s) Name(s): Djabon Falonne Bodrase, MSc. Student; Prof. Kotue Taptue Charles, Supervisor.

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 21st of October 2022.

The JIRB is satisfied with the current version of the research protocol and supporting documents, and agreed that there is no objection on ethical grounds to the proposed study. The JIRB is therefore pleased to grant approval 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 participant; (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.

Sincerely,


Professor Wilfred F. Mbacham
Coordinator of the CRFD-SVSE
Chair of JIRB
Dr. Wilfred Mbacham, Sc.D
Public Health Biotechnologist




Professor Frederic Nico Njavyou
Coordinator for Animal Research Bioethics,
Faculty of Science, UYI

