

République algérienne démocratique et populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté des Sciences de La Nature et de La Vie

Département d'Agronomie



UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

Par

Benhamdi Alaa Eddine

Thème :

Etude phytochimique et activités antioxydante et anti-inflammatoire de la *Withania frutescens*.

Soutenu le **08/10/2023** devant le jury composé de :

| | | | |
|---------------------|----------------------------|------------|---------------------------------|
| Présidente | BELARBI Amaria | MCA | Université de Mostaganem |
| Encadrant | BELHOCINE Mansouria | Pr | Université de Mostaganem |
| Examinatrice | KRIB Soraya | MCA | Université de Mostaganem |

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Dieu le Tout-Puissant, qui m'a accordé la volonté, l'énergie et le courage nécessaires pour accomplir ce travail.

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme BELHOCINE Mansouria professeure à l'université de Mostaganem, je la remercie pour la qualité de son encadrement, sa confiance et sa patience, je la remercie également pour sa disponibilité durant la préparation de ce mémoire.

Les travaux du présent mémoire ont été réalisés majoritairement au Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition (LTAN) de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem dirigé par le docteur AIT SAADA Djamel. Certains travaux ont été effectués dans le laboratoire pédagogique de Biochimie 03. Que Monsieur AIT SAADA Djamel soit infiniment remercié pour m'avoir autorisé l'accès au LTAN.

La gestion administrative de mon dossier a été grandement facilitée par Madame BOUALEM Malika, docteur et responsable du département d'Agronomie auquel j'appartiens. Je lui exprime ma forte reconnaissance.

Un grand merci à Monsieur BENABDELMOUMENE Djilali pour ses conseils précieux, son soutien constant et son aide inestimable.

J'adresse mes sincères remerciements au président du jury, Merci à vous Mme BELARBI Amaria, Maître de conférence classe A, à l'Université de Mostaganem, d'avoir accepté de présider le jury.

J'exprime aussi mes vifs remerciements à Mme KRIB Soraya, maître de conférence classe A, à l'université de Mostaganem, pour l'intérêt qu'il a porté à ma recherche et pour avoir accepté d'examiner mon travail et de l'enrichir avec ses remarques constructives.

Enfin, je remercie aussi nos enseignants pour leurs soutiens moraux et encouragements.

Dédicaces

Ce projet de fin d'études, est dédié :

A mes chers parents, qui m'ont toujours soutenu et motivé dans mes études, qui ont changés des nuits en jours pour m'assurer les bonnes conditions.

C'est un moment de plaisir de dédier cette modeste œuvre, à mon chère frère, source de joie et de bonheur.

Je tiens également à dédier ce travail à ma fiancée pour son aide, ses encouragements, son amour, sa compréhension, aucun langage ne saurait exprimer mon respect et encouragements. Je te dédie ce travail en reconnaissance à l'amour exceptionnel que tu m'offres quotidiennement.

Je dédie également ce travail à ma famille élargie, qui a toujours été là pour moi, dans les moments de joie comme dans les moments difficiles.

Mes sincères remerciements à Madame Rachida, technicienne de laboratoire biochimie 03, pour son aide technique et son soutien indispensable au laboratoire.

Résumé

Contexte : Depuis le début des temps, les populations recourent aux plantes aromatiques et médicinales comme médecine traditionnelle pour guérir différentes maladies humaines. Cependant, peu d'études ont été réalisées dans le passé pour bien documenter, approuver, valider et promouvoir les connaissances traditionnelles.

Objectif : Cette étude, réalisée au laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem a été menée du 1 mai 2023 au 30 Juillet 2023 pour évaluer les caractéristiques phytochimiques et les propriétés biologiques de *Withania frutescens* collectée en avril 2023 dans la wilaya de Mostaganem.

Matériels et Méthodes : Un screening phytochimique a été effectué suivi de dosages des polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés. L'activité antioxydante a été évaluée avec les tests DPPH et FRAP et l'activité antiinflammatoire in vitro a été mise en évidence avec les tests d'hémolyse des globules rouges et de dénaturation des protéines (BSA et blanc d'œuf).

Résultats : Le criblage phytochimique a conclu en une variété de substances bioactives (polyphénols, tanins, terpènes, coumarine, alcaloïdes, flavonoïdes, saponines). L'évaluation quantitative a révélé la richesse de la plante en polyphénols, flavonoïdes et en tanins, et les activités antioxydante et antiinflammatoire sont importantes.

Conclusion : L'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* renferme des composés biologiquement actifs avec des propriétés antioxydante et antiinflammatoire. Cette plante peut être utilisée en médecine traditionnelle pour traiter certaines maladies.

Mots clés : *Withania frutescens*, hémolyse, activité antiinflammatoire, activité antioxydante, composés phénoliques, phytochimie, dénaturation des protéines, choc thermique, tanins, flavonoïdes.

Abstract

Context: Since the beginning of time, people have used aromatic and medicinal plants as traditional medicine to cure various human illnesses. However, few studies have been carried out in the past to properly document, approve, validate and promote traditional knowledges.

Objectives: This study, carried out at the Food Technology and Nutrition laboratory of the Faculty of Nature and Life Sciences at the Abdelhamid Ibn Badis University of Mostaganem, was performed from May 1, 2023 to July 30, 2023 to evaluate the phytochemical characteristics and the biological properties of *Withania frutescens* collected in April 2023 in the wilaya of Mostaganem.

Materials and Methods: A phytochemical screening was undertaken followed by assays of polyphenols and flavonoids. The antioxidant activity was evaluated with the DPPH and FRAP tests and the anti-inflammatory activity was demonstrated with the hemolysis and protein denaturation tests.

Results: The phytochemical screening concluded in a variety of bioactive substances (polyphenols, tannins, terpenes, coumarin, alkaloids, flavonoids, saponins). The quantitative evaluation revealed the richness of the plant in polyphenols and flavonoids, the antioxidant and anti-inflammatory activities are moderate.

Conclusion: The ethanolic extract of *Withania frutescens* leaves contains biologically active compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties. This plant can be used in traditional medicine to treat certain diseases.

Key words: *Withania frutescens*, hemolysis, antiinflammatory activity, antihemolytic potential, antioxidant activity, phenolic compounds, phytochemistry, protein denaturation, Thermal shock, tanins, flavonoïdes.

ملخص

السياق: منذ بداية الزمن، استخدم الناس النباتات العطرية والطبية كطب تقليدي لعلاج الأمراض البشرية المختلفة. ومع ذلك، لم يتم إجراء سوى القليل من الدراسات في الماضي لتوثيق المعارف التقليدية والموافقة عليها والتحقق من صحتها وتعزيزها بشكل صحيح.

الهدف: أجريت هذه الدراسة بمختبر تكنولوجيا الأغذية والتغذية بكلية علوم الطبيعة والحياة بجامعة عبد الحميد بن باديس بمستغانم في الفترة من 1 مايو 2023 إلى 30 يوليو 2023 لتقييم الخصائص الكيميائية النباتية والخصائص البيولوجية لنبات *Withania frutescens* التيمم جمعها في أبريل 2023 بولاية مستغانم

المواد والطرق: تم إجراء فحص كيميائي نباتي متنوع بجرعات من البوليفينول والفلافونويد. تم تقييم نشاط مضادات وتم إثبات النشاط المضاد للالتهابات من خلال اختبارات انحلال الدم وتمسخ FRAP و DPPH الأوكسدة باستخدام اختبارات البروتين.

النتائج: تم إجراء الفحص الكيميائي النباتي في مجموعة متنوعة من المواد النشطة بيولوجيا (البوليفينول، العفص، التربين، الكومارين، الفلويدات، الفلافونويد، الصابونين). كشف التقييم الكمي عن غنى النبات بالبوليفينول والفلافونويد، كما أن النشاط المضاد للأوكسدة والمضاد للالتهابات معتدل.

الخلاصة: المستخلص الإيثانولي لأوراق وبتانيا فروتيسنس يحتوي على مركبات نشطة بيولوجيا ذات خصائص مضادة للأوكسدة ومضادة للالتهابات. يمكن استخدام هذا النبات في الطب التقليدي لعلاج بعض الأمراض.

الكلمات المفتاحية: وبتانيا فروتيسنس، انحلال الدم، النشاط المضاد للالتهابات، النشاط المضاد للأوكسدة، المركبات الفينولية، الكيمياء النباتية

Liste des abréviations

Abs : Absorbance

AlCl₃ : Le chlorure d'aluminium

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

FeCl₃ : Trichlorure de fer

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power.

g : grammes

HCL : Chlorure d'hydrogène

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

Mg : Magnésium

min : minutes

ml : Millilitres

MS : Matière Sèche

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NH₄OH : Ammoniac

PBS : Phosphate-Buffered Saline

% : Pourcentage

µg : Microgramme

µg EAG/g MS : Microgramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche

µg EQ/g MS : Microgramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche

µg EC/g MS : Microgramme d'équivalent de Catéchine par gramme de matière sèche

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 01 : Classification des composés phénoliques | 13 |
| Figure 02 : Types d'acides phénoliques..... | 14 |
| Figure 03 : Types de flavonoïdes | 15 |
| Figure 04 : Autres types de polyphénols | 17 |
| Figure 05 : Structures des tannins condensés | 19 |
| Figure 06 : Tannins hydrolysables : tannins galliques (a) et tannins éllagiques (b) | 19 |
| Figure 07 : Stress oxydant | 25 |
| Figure 08 : Structure de l'acide urique | 29 |
| Figure 09 : Structure du glutathion | 29 |
| Figure 10 : Structure de la vitamine E (ou α –tocophérol) | 30 |
| Figure 11 : Structure de la vitamine C | 30 |
| Figure 12 : La réaction inflammatoire | 32 |
| Figure 13 : Les phases de l'inflammation aigüe | 33 |
| Figure 14 : Les phases de la réaction inflammatoire aigüe | 35 |
| Figure 15 : La plante de <i>Withania frutescens</i> | 40 |
| Figure 16 : Résultats du screening phytochimique de <i>Withania frutescens</i> | 53 |
| Figure 17 : Teneur en polyphénols totaux de <i>Withania frutescens</i> en mg EAG/g..... | 55 |
| Figure 18 : Teneur en flavonoïdes de <i>Withania frutescens</i> en mg EQ/g..... | 57 |
| Figure 19 : Teneur en tanins de <i>Withania frutescens</i> en mg EC/g..... | 59 |
| Figure 20 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par la chaleur de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> et du diclofénac | 61 |
| Figure 21 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par l'hypotonie de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> et du diclofénac..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Figure 22 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine d'œuf de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> ou du diclofénac..... | 67 |
| Figure 23 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> ou du diclofénac..... | 71 |
| Figure 24 : Pourcentage d'inhibition du DPPH de l'extrait du <i>Withania frutescens</i> | 74 |
| Figure 25 : EC50 du test de FRAP de l'extrait du <i>Withania frutescens</i> | 76 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 01 : Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)..... | 26 |
| Tableau 02 : Les espèces réactives de l'azote (ERA)..... | 27 |
| Tableau 03 : Résultat du rendement d'extraction de <i>Withania frutescens</i> | 52 |
| Tableau 04 : Teneur en polyphénols de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> en mg EAG/g..... | 55 |
| Tableau 05 : Teneur en flavonoïdes de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> en mg EQ/g..... | 57 |
| Tableau 06 : Teneur en tanins de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> en mg EC/g..... | 58 |
| Tableau 07 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par la chaleur de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> et du diclofénac de sodium | 60 |
| Tableau 08 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par l'hypotonicité de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> et du diclofénac..... | 63 |
| Tableau 09 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation des protéines (blanc d'œuf) de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> et du diclofénac..... | 66 |
| Tableau 10 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA) de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> et du diclofénac..... | 69 |
| Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> | 72 |
| Tableau 12 : EC50 du test de FRAP de l'extrait de <i>Withania frutescens</i> | 73 |

Table des Matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Partie I : Synthèse bibliographiques

Introduction.....01

Chapitre I : *Withania frutescens*

Généralités.....04

I. Présentation de la *Withania*

frutescens.....06

I.1. Définition06

I.2. Histoire.....06

I.3. Etude botanique06

I.3.1 Classification06

I.3.2 Nomenclature07

I.4 Composition07

I.4.1 Métabolites primaires.....07

I.4.2 Métabolites secondaire.....10

I.4.2.1 Rôle des métabolites secondaires.....11

I.4.2.2. Classification des métabolites secondaires.....12

I.5 Répartition géographique de *Withania frutescens*.....20

I.5.1 Origine et répartition en Asie20

I.5.2 Expansion au Moyen-Orient et en Afrique du nord.....20

I.6 Pharmacologie et applications thérapeutiques de *Withania frutescens*.....21

Chapitre II : Activités antioxydante et anti-inflammatoire

| | | |
|------|---|-----|
| I. | Activité antioxydante..... | 24 |
| II. | I.1 Stress oxydatif..... | 24 |
| III. | 1.1 Généralités..... | 24 |
| IV. | 1.2 Définition..... | 24 |
| | 1.3 Origine du stress oxydatif..... | 25 |
| V. | I.2 Les Radicaux libres..... | 26 |
| | 2.1 Généralités..... | 26 |
| | 2.2 Différentes formes de radicaux libres..... | 26 |
| | I.3 Antioxydants..... | 27 |
| | 3.1 Généralités..... | 27 |
| | 3.2 Types d'antioxydants..... | 27 |
| | 3.2.1 Antioxydants endogènes..... | 28 |
| | 3.2.2 Antioxydants exogènes..... | 29 |
| II. | Activité anti-inflammatoire | |
| | II.1 Inflammation..... | 31 |
| | II.1.1 Définition..... | 31. |
| | II.2 Inflammation aiguë..... | 32. |
| | II.2.1 Les phases de l'inflammation aiguë..... | 32. |
| | II.3 Inflammation chronique..... | 34. |
| | II.4 Les anti-inflammatoires..... | 35. |
| | 4.1 Généralités..... | 35. |
| | 4.2 Les anti-inflammatoires stéroïdiens..... | 36. |
| | 4.3 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens..... | 36. |
| | 4.4 Les anti-inflammatoires d'origine végétale..... | 37. |

Partie II : Partie Expérimentale

Chapitre III : Matériel et Méthodes

| | |
|---|-----|
| III. Objectif | 40 |
| 1. Lieu et période d'expérimentation | 40 |
| 2. Matériel végétal..... | 40 |
| 3. Méthodologie | 41 |
| 3.1. Analyse | |
| qualitative | 41. |
| 3.1.1. Screening phytochimique | 41. |
| 3.2. Analyse | |
| quantitative | 43. |
| 3.2.1. Dosage des polyphénols totaux..... | 43. |
| 3.2.2. Dosage des flavonoïdes..... | 44. |
| 3.2.3. Dosage des tanins | 45. |
| 3.3. Evaluation des activités | |
| biologiques..... | 45. |
| 3.3.1. Détermination de l'activité anti-inflammatoire..... | 45. |
| 3.3.1.1. Effet stabilisateur de la membrane des érythrocytes..... | 46. |
| 3.3.1.2. Test d'inhibition de la dénaturation des protéines..... | 47. |
| 3.3.2. Détermination de l'activité antioxydante..... | 49. |
| 3.3.2.1. Test de DPPH | 49. |
| 3.3.2.2. Test de FRAP | 50. |

Chapitre IV : Résultats et discussion

| | |
|--|-----|
| IV.1. Rendement d'extraction..... | 52. |
| IV.2. Analyse qualitative | 53 |
| IV.3. Analyse quantitative | 54 |
| IV.3.1 Teneur en polyphénols totaux..... | 54. |
| IV.3.2. Teneur en flavonoïdes..... | 56. |
| IV.3.3. Teneur en tanins | 58. |

| | |
|--|-----|
| IV.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire In vitro | 59. |
| IV.4.1. Test de l'hémolyse..... | 59. |

| | |
|--|------------|
| IV.4.2. Test de dénaturation des protéines..... | 65. |
| IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante..... | 71. |
| IV.5.1. DPPH | 71. |
| IV.5.2. FRAP | 73. |
| Conclusion..... | 76. |

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Introduction :

Les plantes médicinales ont été utilisées depuis des temps immémoriaux pour traiter diverses maladies et affections. Leur utilisation est enracinée dans les traditions culturelles et a été transmise de génération en génération. Avec l'avènement de la science moderne, l'intérêt pour ces plantes et leurs propriétés thérapeutiques potentielles a augmenté, conduisant à des recherches approfondies pour comprendre leurs mécanismes d'action et isoler les composés bioactifs responsables de leurs effets bénéfiques.

Les plantes supérieures ont synthétisé par des voies métaboliques complexes, de nombreux composés qu'elles utilisent pour diverses fonctions adaptatives, pour répondre aux stress biotiques et abiotiques que ces plantes peuvent affronter. Ils contiennent une diversité de composés phytochimiques (polyphénols, tanins, flavonoïdes, ...) aux propriétés moléculaires et aux activités biologiques très différentes (antihémolytique, antioxydantes, antimicrobiennes, ...). Les plantes et notamment les plantes aromatiques et médicinales constituent un important réservoir de molécules bioactives, c'est pourquoi l'application de la recherche scientifique à la recherche de nouveaux médicaments naturels doit impliquer l'inventaire des plantes et l'évaluation systématique de leurs activités biologiques. De façon plus large, une plante médicinale est un végétal doué d'un effet thérapeutique sur l'organisme sans être toxique à dose normale comme un antioxydant, antibactérien, anti-inflammatoire, inhibiteur enzymatique par des molécules et composés actifs, (polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, saponines...).

Le recours à la médecine traditionnelle est une pratique très courante dans les campagnes et même dans les villes. L'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS, 2019**) estime que 80% de la population des pays en développement utilisent les plantes médicinales pour combattre plusieurs maladies et assurer leurs soins de santé, en recourant principalement aux extraits de ces plantes pour satisfaire leurs besoins en matière de santé (**Gisèle et al., 2018**). Cette situation peut s'expliquer par la toxicité des produits synthétiques, coût élevé des médicaments chimiques, ou l'insuffisance des centres de santé surtout en milieu rural (**Mpondo et al., 2012**). Parmi les potentialités biologiques reconnues des plantes, l'activité antioxydante présente un intérêt de plus en plus grandissant à cause des rôles importants que jouent les composés antioxydants, retrouvés au niveau des plantes, dans le traitement et la prévention des maladies du stress oxydant (**Jones, 2008 ; Hassan et al., 2017**). En plus, le potentiel inhibiteur des enzymes, immunostimulant ou antihémolytique des extraits de plantes sont de plus en plus exploités in vitro et in vivo (**Sahabi, 2009**). Parmi ces plantes, *Withania frutescens*, une espèce indigène des régions arides et semi-arides, a attiré l'attention en raison de son utilisation traditionnelle dans le traitement de diverses affections tel que le diabète (**El Moussaoui et al., 2021a ; Mechchate et al., 2021**).

Introduction

Les études scientifiques sur *Withania frutescens* restent limitées, malgré son utilisation traditionnelle, soulignant la nécessité d'une recherche plus approfondie pour explorer son potentiel thérapeutique.

C'est dans cet esprit que ce travail vise une contribution à la mise en valeur de notre patrimoine végétal naturel afin de développer de nouveaux produits à haute valeur ajoutée. Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes concentrés sur les plantes médicinales dans les zones arides et semi-arides dont les propriétés thérapeutiques ont été prouvées par l'utilisation de la médecine traditionnelle par la population indigène.

L'objectif principal de ce travail est focalisé sur une étude phytochimique et l'évaluation des activités antioxydante et antihémolytique de la *Withania frutescens*. Ce travail présente une synthèse bibliographique permettant de définir plusieurs termes abordés dans notre sujet et une partie qui exprime la méthodologie utilisée et les paramètres mesurés suivi des parties résultats et discussion qui permettent de discuter nos résultats en comparaison avec d'autres résultats trouvés par les autres chercheurs, finalement, une conclusion générale résume l'ensemble du travail effectué et fini par des perspectives

Introduction

Chapitre I :
Withania frutescens

Généralités

Les plantes possèdent une capacité remarquable à produire une grande variété de composés bioactifs grâce à des processus métaboliques complexes. Ces composés jouent un rôle crucial dans les fonctions d'adaptation des plantes face aux conditions climatiques. Les plantes renferment ainsi de nombreuses molécules phytochimiques, telles que les polyphénols et les alcaloïdes, qui possèdent différentes propriétés biologiques et pharmacologiques, notamment des effets anti tumoraux, antiviraux, antimicrobiens, antioxydants et cicatrisants. En conséquence, les plantes représentent une source précieuse de molécules bioactives.

De nos jours, la recherche de médicaments naturels présentant moins d'effets secondaires est hautement appréciée. Toutefois, l'utilisation de composés phytochimiques sans preuves scientifiques peut potentiellement nuire à la santé humaine en entraînant des effets toxiques indésirables.

Afin de garantir la validité scientifique des plantes et de leurs dérivés, des approches globales ont été adoptées en médecine traditionnelle, telles que celles décrites par (**Zekkour et al.**, 2008).

Cependant, l'utilisation thérapeutique des plantes sans références scientifiques fiables concernant leurs profils toxiques peut entraîner de graves problèmes pour la santé humaine, comme le soulignent (**De Broe et al.**, 2016).

Il est donc essentiel de mener des études scientifiques afin d'optimiser les doses potentiellement bénéfiques des plantes et de leurs dérivés. Plusieurs facteurs doivent être pris en compte pour évaluer ce profil thérapeutique, notamment le stade de croissance et la maturité des plantes utilisées (feuilles, racines, écorce, fleurs, graines, etc.), les conditions de stockage des produits (fraîchement récoltés ou stockés pendant une longue période) et les variations saisonnières de la composition phytochimique.

W. frutescens est une plante médicinale ligneuse vivace qui appartient à la division Magnoliophyta, à la classe Magnoliopsida, à l'ordre Solanales, à la famille Solanaceae et au genre *Withania*.

Cette plante se distingue par sa richesse en classes chimiques bioactives telles que les tanins, les mucilages, les terpénoïdes, les saponines, les flavonoïdes et les polyphénols.

W. frutescens a été largement utilisé par les populations indigènes pour lutter contre l'intoxication, comme l'ont souligné (**De Broe et al.**,2016).

D'autres études ont également rapporté ses propriétés pharmacologiques, notamment ses effets antioxydants, antimicrobiens et antifongiques, comme indiqué par **El Moussaoui et al.** (2019).

Le genre *Withania* est couramment utilisé en médecine traditionnelle pour traiter le stress, l'inflammation, la conjonctivite, la tuberculose et diverses autres infections, comme le mentionnent (**Archana et Namasivayamet al.**,1998) et (**Bhattacharya et al.**, 2003) et présentaient des effets immunomodulateurs sur des modèles animaux, comme indiqué dans les données antérieures (**Dhuley et al.**, 2008 ; **Sharma et al.**, 2010).

La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale, et la recherches trouvent dans les plantes des molécules actives nouvelles ou des matières premières pour l'hémisynthèse des composés actifs.

L'utilisation des plantes en thérapeutique (phytothérapie) connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public (**Diallo**, 2005). Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent (**Marc**, 2001). Par ailleurs, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90% de celles utilisées en médecine traditionnelle (**Diallo**, 2005).

Aujourd'hui, les plantes retrouvent leur place dans notre vie quotidienne (**Flemming**, 1997), plus particulièrement dans les pays en voie de développement où en plus de la médecine conventionnelle, on se soigne aussi avec des remèdes traditionnels à base de plantes (**Waridel**, 2003).

Deux groupes de métabolites ont été distingués, primaires et secondaires (**Hartmann**, 2007). Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes : les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Quant aux métabolites secondaires, ce sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures.

Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique.

Ils sont largement utilisés en thérapie et constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés anti oxydantes, anti-inflammatoires et/ou mutagènes (Epifano *et al.*, 2007).

I. Présentation de *Withania frutescens*

I.1 Définition

Withania frutescens est une plante appartenant à la famille des Solanaceae, couramment utilisée dans la médecine traditionnelle indienne, également connue sous le nom d'Ayurveda (Mishra *et al.*, 2000 ; Chandrasekhar *et al.*, 2012).

I.2 Histoire

L'utilisation de la *Withania frutescens* remonte à plus de 3000 ans et elle est l'une des plantes les plus réputées de l'Ayurveda, la médecine traditionnelle de l'Inde. Elle est souvent décrite comme le "ginseng indien" en raison de ses propriétés tonifiantes et adaptogènes. Ses racines et ses baies sont utilisées pour préparer des remèdes pour une variété de conditions de santé, allant de l'anxiété et de la dépression à l'inflammation et à l'immunité (Mishra *et al.*, 2000 ; Mirjalili *et al.*, 2009).

I.3 Etude botanique

I.3.1 Classification

Règne : Plantae

Ordre : Solanales

Famille : Solanaceae

Genre : *Withania*

Espèce : *Withania frutescens*

I.3.2 Nomenclature

La famille des Solanacées comprend 84 genres, comprenant 3000 espèces, répartis partout dans le monde. Le genre *Withania* comprend 26 espèces différentes trouvées en Afrique du Nord, en Asie occidentale et méridionale, en Europe méridionale et dans la région méditerranéenne (**Mirjalili et al.**, 2009). On pense que *Withania* doit son nom à un géologue britannique, Henry Witham, qui a commencé à écrire sur la botanique fossile en 1830 (**Symon**, 1981).

Withania frutescens (*W. frutescens*) est une plante médicinale ligneuse vivace, c'est un Arbrisseau vivace résistant à la sécheresse, de 30 à 150 cm de hauteur, à feuilles alternes, pétiolées, largement ovales ou presque orbiculaires, entières, obtuses ou arrondies à l'extrémité, parfois un peu cordées à la base. Fleurs hermaphrodites, solitaires ou par petits bouquets de 2-3 ; corolle en clochette pendante, jaune-verdâtre, pubescente, à 5 divisions. Parmi les 26 espèces du genre *Withania* qui ont été identifiées dans le monde, seules cinq ont été acceptées comme noms : *Withania somnifera* (L.) Dunal, *Withania japonica* (Franch et Sav), *Withania coagulans* (Stocks) Dunal, *Withania begonifolia* (Roxb .) Hunz, et *Withania frutescens* (L.) Pauquy. (**Srivastava et Sangwan**, 2020).

I.4 Composition

Withania frutescens est riche en divers constituants chimiques actifs. Les principaux composés bioactifs sont des alcaloïdes et des lactones stéroïdiennes, appelés withanolides (**Singh et al.**, 2022). Ces withanolides sont connus pour leurs propriétés pharmacologiques variées, notamment anti-inflammatoires, antitumorales, adaptogènes, immuno-modulatrices et neuroprotectrices (**Mishra et al.**, 2000 ; **Dar et al.**,2015). Outre les withanolides, *Withania frutescens* contient également des flavonoïdes, des acides aminés, des peptides, des glucosides, de l'acide withanique et des oligo-éléments comme le fer, le zinc et le cuivre (**Mishra et al.**, 2000).

I.4.1 Métabolites primaires :

Tous les êtres vivants assurent leur croissance grâce à un ensemble complexe de réactions chimiques, parmi ces réactions « métabolisme primaire » qui permettent la synthèse et

l'utilisation de substances essentielles pour la vie tel que : polysaccharides, Glucides, protéines, acides aminés, acide nucléiques et lipides (**Botineau**, 2010).

- **Polysaccharides**

Les polysaccharides sont une classe de macromolécules structurellement diverses, reliées entre elles par des résidus monosaccharides via différentes liaisons glycosidiques. Les polysaccharides extraits de *Withania frutescens* sont parmi les composés bioactifs les plus caractéristiques découverts récemment. Jusqu'à présent, la méthode d'extraction la plus couramment utilisée pour les polysaccharides est l'extraction par solvant ou l'extraction assistée par plusieurs solvants. La méthode d'extraction a un impact significatif sur le rendement en polysaccharides, la teneur en sucre, la composition en monosaccharides et les propriétés structurelles (**Benaoun**, 2018).

- **Protéines et acides aminés**

Les acides aminés jouent également un rôle essentiel dans la biochimie de *Withania frutescens*. Cependant, le profil spécifique des acides aminés libres peut varier en fonction de nombreux facteurs, y compris la variété de la plante, l'âge de la plante, les conditions de croissance et les parties spécifiques de la plante examinées.

Withania frutescens est connue pour sa teneur en divers acides aminés, bien que les concentrations spécifiques peuvent varier. En général, les racines, les feuilles et les fruits de la plante contiennent des acides aminés tels que l'alanine, la cystéine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la proline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine et la valine (**Mirjalili et al.**, 2009).

Il est important de noter que les composés bioactifs, y compris les acides aminés, ne sont pas répartis de manière égale dans la plante. Par exemple, la teneur en acides aminés peut être plus élevée dans les racines que dans les feuilles ou les fruits, ou vice versa. De plus, la composition spécifique des acides aminés peut varier en fonction des conditions environnementales, du stade de développement de la plante et d'autres facteurs.

En ce qui concerne les composés aromatiques, il n'est pas clairement documenté si *Withania frutescens* produit des composés aromatiques à partir des acides aminés, comme c'est le cas

pour *Camellia sinensis*. Cependant, *Withania frutescens* est connue pour produire une variété de métabolites secondaires, y compris des withanolides et des alcaloïdes, qui ont des propriétés bioactives et pourraient contribuer à l'arôme et au goût de la plante.

- **Acides aminés et acides gras**

La *Withania frutescens* contient également une gamme d'acides aminés, y compris le tryptophane, l'alanine, la glycine, la proline, la tyrosine et l'acide aspartique. En outre, la plante est une source d'acides gras, y compris les acides oléique, linoléique, palmitique et stéarique (Mishra *et al.*, 2000).

Caroténoïdes

Les caroténoïdes tels que le carotène, la lutéine et la violaxanthine sont présents en quantités minimales dans le thé. En raison de leur caractère hydrophobe, ces caroténoïdes se retrouvent très peu dans l'infusion du thé (Clement, 2004).

- **Alcaloïdes**

Withania frutescens contient également une variété d'alcaloïdes, dont la withanine, la somnine, la somniferine, l'anasomnine, la tropine, la pseudotropine et l'isopélletièreine. Certains de ces alcaloïdes ont montré des propriétés calmantes, sédatives et hypotensives (Mirjalili *et al.*, 2009 ; Dar *et al.*, 2015).

- **Glucides**

Les glucides solubles représentent environ 5% de la matière sèche du thé. Parmi ces glucides, on retrouve environ 1 à 2% d'oses, ainsi qu'une petite quantité de gomme et de pectine (Clement, 2004).

- **Withanolides**

Les withanolides sont des lactones stéroïdiennes qui constituent le groupe le plus important de composés bioactifs présents dans *Withania frutescens* (Singh *et al.*, 2022). Plus de 40 withanolides ont été isolés et identifiés dans cette plante, parmi lesquels la withaferin A et le withanolide D sont les plus notables en raison de leurs puissantes propriétés pharmacologiques, y compris leurs activités anti-inflammatoires, anti-tumorales,

neuroprotectrices et immunomodulatrices (**Mishra et al.**, 2000 ; **Mirjalili et al.**, 2009 ; **Dar et al.**, 2015 ; **Singh et al.**, 2022 ; **Kumar et al.**, 2023).

- **Oligo-éléments**

Les oligo-éléments présents dans la *Withania frutescens* comprennent le fer, le zinc, le cuivre, le calcium et le potassium. Ces oligo-éléments sont essentiels pour le bon fonctionnement du corps humain (**Mishra et al.**, 2000). La *Withania frutescens* est connue pour contenir une variété d'oligo-éléments, qui sont des minéraux nécessaires en petites quantités pour le bon fonctionnement de l'organisme humain. Ces éléments jouent un rôle clé dans la régulation des processus physiologiques, notamment le maintien de l'équilibre hydrique, la régulation du métabolisme et la protection contre les radicaux libres (**Mishra et al.**, 2000).

- ✓ Fer

Le fer est un élément essentiel pour la production d'hémoglobine, une protéine dans les globules rouges qui transporte l'oxygène des poumons vers les tissus de tout le corps. Une carence en fer peut conduire à l'anémie, une condition caractérisée par une diminution du nombre de globules rouges ou de la quantité d'hémoglobine dans le sang, ce qui peut entraîner une fatigue et une faiblesse (**Zimmermann et Hurrell**, 2007).

- ✓ Zinc

Le zinc est un élément vital qui joue un rôle clé dans diverses fonctions biologiques, notamment la croissance, le développement, le système immunitaire, la reproduction et la vision. Il est également impliqué dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides, et la régulation de l'expression génique. Une carence en zinc peut entraîner une variété de problèmes de santé, allant d'une croissance retardée à un système immunitaire affaibli (**Prasad**, 2013).

- ✓ Cuivre

Le cuivre est un oligo-élément essentiel qui joue un rôle dans le maintien de la santé des os, du système nerveux et du système immunitaire. Il participe à la production de globules rouges et aide à l'absorption du fer. Un apport insuffisant en cuivre peut entraîner des problèmes de santé tels que l'anémie, les maladies cardiaques et les troubles neurologiques (**Bost et al.**, 2016).

I.4.2 Métabolites secondaires

Les végétaux supérieurs ont la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques complexes des métabolites dits secondaires. Ces composés sont utilisés par les plantes pour diverses fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir ou améliorent l'efficacité de la reproduction (**Thomas**, 2011).

Ces métabolites sont situés dans l'un des trois classes, des polyphénols, des alcaloïdes et des terpénoïdes. De nombreuses études ultérieures ont prouvé la bioactivité de ces molécules, citant les activités antitumorale, antivirale, antimicrobienne, antioxydant, anti-inflammatoire, etc. (**Thomas**, 2011).

Les composés métaboliques secondaires ne sont pas produits directement au cours de la photosynthèse, mais découlent de réactions chimiques subséquentes. On les appelle donc des métabolites secondaires. Ces composés ne se trouvent pas dans toutes les plantes.

Les métabolites secondaires ont une répartition limitée dans l'organisme de la plante et sont produits en faible quantité, sont d'une variété structurale extraordinaire, plus de 200.000 structures ont été définies. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique (**Hartmann**, 2007).

I.4.2.1 Rôles des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires jouent un rôle très important notamment, en réponse au stress biotique et abiotique qu'ils peuvent subir tels que, les changements de température, la sécheresse, la salinité, la radiation, les herbivores, les infections pathogènes, la défense contre l'attaque des organismes compétitifs dont les bactéries, les champignons, les insectes, les animaux et les autres plantes (**Kliebenstein**, 2012 ; **Costa et al.**, 2013). Cependant, le rôle écologique le plus important est lié à la fonction reproductrice qui garantit le succès évolutif de toutes les espèces vivantes, les pigments et les composés volatils de ces métabolites peuvent attirer les pollinisateurs et ainsi favoriser la dispersion des graines et la fécondation (**Iriti**, 2013)

Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections. Ils sont importants, non seulement en raison de leur rôle dans la défense contre la prédation par les micro-organismes comme les insectes et les herbivores mais aussi pour leurs propriétés biologiques comme antioxydant, antimicrobien

et anti-cancérigènes ainsi leurs effets thérapeutiques contre plusieurs maladies savoir l'hypertension, le diabète et l'obésité (Aires *et al.*, 2013)

I.5.2.2 Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique(Cuendet,1999). Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief, 2003)

1. Polyphénols

Les polyphénols, également appelés composés phénoliques, sont des métabolites secondaires présents spécifiquement dans le règne végétal. Ils font partie du métabolisme secondaire des plantes et jouent un rôle essentiel dans les interactions entre la plante et son environnement, contribuant ainsi à sa survie dans son écosystème. Le terme "composés phénoliques" est utilisé pour désigner toute substance chimique qui possède une structure contenant un noyau aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyles. Un grand nombre de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un hétérocycle de type pyrane (Sharif Swallah *et al.*, 2020)

1.1 Origine des polyphénols

Les polyphénols se trouvent naturellement dans notre alimentation sous diverses formes. On les retrouve en plus grandes quantités dans les fruits, les légumes, les céréales, les graines oléagineuses et les légumineuses, ainsi que dans des boissons telles que le thé, le café et le vin (Kumar Singh *et al.*, 2019).

1.2 Classification des polyphénols

Les polyphénols sont classés en fonction de leur structure chimique, de la présence de cycles de sucre, de leur composition et de leurs voies de synthèse (Prabhu *et al.*, 2021). Cette classification est illustrée dans la Figure 04.

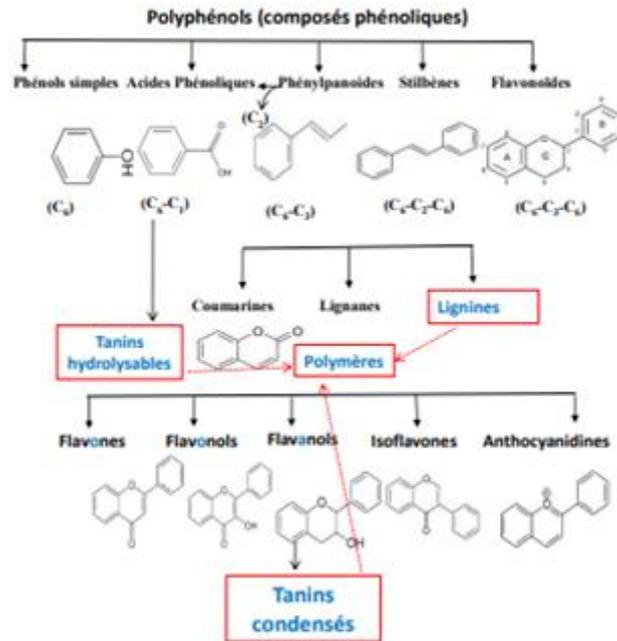


Figure 01: Classification des composés phénoliques (Chehrie-Hacide, 2021)

1.2.1 Composé phénolique simple

- **Acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont des métabolites aromatiques secondaires présents dans tout le règne végétal. Récemment, les acides phénoliques ont suscité un intérêt croissant en raison de leur capacité à protéger contre les dommages oxydatifs causés par la consommation de fruits et de légumes (tels que les maladies coronariennes, les accidents vasculaires cérébraux et les cancers). Ils peuvent être bénéfiques pour la santé en agissant comme des antioxydants, prévenant ainsi les dommages cellulaires provoqués par les processus d'oxydation des radicaux libres. Parmi les exemples d'acides phénoliques, on retrouve l'acide vanillique et l'acide caféique (figure 5) (Prabhu *et al.*, 2021).

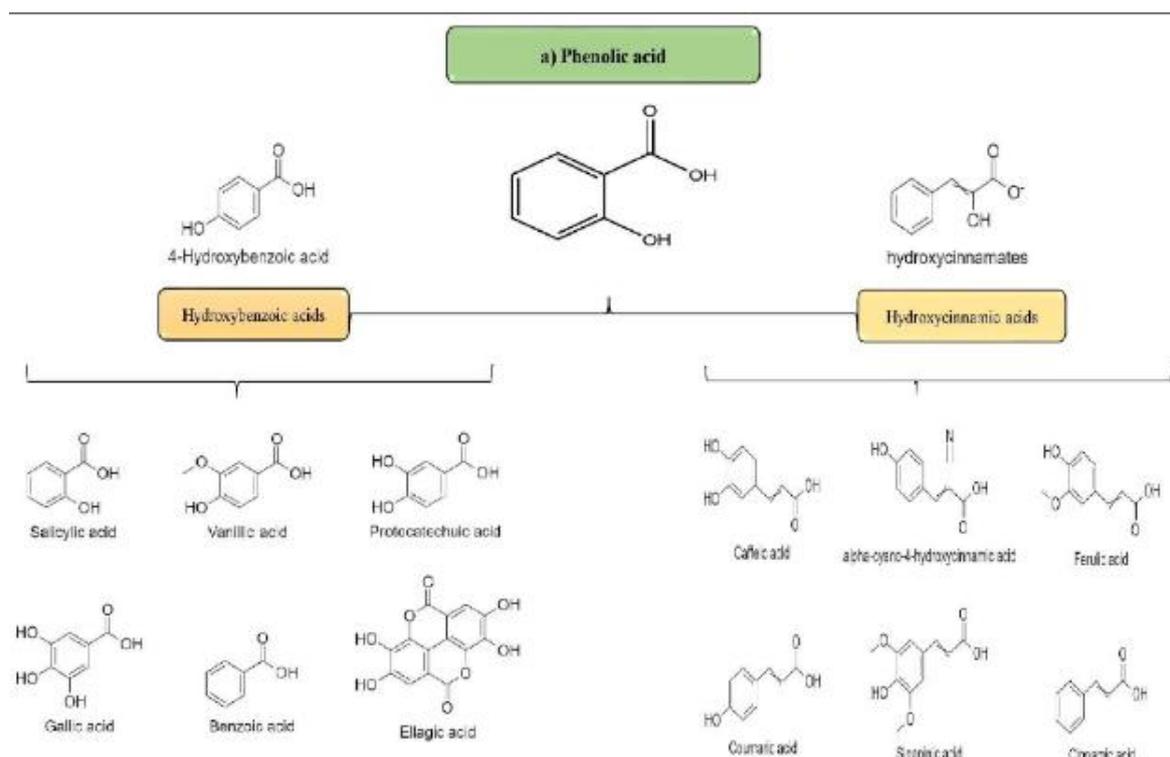


Figure 02 : Types d'acides phénoliques (Prabhu *et al.*, 2021)

Les acides phénoliques simples sont des composés dérivés de l'acide cinnamique. Ils ont subi une perte partielle ou totale des chaînes latérales caractéristiques, telles que les acides hydroxybenzoïques avec une structure commune de type (C6-C1), et les acides hydroxycinnamiques qui présentent une chaîne latérale de 3 carbones (C6-C3) (Prabhu *et al.*, 2021).

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont un autre groupe de composés bioactifs présents dans la *Withania frutescens*. Ces composés sont connus pour leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires, anti-tumoraux et cardioprotecteurs (Kumar *et al.*, 2015).

Les flavonoïdes sont un groupe majeur de métabolites des végétaux, composés de polyphénols ; leur structure est caractérisée par la présence de 15 atomes de carbone et de deux cycles aromatiques reliés par une chaîne de trois atomes de carbone (Harborne, 2013).

Les flavonoïdes peuvent être classés en différentes catégories selon le cycle C auquel le cycle B est attaché, sa configuration et l'oxydation du cycle C. parmi les principales classes de

flavonoïdes, on retrouve les flavones (chrysin, apigénine, baicaléine), les flavonols (quercétine, kaempférol), les isoflavones (daidzéine, glycitéine), les flavan-3-ols (gallocatéchine, catéchine, épicatechine), les flavones (hespérétine, naringénine) et les anthocyanidines (delphinidine, péonidine, cyanidine, pélargonidine) (Rasouli *et al.*, 2017; Singla *et al.*, 2019), comme illustré dans la Figure 6. On les trouve principalement dans des aliments tels que les baies, les oignons, le thé, les raisins, les pommes, les baies et la coca, et ils présentent de nombreux attributs bénéfiques pour la santé, tels que des propriétés de signalisation cellulaire, anti-thrombogènes et neuroprotectrices (Ballard et Junior, 2019).

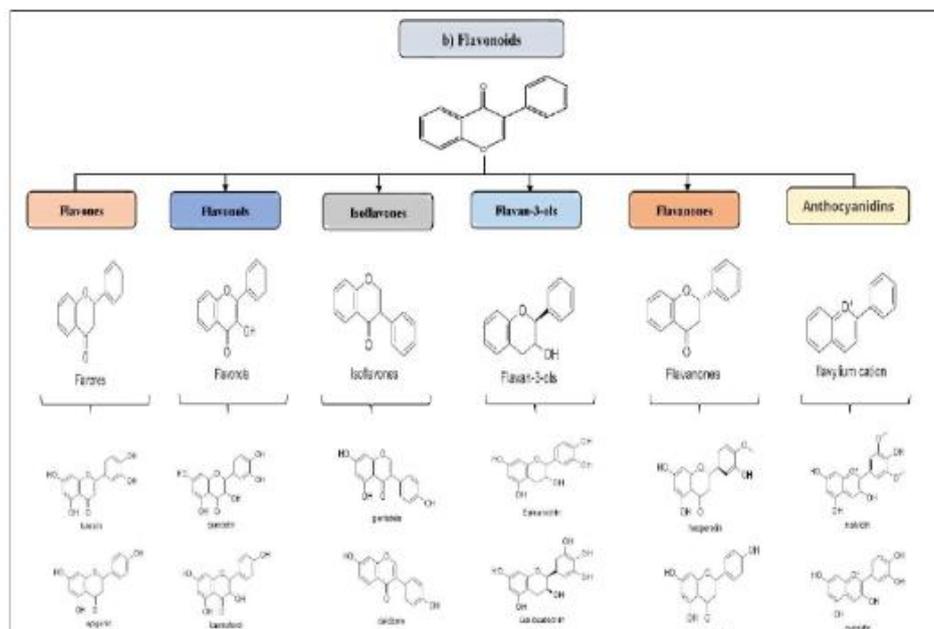


Figure 03 : Types de flavonoïdes (Prabhu *et al.*, 2021).

a. Les flavonols

Les flavonols font partie de la famille des flavonoïdes et se caractérisent par la présence d'une double liaison entre les atomes de carbone C2 et C3, ainsi qu'un groupe carbonyle sur le carbone C4. Parmi les flavonols les plus courants, on retrouve la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Ces composés flavonoïdes sont largement présents dans de nombreux fruits et légumes tels que le chou frisé, l'oignon, la laitue et les tomates (Sandu *et al.*, 2017).

De nouvelles études cliniques ont fourni des preuves supplémentaires démontrant que les flavonols ont un potentiel dans le prétraitement et la prévention des maladies cardiovasculaires, la régénération cellulaire, la prévention de la formation de caillots sanguins et des affections telles que les maladies des gencives et autres problèmes cardiaques (**Singla et al.**, 2019 ; **Behl et al.**, 2020).

b. Les isoflavones

Ce sont des composés non stéroïdiens dérivés de plantes appartenant à la famille des phytoestrogènes (**Nikolić et al.**, 2017). Ils sont principalement présents dans les Fabacées et possèdent une structure similaire à celle des flavonols, avec une double liaison entre les atomes de carbone C2 et C3 et un groupe carbonyle sur le carbone C4. Parmi les flavonols courants, on trouve la quercétine, le kaempférol et la myricétine, qui sont présents dans de nombreux fruits et légumes tels que le chou frisé, l'oignon, la laitue et les tomates (**Sandu et al.**, 2017). Des recherches suggèrent que les isoflavones peuvent être utilisées pour traiter les symptômes liés à la ménopause et qu'elles possèdent des propriétés chimioprotectrices (**Rasouli et al.**, 2017).

c. Flavanones

Les flavanones sont présentes dans les agrumes, certaines plantes aromatiques et les tomates, constituant une petite partie des flavonoïdes. Outre leurs propriétés aromatisantes, elles sont considérées comme importantes pour la santé humaine. Les principales flavanones comprennent l'ériodyctiol des citrons, l'hespéridine des oranges et la naringénine du pamplemousse (**Calderón-Oliver et Alquicira**, 2018). Les flavanones subissent également divers processus chimiques tels que l'O-méthylation, la glycosylation et l'hydroxylation (**Singla et al.**, 2019).

d. Anthocyanidines

Les anthocyanidines sont des pigments responsables principalement de la couleur (rouge, rose, violet) des fruits et légumes (**Wrolstad**, 2004). La présence d'anthocyanidines dans l'épiderme des fruits, des légumes et des fleurs est responsable de leurs différentes couleurs. Divers fruits et légumes, tels que le radis, la betterave, les baies, les fraises et les cerises, sont une source adéquate d'anthocyanidines (**Welch et al.**, 2008). Les baies d'*Aronia* sont particulièrement renommées pour leurs propriétés antioxydantes accrues (**Krga et Milenkovic**, 2019).

e. Flavones

Les flavones sont couramment présentes dans les céréales, le céleri, le persil et le brocoli. On les trouve également en grande quantité dans la couche externe des agrumes. Des études ont enregistré un effet inverse des flavones sur la CAD (**Cutrim et Cortez, 2018**).

- **Autres polyphénols**

Il existe d'autres polyphénols tels que les stilbènes (resvératrol, picéatannol), les lignanes (sésamol, pinorésinol, sinol, entérodiol) et les tanins (tanins hydrolysables, non hydrolysables et condensés), ainsi que les lignines, qui possèdent une gamme étendue d'effets thérapeutiques et d'applications industrielles selon leur nature d'action (**Kumar et al., 2014 ; Rasouli et al., 2017 ; Singla et al., 2019**). La Figure 04 présente un aperçu de certains autres polyphénols présents dans la nature.

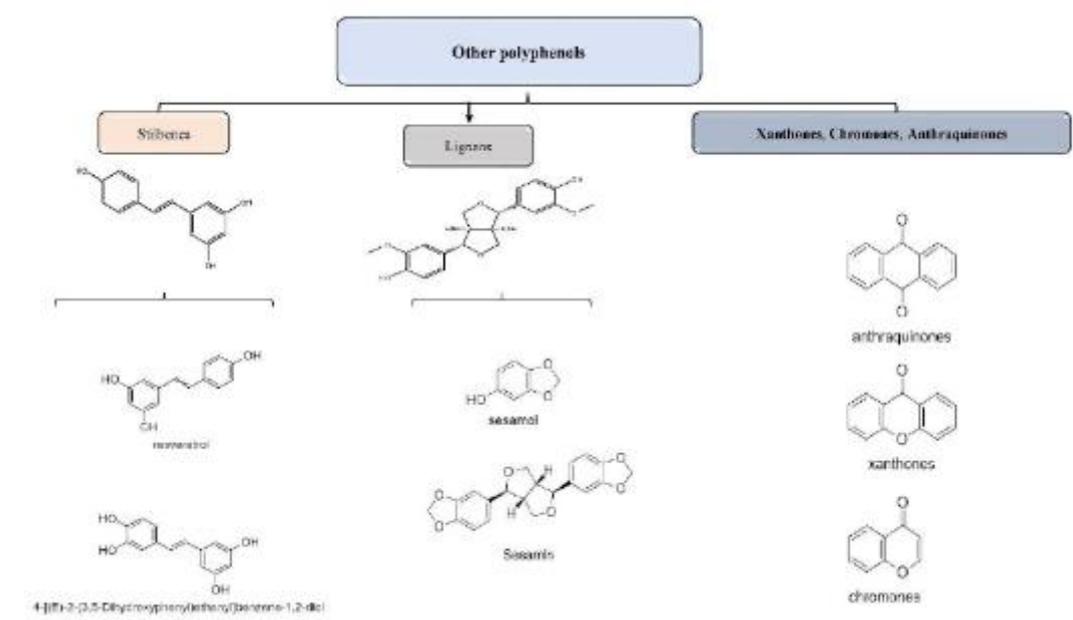


Figure 04: Autres types de polyphénols (**Prabhu et al., 2021**)

a. Stilbènes

Les stilbènes ($C_{14}H_{12}$) sont une catégorie de métabolites dérivés des phénols qui suscitent un grand intérêt dans la recherche en raison de leur activité biologique et de leurs bienfaits potentiels pour la santé humaine (**Shen et al., 2009**). Les stilbènes sont des composés organiques présentant une structure compacte avec une fraction centrale d'éthylène et un

groupe phényl, le groupe phényl est situé aux extrémités des doubles liaisons carbonées (**Chou et al.**, 2018).

b. Lignanes

Les lignanes sont présentes dans de nombreux aliments d'origine végétale tels que les fruits, les céréales complètes, les graines, les légumes, le vin rouge, les noix et le café. Ces molécules de lignanes sont connues pour leurs effets anti-inflammatoire et antioxydant. Elles offrent une protection contre le cancer en bloquant les enzymes qui sont impliquées dans la croissance et la propagation des cellules tumorales, ainsi que dans le métabolisme hormonal. Les graines de lin contiennent également d'autres composants dotés de propriétés antioxydantes, contribuant ainsi à la prévention des maladies cardiovasculaires (**Prabhu et al.**, 2021)

1.2.2 Composés phénoliques complexes

- Tannins

Les tannins sont un groupe de substances phénoliques polymériques hydrosolubles ayant un poids moléculaire relativement élevé. On les trouve à des concentrations variables dans différentes parties de la plante, telles que l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (**Vandi et al.**, 2016). Les tannins sont présents dans de nombreux aliments consommés par les humains, tels que les pommes, le vin rouge et le chocolat, entre autres. Ils peuvent être classés en deux catégories : les tannins condensés et les tannins hydrolysables (**Pizzi**, 2019 ; **Prabhu et al.**, 2021).

a. Tannins condensés

Les tannins condensés, également appelés proanthocyanidines, sont des polymères composés d'unités flavane-3-ol liées principalement par des liaisons C₄-C₆ ou C₄-C₈ (Figure 09) (**Panzella et Napolitano**, 2022). Ils ont une affinité élevée pour les protéines, avec lesquelles ils forment des complexes, jouant ainsi un rôle dans la protection contre les herbivores (**War et al.**, 2018).

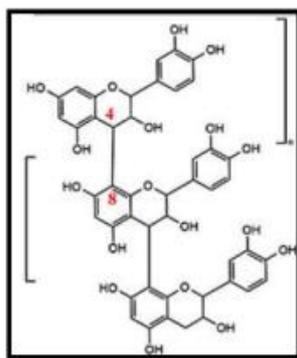


Figure 05 : Structures des tannins condensés (Yan *et al.*, 2021).

b. Tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables, également connus sous le nom d'acides tanniques, sont des polymères formés par l'acide gallique ou son produit de condensation, l'acide éllagique, estérifié par un polyol, généralement le glucose. Cela donne respectivement les tannins galliques (a) et les tannins éllagiques (b) (Figure 06). Ces tannins ont un poids moléculaire plus bas et ont moins tendance à précipiter les protéines que les tannins condensés. De plus, ces molécules sont facilement hydrolysables par des enzymes ou des réactions chimiques (Macheix *et al.*, 2005).

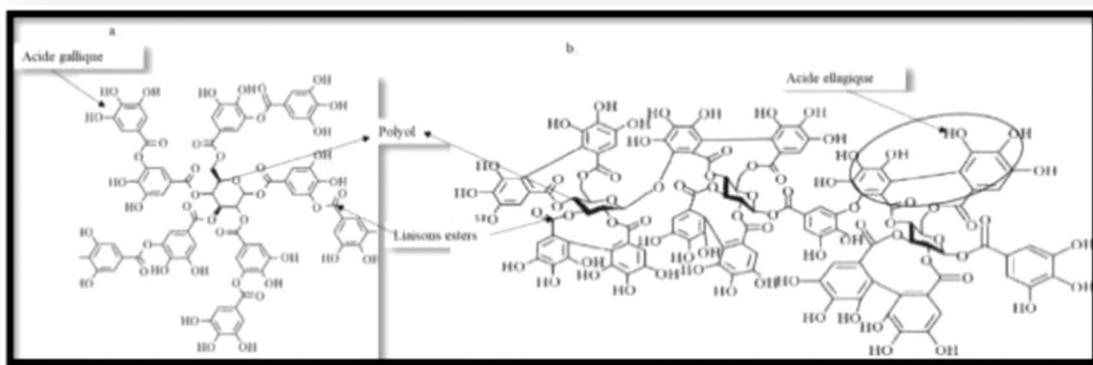


Figure 06 : Tannins hydrolysables : tannins galliques (a) et tannins éllagiques (b) (Hussein *et al.*, 2020 modifiée)

- Lignines

Les lignines sont des composés de poids moléculaire élevé qui contribuent à la formation de la paroi cellulaire des plantes en association avec la cellulose et les dérivés

hémicellulosiques. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation de trois alcools phénylpropéniques: l'alcool p-coumarique, l'alcool coniférique et l'alcool sinapique (Nkhili, 2009). La polymérisation de ces trois alcools conduit à la formation de la lignine, dont la composition varie d'une espèce à une autre. Bien que la structure précise de la lignine ne soit pas encore entièrement connue, il est certain qu'elle est extrêmement complexe (Ghnimi, 2015).

I.5 Répartition Géographique de la *Withania frutescens*

I.5.1 Origine et Répartition en Asie

La *Withania frutescens* est originaire de l'Inde et est largement cultivée à travers le pays, notamment dans les régions semi-arides du Rajasthan, du Pendjab, du Haryana, du Gujarat, de l'Uttar Pradesh et du Madhya Pradesh. Ces régions présentent des conditions climatiques et des types de sols qui sont particulièrement propices à la croissance de la plante. Elle est également cultivée dans d'autres pays asiatiques, notamment au Népal, au Sri Lanka et au Bangladesh (Kulkarni et Dhir, 2008).

I.5.2 Expansion au Moyen-Orient et en Afrique du Nord

Au-delà de l'Inde, la *Withania frutescens* a étendu sa répartition au Moyen-Orient et en Afrique du Nord. En Jordanie, au Yémen et en Égypte, la plante est cultivée et utilisée dans les systèmes médicaux traditionnels. En Afrique du Nord, elle est répandue dans des pays tels que l'Algérie, l'Égypte et le Maroc. Dans ces régions, elle pousse souvent à l'état sauvage dans les régions semi-arides et est également cultivée pour l'usage médicinal (El-Rhaffari et Zaid, 2002).

I.5.3 Présence en Europe et en Amérique

En Europe, la *Withania frutescens* est principalement cultivée à des fins de recherche et pour l'utilisation dans la fabrication de suppléments de santé naturels. En Amérique, bien que moins courante, elle est cultivée dans certaines régions des États-Unis, notamment en Californie et au Nouveau-Mexique.

Il est crucial de noter que la composition chimique de *Withania frutescens* peut varier en fonction de sa localisation géographique. Des facteurs environnementaux comme le climat, le

sol, l'altitude et la saison peuvent influencer la composition des withanolides et d'autres composés bioactifs (Mirjalili *et al.*, 2009 ; El Moussaoui *et al.*, 2021).

I.6 Pharmacologie et applications thérapeutiques de la *Withania frutescens*

- **Propriétés pharmacologiques**

I.6.1 Alcaloïdes et lactones stéroïdiennes

Les constituants actifs de la *Withania frutescens* sont principalement les alcaloïdes et les lactones stéroïdiennes, appelés withanolides (El-Bouzi *et al.*, 2013 ; Mishra *et al.*, 2000). Ces composés ont montré des activités biologiques variées, y compris des effets anti-inflammatoires, anti-tumoraux, adaptogènes, immuno-modulateurs, et neuroprotecteurs (El-Bouzi *et al.*, 2013 ; Mirjalili *et al.*, 2009 ; Dar *et al.*, 2015).

I.6.2 Effets anti-inflammatoires et anti-tumoraux

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les withanolides extraits de *Withania frutescens* possèdent des propriétés anti-inflammatoires en inhibant la production de molécules pro-inflammatoires telles que les cytokines (Singh *et al.*, 2011 ;). De plus, ils ont démontré des effets anti-tumoraux, en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses et en induisant l'apoptose (Chen *et al.*, 2011 ; El Bouzi *et al.*, 2013 ; Kaileh *et al.*, 2007 ; Kumar *et al.*, 2023 ; Srinivasan *et al.*, 2007).

I.6.3 Effets adaptogènes et immunomodulateurs

Withania frutescens a montré des effets adaptogènes, aidant l'organisme à résister aux différents stress physiques et mentaux (Bhattacharya et Muruganandam, 2003). Elle a également des effets immunomodulateurs, augmentant la réponse immunitaire de l'organisme en modulant la production de cytokines (Ziauddin *et al.*, 1996 ; Agarwal *et al.*, 1999).

I.6.4 Effets neuroprotecteurs

Withania frutescens a montré des effets neuroprotecteurs en protégeant les neurones contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène, en améliorant la cognition et en réduisant l'anxiété et le stress (Kumar, 2008 ; Prakash *et al.*, 2019).

- **Applications thérapeutiques**

I.6.5 Traitement des troubles du sommeil et de l'anxiété

L'effet calmant de *Withania frutescens* est exploité dans le traitement des troubles du sommeil et de l'anxiété, comme le démontrent des essais cliniques (**Singh et al.**, 2012). Les effets adaptogènes de la plante peuvent également aider à gérer le stress (**Chandrasekhar et al.**, 2012).

I.6.6 Amélioration de la cognition

Des recherches ont montré que *Withania frutescens* est utilisée pour améliorer la cognition, notamment chez les patients atteints de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (**Kumar**, 2008 ; **Sehgal et al.**, 2012).

I.6.7 Traitement des maladies inflammatoires

Withania frutescens est utilisée pour traiter diverses maladies inflammatoires, comme l'arthrite, en raison de ses propriétés anti-inflammatoires (**Rasool et Varalakshmi**, 2006 ; **Gupta et Kataria**, 2013).

Chapitre 2 :
Activité antioxydante et anti-
inflammatoire

I. L'activité antioxydante

Ces dernières années, un intérêt croissant s'est manifesté pour les propriétés antioxydantes des plantes médicinales. Ceci est principalement dû à leur rôle potentiel dans la prévention de maladies chroniques. En effet, ces plantes, grâce à leurs propriétés antioxydantes, pourraient contribuer à combattre le stress oxydatif, un facteur majeur dans le développement de maladies comme les troubles cardiaques, le cancer, le diabète, l'hypertension et la maladie d'Alzheimer (**Meddour**, 2011).

I.1 Stress oxydatif

1.1. Généralités

Le stress oxydatif est un déséquilibre qui peut survenir dans nos tissus lorsque les défenses antioxydantes de l'organisme ne parviennent pas à neutraliser efficacement un excès de radicaux libres, que ce soit en raison d'une production excessive de ces derniers ou d'une diminution de la capacité antioxydante. En état normal, un équilibre est maintenu entre la production d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme (**Bendif**, 2017).

Les EOA, en raison de leur structure électronique instable, ont la capacité d'attaquer diverses composantes cellulaires. Les molécules biologiques, telles que les protéines, lipides, glucides et l'ADN, sont particulièrement vulnérables à ces attaques radicalaires. Ce processus peut engendrer un dysfonctionnement des activités essentielles des cellules, contribuant ainsi au développement de diverses maladies (**Mohammedi**, 2013).

1.2 Définition

Selon **Zbadi et al.** (2018), le stress oxydatif est un phénomène physiopathologique qui résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les systèmes de défense antioxydants de l'organisme. Ce déséquilibre se manifeste par une accumulation excessive de radicaux oxygénés toxiques, que les mécanismes de défense de l'organisme ne peuvent pas réguler efficacement.

Cet excès de radicaux oxygénés est un facteur déterminant qui favorise le développement de diverses pathologies chroniques. Parmi celles-ci, on compte le cancer, divers troubles

oculaires, des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la sclérose latérale, les maladies cardiovasculaires, le diabète et le vieillissement accéléré (Zbadi *et al.*, 2018).

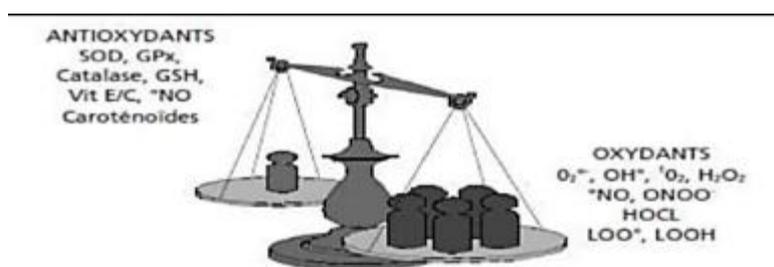


Figure 07: Stress oxydant (Nasri et Hadje Brahim, 2014).

1.3 Origine du stress oxydatif

Les mitochondries sont principalement responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Dans ces organites cellulaires, une fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale peut entraîner la formation de radicaux superoxydes par liaison de ces électrons avec les molécules d'oxygène (Guillouty, 2016). En outre, les mitochondries régulent les carences en oxygène au niveau tissulaire par la production d'ERO (Dupic *et al.*, 2010).

Selon Guillouty (2016), d'autres facteurs peuvent également contribuer à la production des ERO, notamment les rayons ultraviolets (UV), l'ozone (O₃), le tabac et certains herbicides. Les rayons UV (320-400 nm) peuvent réduire l'O₂ en O₂⁻. L'ozone favorise également la production d'ERO en facilitant la migration des polynucléaires neutrophiles (PNN) vers la surface de l'épithélium respiratoire. De plus, la fumée du tabac contient des ERO qui peuvent provoquer la peroxydation lipidique et l'activation de molécules pro-inflammatoires. En ce qui concerne les herbicides, leur toxicité, comme celle du paraquat, peut être induite par la production de radicaux libres qui saturent les voies de détoxification enzymatiques, favorisant ainsi l'apparition du stress oxydatif.

1.2 Les radicaux libres

2.1 Généralité

Les radicaux libres sont des entités chimiques - qu'il s'agisse d'espèces, d'atomes, de molécules ou de fragments moléculaires - qui comportent un ou plusieurs électrons non appariés dans leur couche externe. Ces électrons "célibataires", générés par un apport d'énergie approprié et suffisant, tendent à attirer les électrons d'autres atomes ou molécules afin d'obtenir une stabilité. Ce processus a pour effet de déstabiliser les autres molécules, engendrant un phénomène de réaction en chaîne (**Bendif**, 2017).

2.2 Différentes formes de radicaux libres

Les radicaux libres jouent un rôle crucial dans le phénomène de stress oxydatif. Leur caractéristique principale est la présence d'un électron non apparié sur un atome d'oxygène ou d'azote. Cette propriété leur confère leur réactivité et conduit à leur classification en deux catégories principales : les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERA).

Tableau 01 : Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

| Espèces oxygénées réactives radicalaires | Espèces oxygénées réactives non radicalaires |
|--|--|
| O ₂ ⁻ Anion radical superoxyde | 1O ₂ Oxygène singulet |
| HO ₂ [·] Radical perhydroxyle | H ₂ O ₂ Peroxyde d'hydrogène |
| HO [·] Radical hydroxyle | HOCl Acide hypochlorique |
| RO ₂ [·] Radical peroxyde | |
| RO [·] Radical secondaire alkoxyde | |

Tableau 02 : Les espèces réactives de l'azote (ERA).

| Espèces azotées réactives radicalaires | Espèces azotées réactives non-radicalaires |
|--|--|
| NO [•] : Monoxyde d'azote | NO ₂ : Dioxyde d'azote |
| | N ₂ O ₃ : Trioxyde d'azote |
| | NO ₂ ⁻ : Ion nitrate |
| | ONOO ⁻ : Peroxynitrite |

I.3 Antioxydants

3.1 Généralités

Les antioxydants sont des substances qui ont la capacité de neutraliser ou de minimiser les dégâts causés par les radicaux libres dans l'organisme. Ils contribuent à maintenir des concentrations non cytotoxiques au niveau cellulaire et peuvent être classés en deux systèmes principaux : enzymatiques et non-enzymatiques (**Mohammedi**, 2013).

Les systèmes enzymatiques représentent une ligne de défense extrêmement efficace contre le stress oxydatif (**Lehucher-Michel**, 2001), cette défense se compose notamment de la superoxyde dismutase (qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde), la catalase (qui métabolise le H₂O₂) et la glutathion peroxydase (qui a une action réductrice sur le H₂O₂ et facilite la transformation des hydroperoxydes organiques, surtout lipidiques, de type ROOH en ROH).

Quant aux systèmes non-enzymatiques, ils incluent les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique), ainsi que les polyphénols d'origine végétale (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines, etc.). La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent donc être apportés par l'alimentation (**Bendif**, 2017).

3.2 Types d'antioxydants

Les antioxydants proviennent de deux sources principales. D'une part, il y a la source exogène, qui est fournie par l'apport alimentaire, notamment via les fruits et les légumes. D'autre part, il y a la source endogène, qui est produite par l'organisme lui-même, et peut être soit de nature enzymatique, soit de nature non enzymatique.

3.2.1 Antioxydants endogènes

➤ Antioxydants enzymatiques

- **Superoxyde dismutase**

La superoxyde dismutase (SOD) est une protéine métallique qui accélère la conversion du superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et oxygène (O_2). Elle joue donc un rôle majeur dans notre système de défense contre les radicaux libres (**Haleng et al.**, 2007).

- **Catalase**

La catalase est présente dans les peroxysomes (**Valko et al.**, 2006). Elle catalyse la conversion de l' H_2O_2 en H_2O et O_2 (**Stocker et Keaney**, 2004). La catalase est présente dans les peroxysomes (**Valko et al.**, 2006). Elle catalyse la conversion de l' H_2O_2 en H_2O et O_2 (**Stocker et Keaney**, 2004). La catalase est présente dans les peroxysomes (**Valko et al.**, 2006). Elle catalyse la conversion de l' H_2O_2 en H_2O et O_2 (**Stocker et Keaney**, 2004). La catalase est présente dans les peroxysomes (**Valko et al.**, 2006). Elle catalyse la conversion de l' H_2O_2 en H_2O et O_2 (**Stocker et Keaney**, 2004).

- **Glutathion peroxydase**

La GPx est une sélénoprotéine formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium, elle permet d'éliminer les radicaux libres qui peuvent oxyder la molécule d'ADN (**Belkheiri**, 2010) et les peroxydes lipidiques (**Haleng et al.**, 2007).

➤ Antioxydants non enzymatiques

- **Bilirubine**

La bilirubine est un composé qui repousse l'eau et qui se forme lors de la dégradation de l'hème. Elle a la capacité de capturer les radicaux peroxydes (ROO) et l'oxygène singulet (1O_2), en plus de protéger l'albumine en créant des liaisons avec celle-ci, comme le rapporte (Haleng *et al.*, 2007).

L'ubiquinone

L'ubiquinone, en raison de son caractère lipophile et sa longue chaîne latérale, peut s'intégrer dans les lipoprotéines et les membranes, notamment mitochondriales. Dans ces lieux, elle travaille en synergie avec la vitamine E pour prévenir la peroxydation des lipides (Haleng *et al.*, 2007).

- **Acide urique**

L'acide urique (figure 08) est le produit final du métabolisme des purines chez l'homme (Haleng *et al.*, 2007). C'est un piègeur puissant d' 1O_2 , de $OH\cdot$, de $ROO\cdot$, de O_3 , et de $HOCl$ (Belkheiri, 2010).

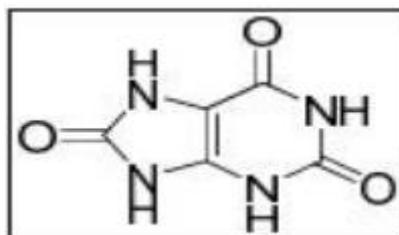


Figure 08 : Structure de l'acide urique (Belkheiri, 2010).

- **Le glutathion**

GSH (figure 09), est un tripeptide formé des acides aminés glutamique, cystéine et glycine. Grâce à son fort potentiel réducteur, il sert de cofacteur pour la glutathion peroxydase (GPX), chélate les métaux de transition, et aide à restaurer les vitamines E et C dans leurs formes actives (Haleng *et al.*, 2007).

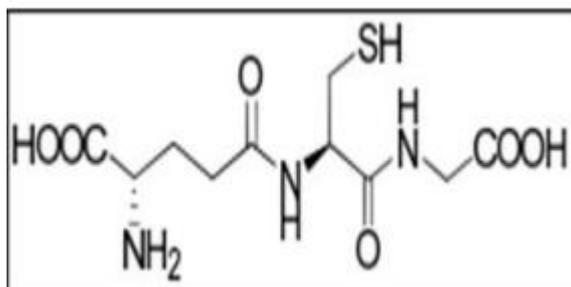


Figure 09 : Structure du glutathion (Belkheiri, 2010).

3.2.2 Antioxydants exogènes

- **Vitamine E (les tocophérols)**

La vitamine E est un antioxydant liposoluble qui protège les membranes biologiques en limitant la peroxydation lipidique par la génération d'un radical tocophéryl (Haleng *et al.*, 2007). Elle se compose de quatre isomères, dont l' α -tocophérol est le plus actif (Gulcin, 2012). La vitamine E fonctionne de deux façons : directement, en capturant les espèces réactives de l'oxygène (ERO), et indirectement, en régulant les enzymes antioxydantes (Vertuani *et al.*, 2004).

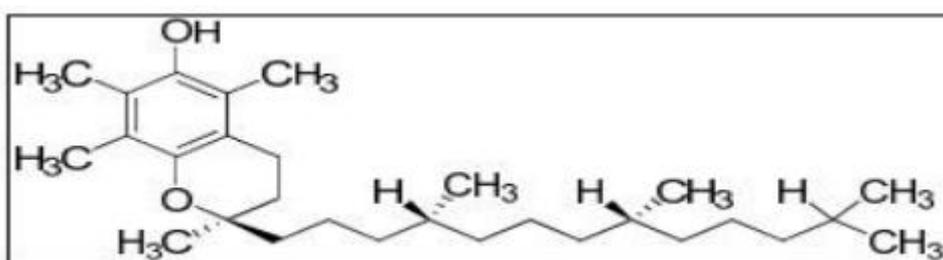


Figure 10 : Structure de la vitamine E (ou α -tocophérol) (Belkheiri, 2010).

- **La vitamine C (ou acide ascorbique)**

C'est une molécule soluble dans l'eau qui se trouve dans les fluides corporels (Vertuani *et al.*, 2004). Son rôle principal est de capturer directement les espèces réactives de l'oxygène, notamment le superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyle ($OH\cdot$), et de régénérer l' α -tocophérol, travaillant ainsi en tandem avec la vitamine E pour prévenir la peroxydation des lipides (Haleng *et al.*, 2007).

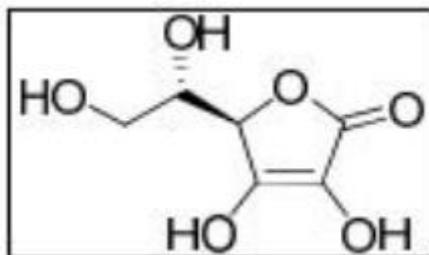


Figure 11 : Structure de la vitamine C (Belkheiri, 2010).

- **Caroténoïdes**

Ils sont abondamment présents dans les fruits et les légumes (Haleng *et al.*, 2007), ont une fonction antioxydante notable. Le β -carotène, en particulier, est efficace pour capter les radicaux hydroxyles (OH), le superoxyde (O₂⁻), les radicaux peroxydes (ROO) et pour neutraliser le singulet de l'oxygène (¹O₂) (Valko *et al.*, 2006). La capacité antioxydante des caroténoïdes est attribuée à leur longue chaîne carbonée qui est riche en doubles liaisons (Hadj Salem, 2009).

- **Le zinc**

C'est un oligo-élément essentiel qui joue un rôle clé en tant qu'antioxydant en faisant partie intégrante de la structure de la superoxyde dismutase. Ce minéral aide à protéger contre l'oxydation des groupes sulfhydryles (SH) présents dans les protéines et joue également un rôle protecteur contre les dommages oxydatifs et peroxydatifs. De plus, le zinc exerce un effet antioxydant supplémentaire en concurrençant le fer et le cuivre (Bettger, 1993).

- **Sélénium**

C'est un oligo-élément essentiel qui contribue de manière significative à la défense de l'organisme contre les lésions oxydatives provoquées par les radicaux libres. Il fait partie intégrante de nombreuses enzymes antioxydantes, dont la glutathion peroxydase (GPx), (Bettger, 1993). Par conséquent, il aide à protéger les cellules contre l'oxydation induite par les radicaux libres.

II. L'activité anti-inflammatoire

II.1 Inflammation

II.1.1 Définition

L'inflammation est un moyen de défense naturelle des organismes supérieurs contre toute agression extérieure provoquée par des facteurs physicochimiques (Irradiations, brulure, traumatismes mécaniques), des infections microbiennes (Bactériennes, virales ou parasitaire) ou liée à des éléments endogènes tels que des composés issus de la réaction immunitaire (Complexes immuns, anticorps cyto toxiques, cytokines). Elle a pour but d'éliminer l'agent pathogène et réparer les lésions tissulaires (Yougbaré-Ziébrou *et al.*, 2016 ; Taïba *et al.*, 2017).

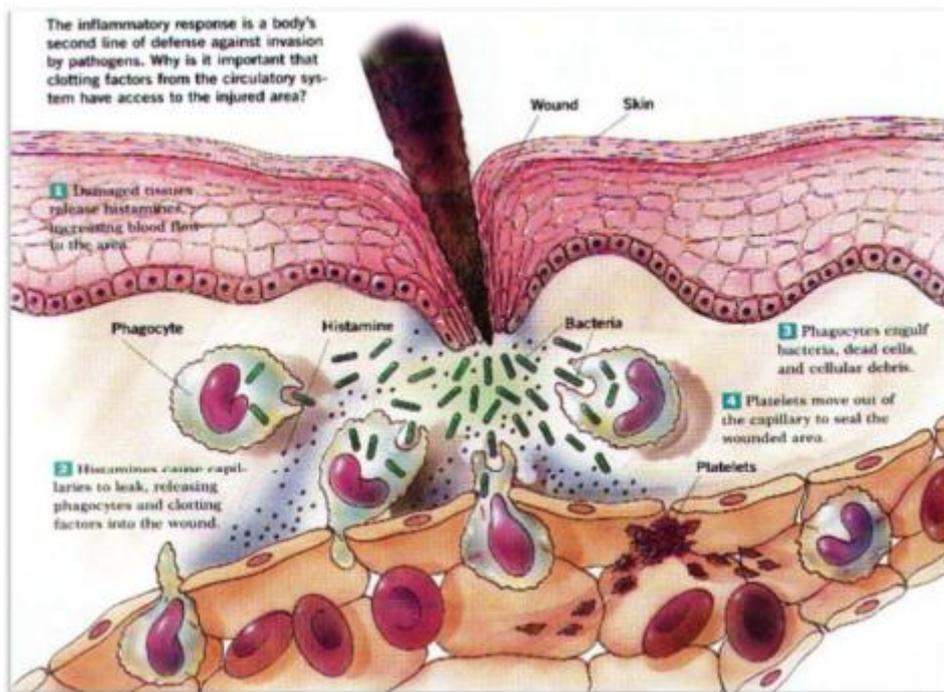


Figure 12 : La réaction inflammatoire (Busse et Fleming, 2006)

II.2 Inflammation aigue

L'inflammation aiguë représente la réaction initiale de l'organisme face à un agresseur externe. Sa durée peut fluctuer entre quelques jours et quelques semaines, en fonction de la gravité de la lésion (Raghavendra *et al.*, 2015). Les principaux signes de cette inflammation sont l'écoulement de fluides et de protéines plasmatiques, connu sous le nom d'œdème, et le déplacement des leucocytes, majoritairement des neutrophiles, des vaisseaux sanguins vers le

lieu de l'inflammation ou la zone lésée (Raghavendra *et al.*, 2015). L'immunité innée intervient non seulement pour éliminer directement le pathogène, mais elle déclenche aussi la réponse immunitaire adaptative qui contribue à l'élimination de la menace (Noack et Kolopp-Sarda, 2018). Les inflammations aiguës peuvent se résorber d'elles-mêmes ou grâce à un traitement, mais dans les cas où la destruction des tissus est importante, des complications peuvent survenir.

II.2.1 Les phases de l'inflammation aiguë

L'inflammation aiguë peut être divisée en phase vasculaire, une phase cellulaire et une phase de résolution et de cicatrisation (Weill de et Batteux, 2003)

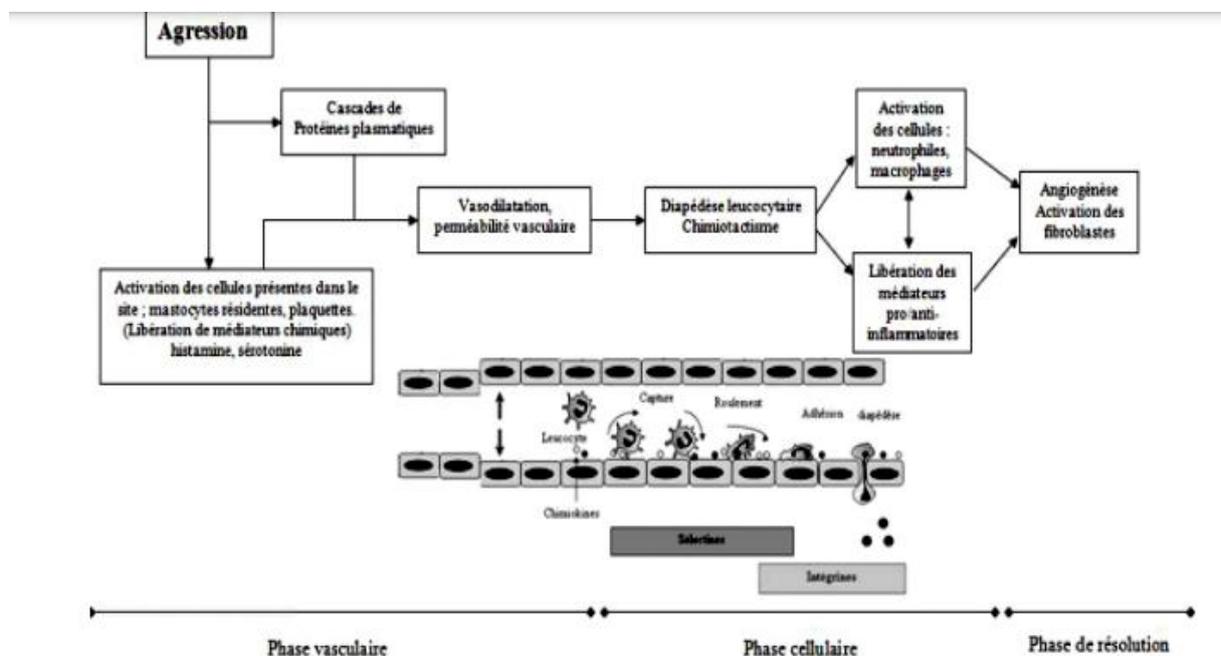


Figure 13 : Les phases de l'inflammation aiguë (Chevalier *et al.*, 2005).

➤ La phase vasculaire

Elle se manifeste cliniquement par les quatre symptômes traditionnels de l'inflammation aiguë : la rougeur, la chaleur, le gonflement et la douleur. L'objectif de cette étape est de signaler une alerte pour mobiliser les cellules de l'immunité innée. Cette phase se déroule extrêmement rapidement, généralement en l'espace d'une minute (Rousselet *et al.*, 2005)

De nombreux médiateurs, y compris les kinines, le TNF- α , les PGs et les leucotriènes, sont impliqués et causent la dilatation des vaisseaux sanguins et l'augmentation de la perméabilité capillaire. De plus, ils entraînent l'élargissement de l'espace entre les cellules, facilitant ainsi le déplacement rapide des protéines plasmatiques vers le site de l'inflammation (**Weill et Batteux**, 2003 ; **Yang et al.**, 2012).

➤ **Phase cellulaire**

Cette étape implique l'éradication des substances étrangères ou des débris nécrosés présents au site de l'inflammation. Cette tâche est accomplie par les neutrophiles qui ont migré vers le site inflammatoire par diapédèse et par les macrophages. Pour mener à bien la désinfection, ces cellules exploitent leur aptitude à la phagocytose (**Rousselet et al.**, 2005).

➤ **Phase de réparation**

Cette étape n'entre en jeu que si les agents d'inflammation et leurs produits dérivés ont été effectivement éliminés. Les neutrophiles et les macrophages, n'étant plus stimulés par les agents pro-inflammatoires, arrêtent de libérer leurs contenus nocifs. Les fibroblastes et les cellules endothéliales forment alors un tissu conjonctif et vasculaire qui conduit à la cicatrisation (**Pasquier**, 1995)

II.3 Inflammation chronique

Cette situation survient lorsque les processus d'inflammation et de cicatrisation restent en équilibre, ce qui peut conduire à une altération de la cicatrisation. C'est le cas, par exemple, dans les maladies chroniques comme la bronchite ou les lésions hépatiques liées à l'alcool. Si ce phénomène est associé à une production accrue de collagène, cela peut donner lieu à une inflammation fibrosante, comme on peut le voir dans le cas de la cirrhose du foie. D'autre part, une formation excessive de tissu granulaire est typique d'une inflammation granulomateuse, qui peut se produire dans des conditions comme la tuberculose ou en présence d'un corps étranger (**Weill et al.**, 2003).

Si la qualité du tissu cicatriciel est compromise, par exemple, à cause d'une inhibition de la synthèse de collagènes par les corticoïdes ou d'un défaut des interactions entre les fibres de collagènes en raison d'une carence en vitamine C, une tension importante peut entraîner la

réouverture de la blessure. Un exemple typique serait l'éventration post-opératoire de l'abdomen.

De plus, les cicatrices plus larges, notamment sur le visage, peuvent poser des problèmes esthétiques. Parmi ces problèmes, on note la formation d'une cicatrice hypertrophique, aussi appelée kéloïde ou chéloïde. Les cicatrices peuvent également entraîner des troubles fonctionnels significatifs, comme des troubles de la vision en cas de cicatrisation sur la cornée, des problèmes de sténose ou d'insuffisance au niveau des valves cardiaques, ou encore des adhérences ou obstructions intestinales dans la paroi abdominale (Charles *et al.*, 2010).

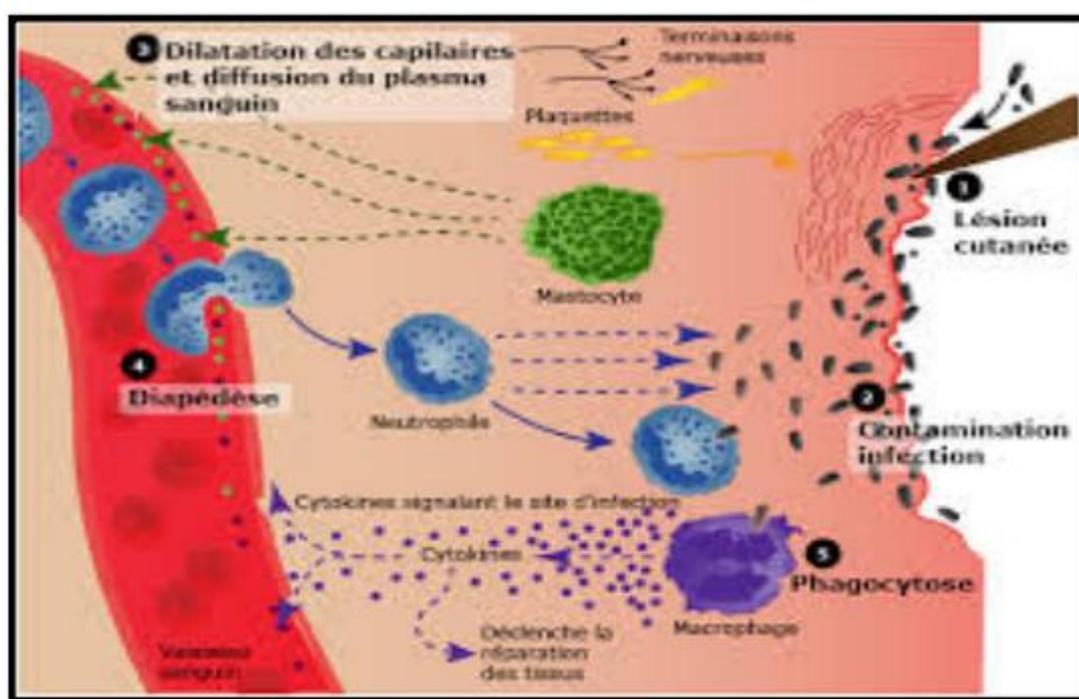


Figure 14 : Les phases de la réaction inflammatoire aiguë (Charles *et al.*, 2010).

Si l'inflammation déclenchée par un agent pathogène n'est pas contenue localement, elle peut se propager à tout l'organisme, principalement par le biais du système lymphatique, ce qui peut mener à une septicémie. Cette généralisation de l'inflammation peut aussi survenir lorsque le péritoine, qui a une surface considérable, est soudainement submergé par une grande quantité de microbes, comme cela peut se produire lors d'une rupture de l'intestin ou de l'ouverture d'un abcès (Silbernagl et Lang, 1998 ; Weill *et al.*, 2003 ; Nourshargh *et al.*, 2006 ; Charles *et al.*, 2010).

II.4 LES ANTI - INFLAMMATOIRES

1. Généralités

La thérapeutique anti - inflammatoire est destinée à contrôler l'excès de réaction aspécifique des tissus et à éviter la transformation de la phase aiguë de l'inflammation en phase chronique (**Muster**, 2005). Elle est généralement menée par des molécules de synthèse du type anti - inflammatoire non stéroïdien ou stéroïdien (Corticoïdes). Ce sont des médicaments largement utilisés mais dont les effets secondaires sont parfois graves, en particulier la toxicité sur le système rénal et digestif (Irritations digestives pouvant aller jusqu'à l'ulcération gastrique) (**Trabsa**, 2015).

2. Les anti - inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti - inflammatoires stéroïdiens ou les glucocorticoïdes sont des dérivés synthétiques de la cortisone, naturellement sécrétée par les glandes surrénales. Ils sont de puissants anti - inflammatoires doués également de propriétés immunomodulatrices et antiallergiques (**Heymonet**, 2013). Ils ont tous une activité hormonale sur les régulations métaboliques (glucidique, protidique, lipidique notamment) et ils entraînent la mise au repos des surrénales par un mécanisme de freination hypothalamo-hypophysaire (**Muster**, 2005).

Contrairement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les glucocorticoïdes sont capables d'inhiber toutes les phases de la réaction inflammatoire. Par leur action directe sur les vaisseaux, ils diminuent les phénomènes vasculaires de l'inflammation. Par leur effet antiprolifératif sur les histiocytes - monocytes - macrophages de tous les types, les lymphocytes, les plasmocytes, les fibroblastes et les polynucléaires neutrophiles, ils inhibent les phénomènes cellulaires précoces et tardifs de l'inflammation (**Muster**, 2005).

- Effets secondaires :

Lors d'une administration brève, les glucocorticoïdes même à doses élevées, ne présentent pratiquement aucun effet secondaire. Au cours d'une administration à long terme, ils entraînent une tendance à l'infection, altération des processus de cicatrisation. L'activité glucocorticoïde exagérée entraîne :

- Une augmentation de la néoglucogénèse et de la libération de glucose. Sous l'action de l'insuline, le glucose est transformé en triglycérides (Dépôt adipeux : visage lunaire et épaissement du tronc), et en cas d'augmentation insuffisante de la sécrétion d'insuline, on observe un « diabète stéroïdien » (**Lüllmann et al.**, 1996). - Une dégradation accrue des

protéines avec atrophie des muscles squelettiques, ostéoporose, trouble de la croissance chez l'enfant, atrophie cutanée. Les conséquences de l'activité minéralocorticoïde du cortisol sont la rétention d'eau et de sodium, l'augmentation de la pression artérielle, la formation d'œdème, et la perte de potassium avec risque d'hypokaliémie (Lüllmann *et al.*, 1996).

3. Les antiinflammatoires non stéroïdiens AINS

- Définition

Les AINS, à la différence des glucocorticoïdes, regroupent différentes classes chimiques de synthèse de structure non stéroïdienne (Muster, 2005). Ce sont des médicaments symptomatiques capables de s'opposer au processus inflammatoire, quelle qu'en soit la cause (Mécanisme, chimique, infectieuse, immunologique) et ils sont très efficaces pour la douleur et l'inflammation. En raison de leurs propriétés, cette classe thérapeutique est l'une des plus utilisées dans le monde (4,5% de la consommation médicamenteuse des pays industrialisé) (Taïba *et al.*, 2017). Cependant, ils sont connus pour de multiples effets indésirables, notamment des saignements gastro-intestinaux, des effets secondaires cardiovasculaires et néphrotoxiques (Wongrakpanich *et al.*, 2018).

- Effets secondaires :

Les effets secondaires des ANIS peuvent être le résultat de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines ou bien déviation du métabolisme de l'acide arachidonique vers une voie autre que celle de la cyclo - oxygénase, notamment la voie de la lipo-oxygénase. Effets gastroduodénaux : Les prostaglandines jouent un rôle important dans la muqueuse gastrique, elles augmentent la production du mucus, la perfusion sanguine gastrique et diminuent la production des radicaux libres sauf en cas d'utilisation AINS à long terme où se produit dyspepsie et ulcères gastroduodénaux.

- **Effets sur le rein** : Complications réno-vasculaires : œdèmes par rétention hydro sodée, oligurie par Insuffisance rénale aigüe (Annick, 2018)
- **Effets cutanés** : Dermatite exfoliatrice, syndromes de Stevens-Johnson et de Lyell. Les éruptions diverses, l'urticaire, la photosensibilisation (Notamment avec le kétoprofène en application cutanée) (Sivry, 2014).

- **Effets Cardiovasculaires** : Résistance au traitement antihypertenseur, poussée hypertensive, insuffisance cardiaque congestive, risque thrombotique artériel (En cas de prise prolongée ou à dose importante) (**Gungomer**, 2015).

4. Les antiinflammatoires d'origine végétale

Les anti - inflammatoires naturelles ou végétales sont celles qui existent dans la nature qui ne subissent pas de modification de la structure chimique après les procédés de leur obtention.

Plusieurs travaux ont été réalisés sur les substances naturelles d'origine végétale dotées de propriétés antiinflammatoires grâce à la présence des molécules naturelles bioactives permettant de traiter certaines maladies inflammatoires (**Bourkhiss et al.**, 2010).

Partie II : partie expérimentale

Chapitre III : Matériels et Méthodes

Partie II : partie expérimentale

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1 Objectif

L'objectif principal de cette étude était d'explorer les propriétés phytochimiques et les activités biologiques de *Withania frutescens*, une plante médicinale indigène des régions arides. Nous avons cherché à identifier et quantifier les principaux composés bioactifs présents dans l'extrait de cette plante, et à évaluer ses activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-hémolytiques. Cette recherche vise à confirmer le potentiel thérapeutique de *Withania frutescens*, tel qu'il est traditionnellement reconnu, et à établir une base scientifique pour son utilisation future dans le développement de médicaments naturels.

III.2. Lieu et Période d'Expérimentation

Les travaux expérimentaux relatifs à cette étude ont été menés entre avril et juin au sein de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. Les analyses ont été effectuées précisément au laboratoire de technologie alimentaire et nutrition (LTAN) ainsi qu'au laboratoire de biochimie 01.

III.3 Matériel végétal

- **Étude de la Plante Médicinale** : *Withania frutescens*



Figure 15 : La plante *Withania frutescens*

Description de la Plante : *Withania frutescens*, une plante médicinale présente dans les régions arides, a captivé l'intérêt pour ses propriétés thérapeutiques reconnues à travers différentes cultures. Sa richesse en composés bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins en fait une source précieuse pour la santé humaine.

Collecte, Préparation des Échantillons et Extraction : Des échantillons (feuilles) de *Withania frutescens* ont été collectés dans leur environnement naturel lors de la saison propice (floraison). Après un nettoyage minutieux pour éliminer les impuretés, les parties aériennes ont été séchées à l'ombre, puis broyées pour obtenir une poudre fine. Cette poudre a ensuite été extraite à l'aide de méthanol pour obtenir l'extrait brut utilisé dans nos analyses.

En explorant *Withania frutescens*, nous cherchons à découvrir les composés bioactifs qui la composent et à comprendre comment ces éléments pourraient contribuer à ses effets thérapeutiques. Notre étude approfondie nous permettra de mieux appréhender le potentiel de cette plante médicinale et son importance pour la santé humaine.

III.4 Méthodologie

- **Préparation de l'extrait brut**
 - **Préparation de l'extrait brut**

L'extraction des principes actifs a été réalisée par macération en utilisant un mélange d'éthanol/eau qui a été choisi de manière à solubiliser un maximum de composés d'un côté, et pour éviter la toxicité des autres solvants (méthanol, acétone, chloroforme ... etc) lors de l'exposition chez les rats. La macération est une procédure d'extraction très répandue et peu coûteuse afin d'épuiser le matériel végétal de toutes substances solubles dans un solvant d'extraction (Abubakar et Haque, 2020).

Un extrait hydro-éthanolique a été préparé selon la méthode décrite par **Messaoudi et al. (2016)**. Brièvement, une quantité de 100 g de poudre des feuilles de *W. frutescens* a été macérée dans 1 L de mélange éthanol/eau distillée (80/20) à l'abri de la lumière pendant 72 heures à température ambiante sous agitation. Après double filtration sous vide à l'aide d'un papier filtre Whatman, le filtrat a été évaporé sous vide à une température de 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Enfin, l'extrait a été lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur (CHRIST Alpha 1-4 LD plus) et l'extrait brut obtenu a été pesé pour déterminer le rendement d'extraction puis conservé à froid (4°C) jusqu'à son utilisation.

- **Calcul du rendement d'extraction**

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale utilisée avant l'extraction (**Falleh et al., 2008**).

$$R\% = (M_{Ext}/M_{Ech}) \times 100.$$

R : le rendement en %.

M_{Ext} : la masse de l'extrait obtenue après évaporation du solvant d'extraction en mg.

M_{Ech} : la masse de l'échantillon végétale utilisée en mg.

III.4.1 Analyse qualitative

- **Screening phytochimique**

L'un des buts essentiels d'un test phytochimique consiste dans la détection des différentes familles de métabolites secondaires existant dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés ainsi que des examens en lumière ultraviolette (**Hagerman et al., 2000**).

Dans notre étude expérimentale nous avons utilisé les techniques standards décrites par (**Terease et Evans, 1989 ; Harborne, 1998 ; Bruneton, 1999**).

Les résultats ont été évalué comme suit : +++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif

1) Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à tester et y ajouter 1ml d'acide chlorhydrique (HCl) et quelques tournures de magnésium. L'apparition d'une coloration rouge, orange ou jaune révèle la présence des flavonoïdes.

2) Les tanins

Un volume d'extrait auquel sont ajoutées quelques gouttes de solution de gélatine 1%. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence des tanins.

3) Les coumarines

5ml d'extrait sont introduits dans un tube auxquels est ajouté 0,5ml de NH_4OH à 10%. Le mélange est observé sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des

coumarines. Un deuxième test a été réalisé en ajoutant 3ml de NaOH à 10% à 2ml d'extrait. La présence des coumarines est indiquée par une coloration jaune.

3. Alcaloïdes

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et Wagner. 5ml d'extrait évaporé à sec, 2ml d'HCL (2%) sont ensuite ajoutés. Le mélange est chauffé dans un bain marie puis filtré. Le filtrat est divisé dans deux tubes à essais où dans l'un sont ajoutés quelques gouttes de réactifs de Mayer, et dans le deuxième quelques gouttes de réactif Wagner.

5) Les saponines (Test de mousse)

Dans un tube à essais, sont introduit 5ml d'extrait à tester et 5ml d'eau distillée chaude. Le tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15min. Une hauteur de mousse persistante indique la présence des saponines.

4. Terpénoïdes

On ajoute 0,5 ml de chloroforme et 0,7 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés à 1 ml de l'extrait éthanolique. La couleur verte-bleue révèle la présence des hétérosides stéroïdiens et la couleur verte-violette révèle la présence des hétérosides terpéniques. (Haddouchi *et al.*, 2016)

5. Test des sucres réducteurs

A 1ml d'extrait analyser, est ajouté 1ml mélange de la solution de Fehling A et B (Annexe) avec chauffage. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des sucres.

III.4.2. Analyse quantitative

La concentration des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) dans notre extrait a été déterminée par les techniques colorimétriques en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible de type Jenway (6715 UV-Vis). Ce type de molécules est doté de diverses propriétés biologiques remarquables chez les plantes.

- **Dosage des polyphénols totaux par le Folin Ciocalteu**

- a) **Principe**

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée selon le protocole décrit par **Li *et al.*, 2006** et **Talbi *et al.*, 2015**.

Cette méthode est basée sur la détermination de la concentration des groupements hydroxyles présents dans l'extrait en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif, acide de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation des phénols, il est réduit en un mélange d'oxydes métalliques bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). L'intensité de la couleur bleue produite, qui est mesurable à 760 nm, est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le mélange.

- b) **Mode opératoire**

En bref, 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dix fois dans le méthanol a été ajouté à 200 μ l d'échantillon ou d'étalon. Après 4 min, la réaction a été neutralisée avec 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 g/L). L'absorbance a été mesurée à 760 nm après 2 h d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière contre un blanc.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0 à 250 μ g/mL). Chaque composé phénolique a été dosé en trois essais pour s'assurer que les résultats sont fiables.

La teneur en polyphénols totaux a été exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) selon la formule suivant (**Bhandari & Rajbhandari, 2014**):

$$TPC = C * V / M$$

Où :

C = concentration d'acide gallique (mg/ml) trouvée à partir de la courbe d'étalonnage ;

V = volume de l'extrait utilisé selon le protocole en ml ;

M = poids d'extrait de la plante en gramme.

- **Dosage des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium AlCl₃**

- a) **Principe**

La méthode du trichlorure d'aluminium décrite par **Bahorun et al. (1996)** a été utilisée pour déterminer les flavonoïdes. Au cours de cette réaction, l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium entraîne la formation d'un complexe de couleur rose qui absorbe à 430 nm.

- b) **Mode opératoire**

1 ml d'extrait de racines de *W. Frutescens* (1 mg/ml) ou standard, dilués dans le méthanol, a été ajouté à des volumes égaux de solution d'AlCl₃ à 2 % (préparé dans le méthanol). Le mélange a été incubé 10 min dans l'obscurité à température ambiante et l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration en flavonoïdes est déduite à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0 à 20 µg/ml). La teneur en flavonoïdes totaux a été exprimée en milligrammes équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg E-quercétine/g d'extrait) selon la formule suivante (**Bhandari & Rajbhandari, 2014**):

$$TFC = C * V / M$$

Où : C = concentration de quercétine (mg/ml) trouvée à partir de la courbe d'étalonnage ; V = volume d'extrait utilisé selon le protocole en ml ; M = poids d'extrait de la plante en gramme.

- **Dosage des tannins condensés par la méthode à la vanilline avec l'HCl**

- a) **Principe**

Les tanins condensés, également appelés proanthocyanidines, sont caractérisés par la formation de pigments anthocyaniques lors de leur oxydation en milieu acide. La méthode colorimétrique de vanilline en milieu acide a été adoptée pour le dosage de ces métabolites en raison de sa sensibilité et sa simplicité. Au cours de cette réaction, la vanilline va réagir avec le groupement flavonoïde terminal des tanins condensés qui se dépolymérisent pour former des complexes de couleur rouge (anthocyanidols) qui absorbent à 550 nm (**Schofield et al., 2001**).

- b) **Mode opératoire**

La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode décrite par **Ali-Rachedi et al., 2018**. Un volume de 50 µL de l'extrait ou standard a été ajouté à 1500 µL de solution de

vanilline (4% dilué dans le méthanol). Le mélange a été vortexé puis un volume de 750 μL de l'acide chlorhydrique concentré a été additionné. Après incubation de 20 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 550 nm contre un blanc.

Une gamme de concentration entre 0 et 2000 $\mu\text{g/ml}$ de catéchine a été préparée pour tracer la courbe d'étalonnage qui permet d'exprimer la teneur des tanins condensés en mg équivalent de catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g d'extrait).

III.4.3 Evaluation des activités biologiques

Les métabolites secondaires des plantes ont une action bénéfique dans la prévention et le traitement de certaines maladies entraînées par le stress oxydant. Pour cela, nous avons choisi d'étudier les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires *in vitro* de *W. frutescens*.

III.4.3.1 Détermination de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'effet anti-inflammatoire des plantes médicinales est considéré comme un caractère très important à évaluer dans les préparations pharmaceutiques. L'activité anti-inflammatoire de notre échantillon a été évaluée par deux tests, le test de stabilisation de la membrane des érythrocytes via l'induction d'hémolyse par la chaleur et par une solution hypotonique, et le test de protection de l'albumine dans une température élevée. Ces tests pourraient avoir une large application pour la détection des agents anti-inflammatoires sans l'utilisation des animaux.

1) Effet stabilisateur de la membrane des érythrocytes

• Test d'inhibition de l'hémolyse

a) Principe

L'hémolyse est un facteur important à évaluer dans les études pharmacologiques car même si une plante médicinale possède une propriété antioxydante puissante, son utilisation est impossible en présence de son effet hémolytique qui est considéré comme un indicateur de toxicité cellulaire. Ce test est basé sur la capacité de l'extrait à stabiliser et protéger la membrane des globules rouges dans un milieu tamponné à une température élevée (Haddouchi *et al.*, 2016).

b) Préparation de la suspension érythrocytaire

Du sang total frais (3 ml) a été prélevé par voie intraveineuse à partir d'un volontaire sain qui n'avait pas pris d'AINS pendant deux semaines avant l'expérience. L'échantillon de sang a été recueilli dans un tube hépariné pour empêcher la coagulation. Après centrifugation à 3000 tours/minute pendant 10 mn à 4°C, le culot globulaire (érythrocytes) obtenu a été lavé trois fois par centrifugation dans 10 volumes de solution saline tamponnée au phosphate 10mM (PBS, pH=7.4). Le surnageant et la couche leucocytaire des globules blancs ont été soigneusement éliminés à chaque lavage. Les érythrocytes lavés ont été conservés à 4 °C. Une solution mère de suspension à 10 % v/v de sang rouge humain (HRBCs=human red blood cells) a été préparée dans un tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7,4).

c) Modes opératoires

Hémolyse induite par la chaleur

La méthode précédemment décrite par **Shinde et al. (1999)** et légèrement modifiée par **Henneh et al. (2018)** a été suivie. Le mélange réactionnel (2 ml) consistait en 1,0 ml de HRBCs à 10 % et 1,0 ml de diverses concentrations de l'extrait des feuilles de *W. frutescens* (10, 30, 100 µg/ml) a été ajouté à chaque tube et mélangé doucement. Le contrôle positif consistait en 1,0 ml de HRBCs et 1,0 ml de diverses concentrations de diclofénac sodique (10, 30, 100 µg/ml). Le contrôle négatif consistait en 1,0 ml de la suspension d'érythrocytes à 10% et 1,0 ml de solution saline normale seule. L'expérience a été réalisée en triple essais. Les solutions obtenues ont été chauffées à 56°C pendant 30 min et refroidies à température ambiante puis centrifugées à 2500 rpm pendant 10 min. Le surnageant a été recueilli et l'absorbance de chaque solution a été mesurée sur un spectrophotomètre à 560 nm (UVmini 1240, Shimadzu) comme indicateur du degré d'hémolyse. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition de l'hémolyse} = 100 \times (1 - A0/A1)$$

Où A0 = absorbance du contrôle négatif (100 % d'hémolyse) et A1 = absorbance des échantillons. Le résultat obtenu est exprimé en concentration d'extrait pour inhiber 50% d'hémolyse érythrocytaire (IC50).

Hémolyse induite par une solution hypotonique.

Dans cet essai, la méthode décrite par **Chandra et al. (2012)** a été suivie avec de légères modifications. Les échantillons d'essai consistaient en 0,5 ml de la solution stock de HRBCs à 10% mélangé avec 4,5 ml de solution hypotonique (0,36% NaCl) contenant des

concentrations variables de l'extrait (10, 30 et 100 µg/ml). Le contrôle positif consistait en 0,5 ml de HRBCs et 4,5 ml de solution hypotonique dans divers concentrations (10, 30 et 100 µg/ml) de diclofénac sodique (médicament standard). Le contrôle négatif était composé de 0,5 ml de suspension HRBC mélangée à 4,5 ml de solution hypotonique seule. L'expérience a été réalisée in triplicate. Le mélange est incubé 10 min à température ambiante puis centrifugé 10 min à 3000 rpm. La teneur en hémoglobine du surnageant a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (UVmini-1240, SHIMADZU) à 540 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[\frac{\text{Absorbance (témoin)} - \text{Absorbance (test)}}{\text{Absorbance (témoin)}} \right] \times 100$$

2) Test d'inhibition de la dénaturation des protéines

a) Principe

La stabilisation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA) par les produits naturels est une caractéristique de sélection des molécules anti-inflammatoires thérapeutiquement intéressantes. **Williams et al. (2008)** ont développé un test de protection de la BSA lorsqu'elle est exposée à une température élevée. La stabilisation thermique de la BSA implique que la protéine est incapable de perdre sa structure et donc sa fonction, et sera aussi incapable d'exprimer les antigènes pathogènes (**Williams, 2009**).

Test de dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA)

Mode opératoire

La méthode précédemment décrite par **Leelaprakash et Dass (2011)** a été utilisée pour le test. Le mélange réactionnel était constitué de 0,2 ml de BSA à 1% et 2,8 ml de PBS (pH 6,4) ajoutés à 2,0 ml de sérum physiologique (témoin négatif), en faisant varier la concentration de l'extrait ou du diclofénac sodique 50, 100 et 150 µg/ml, respectivement. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 20 min et chauffé à 51°C pendant 20 min. Les échantillons ont été refroidis, et l'absorbance a été lue à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UVmini 1240,

Shimadzu). L'expérience a été réalisée in triplicate, et le pourcentage d'inhibition a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition de la dénaturation} = 100 \times (1 - A2/A1)$$

Où A1 = Absorbance du contrôle négatif (100 % de dénaturation des protéines) et A2 = Absorbance de l'échantillon. Le résultat obtenu est exprimé en concentration d'extrait pour inhiber 50% de dénaturation de la BSA (IC50).

Test de dénaturation de l'albumine d'œuf

La méthode de **Mizushima et Kobayashi (1968)** a été suivie avec des modifications apportées par **Obese et al. (2018)**. Le mélange réactionnel (5 ml) consistait en 0,2 ml d'albumine d'œuf fraîche, 2,8 ml de tampon phosphate salin (PBS, pH 6,4) et 2,0 ml de solution de l'extrait à concentrations variables (10, 100 et 150, 1000, 1500 µg/ml). Le témoin positif consistait en 0,2 ml d'albumine d'œuf frais, 2,8 ml de PBS (pH 6,4) et 2,0 ml de diclofénac sodique à concentrations variables (10, 100 et 150 µg/ml). Le contrôle négatif contenait la même quantité d'albumine d'œuf et du PBS avec 2,0 ml d'eau distillée. Le mélange était incubé à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 15 min puis chauffé à 70°C pendant 5 min pour induire la dénaturation. Après refroidissement, l'absorbance a été lue à 660 nm (UVmini 1240, Shimadzu) en utilisant le véhicule comme le blanc. L'expérience a été menée en trois fois. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition de la dénaturation} = 100 \times (1 - A2/A1)$$

Où A1 = Absorbance du contrôle négatif (100 % de dénaturation des protéines) et A2 = Absorbance de l'échantillon. Le résultat obtenu est exprimé en concentration d'extrait pour inhiber 50% de dénaturation de l'albumine fraîche d'œuf (IC50).

N.B : Il est à noter que dans le témoin positif, on remplace l'extrait par le standard (diclofénac) et dans le témoin négatif on remplace l'extrait par l'eau distillée.

III.4.3.2 Détermination de l'activité antioxydante in vitro

L'activité antioxydante in vitro a été évaluée par les techniques colorimétriques utilisant le spectrophotomètre UV-Visible. Deux tests différents ont été réalisés, le premier par la mesure

de l'efficacité des composés de l'extrait à piéger le radical libre DPPH où se transformer en composant plus stable et un deuxième test par le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP).

➤ Le piégeage du radical libre DPPH

• Principe

Le DPPH (1,1-Diphényle-2-picrylhydrazyl) est considéré comme un radical libre relativement stable à température ordinaire et soluble dans le méthanol. Ce composé chimique possède un électron non apparié sur un atome d'azote, cette délocalisation empêche la dimérisation de ce radical et provoque aussi sa couleur violette. Le DPPH est capable de réagir avec les groupements hydroxylés des molécules antioxydantes (gagne un atome d'hydrogène) provoquant une diminution de la coloration violette qui est mesurable à 517 nm par le spectrophotomètre (**Brand-Williams et al.**, 1995).

• Mode opératoire

Les différents extraits ont été mesurés en termes de capacité à donner de l'hydrogène ou à piéger les radicaux en utilisant le radical stable DPPH (**Brand-Williams et al.**, 1995). 0,75 mL d'une solution méthanolique de l'extrait à différentes concentrations ont été mélangés avec 1,5 mL d'une solution méthanolique de DPPH (20 mg/L). L'absorbance a été mesurée à 517 nm après 20 minutes de réaction. Le pourcentage de décoloration DPPH de l'échantillon a été calculé selon l'équation $\% \text{ décoloration} = [1 - (\text{ABSSAMPLE}/\text{ABSCONTROL})] \times 100$. La décoloration a été tracée par rapport à la concentration de l'extrait d'échantillon, et une courbe de régression logarithmique a été établie afin de calculer l'IC50 (concentration inhibitrice 50, Ag/mL) qui est la quantité d'échantillon nécessaire pour diminuer de 50% l'absorbance du DPPH. L'acide ascorbique a été utilisé comme molécule de référence de la même manière.

➤ Test de FRAP

a) Principe

L'évaluation du pouvoir réducteur du fer est basée sur la présence d'un réducteur dans l'échantillon testé capable de donner des électrons pour transformer les ions ferrique (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) dans un milieu réactionnel. Cette réaction est caractérisée par un changement de couleur jaune en une couleur bleue mesurable à 700 nm. Le complexe

$\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ permet de déterminer la concentration des composés phénoliques participant dans la réduction de fer (**Berker *et al.*, 2007**).

b) Mode opératoire

Le pouvoir réducteur a été réalisé selon la méthode décrite par **Gheffour *et al.*, 2015**. En bref, 1 ml d'extrait ou de standard à différentes concentrations, dilué dans le méthanol, a été mélangé avec 2,5 ml de solution tampon phosphate 0,2 M à pH 6,6 et 2,5 ml de ferricyanure de potassium à 1 % ($\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$). Le mélange a été incubé dans l'étuve à 50°C pendant 20 min. La réaction a été arrêtée avec 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10 %. Après centrifugation à 1000 tr/min pendant 10 min, 2,5 ml du surnageant ont été ajoutés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure de fer à 0,1 % (FeCl_3). L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc où l'extrait a été remplacé par le méthanol. L'acide ascorbique a été utilisé comme molécule de référence. Le pouvoir réducteur a été exprimé en concentration efficace médiane (EC50).

Chapitre IV : Résultats et discussion

Chapitre IV : Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction

Après la récupération de l'extrait éthanolique, le rendement d'extraction a été calculé et la valeur est représentée dans le tableau 04

Tableau 03 : Résultat du rendement d'extraction de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens*

| | |
|-------------------------------|-------|
| Rendement d'extraction en (%) | 17,87 |
|-------------------------------|-------|

Dans notre étude, nous avons opté pour une seule méthode d'extraction pour obtenir l'extrait de *Withania frutescens*. Le rendement d'extraction est un paramètre important pour évaluer l'efficacité de l'extraction des composés bioactifs de la plante. Dans notre cas, le rendement représente la quantité d'extrait obtenue à partir de la matière végétale initiale, et il peut donner des indications sur la richesse en composés bioactifs dans l'extrait.

Après avoir réalisé l'extraction de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens*, nous avons déterminé le rendement d'extraction de notre échantillon, qui s'est élevé à **17,87 %**. Ce chiffre reflète la proportion de composés extraits par rapport à la quantité totale de matière végétale traitée. Les feuilles de *W. frutescens* récoltées à Tlemcen, Algérie et macérées dans le méthanol à 80° ont donné un rendement d'extraction supérieur au nôtre (**18,06%**) (**Bereksi et al., 2018**). De plus, l'extrait de racines de *W. frutescens* obtenu par macération, en utilisant comme solvant d'extraction l'éthanol 80%, a donné un rendement d'extraction égal à **15,79 %** par rapport à 100 g de la masse initiale de matière végétale sèche (**Résultat de doctorat de Bentaiba Karima en voie de soutenance**). Par ailleurs, une étude menée sur une espèce proche, *Withania somnifera*, dont les racines ont subi une macération dans l'éthanol 70% a donné un rendement d'extraction de **22,19%**, plus important à celui trouvé dans notre étude chez *W. frutescens* (**Munir et al., 2022**).

Un rendement d'extraction élevé comme celui que nous avons obtenu peut indiquer une extraction efficace des composés bioactifs présents dans la plante. Cependant, il est important de noter que le rendement seul ne fournit pas d'informations sur la qualité ou la nature spécifique des composés extraits. D'autres caractérisations, telles que les analyses

phytochimiques que nous avons réalisées, sont nécessaires pour évaluer les types de composés présents dans l'extrait et leur potentiel biologique.

Nos résultats montrent que l'extraction éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* a permis d'obtenir un rendement significatif, ce qui suggère la présence de composés bioactifs dans l'extrait. Cependant, pour tirer des conclusions plus approfondies sur le potentiel thérapeutique de l'extrait, il est important de poursuivre les analyses pour identifier et quantifier spécifiquement les composés présents et d'évaluer leurs activités biologiques potentielles.

En conclusion, le rendement élevé que nous avons obtenu pour l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* suggère une extraction efficace des composés bioactifs de la plante. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour caractériser davantage ces composés et évaluer leur potentiel pour des activités biologiques spécifiques, telles que les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes que nous avons étudiées

2. Screening phytochimique

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* sont mentionnés dans la figure 16.



Figure 16: Résultats du screening phytochimique de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens*.

- 1- Tannin : +++
- 2- Sucre : +
- 3- Coumarines : -
- 4- Polyphénols : +++
- 5- Terpènes : +++
- 6- Alcaloïdes : ++
- 7- Saponoside : ++
- 8- Flavonoïdes : ++

D'après les résultats obtenus dans la figure 16, notre étude montre la présence des alcaloïdes, flavonoïdes, terpénoïdes, tanins condensés, saponosides, polyphénols, sucres. Seules les coumarines étaient absentes dans l'extrait de *Withania frutescens*. La présence de tanins, polyphénols, et terpènes en forte quantité est cohérente avec d'autres études phytochimiques, telles que celles menées sur *Moringa oleifera* et *Euphorbia tirucalli* (**Pham et al.**, 2021 ; **Kumar et al.**, 2022). Les tanins ont été associés à des propriétés antimicrobienne et anti-biofilm (**Villanueva et al.**, 2023 ; **Widsten et al.**, 2023) antioxydantes et antibactériennes dans *Memecylon umbellatum* (**Kumar et Kumar**, 2017), ce qui pourrait suggérer des applications similaires pour *Withania frutescens*.

La présence moyenne d'alcaloïdes, saponosides, et flavonoïdes dans *Withania frutescens* est également en accord avec les résultats trouvés dans *Azadirachta indica* (**Shrestha et al.**, 2021). Ces composés ont été liés à diverses propriétés biologiques, y compris antioxydantes et antimicrobiennes. L'absence de coumarines dans l'extrait est un résultat unique qui n'a pas été directement comparé dans la littérature sélectionnée. Des études supplémentaires pourraient être nécessaires pour comprendre cette absence, notamment en examinant les méthodes d'extraction et les conditions de croissance de la plante.

Nos résultats phytochimiques suggèrent que l'extrait de *Withania frutescens* est riche en composés bioactifs tels que les tannins, les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes, les saponosides et les flavonoïdes. Ces composés pourraient contribuer aux propriétés thérapeutiques potentielles de la plante, en particulier en termes d'activités antioxydante et antimicrobienne, en accord avec des études similaires menées sur d'autres plantes médicinales.

3. Teneur en composés phénoliques

- Teneur en polyphénols

L'analyse quantitative des polyphénols totaux est déterminée à partir d'équation de la régression linéaire ($Y=0,013X$) et le coefficient de corrélation ($R^2 = 98.9\%$) de courbe d'étalonnage exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g) (annexe 1).

Tableau 04 : Teneur en polyphénols de l'extrait de *Withania frutescens* en mg EAG/g

| | |
|--|------------|
| Teneur en polyphénols en mg EAG /g MS | 15,62±0,38 |
|--|------------|

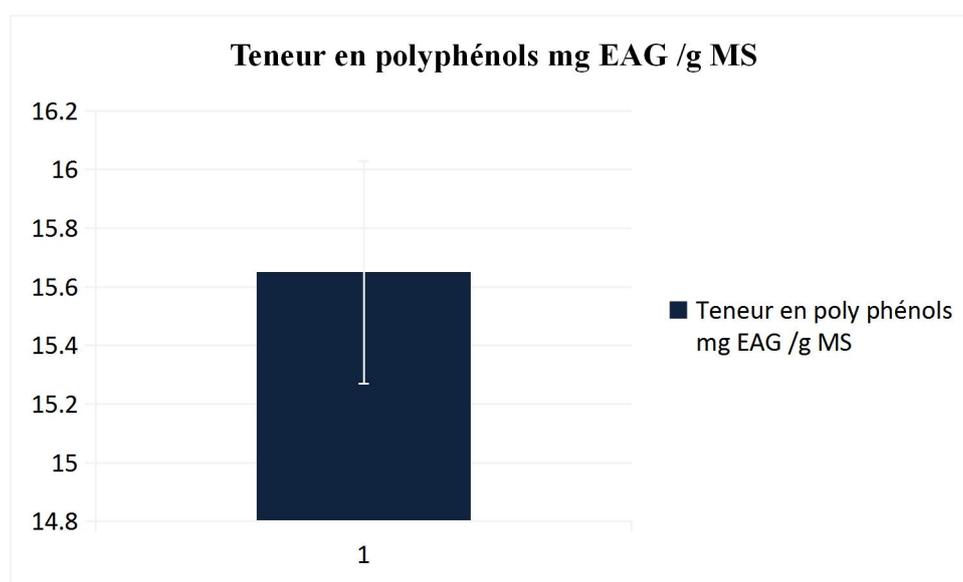


Figure 17 : Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* en mg EAG/g

La teneur en polyphénols de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania Frutescens* est de 15,62 mg EAG/g MS, alors que **Bentaiba et al.** (2023) rapportent une quantité de $63,83 \pm 3,82$ mg EAG/g MS dans l'extrait éthanolique des racines de *Withania frutescens* récoltée dans la région de Sidi Bellatar à Mostaganem. Bien que relativement faible par rapport à certaines autres sources de polyphénols, ce résultat suggère néanmoins une présence notable de ces composés antioxydants. Cette valeur est élevée comparée à celle trouvée par **El Moussaoui et al.** (2019) dans l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* collectée au Maroc (12.04 ± 0.61 mg EGA/g MS). Ces auteurs signalent également une forte

quantité de polyphénols dans les racines de cette plante (53.33 ± 1.20 mg EGA/g MS). Les polyphénols sont largement reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, et anticancéreuses, ce qui pourrait indiquer un potentiel thérapeutique de la *Withania frutescens* dans ces domaines. Par contre, **EL Bouzidi et al. (2011)** ont signalé des quantités significativement élevées de polyphénols dans les extraits méthanolique et éthanolique des racines et des feuilles de cette espèce collectée en mars 2009 à El Hassania (20 Km de Marrakech) au Maroc, les valeurs enregistrées sont : $142,0 \pm 1,6$ mg EAG/g d'extrait dans l'extrait méthanolique des racines, $144,1 \pm 3,7$ mg EAG/g d'extrait dans l'extrait méthanolique des feuilles, 166.6 ± 1.8 mg EAG/g d'extrait dans l'extrait éthanolique des racines et 254.8 ± 2.9 mg EAG/g d'extrait dans l'extrait éthanolique des feuilles. Ces quantités sont nettement supérieures à la nôtre.

Par exemple, dans une étude sur les déchets d'huile d'olive, la teneur totale en polyphénols était de 8,90 g/L pour les extraits d'eaux usées de l'huilerie d'olive (OWWE) et de 0,95 mg/g pour les extraits de grignons d'olive (OCE) (**Leouifoudi et al., 2015**). Bien que ces valeurs soient plus élevées, il est important de noter que les méthodes d'extraction et les matrices peuvent varier considérablement, ce qui peut influencer la teneur en polyphénols.

Dans une autre étude sur les extraits de pissenlit (*Taraxacum officinale*), la teneur en polyphénols variait jusqu'à 0,535 mg/mL pour les feuilles et 0,385 mg/mL pour les fleurs (**Milek et al., 2019**). Ces valeurs sont plus faibles de celles trouvées dans *Withania frutescens*, suggérant que la teneur en polyphénols peut varier considérablement entre différentes espèces et parties de plantes.

Alam et al. (2011) ont analysé des extraits hydrométhanoliques de racines de *W. somnifera* et ont également trouvé des valeurs plus élevées de polyphénols totaux et à des niveaux de 17,80 mg GAE/g MS. Des résultats similaires ont été obtenus par **Dhanani et al. (2017)** pour les extraits aqueux de racines de *W. somnifera* (14,90–18,72 mg GA/g MS). De plus, des teneurs plus élevées en Polyphénols ont été obtenues par **Ganguly et al. (2018)** pour les extraits hydrométhanoliques (97,38 µg GA/mg MS) et aqueux (53,9 µg GA/mg MS) dans les racines de *W. somnifera*, tandis que des niveaux similaires de TPC ont été rapportés par **Yadav et Rai (2018)** pour les extraits méthanoliques de racines de *W. somnifera* (52,811 mg GAE/100 g MS). Les valeurs rapportées sont supérieures à celles obtenues dans cette étude. Une explication de la variabilité détectée parmi les contenus phénoliques dans les échantillons de

Withania pourrait être due aux différentes procédures d'extraction et méthodes d'analyse utilisées dans chaque travail. De plus, il a été suggéré que les composés phénoliques présents dans les plantes varient en fonction des conditions de croissance telles que la sécheresse, les changements de température, la pollution, les rayons UV et les attaques d'agents pathogènes, entre autres, ou du génotype testé (Chrysargyris *et al.*, 2020).

Les polyphénols sont largement reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. La présence de ces composés dans *Withania frutescens* pourrait indiquer un potentiel thérapeutique dans ces domaines, similaire à ce qui a été observé dans d'autres plantes riches en polyphénols (Leouifoudi *et al.*, 2015 ; Milek *et al.*, 2019).

- **Teneur en flavonoïdes**

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par la quercétine à différentes concentrations, avec $Y=0,012X$ et un coefficient de corrélation linéaire $R^2= 0,968$ (Annexe 3). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par gramme (mg EQ/g).

Tableau 05 : Teneur en flavonoïdes de l'extrait de *Withania frutescens* en mgEQ/g

| | |
|--|-----------|
| Teneur en flavonoïdes en mg EQ/g MS | 8,56±0,01 |
|--|-----------|

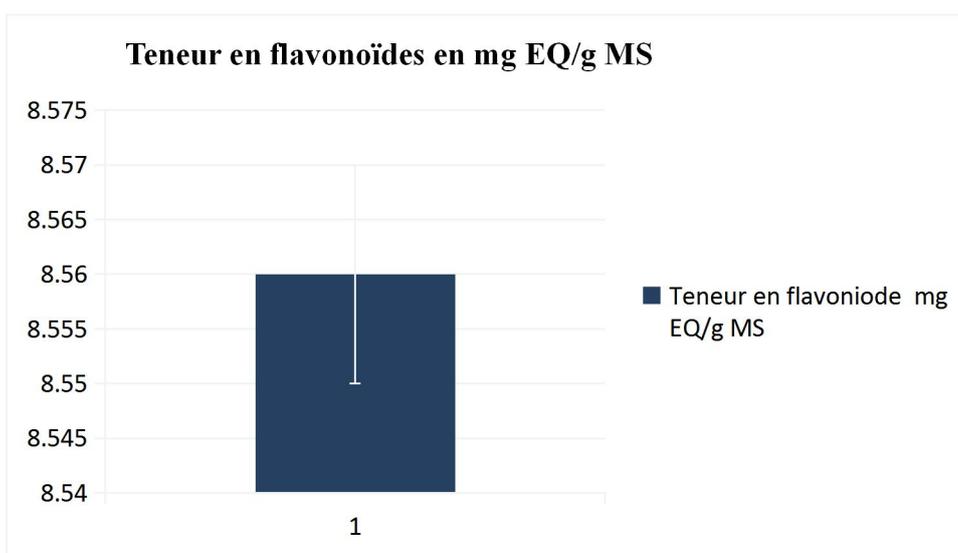


Figure 18 : Teneur en flavonoïdes de *Withania frutescens* en mg EQ/g MS

La teneur en flavonoïdes, un sous-groupe de polyphénols, est de 8,56 mg EQ/g MS. Les flavonoïdes sont également des antioxydants puissants et sont connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire et le système immunitaire. Cette présence de flavonoïdes dans l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* pourrait donc contribuer à ses propriétés thérapeutiques (Pancheet *et al.*, 2016). La richesse en flavonoïdes a été également signalée dans les extraits aqueux et hydrométhanolique de *Withania somnifera* (Polumackanycz *et al.*, 2023). La concentration en flavonoïdes de l'extrait hydro-éthanolique des racines de la même espèce est de **1,56 ± 0,12 mg EQ/g d'extrait (résultats de la doctorante Bentaiba Karima sous presse)**. Comparativement aux autres espèces du genre *Withania*, des valeurs plus importantes en flavonoïdes ont été enregistrées par Azhar *et al.* (2020) avec les extraits méthanoliques de racines de *W. Coagulans* et *W. somnifera* (42.82±1.189 mg ER/g d'extrait et 39.13±0.607 mg ER/g d'extrait respectivement), et qui sont supérieures à nos résultat.

La teneur en flavonoïdes peut varier entre différentes espèces et parties des plantes. Par exemple, une étude sur les extraits de feuilles de *Camellia sinensis* a révélé une teneur en flavonoïdes allant de 11,3 à 42,6 mg/g (Chen *et al.*, 2014). Une autre étude sur les extraits de fruits de *Citrus aurantium* a montré une teneur en flavonoïdes de 16,3 mg/g (Hwang *et al.*, 2012).

Ces comparaisons supposent que la teneur en flavonoïdes de *Withania frutescens* est dans une gamme qui pourrait être attendue pour les plantes médicinales, bien que des variations puissent être présentes en fonction de la méthode d'extraction, de la partie de la plante utilisée, et d'autres facteurs (Panche *et al.*, 2016).

La teneur en flavonoïdes de *Withania frutescens* est cohérente avec les propriétés bioactives connues de ces composés. Des études supplémentaires spécifiques à *Withania frutescens* seraient bénéfiques pour une compréhension plus complète de sa composition en flavonoïdes et de son potentiel thérapeutique.

- **Teneur en tanins condensés**

La teneur en tanins condensés a été déterminée grâce à la courbe d'étalonnage de la catéchine avec l'équation : $Y=0,018X$ avec une corrélation $R^2=0,984$ (Annexe 4).

Les résultats des teneurs en Tanins condensés de l'extrait éthanolique des feuilles *Withania frutescens* sont consignés dans le tableau 06 et la figure 18 ci-dessous.

Tableau 06: Teneur en tanins de l'extrait de *Withania frutescens* en mg EC/g

| | |
|------------------------------------|----------------|
| Teneur en Tanins en mg EC/g | 124 ,071±32,92 |
|------------------------------------|----------------|

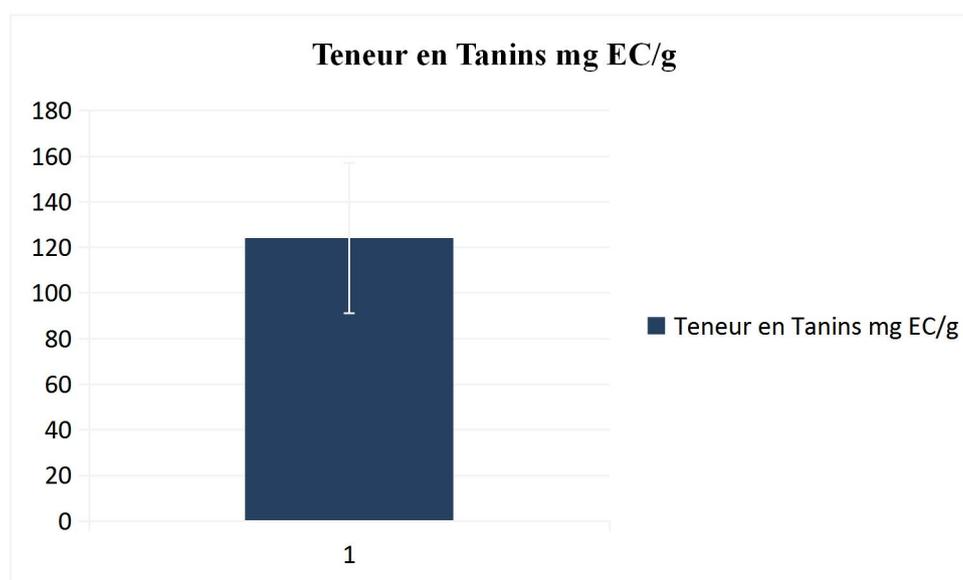


Figure19 : Teneurs en tanins de *Withania frutescens* en mg EC/g

La teneur en tanins est de **124,07 mg EC/g MS**, ce qui est significatif. Les tanins sont connus pour leurs propriétés astringentes et leur capacité à précipiter les protéines. Cette forte concentration de tanins pourrait avoir un impact sur l'utilisation de la *Withania frutescens* en phytothérapie, notamment pour ses propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Chung *et al.*, 2011). En revanche, dans l'extrait éthanolique de racines de cette espèce la quantité de tanins condensés s'évalue à $2,57 \pm 0,23$ mg EC/g selon les travaux de Bentaiba Karima, doctorante en voie de soutenance. La différence entre les deux valeurs est hautement significative. Alagesan et Venugopal, (2019) rapportent un taux de 156.33 ± 14.53 µg/mg de

tanins dans l'extrait aqueux des feuilles de *W. somnifera*. Alors que, dans les extraits hydro-méthanolique, méthanol-chloroforme-eau et aqueux, la concentration en tanins était de 37,75-36,00-18,19 µg équivalent d'acide tannique par mg d'extrait (Ganguly *et al.*, 2018).

La teneur en tanins condensés de *Withania frutescens* obtenue dans cette étude mérite une attention particulière. Cette teneur se situe dans une gamme comparable à celle du thé (*Camellia sinensis*), où la teneur en tanins varie de 50 à 300 mg/g selon le type et la méthode de préparation (Chung *et al.*, 2011). Cette similitude indique que *Withania frutescens* peut être une source notable de tanins, comparable à une source bien connue et largement consommée. En outre, la comparaison avec l'écorce de chêne (*Quercus spp.*), qui contient des tanins condensés jusqu'à 20 % du poids sec de l'écorce (Pizzi, 1980, 2019), met en évidence la diversité des concentrations de tanins dans différentes plantes et parties de plantes. Cette diversité souligne la complexité de la quantification des tanins et l'importance de la méthode d'extraction et de la partie de la plante utilisée. Les tanins sont également étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Chung *et al.*, 2011). La forte concentration de tanins dans *Withania frutescens* pourrait contribuer à ces propriétés thérapeutiques, en accord avec les observations faites dans d'autres plantes riches en tanins.

En somme, la teneur en tanins condensés de *Withania frutescens* n'est pas seulement cohérente avec les propriétés connues de ces composés mais aussi comparables à d'autres sources de tanins. La présence de tanins dans *Withania frutescens* pourrait avoir un impact significatif sur son utilisation en phytothérapie, notamment pour ses propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Des études supplémentaires spécifiques à *Withania frutescens* seraient bénéfiques pour une compréhension plus complète de sa composition en tanins et de son potentiel thérapeutique, ouvrant la voie à de nouvelles applications dans la médecine traditionnelle et moderne.

4. Activité anti inflammatoire *in vitro*

4.1 Effet stabilisateur de la membrane des érythrocytes

- **Hémolyse induite par la chaleur.**

Ce test de la stabilisation de la membrane des globules rouges est basé sur l'incubation de la suspension des globules rouges, avec le diclofénac de sodium, et l'extrait de *Withania*

frutescens à différentes concentrations (10, 30, 150 et 100 µg/ml). Les résultats sont illustrés dans tableau 07 et la figure 20 ci-dessous.

Tableau 07: Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par la chaleur de l'extrait de *Withania frutescens* et du diclofénac de sodium à différentes concentrations (10, 30 et 100 µg/ml).

| | 10 µg/ml | 30 µg/ml | 100 µg/ml |
|--|------------|------------|------------|
| Extrait brut de <i>Withania frutescens</i> | 27,86±1,76 | 40,10±2,45 | 52,08±3,52 |
| Diclofénac | 20,41±0,03 | 45,76±0,04 | 60,24±0,02 |

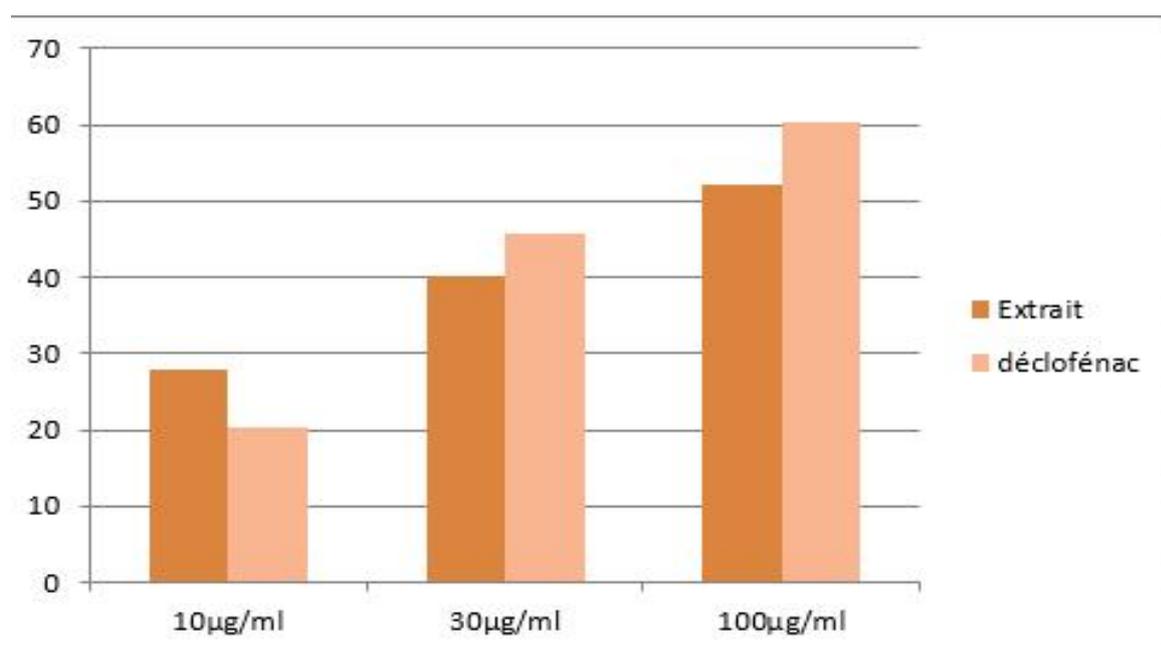


Figure20 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par la chaleur par l'extrait de *Withania frutescens* et le diclofénac de sodium à différentes concentrations (10, 30 et 100 µg/ml)

L'effet stabilisateur de la membrane des érythrocytes est souvent utilisé comme indicateur de l'activité anti-inflammatoire d'un extrait ou d'un médicament. Dans cette étude, l'extrait brut

de *Withania frutescens* a été comparé au diclofénac, un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien bien connu, à différentes concentrations (10 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait brut de *Withania frutescens* et le diclofénac ont tous deux un effet stabilisateur sur la membrane des érythrocytes, comme en témoigne la réduction de l'hémolyse induite par la chaleur. L'effet semble être dose-dépendant pour les deux substances, avec une augmentation de l'effet stabilisateur à mesure que la concentration augmente.

À 10 µg/ml: L'extrait de *Withania frutescens* a montré une stabilisation de $27,86 \pm 1,76$ %, tandis que le diclofénac a montré une stabilisation légèrement inférieure de $20,41 \pm 0,03$ %. Cela suggère que l'extrait peut avoir une activité anti-inflammatoire plus forte à cette concentration particulière.

À 30 µg/ml: Les deux substances montrent une augmentation de l'effet stabilisateur, avec l'extrait de *Withania frutescens* à $40,10 \pm 2,45$ % et le diclofénac légèrement plus élevé à $45,76 \pm 0,04$ %. Cela indique que le diclofénac peut être plus efficace à cette concentration.

À 100 µg/ml: l'effet stabilisateur augmente avec la concentration. L'extrait de *Withania frutescens* montre une stabilisation de $52,08 \pm 3,52$ %, tandis que le diclofénac est plus élevé à $60,24 \pm 0,02$ %. Cela suggère que le diclofénac peut avoir une activité anti-inflammatoire plus forte à cette concentration élevée. L'effet antiinflammatoire de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* est dose dépendant, plus la dose augmente plus l'impact antiinflammatoire est important. Il est important d'augmenter la dose pour atteindre la dose optimale susceptible de donner un effet antiinflammatoire important. En effet, des recherches effectuées sur *Withania frutescens* collectée au Maroc ont révélé que cette plante a une activité anti-inflammatoire avec un pourcentage d'inhibition maximum de $82.20 \pm 8.69\%$ obtenu à la dose de 450 mg/kg (EL Moussaoui *et al.*, 2020).

À une concentration de 10 µg/ml, l'extrait de *Withania frutescens* a montré une stabilisation de la membrane des érythrocytes de $27,86 \pm 1,76$ %, supérieure à celle du diclofénac ($20,41 \pm 0,03$ %). Cette observation est en accord avec l'effet stabilisateur observé dans l'extrait hydroalcoolique de *Terminalia chebula*, qui a montré une protection de 96,72 % sur la stabilité de la membrane des globules rouges humains (Chatterjee *et al.*, 2013).

À des concentrations plus élevées (30 µg/ml et 100 µg/ml), le diclofénac a surpassé l'extrait de *Withania frutescens*, avec des stabilisations de 45,76±0,04 % et 60,24±0,02 %, respectivement.

Ces résultats sont cohérents avec d'autres études qui ont montré une activité anti-inflammatoire significative dans divers extraits de plantes, comme les extraits de feuilles de *Shorea robusta* (Kumar et Van Staden, 2012) et les nanoparticules de l'oxyde de zinc biosynthétisées à partir de l'extrait de feuilles de *Pelargonium odoratissimum* (Njoroge et al., 2021). Une étude menée par Khan et al. (2020) a évalué l'activité protectrice de l'extrait d'*Aloe vera* contre l'hémolyse induite par la chaleur. Les résultats ont montré des valeurs d'IC50 comparables à celles obtenues dans notre étude.

En conclusion, les résultats du test de stabilisation de la membrane des érythrocytes face à l'hémolyse induite par la chaleur suggèrent que l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* présente une activité significative de protection contre ce phénomène. Cela peut être attribué à la capacité de l'extrait à stabiliser les membranes des globules rouges et à prévenir leur éclatement en réponse à la chaleur.

- **Hémolyse induite par une solution hypotonique.**

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits méthanolique de *Withania frutescens*, le test de stabilisation de la membrane des globules rouges a été utilisé. Il s'agit d'incuber une suspension de globules rouges obtenus à partir d'un donneur sain avec les extraits éthanolique de *Withania frutescens*, ainsi que le diclofénac de sodium comme molécule de référence aux concentrations de 10, 30 et 100 µg/ml. Les valeurs des absorbances obtenues ont été converties en pourcentage d'inhibition de l'hémolyse (stabilisation de la membrane) en appliquant la formule décrite dans la méthodologie. Plus le pourcentage de stabilisation de la membrane est élevé, Plus le surnageant est rouge clair et plus importante est l'activité anti-inflammatoire de l'extrait. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 08 et la figure 21 ci-dessous.

Tableau 08 : Pourcentage d'hémolyse induite par une solution hypotonique en fonction de la concentration de l'extrait de *Withania frutescens* et du diclofénac

| | 10 µg/ml | 30 µg/ml | 100 µg/ml |
|---|-------------|-------------|-------------|
| Extrait brut de <i>Withania frutescens</i> | 50,88±1,79 | 61,77±1,55 | 71,77±1,00 |
| Diclofenac | 64,96±0,009 | 68,29±0,003 | 70,38±0,027 |

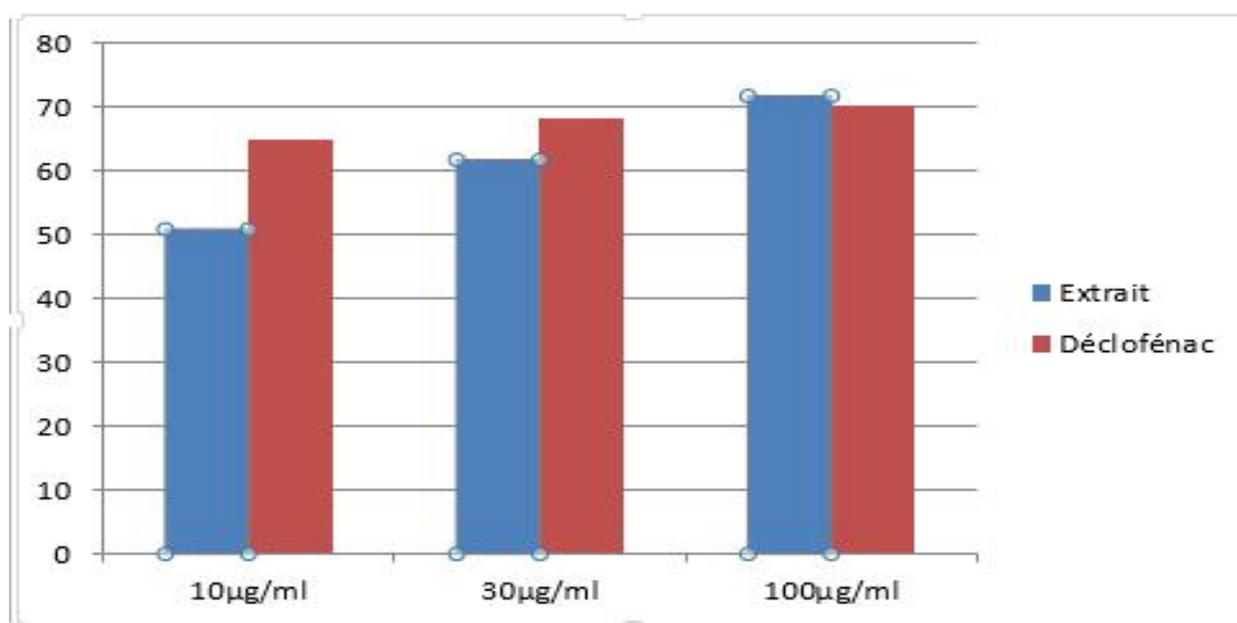


Figure 21 : Pourcentage d'hémolyse induite par une solution hypotonique en fonction de la concentration de l'extrait de *Withania frutescens* et du diclofénac

Dans cet essai, nous avons utilisé le test de stabilisation de la membrane des globules rouges pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *Withania frutescens*. L'objectif était de déterminer si cet extrait avait la capacité de protéger les membranes des globules rouges contre l'hémolyse induite par une solution hypotonique.

Le test implique l'incubation d'une suspension de globules rouges en présence de l'extrait des feuilles de *Withania frutescens* à différentes concentrations (10, 30 et 100 µg/ml), ainsi que du diclofénac de sodium en tant que molécule de référence. Après l'incubation, les absorbances

obtenues ont été converties en pourcentage d'inhibition de l'hémolyse, ce qui indique la capacité de l'extrait à stabiliser la membrane des globules rouges et à prévenir leur éclatement en réponse à la solution hypotonique.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique de *Withania frutescens* présente une augmentation significative du pourcentage de stabilisation de la membrane des globules rouges à mesure que la concentration de l'extrait augmente. À une concentration de 10 µg/ml, l'extrait a induit une inhibition de l'hémolyse de 50,88%, tandis qu'à 30 µg/ml et 100 µg/ml, les pourcentages d'inhibition étaient de 61,77% et 71,77% respectivement. Ces résultats suggèrent une activité anti-inflammatoire dose dépendante potentielle de l'extrait.

Comparativement, le diclofénac de sodium, utilisé comme contrôle positif, a également montré des effets similaires d'inhibition de l'hémolyse, avec des valeurs de 64,96%, 68,29% et 70,38% aux mêmes concentrations.

En interprétant ces résultats, nous pouvons conclure que l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* présente une activité anti-inflammatoire en stabilisant les membranes des globules rouges et en les protégeant de l'hémolyse induite par une solution hypotonique. Ces résultats renforcent l'idée que *Withania frutescens* pourrait contenir des composés bioactifs ayant le potentiel de moduler les processus inflammatoires.

Les résultats obtenus dans ce test indiquent clairement que l'extrait éthanolique de *Withania frutescens* présente une capacité significative à inhiber l'hémolyse des globules rouges. L'augmentation progressive du pourcentage d'inhibition de l'hémolyse à mesure que la concentration de l'extrait augmente suggère une activité anti-inflammatoire potentielle de cet extrait. Cela se manifeste par la capacité de l'extrait à stabiliser les membranes des globules rouges et à prévenir leur éclatement en réponse à la solution hypotonique.

Par ailleurs, l'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* a manifesté une activité anti-inflammatoire intéressante. En effet, le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse qui traduit la stabilisation de la membrane érythrocytaire, est plus élevé et la stabilisation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA) est nettement supérieure comparativement à celle obtenue avec le diclofénac. Cette propriété est vraisemblablement attribuée à sa richesse en composants anti-inflammatoires qui sont mentionnés précédemment (**Bentaiba et al., 2023**).

En comparant ces résultats avec la littérature scientifique, nous constatons que plusieurs études ont évalué l'activité anti-inflammatoire de différentes plantes médicinales en utilisant des tests similaires de stabilisation de la membrane des globules rouges. Les résultats de l'activité cytotoxique de l'extrait éthanolique des racines de *W. somnifera* suggèrent que cette plante médicinale possède un potentiel significatif ($P < 0,05$) de stabilisation membranaire (antihémolytique) ainsi qu'un potentiel thrombolytique et protecteur de l'ADN (**Munir et al., 2022**). Des valeurs aussi importantes ont été obtenues par **Chirumamilla et Taduri, (2023)** dans l'extrait méthanolique des feuilles, fruits et racines de *Solanum khasianum*, une solanacae du genre Salanum les valeurs sont, dans l'extrait des racines de $83,97 \pm 0,36$ % d'inhibition de l'hémolyse à 1 mg/mL, par rapport aux extraits de fruits ($81,68 \pm 0,82$ %) et de feuilles ($70,93 \pm 0,38$ %) qui évoluent de manière dose-dépendante. Le diclofénac, a montré un effet anti-inflammatoire comparativement maximum activité ($85,49 \pm 0,51$ %) à une concentration de 1 mg/mL.

Aussi, une étude menée par **Kumar et al. (2022)** a évalué l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de *Moringa oleifera* en utilisant un test similaire de stabilisation de la membrane. Les résultats ont montré une augmentation significative de la stabilisation de la membrane avec l'augmentation de la concentration de l'extrait, ce qui est en corrélation avec nos propres résultats. De même, une étude menée par **Pham et al. (2021)** sur *Euphorbia tirucalli* a également utilisé un test de stabilisation de la membrane pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait. Les résultats ont montré une capacité d'inhibition de l'hémolyse similaire à celle observée dans notre étude. L'effet dose-dépendant observé dans cette étude est également en accord avec l'inhibition de l'hémolyse induite par l'hypotonie dans l'extrait de méthanol des feuilles de *Justicia secunda* (**Oyebode et al., 2019**). La comparaison avec d'autres plantes médicinales et substances, tel que l'extrait d'*Artemisia annua*, qui a également montré une activité hémolytique (**Weathers et al., 2001**), peut offrir un contexte précieux pour les résultats concernant *Withania frutescens*.

L'évaluation de l'inhibition de l'hémolyse par l'extrait de *Withania frutescens* est cruciale pour déterminer son potentiel thérapeutique et sa sécurité. L'hémolyse peut avoir des conséquences à la fois bénéfiques et nuisibles, selon le contexte (**Gutteridge et Smith, 1988**).

Cependant, il est important de noter que chaque plante médicinale a des compositions chimiques différentes, ce qui peut conduire à des mécanismes d'action distincts. Par

conséquent, bien que les résultats soient comparables, il est essentiel de comprendre les composés spécifiques présents dans *Withania frutescens* et leur rôle dans l'activité anti-inflammatoire.

4.2 Dénaturation des protéines

- **Test de dénaturation de l'albumine d'œuf**

Dans notre étude, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait a été évaluée in vitro par le test d'inhibition de la dénaturation des protéines (l'albumine d'œuf) induite par un traitement thermique. Le tableau 09 et la figures 22 représentent les pourcentages d'inhibition de la dénaturation des protéines (blanc d'œuf) en fonction des différentes concentrations de l'extrait éthanolique (10,100,150,1000 et 1500 µg/ml). Ces résultats sont comparés à ceux enregistrés pour le contrôle positif (diclofénac sodique).

Tableau 09 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation des protéines (blanc d'œuf) par l'extrait éthanolique des feuilles de *W. frutescens* et le contrôle positif (diclofénac) à différentes concentrations

| | 10 µg/ml | 100 µg/ml | 150 µg/ml | 1000 µg/ml | 1500 µg/ml |
|---|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| Extrait brut de <i>Withania frutescens</i> | 93,34±0,68 | 87,59±0,7 | 72,2±0,9 | 71,18 ±1,20 | 69,24 ±1,15 |
| diclofénac | 59,2±0,52 | 41,07±3,63 | 27,97±5,06 | / | / |

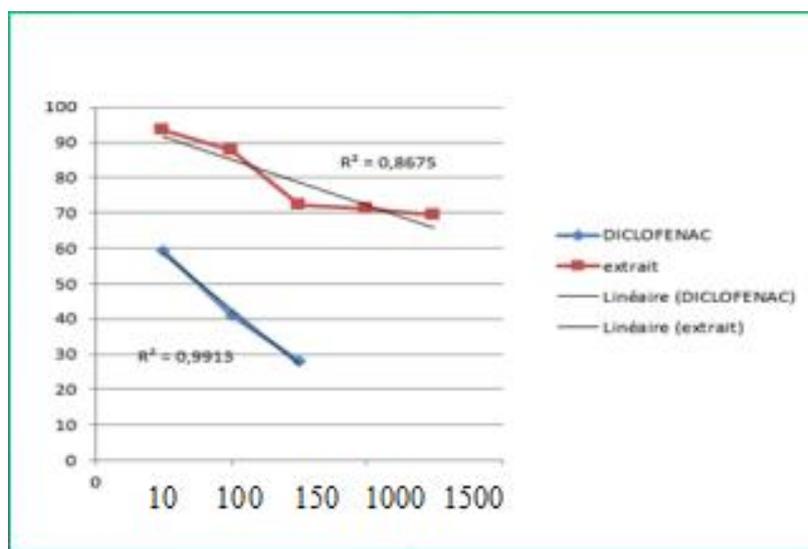


Figure 22 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines (blanc d'œuf) en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* et du diclofénac

L'expérience de dénaturation des protéines, en particulier l'albumine d'œuf, en présence de l'extrait brut de *Withania frutescens* et du diclofénac, révèle des résultats notables. Le tableau présente le taux d'inhibition de la dénaturation à différentes concentrations.

Le taux d'inhibition de la dénaturation par l'extrait de *Withania frutescens* est élevé, même à des concentrations plus faibles. Il montre une diminution progressive avec l'augmentation de la concentration, indiquant une relation dose-dépendante. À 10 µg/ml, l'inhibition est la plus élevée à 93,34%, et elle diminue à 69,24% à 1500 µg/ml.

En comparaison, le diclofénac montre un taux d'inhibition beaucoup plus faible à toutes les concentrations testées. Le taux d'inhibition diminue également avec l'augmentation de la concentration, passant de 59,2% à 10 µg/ml à 27,97% à 150 µg/ml. Il n'y a pas de données disponibles pour les concentrations plus élevées.

La dénaturation des protéines est un processus complexe impliquant des altérations dans leur structure secondaire, tertiaire et quaternaire. L'inhibition de la dénaturation revêt une importance thérapeutique, notamment dans le traitement des maladies inflammatoires. L'extrait de *Withania frutescens* démontre une capacité significative à inhiber la dénaturation de l'albumine d'œuf à faible dose, suggérant un potentiel anti-inflammatoire. En revanche, le diclofénac, bien qu'ayant des propriétés anti-inflammatoires reconnues, montre une inhibition minimale, ce qui pourrait indiquer que l'extrait de *Withania frutescens* contient des composés plus efficaces pour inhiber la dénaturation des protéines.

La dénaturation des protéines est un phénomène complexe ayant des implications dans diverses maladies et conditions pathologiques. L'inhibition de la dénaturation est donc un domaine de recherche prometteur dans le contexte thérapeutique. Notre étude révèle que l'extrait brut de *Withania frutescens* possède une capacité marquée à inhiber la dénaturation de l'albumine d'œuf, surpassant même le diclofénac, un anti-inflammatoire bien connu.

L'association entre *Withania frutescens* et ses propriétés anti-inflammatoires a été précédemment documentée (**Mishra et al.**, 2000). Notre étude apporte une contribution en montrant une inhibition significative de la dénaturation des protéines, un mécanisme potentiel sous-tendant l'effet anti-inflammatoire de la plante.

Le diclofénac, un AINS largement utilisé avec un mécanisme d'action bien compris (**Vane & Botting**, 1998), montre une capacité moins explorée à inhiber la dénaturation des protéines. Notre recherche apporte des données précieuses à cette compréhension.

Une étude a été conduite pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait hydro-alcoolique d'ashwagandha (*W. somnifera*) contre la dénaturation des protéines *in vitro*. Les résultats ont montré une inhibition dose-dépendante de la dénaturation des protéines (albumine) par l'extrait d'ashwagandha, l'effet du diclofénac sodique s'est avéré être moindre par rapport à l'extrait test, les auteurs ont conclu que l'ashwagandha possédait un effet anti-inflammatoire marqué contre la dénaturation des protéines *in vitro* (**Chandra et al.**, 2012). C'est le cas aussi de notre plante, *Withania frutescens*. Une autre étude menée sur la *W. somnifera* a montré que l'extrait brut a provoqué une inhibition dose-dépendante de la dénaturation des protéines avec un effet maximal de 59.48% à 500 mg/mL (**Khan et al.**, 2015). Auparavant, **Gogoi et al.** (2021), ont trouvé avec le test de dénaturation des protéines, dans les extraits méthanoliques des feuilles et des baies de *Solanum khasianum* de la famille des Solanacées, genre *Solanum*, un pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines de 69.40±0.301% et 72.38±0.032% respectivement, contre celui du diclofénac de 73.01±0.106% à la concentration de 30µg/ml avec des IC-50 de 23.37 µg/ml pour les feuilles et 20.96 µg/ml pour les baies et 18.88 µg/ml pour le diclofénac.

En comparant ces résultats avec la littérature scientifique, nous pouvons constater que d'autres études ont également utilisé le test d'inhibition de la dénaturation protéique pour évaluer l'activité anti-inflammatoire d'extraits de plantes. Par exemple, une étude menée par **Khan et al.** (2020) a évalué l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de *Salvia miltiorrhiza* en utilisant un test similaire. Les résultats ont montré une inhibition de la dénaturation de la protéine comparable à celle observée dans notre étude. De même, une autre étude réalisée par **Li et al.** (2019) a évalué l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de *Camellia sinensis* en utilisant un test de dénaturation de l'albumine d'œuf. Les résultats ont montré que l'extrait de *Camellia*

sinensis avait la capacité d'inhiber la dénaturation de l'albumine d'œuf induite par la chaleur, ce qui a été attribué à ses propriétés anti-inflammatoires.

D'autres plantes médicinales ont également été étudiées pour leur capacité à inhiber la dénaturation des protéines (Siddiqui *et al.*, 2006). La comparaison avec ces études révèle que *Withania frutescens* se positionne parmi les plantes présentant une forte capacité d'inhibition.

L'inhibition de la dénaturation des protéines peut avoir des applications dans le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes (Chandra *et al.*, 2017). L'inhibition marquée observée avec *Withania frutescens* suggère un potentiel thérapeutique dans ces domaines.

Dans le contexte de notre étude sur *Withania frutescens*, les résultats obtenus sont cohérents avec ces études antérieures. L'observation que l'extrait éthanolique de *Withania frutescens* prévient la dénaturation de l'albumine d'œuf sous l'effet de la chaleur renforce l'idée que cet extrait pourrait contenir des composés bioactifs ayant des propriétés anti-inflammatoires.

Cependant, il est important de noter que chaque plante a des compositions chimiques uniques, ce qui peut influencer les mécanismes sous-jacents à son activité anti-inflammatoire. Par conséquent, bien que les résultats soient comparables entre différentes études, il est essentiel de poursuivre les recherches pour comprendre les mécanismes spécifiques par lesquels *Withania frutescens* exerce son effet anti-inflammatoire.

En conclusion, l'extrait brut éthanolique des feuilles *Withania frutescens* présente une capacité significative à inhiber la dénaturation des protéines, un mécanisme potentiellement lié à ses propriétés anti-inflammatoires. La comparaison avec le diclofénac et la littérature existante met en évidence l'importance de ces résultats et ouvre la voie à des recherches plus approfondies sur les applications thérapeutiques de *Withania frutescens*.

- **Essai de dénaturation de l'albumine sérique bovine**

Le test d'inhibition de la dénaturation protéique est le plus convenable pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de la *Withania frutescens*. La protéine utilisée pour ces tests est l'albumine de sérum bovine (BSA). Les résultats sont portés sur le tableau 10 et la figure 23 ci-dessous.

Tableau 10 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation de la BSA par l'extrait éthanolique des feuilles de *W. frutescens* et le contrôle positif (diclofénac) à différentes concentrations

| | 50 µg/ml | 100 µg/ml | 150 µg/ml |
|---|-------------|------------|-------------|
| Extrait brut de <i>Withania frutescens</i> | 75,29± 3,15 | 61,17±5,56 | 44,70± 5,85 |
| Diclofénac | 56,86±7,006 | 52,54±9,50 | 36,07±10,54 |

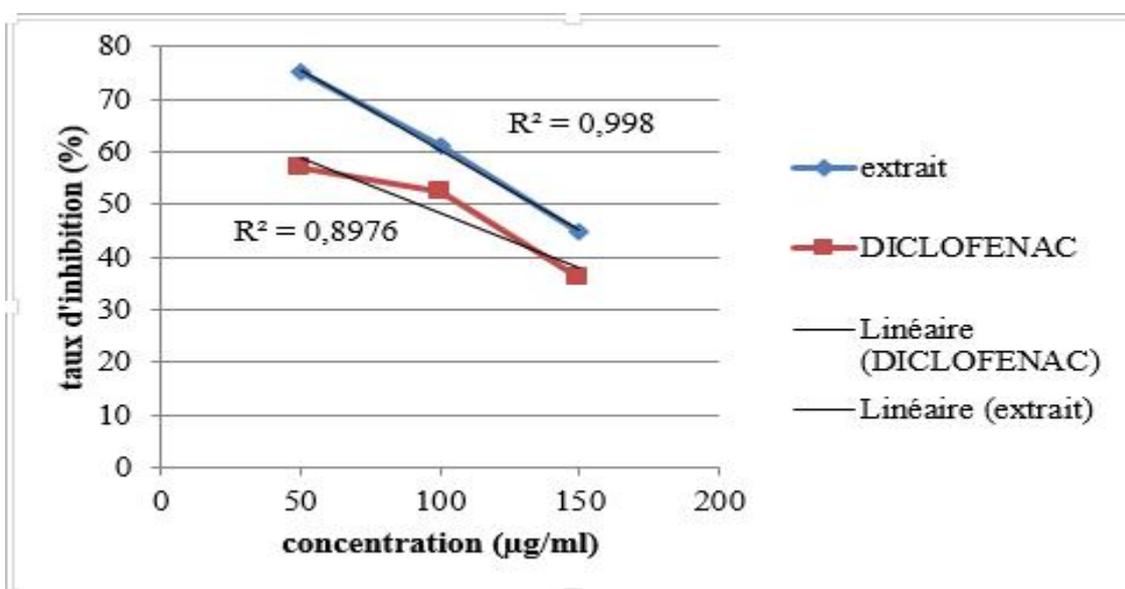


Figure 23 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la BSA en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* et du diclofénac

L'essai de l'inhibition de la dénaturation de la BSA en présence de l'extrait brut de *Withania frutescens* et du diclofénac révèle des résultats intéressants concernant leur capacité à influencer la structure des protéines.

À 50 µg/ml, l'extrait inhibe la dénaturation de la BSA à hauteur de 75,29%, ce qui est un taux d'inhibition élevé. À mesure que la concentration augmente, le taux d'inhibition diminue, passant à 61,17% à 100 µg/ml et à 44,70% à 150 µg/ml. Cette tendance à la baisse suggère une relation complexe dose-dépendante où l'efficacité de l'inhibition diminue avec l'augmentation de la concentration.

Le diclofénac montre également une capacité à inhiber la dénaturation de la BSA, bien que moins efficace que l'extrait de *Withania frutescens* à toutes les concentrations testées. Comme avec l'extrait de *Withania frutescens*, le taux d'inhibition diminue avec l'augmentation de la concentration, de 56,86% à 50 µg/ml à 36,07% à 150 µg/ml.

La dénaturation des protéines est un processus où la structure native d'une protéine est altérée ce qui entrave sa fonction. L'inhibition de la dénaturation peut avoir des implications thérapeutiques, notamment dans le traitement des maladies inflammatoires.

L'extrait de *Withania frutescens* montre une capacité supérieure à inhiber la dénaturation de la BSA par rapport au diclofénac. Cela pourrait indiquer une présence de composés actifs dans l'extrait qui interagissent avec le BSA de manière à préserver sa structure contre le choc thermique. La relation dose-dépendante induit une investigation plus approfondie pour comprendre le mécanisme sous-jacent.

Ces résultats indiquent que l'extrait de *Withania frutescens* a la capacité de stabiliser la structure de l'albumine sérique bovine et de prévenir sa dénaturation, ce qui suggère une activité anti-inflammatoire potentielle. La dénaturation des protéines est souvent associée à des processus inflammatoires, et la capacité de l'extrait à inhiber cette dénaturation peut être liée à sa capacité à moduler les réponses inflammatoires.

En comparant ces résultats avec la littérature scientifique, nous pouvons trouver des similitudes avec d'autres études qui ont évalué l'activité anti-inflammatoire d'extraits de plantes à l'aide du test d'inhibition de la dénaturation protéique. Par exemple, une étude menée par **Joshi et al.** (2018) a évalué l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de *Phyllanthus amarus* en utilisant le même test. Les résultats ont montré une inhibition de la dénaturation de la protéine similaire à celle observée dans notre étude.

L'inhibition de la dénaturation de la BSA par l'extrait de *Withania frutescens* est en accord avec les études antérieures qui ont mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires de cette plante (**Mishra et al.**, 2000). La capacité du diclofénac à inhiber la dénaturation est également cohérente avec son rôle bien connu comme anti-inflammatoire non stéroïdien (**Vane & Botting**, 1998).

La relation dose-dépendante complexe constatée dans cette étude, où l'efficacité de l'inhibition diminue avec l'augmentation de la concentration, est un phénomène qui nécessite une exploration plus approfondie. Des études similaires ont également observé des relations dose-dépendantes non linéaires avec d'autres extraits de plantes (**Chandra et al.**, 2017).

La comparaison avec d'autres plantes médicinales, telles que *Glycyrrhiza glabra*, qui a montré une inhibition similaire de la dénaturation de la BSA (**Siddiqui et al.**, 2006), souligne l'importance de ces résultats. Cela suggère un potentiel thérapeutique pour *Withania frutescens* dans des contextes où l'inhibition de la dénaturation des protéines est préférable.

De plus, une étude menée par **Patel et al.** (2021) sur l'extrait de *Curcuma longa* a également utilisé le test d'inhibition de la dénaturation protéique pour évaluer l'activité anti-inflammatoire. Les résultats ont montré une capacité significative de l'extrait à inhiber la dénaturation de la protéine, ce qui est en corrélation avec nos propres observations.

Cette étude a démontré une capacité significative de l'extrait brut de *Withania frutescens* à inhiber la dénaturation de l'albumine sérique bovine. La comparaison avec le diclofénac et la littérature existante souligne l'importance de ces résultats et suggère des recherches supplémentaires pour explorer le mécanisme sous-jacent et les applications potentielles de *Withania frutescens* dans le traitement des maladies inflammatoires et autres conditions médicales.

5. Activité antioxydante

5.1 DPPH

Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition de DPPH des extraits de *Withania frutescens*

| | |
|--|-------------|
| IC50 de DPPH de <i>Withania frutescens</i> | 83,62 ug/ml |
|--|-------------|

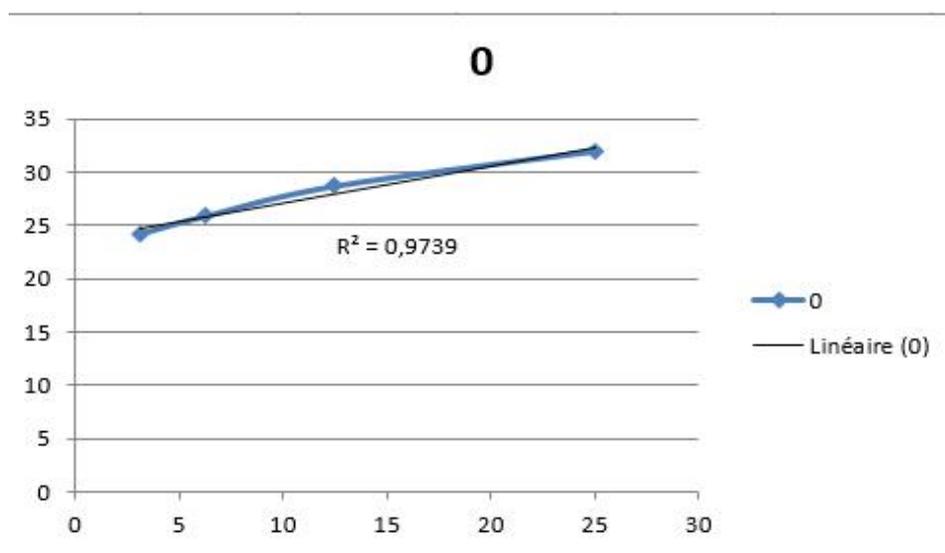


Figure 24: Pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens*

L'essai DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est une méthode courante utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant d'un composé ou d'un extrait. Dans cette étude, l'activité antioxydante de l'extrait de *Withania frutescens* a été obtenue en utilisant l'essai DPPH, et une IC₅₀ de 83,62 µg/ml a été obtenue. L'IC₅₀, ou la concentration inhibitrice à 50 %, est la concentration de l'extrait qui est nécessaire pour réduire l'activité initiale du radical DPPH de 50 %. Plus la valeur de l'IC₅₀ est faible, plus l'extrait est efficace pour neutraliser les radicaux libres, indiquant une forte activité antioxydante.

Dans le cas de l'extrait de *Withania frutescens*, une IC₅₀ de 83,62 µg/ml suggère une activité antioxydante contrôlée. Cette valeur peut être comparée à d'autres substances connues pour leur activité antioxydante, comme le thé vert et le thé noir, qui sont souvent utilisés comme références dans ce type d'étude. L'activité antiradicalaire sur test DPPH de l'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* a montré une IC₅₀ de 25.16 ± 1.21 µg/ml contre l'IC₅₀ de l'acide ascorbique évaluée à 4.82 ± 0.11 µg/ml et cette activité antioxydante a été étroitement corrélée à la présence des acides caféique et homovanillique (**Bentaiba et al., 2023**).

L'activité antioxydante de *Withania frutescens* peut être attribuée à la présence de composés phénoliques, tels que les flavonoïdes et les tanins, qui sont connus pour leur capacité à piéger les radicaux libres (**Kumar & Pandey, 2013**). Cette activité peut avoir des implications

thérapeutiques, notamment dans la prévention et le traitement des maladies associées au stress oxydatif, comme les maladies cardiovasculaires et certains types de cancer (**Phaniendra et al.**, 2015). Selon les travaux de Bentaiba Karima doctorante en voie de soutenance fin 2023, le pouvoir d'inhibition des radicaux libres DPPH de l'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* dont l'IC-50 est de $25.16 \pm 1.21 \mu\text{g/ml}$ était important par rapport à la valeur du contrôle, l'acide ascorbique (une différence de $20 \mu\text{g/ml}$) et faible par rapport à d'autres études. *Withania frutescens* étudiée au Maroc a montré une activité anti-radicalaire plus élevée dans l'extrait de racines (IC-50 = $0,36 \mu\text{g/ml}$), cette valeur est plus proche du contrôle utilisé, le BHT (IC-50 = $0.12 \mu\text{g/ml}$) (une différence de $0,20 \mu\text{g/ml}$) (**EI Moussaoui et al.** 2019). La variété marocaine est donc meilleure en terme de potentiel antioxydant que l'espèce algérienne. Cette variation des valeurs IC-50 dépend de la méthode DPPH et du contrôle utilisé ; le BHT a une valeur IC-50 trois fois inférieure à celle de l'acide ascorbique (**Boulebd,** 2019). Alors que **EL Bouzidi et al.** (2011) ont trouvé une activité antiradicalaire sur DPPH proche de la nôtre dans l'extrait méthanolique.

L'essai au DPPH a révélé une activité antioxydante notable de l'extrait de *Withania frutescens*,

5.2 Test de FRAP

La capacité antioxydante a été déterminée à partir d'IC50 mesurée en fonction des concentrations ; ces IC50 sont déterminées à partir des graphes (Figure 25). Plus les valeurs IC50 sont faibles plus l'activité de l'extrait est grande.

Les résultats du pouvoir réducteur du fer des fractions phénoliques sont représentés dans la figure 24 et le tableau 12 ci-dessous :

Tableau 12 : IC50 du test de FRAP de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens*

| | |
|---|------------|
| IC50 du test FRAP de <i>Withania frutescens</i> | 3,011ug/ml |
|---|------------|

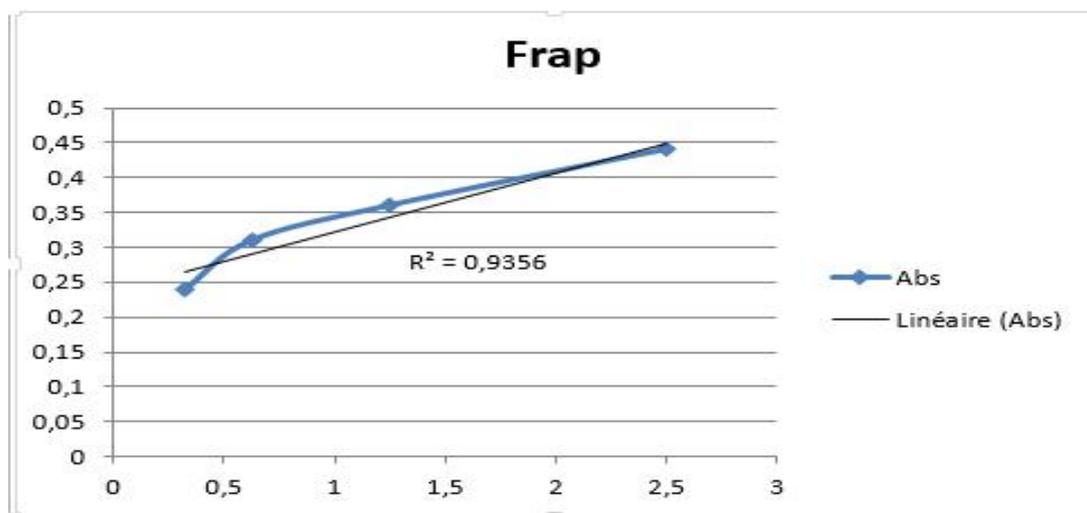


Figure 25: IC50 du test de FRAP de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens*

Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est une méthode couramment utilisée pour évaluer la capacité antioxydante d'un échantillon en mesurant son pouvoir réducteur du fer. Dans cette étude, l'IC50 de FRAP pour l'extrait de *Withania frutescens* a été déterminée à 3,011 µg/ml.

L'IC50, dans ce contexte, représente la concentration de l'extrait qui est nécessaire pour réduire de 50% le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺). Une valeur IC50 plus faible indique une plus grande capacité antioxydante, car elle signifie qu'une concentration plus faible de l'extrait est nécessaire pour atteindre le même effet réducteur.

Une IC50 de 3,011 µg/ml pour l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* indique une activité antioxydante très élevée. Cette valeur est nettement plus faible que l'IC50 obtenue dans l'essai DPPH, ce qui suggère que l'extrait peut avoir une capacité particulièrement élevée à réduire le fer ferrique. L'extrait éthanolique des racines de cette espèce étudiée récemment a manifesté une IC50 de 163.19 ± 6.01 µg/ml avec le test FRAP (**Bentaiba et al., 2023**).

Cette forte activité réductrice peut être attribuée à la présence de composés phénoliques dans l'extrait, tels que les flavonoïdes et les tanins, qui sont connus pour leur capacité à réduire les ions métalliques et à neutraliser les radicaux libres (**Benzie & Strain, 1996**).

La capacité antioxydante mesurée par le test FRAP peut avoir des implications importantes pour la santé, car les antioxydants jouent un rôle clé dans la protection des cellules contre les

dommages oxydatifs. Cela peut être pertinent dans le contexte de maladies liées au stress oxydatif, telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et certains cancers (Halliwell, 1996).

Le test FRAP a révélé une capacité antioxydante significative de l'extrait de *Withania frutescens*, soulignant son potentiel en tant que source d'antioxydants naturels. Des études supplémentaires pourraient explorer les composés spécifiques responsables de cette activité et évaluer leur applicabilité dans des contextes thérapeutiques et nutritionnels

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Conclusion et perspectives

Cette étude a exploré en profondeur les propriétés phytochimiques et biologiques de l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens*, révélant une composition riche en composés bioactifs tels que les polyphénols, les tanins, les flavonoïdes et les alcaloïdes. Les tests *in vitro* ont mis en évidence des activités anti-inflammatoires et antioxydantes notables.

Au terme de ce travail de recherche, nous avons pu explorer les propriétés phytochimiques et les activités biologiques de *Withania frutescens*, une plante médicinale indigène des régions arides et semi-arides. Nos résultats ont révélé la présence de divers composés bioactifs, notamment des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins. Ces composés ont été associés à des activités antioxydantes confirmant ainsi le potentiel thérapeutique de cette plante.

Notre étude a également démontré que l'extrait éthanolique des feuilles de *Withania frutescens* possède une activité anti-inflammatoire significative, comme en témoignent les tests de dénaturation des protéines et de la stabilisation de la membrane érythrocytaire. En effet, l'extrait a montré une capacité à protéger les érythrocytes contre l'hémolyse induite par le stress thermique et osmotique, ce qui pourrait avoir des implications importantes pour le traitement de diverses maladies liées à l'inflammation et au stress oxydatif.

Ce mémoire a contribué à enrichir la connaissance scientifique sur *Withania frutescens*, une plante qui pourrait avoir un impact significatif dans les domaines de la phytothérapie, de la pharmacologie et de la nutrition. Les résultats obtenus soulignent l'importance de poursuivre les recherches dans ce domaine, avec un potentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et nutritionnelles basées sur cette plante. La recherche menée ici sert de fondement solide pour de futures explorations et innovations dans ces domaines.

En conclusion, notre travail a contribué à enrichir les connaissances sur *Withania frutescens* et a mis en évidence son potentiel en tant que source de nouveaux médicaments naturels. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour isoler et caractériser les composés bioactifs spécifiques responsables de ces activités, et pour évaluer leur efficacité et leur sécurité dans des modèles précliniques et cliniques et *in vivo* sur des modèles animaux. Nous espérons que notre travail servira de base pour de futures études et contribuera à la valorisation de la médecine traditionnelle pour le bien-être de l'humanité.

La Liste de Références

- Agarwal R, Diwanay S, Patki P, Patwardhan B. (1999). Studies on immunomodulatory activity of *Withania somnifera* (Ashwagandha) extracts in experimental immune inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(1): 27-35.
- Alagesan, V., Venugopal, S. 2019. Green Synthesis of Selenium Nanoparticle Using Leaves Extract of *Withania somnifera* and Its Biological Applications and Photocatalytic Activities. *BioNanoSci.* 9, 105–116.
- Alam N., Hossain M., Khalil M.I., Moniruzzaman M., Sulaiman S.A., Gan S.H. 2011. High catechin concentrations detected in *Withania somnifera* (ashwagandha) by high performance liquid chromatography analysis. *BMC Complement. Altern. Med.* 2011, 11: 65. doi: 10.1186/1472-6882-11-65.
- Annick, A.A. (2018). Evaluation des activités anti - inflammatoire et anti - oxydante de l'extrait hydro - éthanolique de l'écorce de racines de *Dichrostachys cinerea* L. Wight et Arn. (Fabaceae). Thèse de Doctorat. UFR sciences pharmaceutiques et biologiques. Cote d'ivoire.
- Azhar M.F., Naseer U., Aziz A., Zafar S., Qadir I., Farooq M., Ahmad I., Anjum K. 2020. Antioxidant and phytochemical composition of leaves, stem and root extracts of *Withania coagulans* and *Withania somnifera*. *Zeitschrift Arznei-Gewurzpflanzen.* 2020; 25:27–30.
- Bentaiba K, Belhocine M, Chougrani F, Bououdina M, Mostari A, Fernini M, Bouzouina M. 2023. Effectiveness of *Withania frutescens* root extract on testicular damage induced by lead acetate in adult albino rats. *Reprod Toxicol.* 115:102-110. doi: 10.1016/j.reprotox.2022.12.006.
- Belkheiri N. (2010). Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse III- Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Bendif H. 2017. Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques lamiaceae: *ajuga iva* (l.) schreb., *teucrium polium* l., *thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (boiss. & reut.) greuter & burdet et *rosmarinus eriocalyx* jord & fourr. Thèse de doctorat, Ecole normale supérieure de kouba-Alger, 154 p.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

La Liste de Références

- Bereksi, M. S., Hassaïne, H., Bekhechi, C., & Abdelouahid, D. E. (2018). Evaluation of Antibacterial Activity of some Medicinal Plants Extracts Commonly Used in Algerian Traditional Medicine against some Pathogenic Bacteria. *Pharmacogn J*, 10(3), 507–512.
- Bettger W.J. (1993). Zinc and selenium, site-specific versus general antioxidation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 71(9), 721-724.
- Bhattacharya A, Muruganandam AV. (2003). Adaptogenic activity of *Withania somnifera* : an experimental study using a rat model of chronic stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3): 547-55.
- Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. (2016). Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35: 107-15.
- Boulebd, H. (2019). Comparative study of the radical scavenging behavior of ascorbic acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and theoretical study. *Journal of Molecular Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127210>
- Bourkhiss, M. B., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., & Satrani, B. (2010). Propriétés antioxydantes et anti - inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la Société royale des sciences de Liège* . 79, 141 – 154.
- Busse R et Fleming I. (2006). Vascular endothelium and blood flow. *Handbook of Experimental Pharmacology*. No 176. pp 43–78
- Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P. et Bhattacharya, S. (2017). Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'ashwagandha : une étude préliminaire in vitro. *Journal de pharmacognosie*, 9(1), 53-56.
- Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(1), 14-16.
- Chandrasekhar K, Kapoor J, Anishetty S. (2012). A prospective, randomized double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy of a high-concentration full-spectrum extract

La Liste de Références

of ashwagandha root in reducing stress and anxiety in adults. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 34(3): 255.

Chandrasekhar K, Kapoor J, Anishetty S. (2012). A prospective, randomized double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy of a high-concentration full-spectrum extract of ashwagandha root in reducing stress and anxiety in adults. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 34(3): 255.

Chatterjee, A., Pakrashi, S. C., & Nandy, A. K. (2013). Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. *Pharmaceutical Biology*, 51(12), 1515-1520.

Chen LX, He H, Qiu F. 2011. Natural withanolides: an overview. *Nat Prod Rep*. 2011, 28(4):705-40. doi: 10.1039/c0np00045k.

Chen, L., et al. (2014). Détermination des flavonoïdes dans *Camellia sinensis* et ses extraits par HPLC. *Journal des sciences et technologies alimentaires*, 51(9), 2216-2221.

Chevalier, X.; Flipo, R. ; Goupille, P. and Schaefferbeke, T. (2005). Précis de rhumatologie. COFER, Elsevier Masson, p: 340 -345.

Chirumamilla, P., Taduri, S. 2023. Assessment of in vitro anti-inflammatory, antioxidant and antidiabetic activities of *Solanum khasianum* Clarke. *Vegetos* 36, 575–582 (2023).

Chung, KT, et al. (2011). Tanins et santé humaine : un examen. *Revue critique en science alimentaire et nutrition*, 37(6), 573-581.

Dar NJ, Hamid A, Ahmad M. (2015). Pharmacologic overview of *Withania somnifera*, the Indian Ginseng. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(23): 4445-60.

Dar NJ, Hamid A, Ahmad M. (2015). Pharmacologic overview of *Withania somnifera*, the Indian Ginseng. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(23): 4445-60.

Dar NJ, Hamid A, Ahmad M. (2015). Pharmacologic overview of *Withania somnifera*, the Indian Ginseng. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(23): 4445-60.

Dhanani T., Shah S., Gajbhiye N.A., Kumar S. 2017. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arab. J. Chem*. 2017;10:S1193–S1199. doi: 10.1016/j.arabjc.2013.02.015.

Dupic L., Huet O., Harrois A. et Duranteau J. (2010). Hypoxie et fonction mitochondriale. *Réanimation*, 19(5), 399-405.

La Liste de Références

El Bouzidi L, Larhsini M, Markouk M, Abbad A, Hassani L, Bekkouche K. 2011. Antioxidant and antimicrobial activities of *Withania frutescens*. *Nat Prod Commun.* 6(10):1447-50.

El Bouzidi L, Mahiou-Leddet V, Bun SS, Larhsini M, Abbad A, Markouk M, Fathi M, Boudon M, Ollivier E, Bekkouche K. 2013. Cytotoxic withanolides from the leaves of Moroccan *Withania frutescens*. *Pharm Biol.* 2013, 51(8):1040-6. doi: 10.3109/13880209.2013.775162.

EL Moussaoui, A., Zahra, J. F., Bousta Dalila, & Bari Amina. (2019). Phytochemical Characterization and Antioxidant Activity of the Northern Moroccan Species: *Withania frutescens* L. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12(6), 10–13.

EL Moussaoui, Abdelfattah, Jawhari, Fatima Zahra, Bourhia, Mohammed, Maliki, Imane, Sounni, Fatiha, Mothana, Ramzi A., Bousta, Dalila and Bari, Amina. 2020. "*Withania frutescens*: Chemical characterization, analgesic, anti-inflammatory, and healing activities" *Open Chemistry*, vol. 18, no. 1, 2020, pp. 927-935.

El Moussaoui A, Mechchate H, Bourhia M, Es-safi I, Salamatullah AM, Alkaltham MS, Alyahya HK, Bousta D, Bari A. 2021a. Glycemic Control Potential of Chemically Characterized Extract from *Withania frutescens* L. Roots in Severe Diabetes-Induced Mice. *Applied Sciences*. 2021; 11(9):3998. <https://doi.org/10.3390/app11093998>

EL Moussaoui, A., Bourhia, M., Jawhari, F. Z., Khalis, H., Chedadi, M., Agour, A., Salamatullah, A. M., Alzahrani, A., Alyahya, H. K., Alotaibi, A., Bousta, D., & Bari, A. (2021). Responses of *Withania frutescens* (L.) Pauquy (Solanaceae) Growing in the Mediterranean Area to Changes in the Environmental Conditions: An Approach of Adaptation. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9(August), 1–13.

El-Rhaffari L, Zaid A. (2002). Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée renouvelée. In *Ethnopharmacologia* (pp. 295-318). France: Société Française d'Ethnopharmacologie.

Ganguly B, Kumar N, Ahmad AH, Rastogi SK. 2018. Influence of phytochemical composition on *in vitro* antioxidant and reducing activities of Indian ginseng [*Withania*

La Liste de Références

- somnifera* (L.) Dunal] root extracts. *J Ginseng Res.* 2018, 42(4):463-469. doi: 10.1016/j.jgr.2017.05.002.
- Gogoi, Roktim, Neelav Sarma, Sudin Kumar Pandey and Mohan Lal. 2021. "Phytochemical constituents and pharmacological potential of *Solanum khasianum* C.B. Clarke., extracts: Special emphasis on its skin whitening, anti-diabetic, acetylcholinesterase and genotoxic activities." *Town Planning Review* 5 (2021): 47-61.
- Guillouty A. (2016). Plantes médicinales et antioxydants. Thèse de Doctorat. Université Toulouse III- Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Gungormez, E. (2015). Évaluation de la prescription des anti - inflammatoires non stéroïdiens chez le sujet âgé. Thèse de doctorat en médecine . Université paris Diderot . 26
- Gupta GL, Kataria M. (2013). A critical review on pharmaceutically active plant of ashwagandha (*Withania somnifera*). *Journal of Phytopharmacology*, 2(1): 1-7.
- Gupta, R., et al. (2010). Insuffisance rénale subaiguë induite par le diclofénac dans un modèle de rat : électrophorèse sur gel 2D et étude MALDI-TOF/TOF. Applications cliniques de protéomique, 4(4), 416-428.
- Gutteridge, JM, & Smith, A. (1988). Protection antioxydante par l'hémopexine de la peroxydation lipidique stimulée par l'hème. *Journal biochimique*, 256(3), 861-865.
- Hadj Salem J. (2009). Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine, Nancy, France.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C. et Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62 (10), 628- 638.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition*, 16(1), 33-50.
- Heymonet, C. (2013). Les plantes à visée anti - inflammatoire utilisées en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie . Université de Lorraine. France. 36 - 37
- Hwang, SL, et al. (2012). Caractérisation des flavonoïdes dans la phytothérapie traditionnelle taïwanaise « Huang-Qin » par chromatographie liquide-spectrométrie de masse. *Journal d'analyse des aliments et des médicaments*, 20(3), 664-669.

La Liste de Références

Kaileh M, Vanden Berghe W, Heyerick A, Horion J, Piette J, Libert C, De Keukeleire D, Essawi T, Haegeman G. (2007). Withaferin a strongly elicits I κ B kinase beta hyperphosphorylation concomitant with potent inhibition of its kinase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7): 4253-64.

Kulkarni SK, Dhir A. (2008). *Withania somnifera*: an Indian ginseng. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 32(5): 1093-1105.

Kumar A, Kumar A. (2008). Possible neuroprotective effect of *Withania somnifera* root extract against 3-nitropropionic acid-induced behavioral, biochemical, and mitochondrial dysfunction in an animal model of Huntington's disease. *Journal of Medicinal Food*, 11(2): 386-96.

Kumar S, Seal CJ, Howes MJ, Kite GC, Okello EJ. (2015). In vitro protective effects of *Withania somnifera* (L.) Dunal root extract against hydrogen peroxide and β -amyloid(1–42)-induced cytotoxicity in differentiated PC12 cells. *Phytotherapy Research*, 29(10): 1562-8.

Kumar, P., Yadav, B., Yadav, A., Yadav, J. P., & Yadav, J. P. (2022). Phytochemical Screening, GCMS Profile, and In-silico properties of Bioactive Compounds in Methanolic Leaf Extracts of *Moringa oleifera*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 12(2), 53-59.

Kumar, S., & Kumar, D. (2017). Studies on Phytochemical Screening, Tannins Content and Antibacterial Activity from Leaf and Callus Extracts of *Memecylon umbellatum*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(5), 361-364.

Kumar, S., & Pandey, AK (2013). Chimie et activités biologiques des flavonoïdes : un aperçu. *Le Journal du monde scientifique*, 2013.

Kumar, V., Van Staden, J. (2012). Inhibition of NO₂, PGE₂, TNF- α , and iNOS Expression by *Shorea robusta* L.: An Ethnomedicine Used for Anti-Inflammatory and Analgesic Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, Article ID 254849.

Kumar S, Mathew SO, Aharwal RP, Tulli HS, Mohan CD, Sethi G, Ahn KS, Webber K, Sandhu SS, Bishayee A. 2023. Withaferin A: A Pleiotropic Anticancer Agent from the Indian Medicinal Plant *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023, 16(2):160. doi: 10.3390/ph16020160.

La Liste de Références

- Leouifoudi, I., Harnafi, H., & Zyad, A. (2015). Olive Mill Waste Extracts: Polyphenols Content, Antioxidant, and Antimicrobial Activities.
- Lüllmann, H., Mohr, K., & Hein, L. (1996) . Atlas de poche de pharmacologie. 2ème édition Lavoisier - Médecine sciences. 70 - 77.
- Mechchate H, Es-safi I, Louba A, Alqahtani AS, Nasr FA, Noman OM, Farooq M, Alharbi MS, Alqahtani A, Bari A, et al. 2021. In Vitro Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity and In Vivo Antidiabetic Activity of *Withania frutescens* L. Foliar Extract. *Molecules*. 2021; 26(2):293. <https://doi.org/10.3390/molecules26020293>.
- Meddour A., Yahia M., Benkiki1 N., Ayachi A. 2011. Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparidées *Withania frutescens* L. Lebanese Science Journal 14(1):49-60.
- Mekenza, N et Medjmedj, O. (2018). Évaluation de l'activité anti - inflammatoire de l'extrait brut de la graisse de la Bosse de Camelus dromedarius sur un modèle murin d'inflammation aiguë. Mémoire de Master en biologie spécialité : Immunologie et Oncologie . Université Frères Mentouri. Constantine . 17.
- Miłek, M., Marcinčáková, D., & Legáth, J. (2019). Polyphenols Content, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Assessment of *Taraxacum officinale* Extracts Prepared through the Micelle-Mediated Extraction Method.
- Mirjalili MH, Moyano E, Bonfill M, Cusido RM, Palazón J. (2009). Steroidal lactones from *Withania somnifera*
- Mirjalili MH, Moyano E, Bonfill M, Cusido RM, Palazón J. (2009). Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an ancient plant for novel medicine. *Molecules*, 14(7): 2373-93.
- Mirjalili MH, Moyano E, Bonfill M, Cusido RM, Palazón J. (2009). Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an ancient plant for novel medicine. *Molecules*, 14(7): 2373-93.
- Mirjalili MH, Moyano E, Bonfill M, Cusido RM, Palazón J. (2009). Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an ancient plant for novel medicine. *Molecules*, 14(7): 2373-93.
- Mirjalili, M. H., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R. M., & Palazón, J. (2009). Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an ancient plant for novel medicine. *Molecules*, 14(7), 2373-2393.

La Liste de Références

Mishra LC, Singh BB, Dagenais S. (2000). Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review. *Alternative Medicine Review*, 5(4): 334-46.

Mishra LC, Singh BB, Dagenais S. (2000). Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review. *Alternative Medicine Review*, 5(4): 334-46.

Mishra LC, Singh BB, Dagenais S. (2000). Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review. *Alternative Medicine Review*, 5(4): 334-46.

Mishra, LC, Singh, BB et Dagenais, S. (2000). Base scientifique de l'utilisation thérapeutique de *Withania somnifera* (ashwagandha): une revue. *Revue de médecine alternative*, 5(4), 334-346.

Mishra, LC, Singh, BB et Dagenais, S. (2000). Base scientifique de l'utilisation thérapeutique de *Withania somnifera* (ashwagandha): une revue. *Revue de médecine alternative*, 5(4), 334-346.

Mohammedi Z. 2013. Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud-ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat, Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique, 169p.

Munir N, Mahmood Z, Shahid M, Afzal MN, Jahangir M, Ali Shah SM, Tahir IM, Riaz M, Hussain S, Akram M, Yousaf F. 2022. *Withania somnifera* Chemical Constituents' In Vitro Antioxidant Potential and Their Response on Spermatozoa Parameters. Dose Response. 20(1):15593258221074936. doi: 10.1177/15593258221074936.

Muster, D. (2005). Médicaments de l'inflammation. Edition Elsevier Paris . 21 - 29.

Muster, D. (2005) . Médicaments de l'inflammation. Edition Elsevier Paris . 21 - 29.

Neant, R. (2017). Effets indésirables des anti - inflammatoires non stéroïdiens et automédication : quel est l'impact dans le temps d'un outil d'information écrite sur les connaissances des patients ? Thèse de doctorat en Médecine . Université de Bourgogne. 20.

Njoroge, J., Njuguna, A., Muriithi, G., & Njagi, E. (2021). Green Synthesis and Characterization of ZnO Nanoparticles Using *Pelargonium odoratissimum* (L.) Aqueous Leaf Extract and Their Antioxidant, Antibacterial and Anti-inflammatory Activities. *Antioxidants*, 11(8), 1444.

La Liste de Références

- Noack, M. et Kolopp - Sarda, M. N. (2018). Cytokines et inflammation: physiologie , physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2018 :499, 28 - 37.
- Obese E, Ameyaw E.O, Biney R.P, Henneh I.T, Edzeamey F.J, Woode E. 2018. Phytochemical Screening and Anti-Inflammatory Properties of the Hydroethanolic Leaf Extract of *Calotropis procera* (Ait). R. Br. (Apocynaceae). *Journal of Pharmaceutical Research International*, 23(1): 1-11, 2018; Article no.JPRI.42529.
- Oyebode, O. T., Oyeyemi, I. T., & Afolabi, O. B. (2019). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Justicia secunda* Vahl leaf extract using in vitro and in vivo inflammation models. *Clinical Phytoscience*, 5(1), 1-8.
- Panche, AN, Diwan, AD et Chandra, SR (2016). Flavonoïdes : un aperçu. *Journal des sciences nutritionnelles*, 5, e47.
- Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des Laboratoires*, 276: 87- 92.
- Pham, T. N. H., Nguyen, T. H., Nguyen, T. T. H., Le, T. H., & Nguyen, M. T. T. (2021). Phytochemical Screening and Evaluation of Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity against *Xanthomonas axonopodis* of *Euphorbia tirucalli* Extracts in Binh Thuan Province, Vietnam. *Molecules*, 26(4), 941.
- Phaniendra, A., Jestadi, DB et Periyasamy, L. (2015). Radicaux libres : propriétés, sources, cibles et leur implication dans diverses maladies. *Journal indien de biochimie clinique*, 30(1), 11-26.
- Pizzi, A. (1980). Tanins : perspectives et applications industrielles actuelles. *Biomolécules*, 9(8), 344.
- Pizzi A. 2019. Tannins: Prospectives and Actual Industrial Applications. *Biomolécules*. 2019 9(8):344. doi: 10.3390/biom9080344.
- Prasad AS. (2013). Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Advances in Nutrition*, 4(2): 176-90.

La Liste de Références

- Raghavendra, G. M., Varaprasad, K., et Jayaramudu, T. (2015). Biomaterials : design, development and biomedical applications. In Nanotechnology applications for tissue engineering William Andrew Publishing. 21 - 44
- Rousselet, M. C.; Vignaud, J. M.; Hofman P. and Chatelet, F. P. (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire, (Chapitre 3). Copyright AFECAP, 1-75.
- Sharma, V., et al. (2017). Saponines : propriétés, applications et traitement. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(10), 2175-2190.
- Shrestha, B., Dhillon, S. S., & Pal, P. (2021). Qualitative and Quantitative Phytochemical Screening of *Azadirachta indica* Juss. Plant Parts. International Journal of Applied Sciences and Biotechnology, 9(2), 134-141.
- Siddiqui, BS, Aslam, H., Ali, ST, Khan, S. et Begum, S. (2006). Constituants chimiques de l'écorce de tige de *Buxus papillosa*. Journal des produits naturels, 69(6), 945-949.
- Siddiqui, BS, Aslam, H., Ali, ST, Khan, S. et Begum, S. (2006). Constituants chimiques de l'écorce de tige de *Buxus papillosa*. Journal des produits naturels, 69(6), 945-949.
- Sivry, P. (2014). Anti - Inflammatoires Non Stéroïdiens consommés en automédication : évaluation du niveau de connaissance de 334 patients de cabinets de médecine générale des Alpes - Maritimes. Thèse de doctorat en médecine. Université de Nice - Sophia Antipolis. France .16.
- Stocker R. et Keaney Jr J.F. (2004). Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. Physiological Reviews, 84(4), 1381-1478.
- Taïba, I., Boumahrat, M., Boulifa, A. (2017). Evaluation de l'activité anti inflammatoire, analgésique, antioxydante et antipyrétique de la plante médicinale Algérienne *Sa lvia Officinalis*.L. Mémoire de M aster en Biologie spécialité : Toxicologie. Université Frères Mentourie. Constantine. 2 - 14.
- Trabsa, H. (2015). A ctivité antioxydantes et anti - inflammatoire des fractions des plantes :*Sedum sediforme* et *Lycium arabicum* .Thèse de doctorat en sciences Spécialité : Biochimie . Université ferhet abbas sétif 1. 19.

La Liste de Références

- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico- Biological Interactions*, 160 (1), 1-40.
- Vane, JR, & Botting, RM (1998). Mécanisme d'action des anti-inflammatoires. *Journal scandinave de rhumatologie*, 27(sup107), 9-21.
- Vane, JR, & Botting, RM (1998). Mécanisme d'action des anti-inflammatoires. *Journal scandinave de rhumatologie*, 27(sup107), 9-21.
- Vertuani S., Angusti A. et Manfredini S. (2004). The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1677-1694.
- Villanueva X, Zhen L, Ares JN, Vackier T, Lange H, Crestini C, Steenackers HP. 2023. Effect of chemical modifications of tannins on their antimicrobial and antibiofilm effect against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Front Microbiol*. 13:987164. doi: 10.3389/fmicb.2022.987164.
- Weathers, PJ, et al. (2001). Les effets biologiques de l'artémisinine et de ses dérivés. Dans *Artemisia* (pp. 155-170). Presse CRC.
- Weill B. and Batteux F. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck. France. 312p.
- Weill B. and Batteux F. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck. France. 312p.
- Widsten P, Salo S, Niemelä K, Helin H, Salonen M, Alakomi HL. 2023. Tannin-Based Microbicidal Coatings for Hospital Privacy Curtains. *J Funct Biomater*. 14(4):187. doi: 10.3390/jfb14040187.
- WHO (World Health Organization) (2019). WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf
- Wongrakpanich, S., Wongrakpanich, A., Melhado, K., et Rangaswami, J. (2018). A comprehensive review of non - steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. *Aging and disease*, 9:1, 143.

La Liste de Références

Yadav A.K and Rai D.C. 2018. In vitro screening of Ashwagandha root extracts for the maximum functional components. *The Pharma Innovation Journal* 2018; 7(2): 12-16.

Yang, Y. I.; Shin, H. C.; Kim, S. H.; Park, W. Y.; Lee, K. T. and Choi, J. H. (2012). 6, 6'-Bieckol, isolated from marine alga *Ecklonia cava*, suppressed LPS-induced nitric oxide and PGE2 production and inflammatory cytokine expression in macrophages: The inhibition of NFκB. *International immunopharmacology*, 12(3): 510-517.

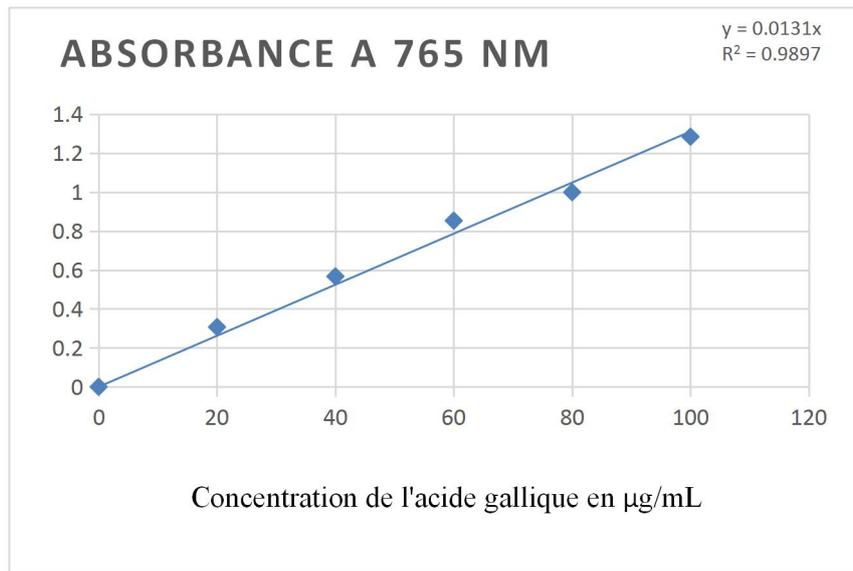
Yougbaré - Ziébrou, M. N., Ouédraogo, N., Lompo, M., Bationo, H., Yaro, B., Gnoula, C., ... et Guissou, I. P. (2016). Activités anti - inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 1 :4, 213 - 219.

Zbadi R., Mohti H. et Moussaoui F. (2018). Stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. *Médecine translationnelle*, 24(2), 134-141.

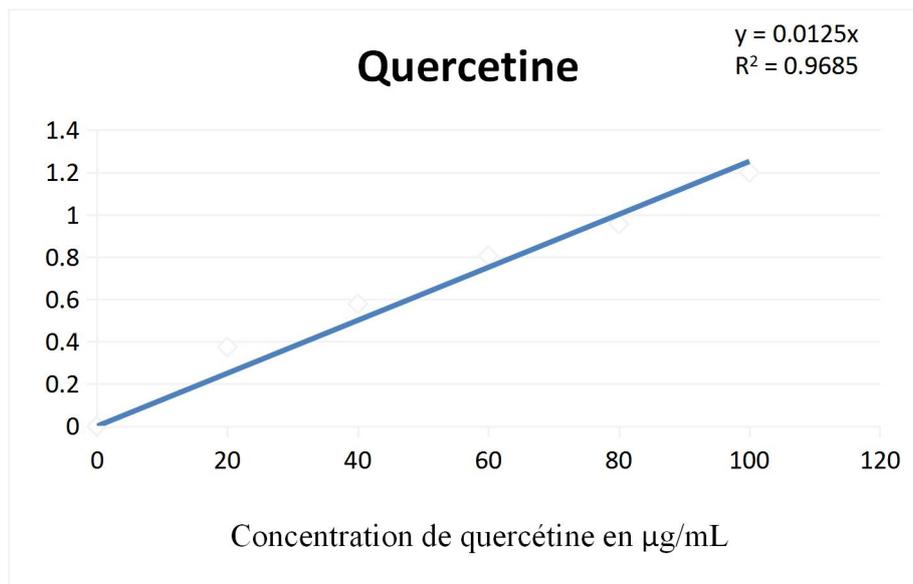
Zimmermann MB, Hurrell RF. (2007). Nutritional iron deficiency. *The Lancet*, 370(9586): 511-20.

Annexe

Annexe 1 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

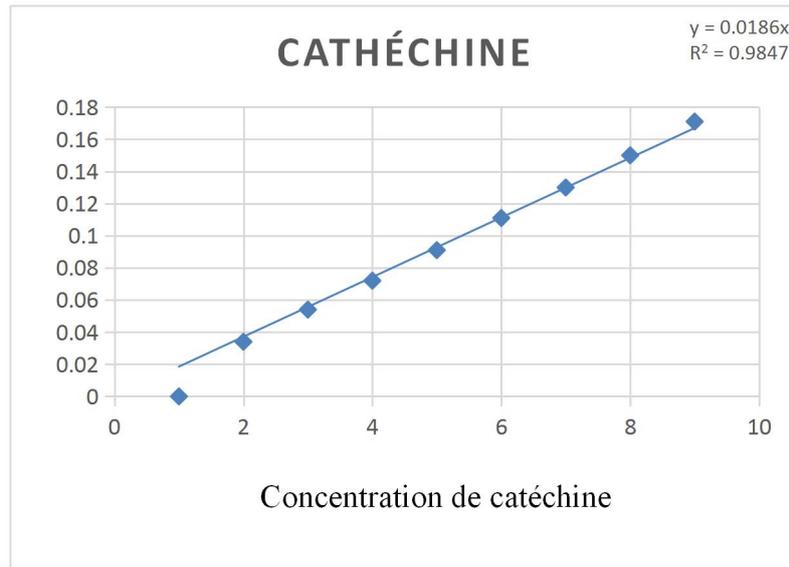


Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

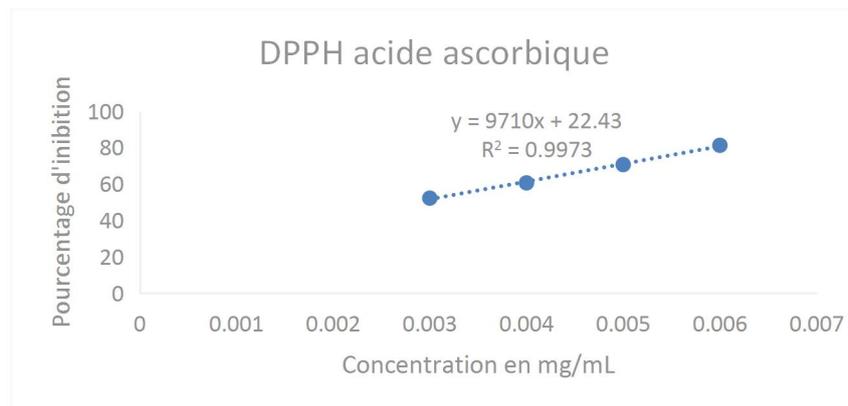


Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de la catéchine

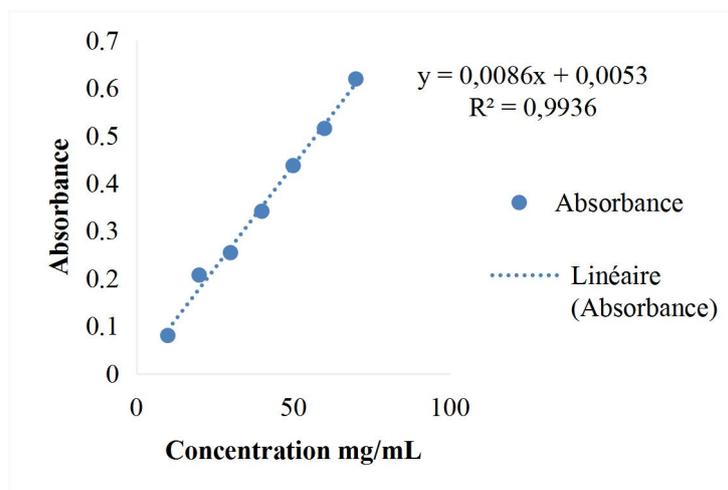
Annexe



Annexe 4 : Courbe de référence de la vitamine C du test de DPPH.



Annexe 5 : Courbe de référence de l'acide ascorbique du test de FRAP



Annexe

Annexe 06 : Méthode de préparation des réactifs pour tests phytochimiques

Réactif de Mayer

Solution A : 1,358 g de chlorure de mercure $HgCl_2$ sont dissous dans 60 ml d'eau distillé.

Solution B : 5 g d'iode de potassium KI sont dissous dans 10 ml d'eau distillé ; les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100 ml avec l'eau distillé.

Réactif de Wagner 2 g de KI et 1,27 g de I sont dissous dans 75 ml d'eau distillée, puis ajusté à 100 ml avec l'eau distillé.

Liqueur de Fehling

Solution A : solution sulfate de cuivre à 40 g/l.

Solution B : 200 g de tartrate de potassium-sodium et 150 g de NaOH pour 1 litre d'eau distillé. Mélanger les deux solutions à volumes égaux (à mélanger juste avant l'emploi).

Annexe 07 : Collecte et préparation de la suspension d'érythrocytes

Du sang total frais (3 ml) a été prélevé par voie intraveineuse à partir d'un volontaire sain qui n'avait pas pris d'AINS pendant deux semaines avant l'expérience. L'échantillon de sang a été recueillis dans un vacutainer hépariné pour empêcher la coagulation. Les culots globulaires ont été obtenus en lavant l'échantillon de sang prélevé trois fois avec une solution saline à 0,9 % et centrifugé 10 min à 3000 tours/minute. Une solution mère de suspension à 10 % v/v de sang rouge humain (HRBCs=human red blood cells) a été préparée à l'aide d'un tampon phosphate isotonique (NaCl 154 mM) dans un tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7,4).

Annexe 08 : Préparation de tampon phosphate salin (PBS)

Une solution tampon a été préparée en utilisant 800 g de NaCl, 20 g de KCl, 144 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ et 24 g de K_2HPO_4 dans 8 L d'eau distillée.

Annexe 09 : Préparation de la solution isotonique (solution saline, 0,9 % NaCl)

La solution saline a été préparée en dissolvant 9 g de NaCl dans 700 ml d'eau distillée dans un récipient propre. L'eau a été ajoutée pour compléter le volume à 1000 ml pour obtenir 0,9% de NaCl