جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
ⵜⴰⵙⴷⴰⵡⵉⵜ ⵙⵉⴷⵉ ⵎⵓⵃⵎⵎⴰⴷ ⴱⵏ ⵄⴱⴷⵍⵍⴰⵀ ⵏ ⴼⴰⵙ
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم ظهر المهراز فاس
ⵜⴰⵖⵉⵡⴰⵍⵜ ⵏ ⵜⵎⵙⵙⵓⵏⵜ ⴹⵀⴰⵕ ⵍⵎⵀⵔⴰⵣ ⴼⴰⵙ
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MAHRAZ FES

**N° d'ordre : 28/2023**

**Centre des Etudes : *Sciences et Techniques et Sciences Médicales***

**Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable (RN2D)**

**Discipline : Biologie**
**Spécialité : Biologie végétale et chimie médicinale**
**Laboratoire : Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agro-Alimentaire et Santé (*LBEAS*)**

# THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par :

**EL MOUSSAOUI Abdelfattah**

# Etude de la variabilité morpho-écologique, phytochimique et activités biologiques et pharmacologiques de *Withania frutescens* (L.) Pauquy

Soutenue le 21/03/2023 devant le jury :

| | | | |
|---|---|---|---|
| Pr. BOUSTA Dalila | PES | Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès | Président |
| Pr. BARI Amina | PES | Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès | Directeur de thèse |
| Pr. ZAIR Touriya | PES | Faculté des Sciences–Meknès | Rapporteur |
| Pr. ALLALI Mustapha | PH | Institut Supérieur des Professions Infirmières et Techniques de Santé, Fès | Rapporteur |
| Pr.DERWICH Elhoussine | PES | Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès | Rapporteur |
| Pr. GUEMMOUH Rajae | PES | Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès | Examinateur |
| Pr. BENDRISS AMRAOUI Mohammed | PES | Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès | Examinateur |

**Année Universitaire : 2022-2023**

## COMMUNICATIONS DANS DES MANIFESTATIONS INTERNATIONALES ET NATIONALES

- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima Zahra Jawhari, Dalila Bousta, Amina Bari. Valorization of phytochemical compounds and antioxidant activity of *Withania frutescens* extract. Colloque International VAHVISTUS-BIO à la Faculté des Sciences Dhar el Mahraz-Fès. 15 et 16 Avril 2019.
- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima Zahra Jawhari, Dalila Bousta, Amina Bari. Évaluation biologique des composés phytochimiques des extraits bruts d'une plante du nord marocain. VIIème congrès international de biotechnologie et valorisation des bioressources, organisé par l'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2019 à Tabarka- Tunisie.
- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima Zahra Jawhari, Abdelkrim Aggour, Dalila Bousta, Amina Bari. Activité anti-inflammatoire, analgésique et anti-cicatrisante d'une espèce du climat aride et semi-aride marocaine : *Withania frutescens* L. Premier Colloque international sur la valorisation des plantes aromatiques et médicinales du Maroc (vpamm'19), à l'école normale supérieure, université Abdelmalek Essaadi, Tétouan-Maroc. 02 au 04 novembre 2019.
- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima Zahra Jawhari, Dalila Bousta, Amina Bari. Caractérisation phytochimique et le pouvoir antioxydant des extraits de deux espèces : *A. microcarpus* et *W. frutescens*. 2ème journée scientifique dédiée aux doctorant(e)s sous le thème « Biotechnologie, Santé et Environnement » à la Faculté Des Sciences Dhar El Mahraz, Fès-Maroc. 10 et 11 Octobre 2018
- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima Zahra Jawhari, Dalila Bousta, Amina Bari. Évaluation phytochimique et étude des activités biologiques des extraits de *Withania frutescens* L.1ére journée scientifique dédiée aux doctorant(e)s « Biotechnologie, Écologie Et Valorisation Des Phyto-Ressources », à la Faculté Des Sciences Dhar El Mahraz, Fès-Maroc. 25 Décembre 2017.
- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima Zahra Jawhari, Dalila Bousta, Amina Bari. Valorisation de la potentialité pharmacologique des composés phytochimiques des extraits brutes d'une plante de la famille de solanacée. International Congres sur la valorisation des ressources naturelles (VARENA-2019), à la faculté des sciences Rabat-Maroc. 26 au 28 Juin 2019.
- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima Zahra Jawhari, Dalila Bousta, Amina Bari. Caractérisation phytochimique et activité antioxydante des espèces du nord du Maroc. Congrès International sur l'innovation la qualité et la sécurité sanitaire des aliments (ICIQFS 2018), à la Faculté Des Sciences Dhar El Mahraz, Fès-Maroc. 28 au 30 novembre 2018.
- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima zahra Jawhari, Dalila Bousta, Amina Bari. Evaluation des activités biologiques des extraits hydroalcooliques d'une espèce du genre Withania. Pôle de recherche plantes médicinales et aromatiques (PMA), à la Faculté Des Sciences Dhar El Mahraz, Fès-Maroc. 25 décembre 2018.

- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima Zahra Jawhari, Dalila Bousta, Amina Bari. *Withania frutescens* : Caractérisation phytochimique et études de toxicité aigues et sub-aigues chez la souris. Congrès International de toxicologie, à la Faculté de médecine, de pharmacie et de médecine dentaire, Fès-Maroc. 12 au 15 octobre 2022.
- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima zahra Jawhari, Dalila Bousta, Hamza Mechchate, Bohza Serhii, Alexandr Rozhenko, Amina Bari. Identification des composés phytochimiques, des activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques de l'huile essentielle de *Withania frutescens* : approche préventive contre les infections nosocomiales. Congrès international de l'industrie, l'environnement et la santé, à la faculté des sciences et techniques, Mohammadia-Maroc. 5 au 8 octobre 2020.
- **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima Zahra Jawhari, Dalila Bousta, Amina Bari. Evaluation phytochimique et étude des activités biologiques des extraits de deux espèces : *Asphodelus microcarpus* L. et *Withania frutescens* L. 3ème forum de biotechnologie à la Faculté des Sciences Dhar el Mahraz, Fès-Maroc. 26 décembre 2017
- Fatima Zahra Jawhari, **Abdelfattah El Moussaoui**, Hamada Imtara, Amina Bari. Phytochemical screening and mineralogical study of extracts from the different parts "roots, seeds, leaves, capitulas" of *Anacyclus pyrethrum* var *pyrethrum* and *Anacyclus pyrethrum* var *depressus*. Colloque International VAHVISTUS-BIO à la Faculté des Sciences Dhar el Mahraz, Fès-Maroc. 15 et 16 avril 2019.
- Fatima Zahra Jawhari, **Abdelfattah El Moussaoui**, Hamada Imtara, Hamza Mechchate, Imane EsSafi, Bari Amina, évaluation des activités analgésique et anti-inflammatoire d'extrait hydro alcoolique des différentes parties des deux variétés d'Anacyclus *pyrethrum* (L.) Link. Une espèce médicinale endémique du Maroc, congrès international de l'industrie, l'environnement et la santé, Mohammedia-Maroc. 5 au 8 octobre 2020.
- Fatima Zahra Jawhari, **Abdelfattah El Moussaoui**, Hamada Imtara, Abdelkrim Agour, Amina Bari. Evaluation de l'activité antioxydante et études phytochimique et minéralogique des extraits des différentes parties « racines, graines, feuilles, capitules » d'*Anacyclus pyrethrum* var *pyrethrum* et *Anacyclus pyrethrum* var *depressus*. Premier colloque international sur la valorisation des plantes aromatiques et médicinales du Maroc (vpamm'19), à l'école normale supérieure, université Abdelmalek Essaadi, Tétouan-Maroc. 02 au 04 ovembre 2019.
- Khalid Chebbac, **Abdelfattah El Moussaoui**, Amin Assoughem, Abdelhakim, El oualli Lalami, Rajae Guemmouh. Etude du profilage chimique, potentiel antioxydant et antimicrobien contre les microbes résistants aux médicaments de : l'huile essentielle d'*Artemisia negrei*. Symposium international sur « Phrmacologie, Phytothérapie et Phytochimie des plantes Aromatiques et Médicinales », à l'école supérieure de technologie Khenifra-Maroc. 27 et 28 juillet 2021.
- Mohammed Chalkha, Yassine Rhazi, **Abdelfattah El Moussaoui**, Khalid Chebbac, Najoua Barghady, Aziz Arzine, Asmae Nakkabi, Mohamed Akhazzane, Mohamed Bakhouch, Mohamed El Yazidi. Synthèse, caractérisation et évaluation biologique de nouveaux systèmes hétérocycliques à partir des aza-aurones. Cinquième Colloque Maghrébin sur la Chimie Hétérocyclique, à la faculté des sciences, Meknès-Maroc. 13 au 15 juillet 2022.

- Abdekrim Agour, Ibrahim Mssillou, **Abdelfattah El Moussaoui**, Fatima zahra Jawhari, Amina Bari, Elhoussine Derwich. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait : Haplophyllum vermiculaire. Premier Colloque international sur la valorisation des plantes aromatiques et médicinales du Maroc (vpamm'19), à l'école normale supérieure, université Abdelmalek Essaadi, Tétouan-Maroc. 02 au 04 novembre 2019.
- Khalid Chebbac, Hazem Ghneim, **Abdelfattah El Moussaoui**, Mohammed Bourhia, Rajae Guemmouh. Activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'huile essentielle d'*Artemisia aragonensis*. Journée scientifique de l'ISPITs, Fès-Maroc. 24 et 25 juin 2022.
- Yassine Rhazi, Mohammed Chalkha, Khalid Chebbac, **Abdelfattah El Moussaoui**, Najoua Barghady, Aziz Arzine, Asmae Nakkabi, Mohamed Bakhouch, Mohamed El Yazidi. Synthèse, caractérisation et évaluation biologiques de nouvelles molécules hybrides à base de quinazolin-4-one. Cinquième Colloque Maghrébin sur la Chimie Hétérocyclique, à la faculté des sciences, Meknès-Maroc. 13 au 15 juillet 2022.

## *PUBLICATIONS INTERNATIONALES*

- **El moussaoui A.**, Jawhari FZ, Bousta Dalila, and Amina Bari, "Phytochemical characterization and antioxidant activity of the northern moroccan species: *Withania frutescens* L.," Asian J. Pharm. Clin. Res., pp. 276–279, May 2019.
- **EL Moussaoui A**., F. Jawhari, K. EL Ouahdani, et al., " Valorization of the Pharmacological Potential of Phytochemical Compounds Contained in the Crude Extract of the Root of a Plant of *Withania frutescens* L ," Phytothérapie, 2019.
- **El Moussaoui A.**, F. Z. Jawhari, A. M. Almehdi, et al., "Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of Withania frutescens.L," Bioorg. Chem., vol. 93, 2019.
- **EL Moussaoui A**., M. Bourhia, F. Z. Jawhari, et al., " *Withania frutescens*. L Extract: Phytochemical Characterization and Acute and Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Studies in Mice ," Biomed Res. Int., vol. 2020, pp. 1–7, 2020.
- **EL Moussaoui A**., M. Bourhia, F. Z. Jawhari, et al., "Phytochemical Identification, Acute, and Sub-Acute Oral Toxicity Studies of the Foliar Extract of *Withania frutescens*,". Molecules. 25 (15) :1–10, 2020.
- **EL Moussaoui A**., F. Z. Jawhari, M. Bourhia, et al., "*Withania frutescens*: Chemical characterization, analgesic, anti-inflammatory, and healing activities," . Open Chemistry 2020; 18: 927–935. 2020.
- **EL Moussaoui A**., M. Bourhia, F. Z. Jawhari, et al., "Chemical Profiling, Antioxidant, and Antimicrobial Activity against Drug-Resistant Microbes of Essential Oil from *Withania frutescens* L.," Appl. Sci., vol. 11, no. 11, p. 5168, Jun. 2021.
- **El Moussaoui A**., M. Kadiri, M. Bourhia, et al., "Promising Antioxidant and Anticorrosion Activities of Mild Steel in 1.0 M Hydrochloric Acid Solution by *Withania frutescens* L. Essential Oil," Front. Chem., vol. 9, p. 760, Oct. 2021.
- **El Moussaoui A**., M. Bourhia, F. Z. Jawhari, et al., "Responses of *Withania frutescens* (L.) Pauquy (Solanaceae) Growing in the Mediterranean Area to Changes in the Environmental Conditions: An Approach of Adaptation," Front. Ecol. Evol., vol. 0, p. 470, Aug. 2021.

- **El Moussaoui A**., H. Mechchate, M. Bourhia, et al., "Glycemic control potential of chemically characterized extract from *Withania frutescens* L. Roots in severe diabetes-induced mice," Appl. Sci., vol. 11, no. 9, p. 3998, Apr. 2021.
- **EL Moussaoui A.**, Allali A., M. Bourhia, et al., "Insecticidal and Antifungal Activities of Chemically-Characterized Essential Oils from the Leaves of *Withania frutescens* L.," Life 2022, Vol. 12, Page 88, vol. 12, no. 1, p. 88, Jan. 2022.
- Chalkha, M.; **EL Moussaoui, A.,** Hadda, T. Ben; Berredjem, M.; Bouzina, A.; Almalki, F.A.; Saghrouchni, H.; Bakhouch, M.; Saadi, M.; Ammari, L. El; et al. Crystallographic study, biological evaluation and DFT/POM/Docking analyses of pyrazole linked amide conjugates: Identification of antimicrobial and antitumor pharmacophore sites. *J. Mol. Struct.* 2022, *1252*, 131818, doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2021.131818.
- Jawhari, F.Z.; **El Moussaoui, A**.; Bourhia, M.; Imtara, H.; Mechchate, H.; Es-Safi, I.; Ullah, R.; Ezzeldin, E.; Mostafa, G.A.; Grafov, A.; et al. *Anacyclus pyrethrum* (L): Chemical Composition, Analgesic, Anti-Inflammatory, and Wound Healing Properties. *Molecules* 2020, *25*, doi:10.3390/molecules25225469.
- Jawhari, F.Z.; **El Moussaoui, A**.; Imtara, H.; Mechchate, H.; Es-Safi, I.; Bouhrim, M.; Kharchoufa, L.; Miry, A.; Bousta, D.; Bari, A. Evaluation of the acute toxicity of the extracts of Anacyclus pyrethrum var. pyrethrum (L.) and Anacyclus pyrethrum var. depressus Maire in Swiss mice. *Vet. World* 2021, *14*, 457–467, doi:10.14202/vetworld.2021.457-467.
- Jawhari F.Z, **El Moussaoui A**, Mohammed Bourhia, Hamada Imtara, Hamza Saghrouchni, Kenza Ammor, Hayat Ouassou, Youssef Elamine, Riaz Ullah, Essam Ezzeldin, Gamal A. E. Mostafa, and Amina Bari., 2021. *Anacyclus pyrethrum* var. *pyrethrum* (L.) and *Anacyclus pyrethrum* var. *depressus* (Ball) Maire: Correlation between Total Phenolic and Flavonoid Contents with Antioxidant and Antimicrobial Activities of Chemically Characterized Extracts. Plants 10, 149. https://doi.org/10.3390/plants10010149
- Khadija, E.O.; **EL Moussaoui A.**; Laila, B.; Dalila, B. Ethnobotanical study of medicinal plants used in the treatment of cancers in the city of casablanca (West-central of morocco). *Trop. J. Nat. Prod. Res.* 2021, *5*, 1044–1054, doi:10.26538/TJNPR/V5I6.11.
- Lafraxo, S.; **El Moussaoui, A**.; A Bin Jardan, Y.; El Barnossi, A.; Chebaibi, M.; Baammi, S.; Ait Akka, A.; Chebbac, K.; Akhazzane, M.; Chelouati, T.; et al. GC-MS Profiling, in Vitro Antioxidant, Antimicrobial, and in Silico NADPH Oxidase Inhibition Studies of Essential Oil of Juniperus thurifera Bark. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2022, *2022*, doi:10.1155/2022/6305672.
- Lafraxo, S.; Barnossi, A. ; **EL Moussaoui, A**. El; Bourhia, M.; Salamatullah, A.M.; Alzahrani, A.; Akka, A.A.; Choubbane, A.; Akhazzane, M.; Aboul-Soud, M.A.M.; et al. Essential Oils from Leaves of *Juniperus thurifera* L., Exhibiting Antioxidant, Antifungal and Antibacterial Activities against Antibiotic-Resistant Microbes. *Hortic. 2022, Vol. 8, Page 321* 2022, *8*, 321, doi:10.3390/HORTICULTURAE8040321.
- Chebbac, K.; Ghneim, H.K.; **El Moussaoui, A**.; Bourhia, M.; El Barnossi, A.; Ouaritini, Z.B.; Salamatullah, A.M.; Alzahrani, A.; Aboul-Soud, M.A.M.; Giesy, J.P.; et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Chemically-Characterized Essential Oil from *Artemisia aragonensis* Lam. against Drug-Resistant Microbes. *Molecules* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27031136.

- Maliki, I.; Almehdi, A.M.; **El Moussaoui, A**.; Abdel-rahman, I.; Ouahbi, A.; Morocco, M. *Moroccan Journal of Chemistry Phytochemical screening and the antioxidant, antibacterial and antifungal activities of aqueous extracts from the leaves of Lippia triphylla planted in Morocco*; 2020; Vol. 8.
- Maliki, I.; Es-safi, I.; **El Moussaoui, A**.; Mechchate, H.; El Majdoub, Y.O.; Bouymajane, A.; Cacciola, F.; Mondello, L.; Elbadaoui, K. *Salvia officinalis* and *Lippia triphylla*: Chemical characterization and evaluation of antidepressant-like activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021, *203*, 114207, doi:10.1016/J.JPBA.2021.114207.
- Es-Safi, I.; Mechchate, H.; Amaghnouje, A.; **El Moussaoui, A**.; Cerruti, P.; Avella, M.; Grafov, A.; Bousta, D. Marketing and legal status of phytomedicines and food supplements in Morocco. *J. Complement. Integr. Med.* **2020**, *0*, doi:10.1515/jcim-2020-0168.
- Zouirech, O.; Alyousef, A.A.; El Barnossi, A.; **El Moussaoui, A**.; Bourhia, M.; Salamatullah, A.M.; Ouahmane, L.; Giesy, J.P.; Aboul-soud, M.A.M.; Lyoussi, B.; et al. Phytochemical Analysis and Antioxidant, Antibacterial, and Antifungal Effects of Essential Oil of Black Caraway (*Nigella sativa* L.) Seeds against Drug-Resistant Clinically Pathogenic Microorganisms. *Biomed Res. Int.* 2022, *2022*, 1–11, doi:10.1155/2022/5218950.
- El Abdali, Y.; Agour, A.; Allali, A.; Bourhia, M.; **El Moussaoui, A**.; Eloutassi, N.; Mohammed Salamatullah, A.; Alzahrani, A.; Ouahmane, L.; Aboul-Soud, M.A.M.; et al. *Lavandula dentata* L.: Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antifungal and Insecticidal Activities of Its Essential Oil. Plants 2022, 11, doi:10.3390/PLANTS11030311.
- Mechchate, H.; Es-Safi, I.; Bourhia, M.; Kyrylchuk, A.; **El Moussaoui, A**.; Conte, R.; Ullah, R.; Ezzeldin, E.; Mostafa, G.A.; Grafov, A.; et al. In-Vivo Antidiabetic Activity and In-Silico Mode of Action of LC/MS-MS Identified Flavonoids in Oleaster Leaves. *Molecules* 2020, *25*, doi:10.3390/MOLECULES25215073.
- Mssillou, I.; Agour, A.; Allali, A.; Saghrouchni, H.; Bourhia, M.; **El Moussaoui, A**.; Salamatullah, A.M.; Alzahrani, A.; Aboul-Soud, M.A.M.; Giesy, J.P.; et al. Antioxidant, Antimicrobial, and Insecticidal Properties of a Chemically Characterized Essential Oil from the Leaves of *Dittrichia viscosa* L. Mol. 2022, Vol. 27, Page 2282 2022, 27, 2282, doi:10.3390/MOLECULES27072282.

## *PRIX DE LA MEILLEURE COMMUNICATION ORALE*

Prix de la meilleure communication orale au congrès international de l'industrie, l'environnement et la santé, à Mohammedia, du 05 au 08 Octobre 2020. Évaluation des activités analgésique et anti-inflammatoire d'extrait hydro alcoolique des différentes parties des deux variétés d'*Anacyclus pyrethrum* (L.) Link. Une espèce médicinale endémique du Maroc.

Fatima Zahra Jawhari, **Abdelfattah El Moussaoui**, Hamada Imtara, Hamza Mechchate, Imane Es-Safi, Amina Bari

# DÉDICACES

Je dédie ce travail à …✍

**A mes très chers parents**

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien être. Vous avez toujours été présents et généreux. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez placés en moi.

Ce travail est aussi le vôtre. Puisse Dieu tout puissant vous protéger, vous procurer longue vie et bonne santé afin que je puisse vous restituer un minimum de ce que je vous dois.

**A mes sœurs, frères et ma femme**

Pour votre soutien moral et vos encouragements.

Permettez-moi de vous exprimer mon amour le plus profond et mes vœux de réussite.

**A Tous Mes Amis**

En souvenir des agréables moments partagés et en témoignage de notre amitié.

**A Tous**

Mes Maîtres et Professeurs de la faculté des sciences Dhar El-Mahraz, Fès.

**A toute**

personne m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire

# REMERCIEMENTS

*Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.*

*J'adresse ma profonde gratitude à ma Directrice de thèse, Madame BARI Amina, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir fait l'honneur de diriger ces travaux de recherche durant lesquels elle m'a offert sa confiance, ses conseils qui m'ont été d'une aide précieuse et le soutien moral qu'elle a su m'apporter tout au long de ce parcours, tout en restant l'exemple absolu du travailleur infatigable, avec un sens aigu pour le détail, ce qui m'a toujours motivé pendant ce travail.*

*Je ne saurais remercier suffisamment Madame BOUSTA Dalila, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury, pour sa collaboration, son soutien pour un stage en Ukraine dans le cadre du projet H2020 et pour l'intérêt qu'elle a portée à ce travail.*

*J'adresse également mes remerciements à Madame ZAIR Touriya, Professeur à la Faculté des Sciences Meknès, d'être rapporteur de cette thèse. Que je remercie infiniment pour la peine qu'elle s'est donnée pour son déplacement.*

*Je tiens à remercier Monsieur DERWICH El houssine, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, pour le temps qu'il a consacré en tant que rapporteur à l'examen de ce travail et également pour la peine qu'il s'est donnée pour son déplacement.*

*Je tiens à remercier Monsieur ALLALI Mustapha, Professeur à l'Institut Supérieur des Professions Infirmières et Techniques de Santé de Fès, pour le temps qu'il a consacré en tant que rapporteur à l'examen de ce travail et également pour la peine qu'il s'est donnée pour son déplacement.*

*Je tiens à remercier Madame GUEMMOUH Raja, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur d'être examinatrice et de participer au jury de ce travail.*

*Mes sincères remerciements à Monsieur BENDRISS AMRAOUI Mohammed, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, d'avoir accepté de faire partie du jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance la plus profonde.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur BOHZA Serhii, Professeur à l'institut de chimie organique de l'Académie nationale des sciences de Kyiv-Ukraine, pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche, pour sa gentillesse, son accueil, sa disponibilité et le temps qu'il m'a consacré pour mener à bien mon séjour de recherche en Ukraine.*

*Mes remerciements les plus chaleureux sont dédiés à tous (tes) mes amis (es) et plus précisément JAWHARI Fatima Zahra, BOURHIA Mohamed, KHALIS Hind et tous ceux que j'aurais pu oublier, pour leur présence, leur soutien, pour tous les moments partagés et ceux à venir. Merci de vos amitiés qui me sont chères.*

# Résumé

*Withania frutescens* (L.) est une espèce autochtone et négligée des zones aride et semi-aride. Cette espèce est encore présente dans les milieux naturels de la Région Fès-Meknès. Notre objectif global vise de la caractérisation de la variabilité morpho-écologique, phytochimique de l'espèce au niveau de quatre stations, l'évaluation des activités biologiques des extraits et des huiles essentielles, et les applications pharmaceutiques, notamment celle du mucilage pour l'encapsulation des huiles essentielles et des antibiotiques.

Des prospections de terrain et une enquête ethnobotanique ont été réalisées dans le but de connaitre la répartition de l'espèce et ses usages traditionnels par les populations autochtones. L'étude écologique (sol, topographie climat, flore) a été entreprise dans le but de la caractérisation du milieu et de la variabilité des caractères morphologiques et histologiques en rapport avec les conditions microclimatiques. L'étude de la variabilité spatio-temporelle des polyphénols totaux a été réalisée à l'aide du réactif de Folin-ciocalteu suivie de l'identification des composés phénoliques par GC-MS après silylation. Afin de valoriser et de valider l'usage traditionnel de la plante par la population autochtone, les extraits (feuilles et racines) ont été évalués pour leur activité antioxydante, antimicrobienne, antiinflammatoire et antidiabétique après une étude de la toxicité aigu et subaigu. Par ailleurs, le pouvoir pharmacologique et environnemental des huiles essentielles a été évalué par l'activité antioxydante, antimicrobienne, insecticide et anticorrosive. Les potentialités nutritionnelles ont été évaluées par ICP, de même, les mucilages de *W. frutescens* ont été isolés et séparés par une chromatographie sur colonne. Ils ont été caractérisés par Infrarouge, RMN, Cosy et HBMC afin de sélectionner une structure moléculaire de ces mucilages. Cette molécule a été utilisée comme une matrice d'encapsulation des huiles et des antibiotiques.

La caractérisation du milieu physique a révélé que *W. frutescens* peut vivre sur différents types de sol au niveau de l'étage bioclimatique semi-aride. Le cortège floristique a révélé que la flore des zones d'étude est composée de 74 espèces de 32 familles, avec une dominance des herbacés annuelles. La morphométrie et l'histométrie de *W. frutescens* a montré une différence dans la largeur des touffes, la longueur de la plante et l'épaisseur des tissus en rapport avec les conditions miroclimatiques. La multiplication par germination a présenté un taux de 88,49%. L'enquête ethnobotanique a révélé que la plante est utilisée, malgré sa rareté, comme un traitement naturel contre certaines infections.

Le criblage phytochimique des feuilles et des racines a montré la richesse de l'espèce en composés phytochimiques, et le suivi annuel de la teneur des polyphénols totaux dans les quatre stations a révélé que la concentration de ces composés varie d'une station à l'autre. Un total de 59 composés a été identifié pour la première fois par GC-MS après une silylation.

L'évaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien a montré que l'extrait hydroalcoolique des racines est plus efficace que celui des feuilles. L'évaluation de la toxicité des extraits n'a montré aucune modification des paramètres biochimiques du sérum et au niveau des organes des animaux. L'évaluation des effets thérapeutiques des deux extraits a montré un pouvoir antiinflammatoire, une efficacité cicatrisante et une activité antidiabétique.

L'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles et de l'hydrolat de la plante étudiée, a montré que l'hydrolat a un pouvoir antioxydant et antimicrobien moins important que celui des huiles essentielles. Alors que ces dernières ont montré un pouvoir anticorrosif et une efficacité insecticide avec une faible concentration.

L'évaluation des potentialités nutritionnelles et des applications pharmaceutiques de la plante a montré d'une part que la poudre des feuilles est riche en minéraux, qu'elle renferme 17 acides aminés, et 12 vitamines. Et d'autre part l'optimisation de l'extraction du mucilage a révélé un rendement de l'ordre de 92,155%. Sa séparation sur colonne chromatographique a permis de révéler 10 fractions, qui ont été analysées par Infrarouge, RMN, COSY, HBMC. Nous avons pu purifier et caractériser, pour la première fois, une molécule du mucilage. Les résultats de l'encapsulation des nanoparticules ont prouvé que ce mucilage est une bonne matrice d'encapsulation des huiles essentielles et des antibiotiques.



**Mots clés** : *Withania frutescens* ; Ecologie ; Caractérisation phytochimique ; Activités biologiques ; Bioinsecticide ; Valeur nutritionnelle ; Mucilage ; Encapsulation.

# Abstract

*Withania frutescens* (L) is a native and neglected species of arid and semi-arid zones. This species is still present in the natural environments of the Fez-Meknes Region. Our global objective is to characterize the morpho-ecological and phytochemical variability of the species at 4 stations, to evaluate the biological activities of the extracts and essential oils, and the pharmaceutical applications, in particular that of the mucilage for the encapsulation of essential oils and antibiotics.

Field surveys and an ethnobotanical survey were carried out in order to know the distribution of the species and its traditional uses by the indigenous populations. The ecological study (soil, topography, climate, flora) was undertaken in order to characterise the environment and the variability of morphological and histological characteristics in relation to microclimatic conditions. The study of the spatio-temporal variability of total polyphenols was carried out using the Folin-ciocalteu reagent followed by the identification of phenolic compounds by GC-MS after silylation. In order to valorise and validate the traditional use of the plant by the indigenous population, the extracts (leaves and roots) were evaluated for their antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and antidiabetic activity after an acute and subacute toxicity study. In addition, the pharmacological and environmental potency of the essential oils was evaluated for antioxidant, antimicrobial, insecticidal and anticorrosive activity. The nutritional potentialities were evaluated by ICP, and the mucilages of *W. frutescens* were isolated and separated by column chromatography. They were characterised by Infrared, NMR, Cosy and HBMC to select a molecular structure of these mucilages. This molecule was used as a matrix for encapsulating oils and antibiotics.

The characterisation of the physical environment revealed that *W. frutescens* can live on different types of soil in the semi-arid bioclimatic zone. The floristic composition revealed that the flora of the study areas is composed of 74 species from 32 families, with a dominance of annual herbaceous plants. Morphometry and histometry of *W. frutescens* showed a difference in clump width, plant length and tissue thickness in relation to the mioclimatic conditions. Multiplication by germination showed a rate of 88.49%. The ethnobotanical survey revealed that the plant is used, despite its rarity, as a natural treatment against certain infections.

Phytochemical screening of leaves and roots showed the richness of the species in phytochemical compounds, and annual monitoring of total polyphenol content in the four stations revealed that the concentration of these compounds varies from one station to another. 59 compounds were identified for the first time by GC-MS after silylation.

The evaluation of antioxidant and antimicrobial power showed that the hydroalcoholic extract of the roots is more effective than that of the leaves. Toxicity evaluation of the extracts showed no change in the biochemical parameters of the serum and organs of the animals. The evaluation of the therapeutic effects of the two extracts showed anti-inflammatory, healing and anti-diabetic activity.

The evaluation of the biological activities of the essential oils and the hydrolate of the plant studied, showed that the hydrolate has less antioxidant and antimicrobial power than the essential oils. While the latter showed anticorrosive power and insecticidal efficacy at low concentration.

The evaluation of the nutritional potential and pharmaceutical applications of the plant has shown on the one hand that the leaf powder is rich in minerals, that it contains 17 amino acids and 12 vitamins. On the other hand, the optimisation of the extraction of the mucilage revealed a yield of about 92.155%. Its separation on a chromatographic column revealed 10 fractions, which were analysed by Infrared, NMR, COSY, HBMC. We were able to purify and characterise, for the first time, a mucilage molecule. The results of the encapsulation of the nanoparticles proved that this mucilage is a good matrix for encapsulating essential oils and antibiotics.



**Key words:** *Withania frutescens*; Ecology; Phytochemical characterisation; Biological activities; Bioinsecticide; Nutritional value; Mucilage; Encapsulation.

**ملخص**

عبعب شجيري (*Withania frutescens* L.) هو نوع أصلي ومهمل من المناطق القاحلة وشبه القاحلة. هذا النوع لا يزال موجودًا في البيئات الطبيعية لمنطقة فاس مكناس. هدفنا العام هو تحديد خصائص التباين المورفو-إيكولوجي والكيميائي النباتي للنوع في أربع محطات، تقييم الأنشطة البيولوجية للمستخلصات والزيوت الأساسية، وكدى التطبيقات الصيدلانية، ولا سيما الصمغ لتغليف الزيوت الأساسية والمضادات الحيوية.

أجريت دراسات استقصائية ميدانية واستقصائية عرقية نباتية لتحديد التوزيع الجغرافي للنوع واستخداماته التقليدية من طرف السكان الأصليين الدراسة الإيكولوجية (التربة، المناخ الطبوغرافي، والنباتات). أجريت بهدف تحديد خصائص البيئة وتباين الخصائص المورفولوجية والنسيجية فيما يتعلق بالظروف المناخية الدقيقة. تم إجراء دراسة التباين المكاني الزمني لمجموع البوليفينول باستخدام كاشف Folin-ciocalteu متبوعًا بتحديد المركبات الفينولية بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية بعد السيليلة. من أجل تعزيز الاستخدام التقليدي للنبات من قبل السكان الأصليين والتحقق من صحته، تم تقييم المستخلصات (الأوراق والجذور) لمضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات ومضادات الالتهاب ومضادات السكري بعد دراسة السمية الحادة ودون الحادة. علاوة على ذلك، تم تقييم القوة الدوائية والبيئية للزيوت الأساسية من خلال مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات والمبيدات الحشرية والنشاط المضاد للتآكل. الإمكانات الغذائية تم تقييمها بواسطة التحليل المعدني، وبالمثل تم عزل صمغيات *W. frutescens* وفصلها بواسطة كروماتوغرافيا العمود، ليتم تمييزها بالأشعة تحت الحمراء ، الرنين المغناطيسي النووي ، كوزي و HBMC من أجل تحديد التركيب الجزيئي لهذه الصمغ. هذا الجزيء تم استخدامه كمصفوفة تغليف للزيوت والمضادات الحيوية.

كشف توصيف البيئة الفيزيائية أن *W. frutescens* يمكن أن تعيش على أنواع مختلفة من التربة في المرحلة المناخية الحيوية شبه القاحلة. كشف موكب الأزهار أن النباتات في مناطق الدراسة تتكون من 74 نوعًا من 32 عائلة، مع هيمنة النباتات العشبية السنوية. أظهر قياس التشكل وقياس النسيج لـ *W. frutescens* اختلافًا في عرض الخصلات وطول النبات وسمك الأنسجة فيما يتعلق بالظروف المناخية الدقيقة. أظهرت نتائج إنبات البذورنسبة 88.49٪. وكشف المسح العرقي النباتي أن النبات يستخدم رغم ندرته كعلاج طبيعي ضد بعض أنواع العدوى.

أظهر الفحص الكيميائي النباتي للأوراق والجذور ثراء النبتة المدروسة بالمواد الكيميائية النباتية، وكشفت المراقبة السنوية لإجمالي محتوى البوليفينول في المحطات الأربع أن تركيز هذه المركبات يختلف من محطة إلى أخرى. تم تحديد 59 مركبًا لأول مرة بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية بعد السيليلة.

أثبت تقييم القوة المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات أن المستخلص المائي الكحولي للجذور أكثر فاعلية من تلك الموجودة في الأوراق. لم يظهر تقييم سمية المستخلصات أي تغيير في البارامترات الكيميائية الحيوية للمصل وفي أعضاء الحيوانات. كشف تحليل التأثيرات العلاجية للمستخلصين قوة مضادة للالتهابات وفعالية علاجية ونشاط مضاد للسكري.

أوضح تقييم الأنشطة البيولوجية للزيوت الأساسية والهيدرولات في النبات المدروس أن الهيدرولات لديها طاقة مضادة للأكسدة ومضادة للميكروبات أقل أهمية من تلك الموجودة في الزيوت الأساسية. في حين أظهر الأخير قوة مضادة للتآكل وفعالية مبيدات حشرية بتركيز منخفض.

بين تقييم الإمكانات الغذائية والتطبيقات الصيدلانية للنبات من ناحية أن مسحوق الأوراق غني بالمعادن، وأنه يحتوي على 17 حمضًا أمينيًا، و 12 فيتامينًا. من ناحية أخرى، أظهر تحسين استخراج المصل عائدًا يبلغ حوالي 92.155٪. كشف فصل الصمغ بالعمود اللوني عن 10 أجزاء، والتي تم تحليلها بواسطة الأشعة تحت الحمراء، الرنين المغناطيسي النووي ، كوزي و HBMC. تمكنا لأول مرة من تنقية جزيء الصمغ وتوصيفه. أثبتت نتائج تغليف الجسيمات النانوية أن هذا الصمغ عبارة عن مصفوفة تغليف جيدة للزيوت الأساسية والمضادات الحيوية.

**الكلمات الدالة:**

*Withania frutescens* ; الإيكولوجيا، ؛ التوصيف الكيميائي النباتي ؛ الأنشطة البيولوجية ؛ المبيدات الحيوية ؛القيمة الغذائية ؛ الصمغ ؛ التغليف.

## Liste des abréviations

**13C** : Isotope du carbone avec un masse de
**AIB** : Acide Indol Butyrique
**AlCl3** : Chlorure d'aluminium
**ALT** : Alanine transaminase
**AP**: Ancienne période (1960-1970)
**AST** : Aspartate transaminase
**ASTER:** Modèle Numérique d'Elévation Global
**BHT** : Butyl hydroxy toluène
**C**: Degré Celsius
**CaCO3** : Carbonate de calcium
**CCM** : Chromatographie sur couche mince
**CMI** : Concentration minimale inhibitrice
**COSY** : COrrelated SpectroscopY
**COX** : Enzymes cyclooxygénase
**DI** : Diamètre de la zone d'inhibition
**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
**EB** : Eau bouillante
**EDTA** : Acide éthylène diamine tétra-acétique
**EFWF** : Extrait des feuilles
**EIS** : Spesctroscopie d'impédance électrochimique
**ERWF** : Extrait racinaire
**ESE**: Est Sud Est
**FeCl3** : Chlorure de fer (III)
**FRAP** : Pouvoir antioxydant ferrique réducteur
**GC**: Chromatographie en phase gazeuse
**FBG** : Glycémie à jeun
**H.T**: Température hivernale
**H2O2** : Eau oxygéné
**H2SO4** : Acide sulfurique
**HBMC** : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy
**HCl** : Acide chlorhydrique
**HE** : huile essentielle
**HEWF** : Huile essentielle de W.drutescens
**HPLC** : Chromatographie liquide haute performance
**ICP**-AES : Spectrométrie d'Émission Atomique de Plasma d'argon à Couplage Inductif
**IF** : Indice de fructification
**IPP** : Isopentényl pyrophosphate
**KNO3** : Nitrate de potassium
**LOX** : 5-lipoxygénase
**MDG** : Moyenne journalière de germination
**MgCl2** : Chlorure de magnésium
**MgSO4** : Sulfate de magnésium

**MNT**: Modèle Numérique de Terrain
**MS** : Acier doux
**MSTFA** : N-méthyl-N-triméthylsilyl trifluoroacétamide
**Na2CO3** : Carbonate de sodium
**Nacl** : Chlorure de sodium
**NaOH** : Hydroxyde de sodium
**NP** : Nitrate de potassium
**NP**: Nouvelle période (2010-2019)
**PAM** : Plante aromatique et médicinale
**PF** : Papier filtre
**PGE2** : Prostaglandine E2
**PGF**2a : Prostaglandine F2α
**pH**: Potentiel Hydrogène
**PMF** : Poids de matière fraîche
**PMS** : Poids de matière sèche
**PP** : Polarisation potentiodynamique
**Q2**: Quotient pluviometrique
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire
**ROW** : Poids relatif des organes
**S** : Sol
**Semi.A**: Semi-aride
**SF4°C** : Scarification à froid 4°C
**Sub. H**: Subhumide
**TAC** : Capacité antioxydante totale
**TE** : Teneur en eau
**TR** : Temps de rétention
**TTC** : Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium
**W.f** : *Withania frutescens*

# Liste des figures

**Figure 1**: Cartes de l'aridité aux périodes 1961-1970 et 1991-2000 (Second communication nationale, 2010).....8
**Figure 2**: Carte de situation et de découpage Communal de la région Fès-Meknès (Direction générale des collectivités locales, 2015).....10
**Figure 3:** Répartition géographique de *Withania frutescens* au Maroc.....23
**Figure 4:** Structures des withanolides isolés (El Bouzidi et al., 2013).....24
**Figure 5**: Cartes géologiques de la station d'étude (A), carte topographique (B), carte des classes de pente (C) et modèle numérique de terrain (D).....28
**Figure 6**: Informations sur les profils des informateurs (Age, niveau scolaire…).....39
**Figure 7**: Usages de la plante par la population, parties utilisées, période de collecte, modes, posologie et durée d'usage.....40
**Figure 8**: Origine et état de conservation (A) et maladies soignés par cette plante (B).....41
**Figure 9**: Carte géologique montre les différents types du sol dans la zone d'étude.....42
**Figure 10**: Diagramme ombrothermique des stations étudiées pour la nouvelle période (2010-2019) et l'ancienne période (1960-1970).....44
**Figure 11**: Longueur et largeur (A), surface foliaire (B), milieu naturel de station 3 (C) et de station 4 (D) de *Withania frutescens* (L.) Pauquy.....50
**Figure 12**: Épaisseur du tissu des feuilles (A), des racines (B) et des tiges (C) de *Withania frutescens* (L.) Pauquy.....51
**Figure 13**: Coupe histologique au niveau de la tige de *Withania frutescens*. A : epiderme ; B : parenchyme cortical ; C : xylème ; D : parenchyme médullaire ; E : Phloème.....52
**Figure 14**: Fruits et graines de *W. frutescens* à différents stade de maturation (A) et coupe longitudinale de la graine (B). EC : Le chapeau de l'endosperme ; EL : l'endosperme latéral ; R : l'extrémité de la radicule ; H : l'hypocotyle ; C : les cotylédons ; T : testa.....53
**Figure 15**: Résultats de germination des graines de *W. frutescens* par les différents tests.....54
**Figure 16**: Germination des graines de *W. frutescens* en fonction du temps (A) et dans un milieu imbibé (B).....54
**Figure 17**: Evolution du poids la graine en fonction du temps (A), la création des orifices au niveau de la graine (B et C), développement de la plante après une germination (D et E).....55
**Figure 18**: Test de multiplication de la plante par bouturage (A), résultats du suivi de la croissance de la partie aérienne (B, C et D) et boutures enracinés (E). ND : nombre des nœuds ; Nfe : nombre des feuilles ; NL : nombre des fleurs.....57

**Figure 19:** Profil chromatographique en phase gaseuze (GC/MS) des composés phytochimiques de l'extrait de *W. frutescens* dans les quatre stations. .....65
**Figure 20** : Parties étudiées de *Withania frutescens* .....68
**Figure 21**: Activité antioxydante par la méthode de DPPH· pour l'ERWF (A), l'EFWF (B), BHT (C) et leur IC50 (D). .....78
**Figure 22**: Résultats de la capacité antioxydante par la methode de phosphomolybdate (A) et la concentration efficace 50% (CE-50) des extraits et de la quercétine en utilisant la méthode FRAP (B) .....79
**Figure 23:** Absorbance du β-carotène en présence des extraits étudiés, du BHT et du contrôle négatif. .....79
**Figure 24**: Photos de la zone d'inhibtion sur milieu solide de S. aureus (A) et E. coli (B), et la concentration minimale pour inhiber la croissance bactérienne sur milieu liquide (C). .....81
**Figure 25**: Pouvoir antifongique des extraits racinaire et foliaire de *W. frutescens.* .....82
**Figure 26**: Evolution du poids corporel après 14 jours de traitement avec l'extrait des feuilles (A) et l'extrait des racines (B) de *W. frutescens.* .....83
**Figure 27**: Evolution du poids corporel des animaux traitent par l'EFWF (A) et par l'ERWF (B), et poids relatif des organes des reins, du foie et de la rate après 28 jours de traitement avec l'EFWF (C) et avec l'ERWF (D). .....84
**Figure 28**: Effet de l'extrait de *W. frutescens* sur les paramètres sériques des animaux (A : Urée, B : Créatinine, C : ASAT, D : ALAT). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, n = 5. .....86
**Figure 29:** Photomicrographies de tranches de foie, de reins et de rates d'animaux ayant reçu l'extrait de W. frutscens pendant 28 jours (Hématoxyline/Eosine, X 40). V=veine, SH=sinus hépatique, H=hépatocyte, Ny=noyau, SM= sinus marginal, SV=sinus veineu, L=lumière, TC=tube collécteur, CP=capillaire péritubulaire, TP=tube proximal. .....87
**Figure 30**: Pouvoir antiiflammatoire par voie cutané de l'extrait des feuilles (A) et racinaires (B). .....88
**Figure 31**: Pouvoir anti-inflammatoire par voie orale de l'EFWF (A) et de l'ERWF (B). .....88
**Figure 32**: Activité antalgique de l'ERWF et de l'EFWF .....89
**Figure 33**: Activité cicatrisante de l'extrait des feuilles (A) et de l'extrait des racines (B) à 5% et 10%. .....90
**Figure 34**: Profil chromatographique GC-MS de l'HE de *W. frutescens.* .....103
**Figure 35:** Pouvoir antioxydant de HEWF par la méthode de DPPH (A), la methode de phosphomolybdate (B), la methode de FRAP (C) et la méthode de beta-carotene (D). .....105

**Figure 36**: Effets des huiles essentielles de *W. frutescens* sur la mortalité de C. maculatus adulte, (A) huile essentielle testée par inhalation; (B) Huile essentielle testée par contact. ..109
**Figure 37**: Effets des huiles essentielles de *Withania frutescens* sur sur l'émergence de C. maculatus. (A) Huile essentielle testée par inhalation ; (B) Huile essentielle testée par contact. .....110
**Figure 38**: Activité répulsive de différentes concentrations d'huile essentielle de Withania frutescenscontre C. maculates. Classe a (0,1≤ Répulsion ≤ 20%) ; Classe b (20,1≤ Répulsion ≤ 40%) ; Classe c (40,1≤ Répulsion ≤ 60% ; Classe d (60,1≤ Répulsion ≤ 80% ; Classe e (80,1≤ Répulsion ≤ 100%. .....110
**Figure 39:** Courbes de polarisation de MS dans 1.0 M HCl à différentes concentrations de HEWF à 298 K.....112
**Figure 40**: Diagrammes de Nyquist et de Bode d'acier doux (MS) dans 1.00 M HCl avec et sans concentrations de HEWF à 298 K. .....113
**Figure 41**: Modèle de circuit électrique equivalent .....114
**Figure 42**: Tracés des modèles de l'isotherme d'adsorption de HEWF pour la surface de MS dans 1.0 M HCl à 298 K obtenus à partir des données EIS. .....117
**Figure 43**: Concentration des acides aminés dans la poudre racinaires et foliaire .....127
**Figure 44**: Concentration des vitamines dans la poudre des racines et des feuilles. .....127
**Figure 45**: Etapes suivies pour l'extraction et la purification du mucilage de *W.frutescens* .129
**Figure 46**: Variation du rendement d'extraction du mucilage de chaque experience .....129
**Figure 47**: Test d'exposition du mucilage de *W. frutescens* à haute température .....130
**Figure 48**: Les fractions du mucilage sur la colone chromatographique .....131
**Figure 49**: Analyse de la molécule purifiée par RMN (A), Cosy (B), HMBC (C) et infra-rouge (D).....133
**Figure 50**: Préparation d'encapsulation dans un matrice du alginate-mucilage.....135
**Figure 51**: Pouvoir antibactérien du mucilage de *W. frutescens* par la méthode de disque sur milieu solide. Mu : mucilage ; Kan : kanamycine ; Str : stréptomycine ; Amp : ampiciline. 137
**Figure 52**: Croissance bactérienne en fonction de la concentration des nanoparticules.....137
**Figure 53:** Effet de la température sur les nanoparticules et l'inhibition de la croissance bactérienne .....138
**Figure 54**: Visualisation 2D de l'interaction entre la molécule et les sites actifs. A : interactions avec le site actif 4EY7, B : interactions avec le site actif 2CDU, C : interactions avec le site actif de 1FJ4, D : interactions avec le site actif de 3Q8U.....140

**Figure 55:** Visualisation 3D de l'interaction entre la molécule et les sites actifs. A : interactions avec le site actif 4EY7, B : interactions avec le site actif 2CDU, C : interactions avec le site actif de 1FJ4, D : interactions avec le site actif de 3Q8U.....141

# Liste des tableaux

**Tableau 1**: Coordonnées, altitudes et expositions des stations sélectionnées .....27
**Tableau 2:** Indice de continentalité, d'aridité et de Quotient pluviothermique et leurs classifications. .....29
**Tableau 3**: Caractéristiques physico-chimiques du sol dans les stations d'étude.....42
**Tableau 4**: Détermination des synthèses bioclimatiques selon les indices climatiques de continentalité, d'aridité et de rapport pluviométrique dans les quatre stations. .....43
**Tableau 5**: Espèces végétales enregistrées dans les formations de *Withania frutescens*(L.)...47
**Tableau 6**: Pourcentages des formes de vie végétale et des types morphologiques dans la zone d'étude. .....49
**Tableau 7**: Résultats du criblage phytochimique pour les extraits étudiés (feuilles et racines) .....58
**Tableau 8**: Variabilité quantitative mensuelle des polyphénols totaux (mg GAE/g) chez *Withania frutescens* (L.) Pauquy en fonction des mois. .....60
**Tableau 9:** Identification des composés phytochimiques contenus dans l'extrait des feuilles de *W. frutescens* .....63
**Tableau 10**: Pouvoir antibacterien d'ERWF, d'EFWF et les antibiotiques sur milieu solide. 80
**Tableau 11**: Effet de l'extrait végétal sur le développement des paramètres biochimiques ....92
**Tableau 12**: Effet antihyperglycémique d'ERWF et d'EFWF sur des souris diabétiques induites par l'alloxane pendant 12 heures .....92
**Tableau 13**: Effet de l'extrait végétal sur le poids corporel .....93
**Tableau 14**: Effet de l'extrait de *W. frutescens* sur les paramètres biochimiques.....93
**Tableau 15**: Composés phytochimiques contenus dans les huiles essentielles de *W.frutescens*. .....103
**Tableau 16**: Diamètre de la zone d'inhibition de l'HE, de l'hydrolat et des antibiotiques (mm) .....106
**Tableau 17**: Concentration minimale inhibitrice de l'hydrolat et de l'huile essentielle de *W.frutescens* (CMI en µg/ml).....106
**Tableau 18**: Résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'hydrolat.....109
**Tableau 19**: Paramètres électrochimiques générés à partir des courbes de PP du MS immergé dans 1,0 M HCl à différentes concentrations de HEWF à 298 K. .....113
**Tableau 20**: Efficacité d'inhibition et paramètres EIS pour MS dans 1.0 M HCl à différentes concentrations de HEWF .....115

**Tableau 21**: Formes linéarisées et conventionnelles des modèles d'isothermes d'adsorption les plus utilisés. ..... 116
**Tableau 22**: Teneur de la composition minérale des deux extraits en mg/kg. ..... 126
**Tableau 23**: Résultats de l'optimisation de l'extraction du mucilage de *W.frutescens* ..... 128
**Tableau 24**: Résultats d'efficacité d'encapsulation des huiles essentielles de *W.frutescens* dans la matrice alginate-mucilage ..... 136
**Tableau 25**: Résultats du docking de la molécule dans l'acétylcholinestérase humaine, la NAD(P)H oxydase, la bêta-cétoacyl-[protéine porteuse d'acyle] synthase d' E. coli et les récepteurs nucléoside diphosphate kinase de *S. aureus*. ..... 139

# Sommaire

**Introduction générale** ....1

**Chapitre 1 : Synthèse bibliographique** ....4

I. Introduction ....5

II. Définition et intérêt de la biodiversité ....5

III. Biodiversité et changement climatique ....5

1. Diversité des écosystèmes ....6

2. Evolution des écosystèmes ....6

3. Déplacement des aires de répartition de la biodiversité ....6

IV. La biodiversité marocaine et le changement climatique ....7

1. Biodiversité du Maroc ....7

2. Situation climatique nationale ....8

3. L'écosystème Marocain ....8

4. Etat de la biodiversité de la région d'étude : Fès-Meknès ....9

5. Géographie et géomorphologie de la région ....10

6. Situation climatique de la région d'étude ....11

7. Etat de la biodiversité de la région d'étude ....11

V. Plantes emblématiques dans les zones arides et semi-arides ....12

1. Valeur des plantes emblématiques du climat aride et semi-aride ....12

2. Évolution d'une ressource diversifiée dans le climat aride et semi-aride ....13

3. Durabilité et conservation des plantes dans les zones arides et semi-arides ....13

4. Adaptation des plantes emblématiques aux changements climatiques ....14

5. Les effets thérapeutiques des plantes emblématique : Propriétés biologiques ....14

5.1. Métabolites secondaires ....15

5.1.1. Alcaloïdes ....15

5.1.2. Composés terpéniques ....15

5.1.3. Polyphénols .....15
5.1.3.1. Tanins .....15
5.1.3.2. Coumarines .....15
5.1.3.3. Flavonoides .....16
5.1.3.4. Saponosides .....16
5.2. Méthodes d'extractions des composés phytochimiques .....16
5.2.1. Huiles essentielles .....16
5.2.2. Extraits bruts .....16
5.3. Méthodes d'analyse des composés phytochimiques .....17
5.3.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC) .....17
5.3.2. Chromatographie en phase gazeuse .....17
5.3.3. Spectroscopie infrarouge .....17
5.3.4. Spectroscopie UV-Visible .....18
5.4. Activités biologiques des composés phytochimiques .....18
5.4.1. Propriétés antimicrobiennes des plantes .....18
5.4.2. Pouvoir antioxydant des composés bioactifs .....18
5.4.3. Activité anti-inflammatoire .....18
5.4.4. Pouvoir antalgique .....19
5.4.5. Propriété cicatrisante .....19
5.4.6. Propriété antidiabetique .....19
5.4.7. Pouvoir insecticide .....20
VI. Les plantes emblématiques de la région d'étude : Cas de *Withania frutescens* (L) .....20
1. Caractères généraux des solanacées .....20
2. Caractères généraux de l'espèce : *Withania frutescens* .....22
3.1. Appareil végétatif .....22
3.2. Appareil reproducteur .....22
3.3. Taxonomie .....22
3.4. Répartition géographique et écologie de *Withania frutescens* .....23
3.5. Usage médicinal .....23
3.6. Données phytochimiques .....24
VII. Conclusion .....24

**Chapitre 2 : Etude du milieu physique, caractérisation écologique et physiologie d'adaptation de la plante étudiée** ..... 25

I. Introduction ..... 26

II. Matériel et méthodes ..... 26

1. Prospection et étude ethnobotanique de *Withania frutescens* ..... 26

2. Caractérisation écologique de la zone d'étude ..... 27

2.1. Description de la zone d'étude ..... 27

2.2. Analyse pédologique du milieu naturel de *W. frutescens* ..... 28

2.3. Étude bioclimatique ..... 28

2.4. Cortège floristique ..... 29

3. Caractérisation morphologique de l'espèce étudiée ..... 29

3.1. Étude morphométrique de *W. frutescens* ..... 29

3.2. Analyse histologique des tissus végétaux ..... 30

4. Techniques de la multiplication de la plante étudiée ..... 30

4.1. Multiplication de la plante (*W. frutescens*) par graines ..... 30

4.1.1. Caractérisation morphologique des fruits et des graines ..... 30

4.1.2. Nettoyage des graines collectées ..... 30

4.1.3. Teneur en eau ..... 31

4.1.4. Test de viabilité des graines ..... 31

4.1.4.1. Test de flottaison ..... 31

4.1.4.2. Test de tetrazolium (Chlorure de triphényltétrazolium) ..... 31

4.1.5. Tests de germination des graines ..... 31

4.2. Multiplication végétative par bouturage ..... 32

4.2.1. Collecte et manipulation des boutures ..... 33

4.2.2. Traitements et paramètres de mesure ..... 33

4.2.3. Substrat ..... 33

4.2.4. Acide Indol Butyrique ..... 33

4.2.5. Repiquage et entretien journalier ..... 34

5. Caractérisation phytochimique de *Withania frutescens* ..... 34

5.1. Criblage phytochimique ..... 34

5.1.1. Tanins ..... 34

5.1.1.1. Tanins catéchiques ..... 34
5.1.1.2. Tanins galliques ..... 34
5.1.2. Flavonoïdes ..... 35
5.1.3. Saponosides ..... 35
5.1.3.1. Stérols et les triterpènes ..... 35
5.1.3.2. Hétérosides stéroidiques ..... 35
5.1.3.3. Tritépènes hétérosides ..... 35
5.1.4. Coumarines ..... 35
5.1.4.1. Test de détection ..... 35
5.1.4.2. Test de confirmation ..... 36
5.1.5. Quinones libres ..... 36
5.1.6. Alcaloïdes ..... 36
5.1.7. Glycosides cardiaques ..... 36
5.1.8. Oses et holosides ..... 36
5.1.9. Mucilages ..... 36
5.2. Dosage des composés phénoliques ..... 36
5.2.1. Dosage des polyphénols totaux ..... 37
5.2.2. Dosage des flavonoïdes ..... 37
5.2.3. Dosage de tanins condensés ..... 37
6. Variabilité temporelle des polyphénols totaux ..... 37
6.1. Variation temporelle de la teneur en polyphénols ..... 37
6.2. Identification des composés phytochimiques ..... 38
7. Analyses statistiques ..... 38
III. Résultats et discussion ..... 38
1. Enquête sur la répartition et les usages de l'espèce place de *W. frutescens* ..... 38
1.1. Profils des informateurs ..... 39
1.2. Usages de la plante ..... 39
1.3. Origine et état de conservation de l'espèce ..... 40
1.4. Types de maladies traitées ..... 40
2. Caractérisation écologique de la zone d'étude ..... 41
2.1. Étude pédologique ..... 41

2.2. Evolution des conditions microclimatiques .....43
2.3. Diversité végétale .....45
3. Caractérisation morpho-écologique de l'espèce étudiée .....49
3.1. Étude morphométrique de *W. frutescens* .....49
3.2. Étude histologique de *W. frutescens* .....50
4. Multiplication par graines de la plante étudiée .....52
5. Multiplication végétative par bouturage .....56
6. Caractérisation phytochimique de l'éspèce étudiée .....57
6.1. Criblage phytochimique .....57
6.2. Dosage des composés phénoliques .....58
6.3. Etude de la variabilité spatio-temporelle des polyphénols totaux au niveau des feuilles .....59
6.3.1. Variation temporelle de la teneur en polyphénols .....59
6.3.2. Identification des composés phytochimiques au niveau des feuilles .....61
IV. Conclusion .....65
**Chapitre 3 : Evaluation des activités biologiques d'extrait des feuilles et des racines de *Withania frutescens*** .....66
I. Introduction .....67
II. Matériel et méthodes .....67
1. Matériel végétal .....67
2. Activité antioxydante de l'ERWF et de l'EFWF .....68
2.1. Piégeage du radical libre DPPH· .....68
2.2. Test du pouvoir réducteur .....68
2.3. Test de la capacité anti-oxydante totale .....69
2.4. Test de décoloration du ß-carotène .....69
3. Pouvoir antimicrobien d'ERWF et d'EFWF .....69
3.1. Pouvoir antibactérien .....69
3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne .....70
3.2.1. Méthode des disques .....70
3.2.2. Détermination des valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....70
4. Activité antifongique de l'ERWF et de l'EFWF .....71

4.1. Préparation de la suspension fongique .....71
4.2. Préparation des milieux de cultures .....71
4.3. Ensemencement et incubation des boites de pétri .....71
4.4. Paramètres étudiés .....71
4.4.1. Taux d'inhibition (TI%) .....72
4.4.2. Détermination de CMI .....72
4.4.3. Détermination de la vitesse de croissance .....72
5. Evaluation de la toxicité de l'ERWF et l'EFWF .....72
5.1. Animaux utilisés .....72
5.2. Préparation des solutions d'essai .....73
5.3. Test de la toxicité aiguë .....73
5.4. Toxicité subaiguë .....73
5.4.1. Analyse de la biochimie du sérum .....73
5.4.2. Évaluation histopathologique .....74
6. Activité anti-inflammatoire de l'ERWF et de l'EFWF .....74
6.1. Préparation de la crème .....74
6.2. Animaux utilisés .....74
6.3. Evaluation de l'activité antiiflammatoire de l'EFWF et de l'ERWF .....74
6.4. Evaluation de l'activité analgésique .....75
6.5. Evaluation de l'activité cicatrisante .....75
7. Evaluation du pouvoir antidiabétique *in vivo* des extraits étudiés .....76
7.1. Induction expérimentale du diabète .....76
7.2. Évaluation de l'activité antidiabétique .....76
7.3. Évaluation de l'activité antihyperglycémique .....76
8. Analyses statistiques .....76
III. Résultats et discussion .....77
1. Rendement d'extraction .....77
2. Activité antioxydante .....77
3. Activité antibactérienne .....80

4. Activité antifongique .....81
5. Toxicité aiguë .....83
6. Toxicité subaiguë .....84
7. Pouvoir anti-inflammatoire des extraits de *W. frutescens* .....87
8. Activité analgésique des extraits de *W. frutescens* .....89
9. Activité cicatrisante .....90
10. Evaluation du potentiel antidiabétique des extraits de *W. frutescens* .....91
IV. Conclusion .....94
**Chapitre 4 : Caractérisation phytochimique et évaluation des activités biologiques et anticorrosive des huiles essentielles de *W. frutescens*** .....95
I. Introduction .....96
II. Matériel et méthodes .....97
1. Extraction des HEWF .....97
2. Préparation de l'hydrolat .....97
3. Caractérisation chimique de l'huile essentielle par GC/MS .....97
4. Activité antioxydante in vitro d'HEWF .....98
4.1. Test de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl .....98
4.2. Test du pouvoir antioxydant réducteur ferrique .....98
4.3. Test de la capacité antioxydante totale .....98
4.4. Test de la décoloration du bêta-carotène .....99
5. Pouvoir antibactérien .....99
6. Pouvoir antifongique .....100
7. Pouvoir insecticide des huiles essentielles de *W.frutescens* .....100
7.1. Élevage des insectes .....100
7.2. Toxicité de l'huile essentielle contre *C. maculatus* .....100
7.2.1. Toxicité par contact .....100
7.2.2. Toxicité par inhalation .....101
7.2.3. Test de répulsion .....101
8. Pouvoir anticorrosion des huiles essentielles .....101

8.1. Matériau ..... 101
8.2. Milieu corrosif ..... 102
8.3. Mesures électrochimiques ..... 102
III. Résultats et discussion ..... 102
1. Composition phytochimique de l'huile essentielle ..... 102
2. Activité antioxydante ..... 104
3. Activité antibactérienne de l'huile essentielle ..... 106
4. Activité antifongique ..... 108
5. Pouvoir insecticide de HEWF ..... 109
6. Activité anticorrosion de HEWF ..... 111
6.1. Mesures PP ..... 111
6.2. Mesures de l'impédance électrochimique ..... 113
6.3. Isotherme d'adsorption ..... 115
IV. Conclusion ..... 117
**Chapitre 5 : Evaluation des potentialités nutritionnelles de la plante et application pharmaceutique du mucilage pour l'encapsulation des huiles essentielles et des antibiotiques** ..... 118
I. Introduction ..... 119
II. Matériel et méthodes ..... 119
1. Valeur nutritionnelle de *W.frutescens* ..... 119
2. Optimisation de l'extraction du mucilage ..... 120
2.1. Extraction du mucilage de Wf ..... 120
2.2. Caractérisation physico-chimique du mucilage ..... 120
2.3. Mesure de l'indice de gonflement ..... 120
2.4. Capacité de rétention d'eau ..... 121
2.5. Absorption de l'huile ..... 121
2.6. Capacité d'émulsion ..... 121
2.7. Mesure de la conductivité ..... 121
2.8. Test de vieillissement accéléré par centrifugation ..... 121
3. Caractérisation chimique des mucilages ..... 121
3.1. Chromatographie sur couche mince ..... 121

3.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire .....122
3.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC) .....122
3.4. Détérmination structurale du mucilage .....122
4. Docking moleculaire .....123
5. Encapsulation des huiles essentielles de *W.frutescens* dans le mucilage .....123
5.1. Propriétés et performances du mucilage-alginate de W.f comme matrice d'encapsulation .....123
5.1.1. Préparation de l'encapsulation de l'huile de *W.frutescens* dans le mucilage .....123
5.1.2. Efficacité de l'encapsulation avant le séchage .....124
5.1.3. Efficacité de l'encapsulation après séchage .....124
6. Encapsulation de nanoparticules de mucilage de *Withania frutescens* avec des antibiotiques : stabilité *in vitro* et évaluation fonctionnelle .....125
6.1. Encapsulation d'antibiotiques dans une matrice du mucilage. .....125
6.2. Caractérisations physiques .....125
6.3. Evaluation du pouvoir antimicrobienne de McAb .....125
7. Analyses statistiques .....125
III. Résultats et discussion .....125
1. Valeur nutritionnelle de *W.frutescens* .....125
2. Extraction, purification et caractérisation physico-chimique du mucilage .....128
3. Isolement et caractérisation structurale des molécules du mucilage .....130
4. Encapsulaltion des huiles essentielles dans une matrice du mucilage .....134
5. Stabilité in vitro et évaluation fonctionnelle d'encapsulation de nanoparticules de mucilage de *Withania frutescens* avec des antibiotiques .....136
6. Docking de la molécule purifiée .....139
IV. Conclusion .....141
**Conclusion générale et perspectives** .....142
**Références bibliographiques** .....145

# Introduction générale

L’aridité du climat est une contrainte à la vie qui revient de plus en plus dans de nombreuses régions du monde en raison du changement climatique global (IPCC, 2007). L'augmentation de la sécheresse a un impact sur la survie des plantes dans les écosystèmes naturels, et entraîne également une réduction des rendements des cultures. Le changement climatique dans les régions semi-arides déclenche des processus de désertification, ce qui peut avoir de graves conséquences si l'on considère que les écosystèmes boisés semi-arides soutiennent une partie considérable de la biomasse terrestre, de la productivité primaire nette et de la biodiversité dans le monde (Atjay, 2007).

Dans la région méditerranéenne, le changement climatique impose une augmentation générale des températures et de l'aridité, couplée à une fréquence accrue d'événements climatiques extrêmes tels que les vagues de chaleur et les gelées hivernales tardives (Diffenbaugh et al., 2005 ; Christensen et al., 2007). Cela représente un défi complexe pour les plantes habitant les écosystèmes de type méditerranéen (Valladares et al., 2008). Et l'augmentation de la période sèche peut affecter le développement des plantes en modifiant la phénologie tout en affectant les caractères biochimique, physiologique et anatomique, car tous les processus biogéochimiques dépendent du climat (Schwartz,1999 ; Morison et Morecroft, 2006).

Les plantes qui subissent plus d'un événement de stress extrême au cours d'une même saison de croissance (Wollenweber et al., 2005), mobilisent l'ensemble de la machinerie métabolique vers l'acclimatation et la survie des plantes (Chaves et al., 2010), permettant ainsi leur persistance dans des environnements difficiles (García et Zamora, 2003). Cette plasticité métabolique est coûteuse, car le carbone et l'énergie fraîchement assimilés sont détournés de la croissance, mais peut représenter un déterminant clé pour la survie des plantes dans le difficile environnement méditerranéen (Pearse et Hipp, 2012).

Depuis l’antiquité, l’homme n’a pas arrêté de chercher ses besoins en puisant dans la nature, il assure non seulement ses besoins nutritionnels mais également médicamenteux. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l’utilisation des plantes médicinales afin d’améliorer la santé des hommes. Aujourd’hui, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés thérapeutiques des plantes et les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l’efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé publique (Belakhedar, 1998).

De nos jours, l’utilisation des plantes médicinales connait un intérêt considérable. En effet, la majorité des médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés de produits naturels (plantes, animaux, bactéries et champignons) (Murray et al., 1991). Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des produits synthétisés par les plantes elles-mêmes. De nombreux métabolites secondaires essentiellement les polyphénols sont des antibiotiques au sens large, car ils protègent les plantes contre les champignons, les bactéries, les animaux et même des autres plantes (Buchanan et al., 2000). L’homme a exploité ces polyphénols qui sont connus pour leurs activités biologiques et qui sont en relation directe

avec la santé de l'être humain. Ces composés phénoliques sont notamment présents comme ingrédients dans plusieurs préparations cosmétiques utilisés dans le traitement du vieillissement cellulaire et la protection de la peau (Menaa et al., 2014).

Généralement, les plantes possèdent des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines...) et des techniques chimiques (extraction, distillation...), permettent l'isolement du principe actif pour l'utiliser en pharmacie. Ces remèdes naturels sont très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (Benmiloud, 2014).

Vu sa position biogéographique avantageuse et son large étendu entre la Méditerranée et l'Afrique subsaharienne, le Maroc est considéré parmi les pays connus pour leur diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition ancienne d'utilisation des plantes. Ce potentiel de plantes médicinales comporterait un millier d'espèces présentant divers intérêts et constituant un axe de recherche scientifique particulier. En effet, le Maroc abrite une flore composée de 7000 espèces végétales (Dahssi. et al., 2004), avec 4800 taxons de plantes vasculaires réparties en 155 familles et 981 genres (Verlaque et al., 2001 ; Fennane, 2018a, 2018b). Ce patrimoine végétal présente un réservoir de ressources médicinales pour la population autochtone, mais soumis à une dégradation dont la surexploitation et la destruction d'habitat. L'augmentation de l'aridité entraine une pression croissante de la population autochtone, réduisant de plus en plus la distribution de ces ressources (Jawhari et al., 2021).

Comment se manifeste l'adaptation des plantes à l'aridité du point de vue morphologique, physiologique et phytochimique? Quelles activités biologiques des espèces emblématiques des zones arides et semi arides? Et comment exploiter ce potentiel au service de la santé? Telles sont les principales motivations de notre thèse.

*Withania frutescens* est une espèce endémique du Maroc, partagée avec la Péninsule Ibérique, les Canaries et l'Ouest de l'Algérie. Cette espèce est largement distribuée au niveau des zones arides et semi arides du Maroc. Dans les zones naturelles aux alentours de la ville de Fès, encore épargnées par l'agriculture, cette espèce est réfugiée essentiellement dans les touffes du jujubier. Il s'agit de connaitre l'adaptation de cette plante dans les zones arides et semi-arides face à une expansion et un déplacement nordique de l'aridité, et d'évaluer ses valeurs thérapeutiques par des différents tests biologiques et chimiques.

Notre thèse s'appuie sur une approche pluridisciplinaire, réalisée pour la première fois sur cette espèce médicinale élite, par la caractérisation physicochimique du milieu naturel, l'étude de la variabilité phytochimique des polyphénols totaux, la multiplication de l'espèce. Et la valorisation pharmacologique et environnementale de sa composition phytochimique.

Le document est structuré, hormis l'introduction et la conclusion, comme suivant :

- Chapitre 1 : Des connaissances sur la biodiversité et l'aridité mondiale, et présentation de la région d'étude. Des rappels sur les plantes médicinales et les

différentes méthodes d'extraction, d'analyse et d'études de certaines activités biologiques des substances bioactives. Présentation de l'espèce sélectionnée, basée sur des données botaniques, écologiques et chimiques.

- Chapitre 2 : Présentation de la zone d'étude et caractérisation topographique, bioclimatique et pédologique des zones sélectionnées. Etude la variabilité morpho-écologique, suivi annuel de la variation des polyphénols totaux et identification phytochimique des composés phénoliques. Caractérisation morphométrique, histométrique des parties de la plante (feuilles, tiges, racines et graine) et multiplication par germination et par bouturage de l'espèce.
- Chapitre 3 : Evaluation des activités biologiques des extraits de la plante (Extraits des feuilles et extrait des racines), en commençant par le test *in vitro* (antioxydant, antimicrobien) suivi par le test *in vivo* (toxicité, antiinflammatoire, cicatrisante et antidiabétique).
- Chapitre 4 : Evaluation de des activités biologiques et anticorrosive des huiles essentielles de *W.frutescens*, en commençant par l'extraction et l'identification par GC-MS, suivi par une évaluation du pouvoir antioxydant, antimicrobien et insecticide. Evaluation du pouvoir électrochimique par l'activité anticorrosive.
- Chapitre 5 : Evaluation des potentialités nutritionnelles de la plante et application pharmaceutique du mucilage pour l'encapsulation des huiles essentielles et des antibiotiques. Détermination de la valeur nutritionnelle de la poudre des feuilles et des racines. Extraction et purification des mucilages et étude de sa stabilité et de son efficacité. Encapsulation des huiles et des antibiotiques dans la matrice des mucilages purifiés, et évaluation de l'efficacité suivie par une étude moléculaire (docking moléculaire).

# Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

## I. Introduction

La Terre est dotée d'une riche variété de formes de vie, et les millions d'organismes vivants qui y abondent sont bien liés par les lois de la nature. L'interdépendance des diverses formes de vie, depuis les producteurs primaires unicellulaires jusqu'aux plantes et animaux supérieurs à la structure complexe, est une caractéristique unique de cette planète verte (Pullaiah et al., 2015). Cependant, on constate un déclin alarmant des habitats naturels et des espèces au cours des dernières décennies. Nous pouvons considérer le présent comme l'époque d'une catastrophe de la biodiversité (Canadell et Noble, 2001 ; Rankou et al., 2015). Ce problème est principalement le résultat de l'activité humaine, notamment la surutilisation et la dégradation des ressources naturelles, la fragmentation et la contamination de l'écosystème, et l'introduction d'espèces invasives. En gérant les ressources biologiques de manière optimale et durable, par la mise en place de mesures multidisciplinaires et transversales impliquant les gestionnaires, les scientifiques et les populations locales, la conservation et la valorisation s'avère être la stratégie essentielle pour ralentir cette dégradation (Pullaiah et al., 2015).

## II. Définition et intérêt de la biodiversité

Aujourd'hui encore, 80 % des habitants des pays en développement dépendent des médecines traditionnelles. On estime que plus de 25 % de tous les médicaments disponibles aujourd'hui sont dérivés de plantes tropicales. Plus de 40 % de tous les produits pharmaceutiques disponibles aux États-Unis proviennent de sources naturelles. En 1960, un enfant contractant une leucémie avait une chance sur cinq de survivre (Pullaiah et al., 2015). A cela, s'ajoutent les avantages indirects de la biodiversité qui comprennent le piégeage des nutriments, le maintien des cycles de l'eau, la production et la protection des sols, l'absorption et la décomposition des polluants, la fourniture de services récréatifs, esthétiques, scientifiques, etc. Ces services écologiques sont encore largement sous-estimés dans le monde et davantage dans les pays en développement à écosystèmes fragiles (Pullaiah et al., 2015).

## III. Biodiversité et changement climatique

Des études ont été consacrées à la manière dont la biodiversité répond aux pressions climatiques, mais les informations sur les mécanismes par lesquels la biodiversité s'adapte au changement climatique, en particulier les limites de cette adaptabilité, sont encore rares et mal comprises. La vitesse des mécanismes d'adaptation potentiels doit, bien entendu, être compatible avec la durée des chocs individuels du changement climatique. Il s'agit là d'un aspect crucial (Sandra et al., 2017). En outre, il contient des informations sur les enregistrements historiques couvrant les cent dernières années et des délais géologiques de l'ordre d'un million d'années. Il devient plus facile d'identifier les changements climatiques à des échelles de temps de 1 000 ans (le dernier optimum climatique médiéval), 10 000 ans (la déglaciation la plus récente) et 100 000 ans (cycles glaciaires de Milankovic), ainsi que certains des changements correspondants dans la biodiversité (Davis et al., 2003). Les échelles de temps auxquelles se produisent les changements majeurs sont un élément crucial du changement climatique, mais elles sont difficiles à détecter et nécessitent l'apport d'autres

disciplines. L'objectif fondamental est de rassembler les connaissances disponibles dans cet environnement multidisciplinaire et d'évaluer le degré d'adaptation de la biodiversité au changement climatique (Sandra et al., 2017).

## 1. Diversité des écosystèmes

Une variété d'habitats écologiques, dont les forêts, les prairies, les zones humides, les écosystèmes côtiers et marins et les écosystèmes désertiques, se sont développés en raison de la grande diversité des qualités physiques et des conditions climatiques, et ces habitats abritent et soutiennent une énorme biodiversité (Sandra et al., 2017). Un écosystème forestier, par exemple, est une unité forestière naturelle composée de tous les éléments biotiques (êtres vivants) locaux, tels que les plantes, les animaux et les micro-organismes, ainsi que de tous les éléments abiotiques (non vivants). Il existe différents systèmes de classification et niveaux de spécificité pour les forêts. L'un d'eux est le "biome" dont elles font partie. Une autre distinction consiste à déterminer si les forêts sont principalement composées de feuillus, de conifères (feuillus qui portent des aiguilles) ou d'une combinaison des deux (Sandra et al., 2017).

## 2. Evolution des écosystèmes

La biodiversité est à la base du développemnt durable. En effet, les ressources et les avantages que les civilisations humaines tirent des écosystèmes, que ce soit directement ou indirectement (nourriture, fibres, quantité et qualité de l'eau, etc.), ont un impact significatif sur leurs activités et leur prospérité (stabilisation des sols, prévention des inondations, régulation du climat, biodiversité comme source d'innovation agronomique, biomédicale et biotechnologique...) (Diamond, 2005 ; Sandra et al., 2017).

Le développement des activités économiques et l'augmentation de la population mondiale depuis la "révolution industrielle" ont entraîné une pression humaine accrue sur les écosystèmes et la biodiversité. Cette pression s'est traduite par la destruction et la fragmentation importante de nombreux habitats (forêts tropicales humides, mangroves, zones humides, etc.). De même, l'introduction délibérée ou involontaire d'espèces végétales invasives par l'homme, et le prélèvement direct de plantes ont entrainé des extinctions locales et globales d'espèces et des pertes de diversité génétique (Leadley et al., 2014).

## 3. Déplacement des aires de répartition de la biodiversité

En fonction des frontières géographiques et de l'adéquation des circonstances environnementales (notamment celles liées au sol et au climat) à leur physiologie unique, les membres d'une espèce se dispersent spatialement à la surface de la Terre. Afin de maintenir des conditions avantageuses pour leur survie et leur reproduction, les individus se disperseront différemment si ces circonstances changent (Sandra et al., 2017).

L'aire de répartition géographique prospective d'une espèce est une représentation de sa niche biologique à l'échelle mondiale. La niche écologique, qui était à l'origine décrite comme l'ensemble des conditions environnementales dans lesquelles les membres d'une espèce sont capables de vivre et de se reproduire indéfiniment, désigne désormais l'ensemble des traits (comme la capacité maximale d'une plante à résister au gel) qui permettent aux membres

d'une espèce de vivre et de se reproduire dans un ensemble particulier de conditions environnementales (Higgins et al., 2012).

Au cours du siècle à venir, les conditions climatiques qui favorisent la survie de chaque espèce continueront à se déplacer vers les pôles et vers le haut. Par conséquent, les climats aux frontières faisant face aux tropiques deviennent défavorables à la survie des espèces, tandis que les climats aux marges faisant face aux pôles le deviennent (Saltré et al., 2004).

## IV. Biodiversité marocaine et changement climatique

En termes de biologie et de biogéographie, le Maroc est l'une des nations les plus uniques. En raison de la diversité de ses écosystèmes, qui comprennent plus de 36 écosystèmes, dont celui de l'arganeraie, que l'UNESCO a désigné comme réserve de biosphère, et de sa diversité bioclimatique, qui se caractérise par un climat humide dans le Haut et le Moyen Atlas et le Rif, subhumide et semi-aride dans les plaines. Avec un taux d'endémisme global de 11% pour la faune et de plus de 20% pour les plantes vasculaires, il abrite plus de 24 000 espèces animales et 7 000 espèces végétales différentes (Benabid, 2000). La déforestation, l'urbanisation chaotique, l'agriculture intensive, le surpâturage, la surexploitation des ressources, la pollution et l'insuffisance du contrôle législatif exercent une pression importante sur la biodiversité marocaine, entraînant une raréfaction irréversible de nombreuses espèces.

### 1. Biodiversité du Maroc

En ne considérant que les espèces végétales, le Maroc est l'une des nations à forte biodiversité. Avec 4800 espèces de plantes vasculaires (Verlaque et al., 2001) réparties en 155 familles et 981 genres (Fennane, 2018a, 2018b, 2018c, 2018d, 2018e, 2018f, 2017a, 2017b, 2017c, 2016), dont environ 800 espèces strictement endémiques (Dobignard et Chatelain, 2013), 1600 taxons estimés rares ou menacés (Fennane et Ibn Tattou, 1999), la richesse (HCEFLCDH, 2015). La répartition géographique des taxons, endémiques et rares au Maroc, démontre l'importance des massifs du Haut Atlas, du Moyen Atlas, du Rif et de l'Anti-Atlas pour la diversité floristique. Le Haut Atlas du Toubkal, le Haut Atlas du Mgoun et le Moyen Atlas oriental sont les régions les plus importantes et les plus menacées, et représentent l'un des points chauds de la biodiversité du bassin méditerranéen (Fennane, 2004). Tout en sachant que les plaines fertiles sont presque globalement envahies par l’agriculture et l’urbanisation.

En vertu de l'abondance, de la diversité, de l'endémisme extraordinairement élevé et de l'unicité de sa flore, le Maroc vient en deuxième position après la Turquie dans le bassin méditerranéen, une région avec une flore remarquablement abondante et distinctive à l'échelle mondiale (Clearing House on Biodiversity of Morocco, 2009). La distribution et le statut de conservation des plantes et des habitats, cependant, sont souvent insuffisants malgré leurs nombreux avantages. En raison de leurs valeurs multiples écologique, scientifique, alimentaire, économique, thérapeutique, culturelle ou sociale, ces ressources biologiques ont le potentiel de contribuer de manière significative à la prospérité de la nation dans une variété de secteurs.

## 2. Situation climatique nationale

Le Maroc est un pays d'Afrique du Nord qui se situe entre deux zones climatiques, tempérée au nord et tropicale au sud. Les observations climatiques faites sur le Maroc au cours des dernières décennies montrent que le climat semi-aride se déplace vers le nord du pays. Le rapport du GIEC mentionne fréquemment l'augmentation de la température moyenne annuelle, la fréquence et la sévérité des périodes de sécheresse, l'apparition d'inondations inhabituelles dues à la perturbation des précipitations saisonnières, la réduction de la durée des chutes de neige en montagne et la modification de la répartition spatiale et temporelle des précipitations comme effets du changement climatique sur l'environnement. Ces observations ont été constatées au Maroc au cours des dernières décennies, selon tous les observateurs climatiques marocains. Elles sont toujours vérifiables même si elles sont passées d'une forme cyclique à une forme structurelle. Le Maroc présente des vulnérabilités inhérentes à sa situation géographique, à sa topographie et à son couvert végétal, notamment une répartition spatio-temporelle irrégulière des précipitations qui vont de plus de 2000 mm par an sur les reliefs du nord à moins de 25 mm par an dans les plaines désertiques du Sud. Et les observation climatiques ont montré qu'il y a une progression du climat semi-aride vers le Nord (Figure 1) (Second national communication, 2010 ; Räisänen et al., 2004 ; Füssel, 2007 ; Janpeter et al., 2012).

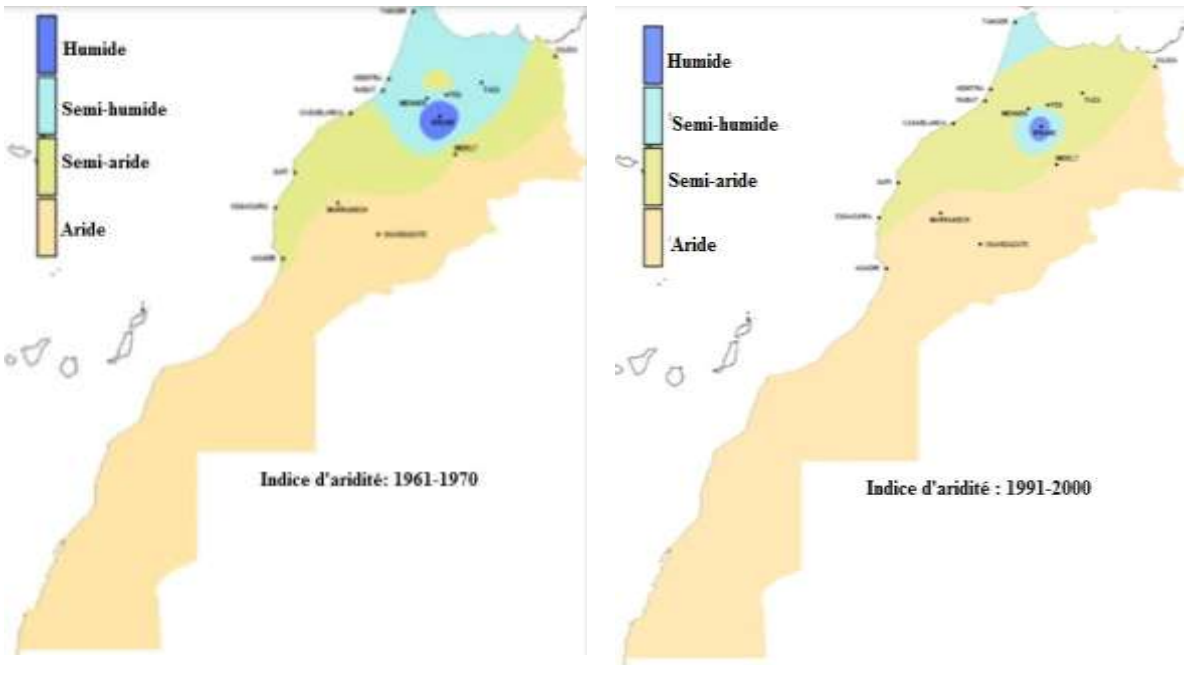



**Figure 1**: Cartes de l'aridité aux périodes 1961-1970 et 1991-2000 (Second national communication, 2010)

## 3. L'écosystème Marocain

L'écologie naturelle au Maroc est affectée par une variété de facteurs, dont certains sont causés par l'homme et d'autres sont liés au climat et aux anomalies climatiques dans la région. L'écosphère au Maroc est particulièrement vulnérable à cause des activités humaines telles que le surpâturage, la coupe inappropriée de bois de chauffage, la fourniture de branches au

bétail pendant les périodes sèches, et la collecte de glandes pour l'usage humain (Füssel, 2007 **;** Second national communication, 2010).

Les principales espèces d'arbres qui composent la forêt marocaine sont dispersées dans tout le pays en fonction des besoins écologiques spécifiques de chacune. Ainsi, les espèces des zones subhumides, humides et perhumides sont appelées à se rétrécir pour laisser la place à des espèces plus résistantes au stress et à la sécheresse, tandis que les zones arides et semi-arides sont appelées à s'étendre pour fusionner avec la zone saharienne, qui constitue l'aire de l'Acacia radiana et de l'arganier avec leur cortège. Il s'agit de permettre aux espèces indigènes qui ont évolué pour survivre à la sécheresse et au stress hydrique de se déplacer et de s'établir dans des biomes jusque-là inexplorés. Dans ce contexte, les méthodes de sélection végétale, de reforestation, de sylviculture et de gestion sont particulièrement importantes dans les zones sèches (Second national communication, 2010).

En plus des impacts déjà remarqués du changement climatique sur l'écosystème, les activités humaines exercent également une pression importante et soutenue. Les massifs forestiers, par exemple, qui détiennent une grande part de la biodiversité marocaine, ont été visiblement très affectés par ces activités avec de nombreux arbres matures qui meurent. Ce phénomène de dépérissement devient de en plus fréquent, auquel s'ajoute l'absence de régénération. Pour cette raison, la forêt marocaine est considérée comme étant dans un état statique, voire une forêt fossilisée (Benabid, 2000).

## 4. Etat de la biodiversité de la région d'étude : Fès-Meknès

Fès-Meknès se trouve au centre géographique du Maroc Nord, entourée des régions de Tanger-Tétouan-Al Hoceima au nord, de Rabat-Salé-Kenitra à l'ouest, de l'Oriental à l'est, et de Beni Mellal-Khenifra et Draa-Tafilalet au sud. Ses 40,075 kilomètres carrés de superficie représentent 5,70 % de la superficie totale du Maroc. La nouvelle division administrative compte douze régions, dont celle-ci est la troisième. Elle est divisée en deux préfectures (Fès et Meknès) et sept provinces (Boulemane, El Hajeb, Taza, Taounate, Sefrou, Ifrane et Moulay Yacoub) (Fig.2). Cependant, le réseau hydrographique de la région, sa topographie variée et son extraordinaire richesse florale et faunistique soulignent son grand potentiel écologique et sa diversité (Direction générale des collectivités locales, 2015).

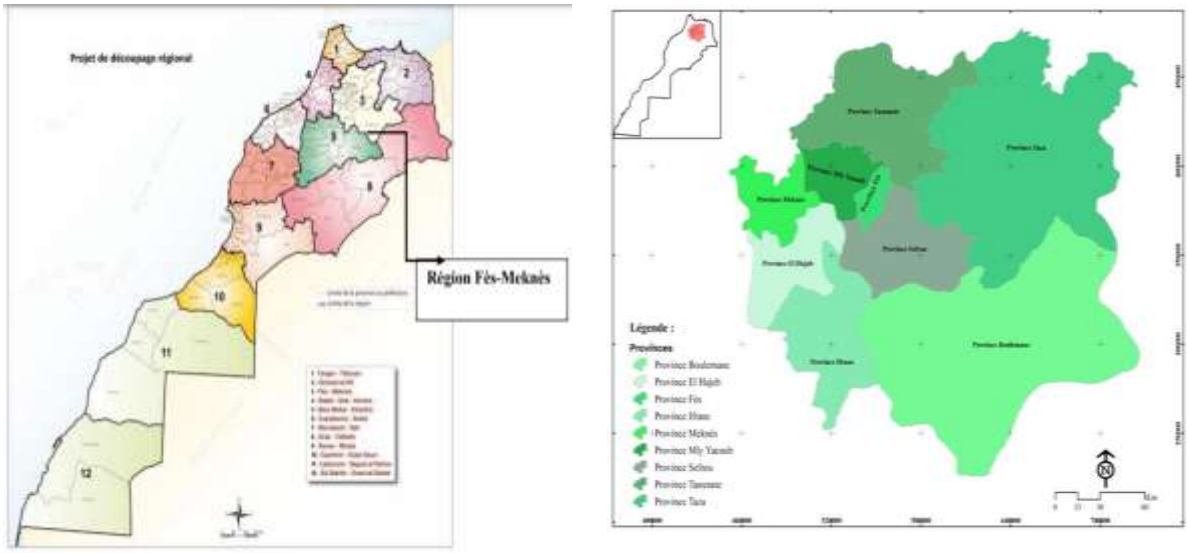



**Figure 2**: Carte de situation et de découpage Communal de la région Fès-Meknès (Direction générale des collectivités locales, 2015).

## 5. Géographie et géomorphologie de la région

Les disparités géographiques à l'intérieur de la région introduisent des distinctions importantes au niveau de la pluviométrie dont on peut distinguer les zones humides qui sont celles qui reçoivent un volume de précipitations assez important. La région de Fès-Meknès présente plusieurs étages bioclimatiques comme le bioclimat continental, très chaud en été, froid en hiver, le bioclimat humide et subhumide à hiver froid et le bioclimat semi-aride à hiver froid.

Les données climatiques disponibles sur cette zone, montrent que la zone autour de Fès est caractérisée par un climat semi-aride avec une saison sèche de 5 à 6 mois et une pluviométrie annuelle moyenne inférieure à 500mm. Dans les deux stations météorologiques considérées (Fès Saïss et Fès Direction Régionale de l'Hydrogéologie) la pluviométrie annuelle moyenne est de 504 mm (en considérant 30 années d'observations avec un maximum de 788 mm et un minimum de 199 mm) et 392 mm (en 21 ans d'observations avec un maximum de 565 mm et un minimum de 186 mm) respectivement, avec une période estivale aride de près de 6 mois (Akdim et al., 2013 ; Waele et al., 2004).

La température annuelle moyenne pour la station de Fès-Saıss (dans l'intervalle 1978-1992) est de 16,6 °C, avec une variation thermique moyenne d'un peu plus de 16,4 °C entre le mois le plus froid (janvier, 9,3 °C) et le mois le plus chaud (juillet, 25,7 °C), déterminant une évapotranspiration de 390 mm selon la méthode de Thornthwaite, représentant environ 87% de la pluviométrie moyenne annuelle (Waele et al., 2004).

Les précipitations les plus élevées enregistrées au cours de l'intervalle 1914-2000 à la station météorologique de Fès étaient de 85 mm en une journée, 145,1 mm sur trois jours consécutifs et 161,1 mm sur cinq jours consécutifs. Une analyse statistique des précipitations journalières de cette région selon la méthode de Gumbel et Fuller-Coutagne (Arisci et al., 2000 ; Moisello, 1998), a montré des intervalles de récurrence de 10 ans pour des précipitations de 61 mm, 110 mm et 125 mm, respectivement, en un, trois et cinq jours, et 50 ans pour 73 mm, 133 mm et 154 mm pour les mêmes intervalles (Waele et al., 2004).

## 6. Situation climatique de la région d'étude

Les disparités géographiques à l'intérieur de la région introduisent des distinctions importantes au niveau de la pluviométrie dont on peut distinguer les zones humides qui sont celles qui reçoivent un volume de précipitations assez important. La région de Fès-Meknès présente plusieurs étages bioclimatiques comme le bioclimat continental, très chaud en été, froid en hiver, le bioclimat humide et subhumide à hiver froid et le bioclimat semi-aride à hiver froid.

Les données climatiques disponibles sur cette zone, montrent que la zone autour de Fès est caractérisée par un climat semi-aride avec une saison sèche de 5 à 6 mois et une pluviométrie annuelle moyenne inférieure à 500mm. Dans les deux stations météorologiques considérées (Fès Saïss et Fès Direction Régionale de Hydrogéologie) la pluviométrie annuelle moyenne est de 504 mm (en considérant 30 années d'observations avec un maximum de 788 mm et un minimum de 199 mm) et 392 mm (en 21 ans d'observations avec un maximum de 565 mm et un minimum de 186 mm) respectivement, avec une période estivale aride de près de 6 mois (Akdim et al., 2013 ; Waele et al., 2004).

La température annuelle moyenne pour la station de Fès-Saıss (dans l'intervalle 1978-1992) est de 16,6 °C avec une excursion thermique moyenne d'un peu plus de 16,4 °C entre le mois le plus froid (janvier, 9,3 °C) et le mois le plus chaud (juillet, 25,7 °C), déterminant une évapotranspiration de 390 mm selon la méthode de Thornthwaite, représentant environ 87% de la pluviométrie moyenne annuelle (Waele et al., 2004).

Les précipitations les plus élevées enregistrées au cours de l'intervalle 1914-2000 à la station météorologique de Fès étaient de 85 mm en une journée, 145,1 mm sur trois jours consécutifs et 161,1 mm sur cinq jours consécutifs. Une analyse statistique des précipitations journalières de cette région selon la méthode de Gumbel et Fuller-Coutagne (Arisci et al., 2000 ; Moisello, 1998), a montré des intervalles de récurrence de 10 ans pour des précipitations de 61 mm, 110 mm et 125 mm, respectivement, en un, trois et cinq jours, et 50 ans pour 73 mm, 133 mm et 154 mm pour les mêmes intervalles (Waele et al., 2004).

## 7. Etat de la biodiversité de la région d'étude

Dans la région de Fès-Meknès, Les formations forestières sont composées d'essences très hétérogènes, souvent claires et à structures très diverses ; ces formations sont en majorité domaniales et s'étendent sur une grande surface de la région. La Cédraie occupe les zones de montagne dans le Moyen Atlas et le Rif, Les Chênaies occupent les plaines et piémonts de montagne.

Par rapport à l'ensemble du territoire national, la végétation spontanée de la région est à peu près égale au nombre total de familles recensées au Maroc, avec une grande variété d'endémisme (Jawhari et al., 2020). En plus de la flore vasculaire, il existe plusieurs espèces de lichens, de champignons, d'algues et de mousses. Cependant, plusieurs facteurs mettent à mal cet héritage, tels que le surpâturage, la surexploitation, la pollution, etc. Ces menaces entraînent la raréfaction voire l'extinction des espèces, ainsi qu'une détérioration souvent irréversible des écosystèmes.

Des études récentes sur la biodiversité ont montré que la répartition des espèces végétales dépend à la fois des facteurs climatiques à l'échelle régionale et des facteurs

microclimatiques et édaphiques à l'échelle locale. Le taux global d'endémisme est élevé, il diffère d'une zone à l'autre sur cette région, tel que la zone de Moyen Atlas (Ifrane /Azrou/ Imouzzer Kandar) est riche en espèces endémiques (19%), suivi par la zone Moyen Atlas (Bou nacer) qui comprend un taux d'endémisme global d'ordre de 18% et ensuite Moyen Atlas (Tazekka) avec un taux d'ordre de 17%. ce qui s'explique par le fait que ces localités font partie d'une zone de biodiversité montagneuse clé au Maroc (Jawhari et al., 2020).

La répartition de la flore strictement endémique dans la région de Fès/Meknès révèle la très haute valeur biogéographique du Moyen Atlas comme principale source d'endémisme (Jawhari et al., 2020). Cette richesse en espèces s'explique par la position géographique et la diversité de ses habitats qui résulte d'une hétérogénéité climatique et édaphique. Ainsi la proportion des différentes catégories de types biologiques est variable (Dernegi 2010).

## V. Plantes emblématiques dans les zones arides et semi-arides

La sécheresse et l'augmentation de la température de la surface de la terre associées au changement climatique sont susceptibles de poser des défis sociaux et économiques importants. Comprendre les impacts de ces changements sur les producteurs primaires tels que les plantes, et leur valeur en tant que capital naturel, sera crucial pour concevoir des mesures visant à réduire les conséquences négatives des perturbations climatiques. Une multitude d'adaptations à la chaleur et au stress hydrique se sont développées chez les plantes emblématiques des zones arides et semi arides, pour réguler le métabolisme et la reproduction dans des environnements limités en eau (GIEC, 2007 ; Mora et al., 2015).

### 1. Valeur des plantes emblématiques du climat aride et semi-aride

La diversité taxonomique et géographique des plantes emblématiques représente une riche ressource de plantes pré-adaptées à la sécheresse. Les études ethnobotaniques des flores arides ont montré que ces plantes sont appréciées pour un éventail d'objectifs (Hodgson, 2015 ; Neuwinger, 1996 ; Nobel, 2010 ; Van Wyk & Gericke, 2000).

Le contexte géographique a également joué un rôle dans la sélection des plantes pour le commerce. Les distributions quasi cosmopolites ont probablement été influencées par leur présence native à proximité de centres commerciaux accessibles autant que par leurs propriétés souhaitables (Grace et al. , 2015). La valeur économique des plantes adaptées aux zones arides augmentera probablement dans les scénarios de changement climatique prévus (Mora et al., 2015).

Les régions à forte richesse en espèces emblématiques coïncident avec des endroits où la vulnérabilité socio-économique au changement climatique est la plus grande, et la flore indigène dans ces zones qui se chevauchent assumera probablement une plus grande importance à des fins aussi diverses que le carburant, le fourrage, le contrôle de l'érosion et d'autres services écosystémiques, et peut-être en inspirant l'innovation dans le stockage et la gestion des ressources en eau. Néanmoins, les environnements arides et semi-arides sont suffisamment similaires pour que de nombreux taxons utilitaires succulents introduits soient économiquement viables, mais aussi pour avoir un avantage concurrentiel qui a entraîné de graves problèmes de plantes envahissantes. En effet, les plantes succulentes qui ont été largement distribuées au-delà de leur aire de répartition naturelle sont économiquement

viables car elles partagent des adaptations physiologiques avec la flore indigène (Drenovsky et al., 2012; Meinzer, 2003).

## 2. Évolution d'une ressource diversifiée dans le climat aride et semi-aride

Les plantes emblématiques sont fréquentes dans les milieux où l'absorption d'eau est régulièrement limitée par un déficit hydrique causé par la sécheresse ou le gel, l'accumulation de sel et l'acidité du sol, et où les plantes sont exposées à de fréquentes sécheresses physiologiques (Schimper, 1903). Des flores arides et semi-arides riches avec un endémisme élevé au niveau des espèces se trouvent également à Madagascar, au Nord d'Afrique, dans la péninsule arabique, dans les Andes centrales, dans l'est du Brésil, au Mexique et dans les déserts Nord-Amérique, ce qui entraîne des affinités floristiques distinctives (Barthlott, 2015 ; van Wyk & Smith, 2001 ). Par exemple, la famille des Didiereaceae est typique de la forêt épineuse sèche de la pointe sud de Madagascar, alors que les Cactaceae sont largement représentées dans les Amériques et les euphorbiacées sont répandues en Afrique et dans les Amériques (Gibson, 1996 ; Hernandez-Hernandez et al., 2011 ; Hommes, 2017 ; Ward, 2009 ; van Wyk & Smith, 2001).

## 3. Durabilité et conservation des plantes dans les zones arides et semi-arides

Le risque majeur pour la réalisation du potentiel des plantes en tant que capital naturel est que la demande ne peut pas être satisfaite de manière durable. Les zones de grande diversité chevauchent plusieurs points chauds de la biodiversité mondiale où des communautés entières des plantes sont collectivement vulnérables à l'extinction (Myers et al., 2000). La perte d'habitat et la récolte non durable pour le commerce sont les principales menaces pour les plantes (Grace, 2011; Oldfield, 1997). Le nombre d'individus produits par les pépinières commerciales dépasse le nombre extrait de la nature pour certains groupes des plantes, mais la pression continue sur les populations naturelles, due à la perte d'habitat ainsi qu'au prélèvement pour le commerce, suggère que la demande continue de dépasser l'offre. Il existe donc des opportunités de culture commerciale de plantes pour soutenir la demande (Oldfield, 1997).

Dans le contexte de la dynamique de l'offre et de la demande, les évaluations de la conservation sont essentielles pour des mesures éclairées visant à préserver la disponibilité de la diversité naturelle en tant que ressource pour l'avenir. Afin de maximiser les opportunités de développement des ressources végétales pour la résilience au changement climatique conformément à la convention sur la diversité biologique (CDB), l'accessibilité doit être équilibrée par rapport aux avantages équitables convenus pour toutes les parties prenantes, y compris le secteur de la conservation. En effet, les menaces affectent des communautés entières de plantes avec des traits et des préférences de niche similaires (Cody, 2015 ; Purvis et al., 2000). Des changements importants dans la diversité des plantes emblématiques et la composition floristique ont été détectés à la suite du surpâturage et de la sécheresse (Vetter, 2009).

## 4. Adaptation des plantes emblématiques aux changements climatiques

Les variations de température, d'intensité lumineuse et d'humidité ne sont que quelques-uns des dangers climatiques auxquels les plantes sont confrontées au quotidien. Des recherches approfondies sur un petit nombre d'espèces modèles démontrent que, dans des limites spécifiques, la plupart de ces plantes peuvent s'adapter à ces variations sur de courtes périodes. La prédiction de la réponse potentielle de la biodiversité végétale à un changement climatique durable pourrait commencer par une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires qui permettent ces adaptations. En particulier pour les facteurs impactés par le changement climatique, comme la température, les plantes sont plus dépendantes de leur environnement que les animaux. Par conséquent, l'optimisation de mécanismes qui s'excluent mutuellement est la clé de l'adaptation des plantes au changement climatique :

- Optimisation de la forme de la plante : selon l'environnement, peut avoir un système racinaire de 1 à 4 et une architecture allant d'une tige unique à un buisson, avec une variété de tailles des feuilles. La quantité totale de photosynthèse augmente avec l'accroissement de la surface foliaire, mais aussi la quantité d'eau et de nutriments consommés (Tardieu, 2012).
- Optimisation du cycle de croissance des plantes. Les différents types de plantes annuelles ont des cycles de vie différents, allant de quelques semaines à une année entière, et il y a beaucoup de variations dans les gènes, même au sein d'une même espèce. Moins le cycle dure longtemps et plus il y a de temps entre les cycles, moins les plantes sont susceptibles d'être stressées par des déficits en eau ou en chaleur (Amigues et al., 2006).
- Maximiser l'efficacité des transferts " eau-dioxyde de carbone ". Les stomates, minuscules ouvertures dans les feuilles, se ferment sous régulation hydro-passive et hormonale lorsque la plante subit un déficit hydrique (Brodribb et MacAdam, 2011).
- Améliorer le rapport "reproduction/ production". L'avortement qui se produit après la floraison est une adaptation qui aide les plantes à générer moins de graines qui germeront (Brodribb et MacAdam, 2011).

## 5. Les effets thérapeutiques des plantes emblématique : Propriétés biologiques

Les plantes présentent des avantages majeurs, notamment celui d'être les sources alternatives de médicaments les plus efficaces et les moins chères. L'utilisation locale de produits naturels issus de plantes comme remèdes de santé primaires, en raison de leurs propriétés pharmacologiques, est assez courante en Asie, en Amérique latine et en Afrique (Bibitha et al., 2002). La perception des pharmacopées populaires a changé et les scientifiques ont commencé à voir dans les plantes plus qu'une source de substances simples que l'on peut isoler, étudier et même reconstituer par synthèse ; elles sont aussi une source de mélanges complexes (essences, extraits totaux, gommes, résines, etc.) que l'industrie chimique ne pourra jamais simuler complètement (Bellakhdar, 1987).

Et la présence de constituants phytochimiques dans les plantes médicinales les rend utiles pour guérir ainsi que pour traiter les maladies humaines (Yahaya et al., 2017). Les composés phytochimiques sont des composés naturellement présents dans les plantes

médicinales (Wadood et al., 2013). De grandes populations du monde, en particulier dans les pays en développement, s'appuient sur le système traditionnel de médecine pour traiter diverses maladies (Yahaya et al., 2017).

### 5.1. Métabolites secondaires

Face aux restrictions biotiques (attaques de phytopathogènes) ou aux contraintes abiotiques (changements climatiques et environnementaux), les métabolites secondaires des plantes semblent jouer un rôle important dans la réponse de la plante à son environnement. Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires n'ont aucun rôle dans l'expansion des êtres vivants. Certains d'entre eux, comme la lignine et les flavonoïdes, sont partagés par toutes les plantes terrestres.

#### 5.1.1. Alcaloïdes

Il existe de nombreux types d'alcaloïdes, ce qui rend cette classe de composés naturels très importante (Muniz, 2006). Plus de dix mille alcaloïdes ont été identifiés dans les plantes depuis la découverte du premier alcaloïde (la morphine) dans l'opium en 1806 (Louis, 2004 ; Hesse, 2002). Les effets physiologiques des alcaloïdes sont souvent assez puissants. Dans la plupart des cas, il s'agit de poisons végétaux très efficaces conçus pour provoquer un certain effet. Ils sont plus efficaces lorsqu'ils sont administrés sans altération, et leur valeur ne peut être certifiée que par un médecin (Volak et al., 1983).

#### 5.1.2. Composés terpéniques

Monoterpènes sont les constituants les plus simples des terpènes. Ils sont issus du couplage de deux unités isopréniques. Ce sont les éléments habituels des huiles essentielles HE, de structure irrégulière, ils participent à la formation des pyréthrines et à la composition de certaines HE d'Astéracées ; cyclisés en méthylcyclopentanes, ils constituent les iridoïdes. Si l'on connaît une quarantaine de squelettes monoterpéniques, la grande majorité des structures décrites se rattache à un petit nombre d'enchainements de base issus du couplage tête-à-queue de deux unités en $C_5$ en diphosphate de géranyle.

#### 5.1.3. Polyphénols

##### 5.1.3.1. Tanins

Les tanins sont des substances chimiques ayant une activité biologique (Djemi, 2009). Les tanins ont une fonction biologique dans les plantes en raison de leur capacité à repousser les insectes et les herbivores et à lutter contre les maladies fongiques et bactériennes (Peronny, 2005). Les plantes supérieures distinguent souvent deux types de tanins, les tanins hydrolysables et les tanins condensés, qui sont distincts par leur structure et leur origine biogénétique. Les deux principales fonctions de ces éléments sont l'hémostase et la défense antimicrobienne (Diallo, 2005).

##### 5.1.3.2. Coumarines

C'est dans la fève tonka (*Dipteryx odora* Willd., Fabaceae) que la coumarine a été découverte pour la première fois en 1820, et son nom familier, "coumarou", a inspiré le mot "coumarines". En première approximation, les coumarines peuvent être considérées comme des lactones d'acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques, ce qui correspond à la formule chimique des

coumarines. Les plus simples des plus de mille coumarines identifiées peuvent être trouvées dans de nombreuses espèces végétales différentes. Les composés les plus complexes se trouvent dans les groupes d'angiospermes Fabaceae, Asteraceae, et notamment Apiaceae et Rutaceae (Bruneton, 2009).

5.1.3.3. Flavonoides

Toutes les sortes de plantes contiennent des flavonoïdes (Ghedira, 2005). Ils sont presque toujours solubles dans l'eau, et ils sont responsables de la coloration des fleurs dont la force d'attraction facilite la pollinisation entomophile. Pour assurer la protection des tissus contre les effets néfastes des rayons ultraviolets B, on trouve également des flavonoïdes dans la cuticule et dans les cellules épidermiques des feuilles. En outre, ils peuvent contribuer à la résistance des plantes aux maladies. Parce qu'ils partagent un ancêtre biosynthétique, tous les flavonoïdes ont un composant structurel fondamental, la chaîne 2-phénylchromane (Bruneton, 2009). Ils sont souvent ingérés sous forme de fruits, de légumes et de liquides. Ils constituent une classe d'environ 6 000 substances chimiques naturelles que l'on peut trouver dans pratiquement toutes les plantes vasculaires (Ghedira, 2005).

5.1.3.4. Saponosides

On trouve dans les plantes une vaste classe d'hétérosides appelés saponosides. La dissolution de ces substances dans l'eau produit des solutions mousseuses (Rachid, 2013), démontrant leurs caractéristiques tensioactives. Les applications multiséculaires des plantes qui en contiennent sont basées sur leur activité de surface (Bruneton, 2009). Chimiquement parlant, ils se distinguent par l'union d'un radical glucidique (glucose, galactose) et d'un radical aglycone (volak, 1983).

## 5.2. Méthodes d’extractions des composés phytochimiques

### 5.2.1. Huiles essentielles

Lorsqu'il s'agit d'extraire des molécules à des fins thérapeutiques, l'hydrodistillation est sans aucun doute le meilleur procédé chimique, le plus rentable et le plus utilisé. Cependant, il arrive que cette méthode présente de sérieux problèmes (bruneton, 1999), dont le plus important est la possibilité de discriminer les molécules les plus volatiles par dégradation thermique ou hydrolyse. La procédure en deux étapes est simple et ne nécessite aucun équipement spécialisé pour être reproduite en laboratoire. Les molécules aromatiques contenues dans le matériel végétal sont emportées dans les vapeurs de l'eau qui s'évapore lorsque le flacon contenant le matériel végétal est chauffé. L'eau se condense dans un refroidisseur et est récupérée dans un Erlenmeyer où l'HE et l'eau aromatique (hydrolat) sont séparés en deux phases distinctes (Farhat, 2010).

### 5.2.2. Extraits bruts

Les différents produits chimiques d'une combinaison ont des solubilités différentes dans le solvant utilisé dans la procédure d'extraction. Les fluides liquides et supercritiques peuvent être utilisés comme solvants, selon l'état de la combinaison. Les produits végétaux à haute valeur ajoutée peuvent être extraits à l'aide de diverses méthodes. Ces méthodes peuvent être

classées en deux catégories : traditionnelles (utilisées depuis longtemps) ou de pointe (nouvellement créées) (Penchev, 2010).

## 5.3. Méthodes d'analyse des composés phytochimique

### 5.3.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance est une technique d'analyse quantitative, qualitative et séparative. Sa grande précision permet la recherche de traces, elle agit de manière très précise sur la sélectivité selon la composition de l'éluant et le choix de la colonne (Rouessac et al., 2004). Les constituants du mélange sont recueillis, identifiés et dosés en fonction de leurs vitesses d'adsorption et de désorption à l'aide d'un détecteur couplé à la colonne chromatographique à la sortie de la colonne, qui aboutit à son tour à un tracé représentatif de constituant (pic) en fonction de leur temps de rétention (Panaiva, 2006). Elle est surtout adaptée à l'analyse de composés thermosensibles, de haut poids moléculaire, de polarité élevée et peu ou non volatils. La technique est à la fois flexible et abordable. Elle offre des avantages utiles tels que la validation des instruments et la gestion des données. La chromatographie phase liquide haute performance présente une large gamme d'applications dans les domaines pharmaceutiques, biochimiques, alimentaires...etc.

### 5.3.2. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique qui permet de séparer et d'analyser les molécules organiques d'un mélange complexe. Elle s'applique principalement aux molécules aisément vaporisables et thermiquement stables. Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur. Il existe plusieurs types de détecteurs ; le détecteur le plus utilisé pour l'analyse des composés organiques est le détecteur à ionisation de flamme (FID). C'est un détecteur universel qui permet la détection de la majorité des substances organiques. La combustion des produits organiques, séparés dans la colonne capillaire, produit des ions carbones détectés par les électrodes où ils créent un courant d'ionisation. Ce courant est amplifié, transformé et enregistré dans une station de traitement des données. Il est important de noter que les surfaces des pics obtenus sont proportionnelles aux concentrations des produits dans le mélange.

### 5.3.3. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge traite de l'enregistrement de l'absorption des rayonnements dans la région infrarouge du spectre électromagnétique qui se subdivisent en région infrarouge ordinaire 2,5 -15 μ qui est la plus pratique pour les organiciens, La région proche infrarouge 0,8 -2,5 μ, et la région lointaine infrarouge 15-200 μ (Ndinga, 2015). L'analyse fournit des renseignements sur les groupes fonctionnels de la molécule. Ainsi que, la confirmation de l'identité des composés organiques et le suivi des réactions. Par conséquent, le spectre infrarouge d'un composé est appelé son empreinte digitale car chaque composé possède un motif d'absorption unique dans la région d'empreinte digitale située au-dessous de 1500 $cm^{-1}$ (Yadav et al., 2013).

#### 5.3.4. Spectroscopie UV-Visible

L'absorbance d'une solution est évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. A partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, un monochromateur peut produire un faisceau de lumière dont la longueur d'onde est unique et réglable avec précision. L'appareil mesure alors l'intensité I de la lumière qui a traversé un réservoir contenant la solution à examiner, après avoir eu une intensité initiale de $I_0$. L'absorbance à la longueur d'onde spécifiée est la valeur indiquée par le spectrophotomètre (Tomlison, 1963).

### 5.4. Activités biologiques des composés phytochimiques

Lorsqu'il s'agit de prévenir ou de traiter des troubles infectieux, cardiovasculaires, inflammatoires, neurodégénératifs, cancérigènes et autres, les propriétés thérapeutiques des plantes emblématiques ouvrent la voie à leur application en médecine et dans l'industrie pharmaceutique. Les plantes en général, et les huiles essentielles en particulier, constituent l'une des options les plus prometteuses en raison de leur activité antibactérienne et antioxydante lorsqu'elles sont utilisées comme agents préventifs dans l'industrie alimentaire.

#### 5.4.1. Propriétés antimicrobiennes des plantes

En raison de l'augmentation inquiétante du nombre de maladies causées par des microbes résistants aux antibiotiques, l'identification de nouveaux médicaments antimicrobiens suscite un intérêt croissant. L'une des caractéristiques communes des composés phytochimiques est leur action antimicrobienne. De nombreuses recherches ont été menées sur les plantes pour déterminer leurs qualités thérapeutiques en général et leurs qualités antibactériennes en particulier (Chen-S et al., 2009 ; Chen-Y et al., 2006).

#### 5.4.2. Pouvoir antioxydant des composés bioactifs

Pour simplifier, les antioxydants sont des substances chimiques qui, ajoutées à un substrat oxydable à l'état de traces, peuvent réduire considérablement la vitesse d'oxydation, voire l'empêcher complètement. De nombreuses substances, depuis les enzymes dotées de caractéristiques catalytiques spécialisées jusqu'aux minuscules composés solubles dans l'eau ou les graisses, répondent à ce critère fonctionnel. De nombreuses techniques ont été mises au point pour évaluer la capacité antioxydante; néanmoins, les recherches varient considérablement d'une étude à l'autre, ce qui rend difficile la corrélation entre les résultats. La capacité antioxydante ne peut être mesurée de manière fiable *in vitro* ou *in vivo* en raison de la grande variété d'espèces réactives et de processus oxydatifs présents dans l'organisme (Nikie, 2010).

#### 5.4.3. Activité anti-inflammatoire

La réponse inflammatoire est un mécanisme défensif adaptatif qui aide l'organisme à lutter contre les agents pathogènes et autres envahisseurs nuisibles. Ce système défensif déclenche la destruction des envahisseurs, la guérison des tissus blessés et le rétablissement de l'homéostasie. Toutes les altérations cellulaires, vasculaires et humorales qui se produisent

lorsqu'un tissu ou une cellule est endommagé, quelle qu'en soit la cause. Les symptômes varient d'un endroit à l'autre et peuvent aller de la rougeur et de la chaleur à l'œdème et à la fièvre. Situations qui ne se produisent que localement dans les tissus vascularisés, notamment le tissu conjonctif. L'inflammation a deux objectifs : éradiquer l'infection en cause et réparer les dommages qu'elle a causés. Une inflammation persistante, en particulier si elle concerne des lésions très importantes ou un produit chimique au niveau de la santé humaine (Medzhitov, 2008).

#### 5.4.4. Pouvoir antalgique

Un praticien peut être déconcerté par les apparentes contradictions inhérentes aux phénomènes de la douleur. Ce dualisme peut être mis en évidence de plusieurs manières. La douleur est un symptôme, un signal souvent salvateur car il est le premier à attirer l'attention sur un phénomène pathologique ; elle peut aussi, par sa gravité et sa durée, devenir un véritable syndrome, affectant les principales fonctions organiques, et capable d'aggraver l'état du patient. La douleur, d'un point de vue physiopathologique, est transmise par des canaux périphériques et centraux bien définis. Cependant, du point de vue du praticien, l'établissement d'un diagnostic et la mise en œuvre d'une thérapie étiologique sont souvent plus prioritaires. Du point de vue du patient, le soulagement de la douleur est généralement la première et la seule demande (Traoré, 2006).

#### 5.4.5. Propriété cicatrisante

Après une blessure, la peau subit un processus biologique très complexe et dynamique appelé cicatrisation, qui vise à restaurer rapidement l'intégrité et l'homéostasie de la peau. Plusieurs médiateurs solubles (facteurs de croissance et cytokines) collaborent avec de nombreux types de cellules (cellules inflammatoires, endothéliales, sanguines, épithéliales et immunologiques) et interagissent avec la matrice extracellulaire pour assurer une cicatrisation correcte. Trois phases se chevauchant (la phase inflammatoire, la phase épithéliale et la phase de remodelage) ont été traditionnellement identifiées dans la cicatrisation d'une plaie profonde (qui s'étend également au derme) (Martin, 1997 ; Singer et Clark, 1999). L'épiderme reconstruit permet aux chercheurs d'examiner les connexions entre les fibroblastes et les kératinocytes. Cependant, ces méthodes restent complémentaires aux investigations *in vivo*, souvent réalisées avec des souris, en particulier des animaux transgéniques, qui ont permis d'améliorer la connaissance des voies de cicatrisation des plaies ces dernières années (Martin, 1997 ; Singer et Clark, 1999).

#### 5.4.6. Propriété antidiabetique

L'Organisation mondiale de la santé définit le diabète comme une maladie qui dure toute la vie et qui est due soit à une production insuffisante d'insuline par le pancréas, soit à une mauvaise utilisation de l'insuline produite. Lorsque la glycémie est trop élevée ou trop basse, l'hormone insuline intervient. Le diabétique chez une personne jeune, si la glycémie est supérieure à 1,26 g/l (ou 7 mmol/l). L'hyperglycémie, ou glycémie anormalement élevée, est une complication fréquente du diabète non traité et est associée à des dommages à long terme

sur de nombreux systèmes organiques (Adoo, 1974). Certains patients diabétiques, à la recherche d'un médicament abordable, essaient n'importe quelle plante, dont certaines peuvent être antidiabétiques mais à des niveaux qui les rendent toxiques, tandis que d'autres sont trop risquées pour être utilisées comme antidiabétiques (Adoo, 1974).

#### 5.4.7. Pouvoir insecticide

Les extraits et les huiles essentielles ont historiquement démontré leurs activités contre un large éventail de ravageurs grâce à une toxicité aiguë, une répulsion et des potentiels anti-appétissants. Ils étaient traditionnellement utilisés pour protéger les cultures et conserver les denrées alimentaires. Ces dernières années, l'utilisation des huiles essentielles a suscité un intérêt croissant en raison de la sensibilisation accrue des consommateurs à avoir une alimentation saine sans résidus en plus des problèmes liés aux préoccupations environnementales. Ainsi, plusieurs composés actifs de diverses espèces végétales ont été étudiés. Ils pourraient être impliqués dans la découverte et le développement d'insecticides en raison de leur efficacité, de leur biodégradabilité, de leurs modes d'action variés, de leur faible toxicité ainsi que de la disponibilité des matières premières (Neeraj et al., 2017).

## VI. Les plantes emblématiques de la région d'étude : Cas de *Withania frutescens* (L)

La famille des solanacées comporte des espèces médicinales à alcaloïdes dérivés du tropane (Belladone, Datura, Jusquiame, Duboisia, Mandragore), nicotine (*Nicotiana*), gluco-alcaloïdes stéroidiques (*Solanum*), amides rubéfiants (*Capsicum*) et des espèces alimentaires (Pomme de terre, Tomate, Aubergine, Poivron). Un alcaloïde stéroïdien appelé solanine est présent en quantités dangereuses dans toutes les plantes de la famille des solanacées. Même si les baies mûres sont la partie la moins dangereuse de ces plantes, une ingestion accidentelle peut toujours être mortelle. Même les germes et les taches de la pomme de terre contiennent l'alcaloïde solanine. Bien que les feuilles, les tiges et les racines de ces espèces alimentaires contiennent également des alcaloïdes, les parties comestibles (tubercules de pomme de terre, fruits d'aubergine et poivrons) sont exemptes de toxines. Les pommes de terre, les aubergines, les tomates, les piments et le tabac sont tous membres de la famille des Solanaceae, qui compte 147 genres et environ 2 900 espèces. Cette famille est largement répandue dans les climats tropicaux et tempérés, l'Amérique du Sud étant le principal centre de dispersion. Les genres les plus importants sont *Solanum*, qui regroupe à lui seul 1400 espèces, puis, loin derrière, *Lycianthes*, avec 200 espèces, *Cestrum*, avec 175 espèces, *Nicotiana*, avec 100 espèces, *Physalis*, avec 100 espèces, *Lycium*, avec 90 espèces... (Olmstead et al., 2007 ; Olmstead, 1999).

### 1. Caractères généraux des solanacées

Ce sont surtout des plantes herbacées, annuelles, bisannuelles, ou vivaces par des rhizomes pouvant devenir tuberculeux, parfois sarmenteuses et épineux, mais il y a aussi quelques arbustes et petits arbres. Les feuilles, sans stipules, sont alternes, généralement simples, mais parfois profondément lobées et pouvant même être composées-pennées.

L'inflorescence est initialement une cyme bipare, mais pouvant devenir unipare par avortement. De l'élément manquant, reste la bractée, celle-ci peut alors être entrainée, ce qui

fait qu'une fleur peut se retrouver à l'aisselle de 2 bractées en positions perpendiculaires : l'une est dans sa position normal, l'autre, plus grande, provient de la ramification inférieure. Ce développement particulier, propre aux solanacées, a notamment été étudié chez le pétunia. Rarement, cette inflorescence est réduite à une fleur solitaire.

Les fleurs sont régulières mais le genre *Petunia* présente des fleurs légèrement zygomorphes. Elles sont hermaphrodites et pentamères.

Le périanthe est constitué de 5 pétales soudés. Ce calice persiste souvent après la fécondation, entourant la base de fruit à maturité comme chez la Belladone, *Atropa belladonna* L. Il est même parfois accrescent, chez le genre *Physalis*, continuant sa croissance en prenant une teinte orangée (à l'origine du terme de coqueret) et enfermant le fruit dans une sorte de cage, ce qui lui a valu son surnom d' "amour – en cage ".

La corolle présente 5 pétales, soudés en une corolle qui peut prendre différentes formes : rotacée chez les morelles (genre *Solanum*), campanulée chez la Belladone (genre *Atropa*), infundibuliforme chez la Jusquiame (genre *Hyocyamus*) hypocratériforme chez le tabac (genre *Nicotiana*), et exceptionnellement bilabiée chez le genre *Salpiglossis*. L'androcée est en principe isostémone, avec 5 étamines dont les filets sont soudés au tube de la corolle.

Les anthères s'ouvrent habituellement par des fentes. Mais il peut y avoir avortement de l'étamine postérieure dans le cas de fleurs devenues zygomorphes (*Salpiglossis*).

Le genre de *Withania* regroupe 21 espèces dans le monde (Catalogue of Life, 2018 ; NCBI, 2018), dont 3 espèces au Maroc.

- *W.adpressa* Coss.
- *W.adunensis* Vierh.
- *W.aristata* (Ait.) Pauq.
- *W.begoniifolia* (Roxb.) A.T. Hunziker & G.E. Barboza
- *W.chamaesarachoides* (Makino) A.T. Hunziker
- *W.chevalieri* A.E. Goncalves
- *W.coagulans* (Stocks) Dun.
- *W.echinata* (Yatabe) A.T. Hunziker
- *W.frutescens* (L.) Pauquy
- *W.grisea* (Hepper & Boulos) Thulin
- *W.heterophylla* (Hemsl.) A.T. Hunziker
- *W.japonica* (Franch. & Sav.) A.T. Hunziker
- *W.kweichouensis* (K.Z. Kuang & A.M. Lu) A.T. Hunziker
- *W.qaraitica* A.G. Miller & J.A. Biagi
- *W.reichenbachii* Bitter
- *W.riebeckii* Schweinf. ex Balf. fil.
- *W.sinensis* (Hemsl.) A.T. Hunziker
- *W.sinica* (K.Z. Kuang & A.M. Lu) A.T. Hunziker
- *W.somnifera* (L.) Dun.
- *W.sphaerocarpa* F.N. Hepper & L. Boulos
- *W.yunnanensis* (K.Z. Kuang & A.M. Lu) A.T. Hunziker

Les espèces les plus importantes du point de vue médicinal et économique et largement cultivées sont *W. somnifera* et *W. coagulens.*

## 2. Caractères généraux de l'espèce : *Withania frutescens*

Un arbuste qui peut atteindre une hauteur de 2 mètres et dont les branches sont recouvertes de poils épais et laineux, feuilles vertes alternes, pétiolées, glabres ou (surtout chez les juvéniles) pubescentes, le limbe est largement ovale (atteignant 4 x 5 mm), entier, obtus, tronqué à sub-cordé à la base. Espèce à calice campanulé, de 4-8 mm de long, devenant subglobuleux à maturité (avec 5 angles), divisé jusqu'à moins de la moitié en 5 lobules lancéolés aigus (ceux des calices fructifères devenant crochus), et corolle de 8-17 mm de diamètre, Cet arbuste fleurit entre les mois de février et juillet et produit des baies rouges, lustrés, d'un diamètre de 7 à 9 millimètres, enfermés dans un calice (Beniston, 1984). Nous avons observé que dans les milieux secs, cette espèce perd ses feuilles en été qu'à l'arrivée des premières puies automnales, les fleurs et les feuilles apparaissent et cette floraison se prolonge jusqu'à l'arrivée de la période sèche.

### 3.1. Appareil végétatif

La tige centrale est épaisse et solide, et elle se ramifie vers l'extérieur en forme d'étoile. Elle a beaucoup d'implications, et elles sont toutes recouvertes d'un duvet gris. Sa hauteur est flexible, allant de 1,20 à 2 mètres. Les petites feuilles vertes sont alternées, pétiolées, principalement ovales ou pratiquement orbiculaires, entières, obtuses ou arrondies à l'extrémité, et parfois un peu cordées à la base. Une racine pivotante longue et fibreuse. Feuillage caduc en été (Observation personnelle).

### *3.2.* Appareil reproducteur

*Withania frutescens* possède de petites fleurs axillaires pédicellées qui peuvent être jaunes ou vertes. La fleur est actinomorphe, avec 5 étamines et un pistil, et elle peut exister seule ou en petits groupes ; en forme d'étoile ou d'une trompette selon la hauteur à laquelle les pétales sont soudés entre eux. Les pétales et les sépales sont soudés à différentes hauteurs pour produire un tube qui culmine en 5 lobes. Il y a 5 dents sur le calice vert. La fleur est tubulaire, avec 5 lobes parfois en miroir, 5 étamines incorporées, et 1 style Le fruit est une baie (comme chez la tomate) globulaire entourée d'un calice élargi et papuleux (Beniston. 1984).

### 3.3. Taxonomie

Selon la classification phylogénétique, *Withania frutescens* appartient aux taxa suivants :

**Division** : Asteridées
**Règne** : Végétal.
**Embranchement** : Spermaphytes.
**Sous – embranchement** : Angiospermes.
**Classe** : Eudicots.
**Ordre** : Solanales.
**Famille** : Solanacées.
**Genre** : *Withania.*
**Genre/Espèce** : *Withania frutescens*(L)
**Synonyme** : Atropa *frutescens* L.
**Nom arabe** : Bennour, Irram

**Nom berbère** : Tizrhar, Avadiz, Tiremt, teyrat

### 3.4. **Répartition géographique et écologie de *Withania frutescens***

*Withania frutescens* est une espèce endémique du Maroc, partagée avec la péninsule ibérique, les Canaries et l'Ouest de l'algérie Se trouve au niveau des forêts claires, des mattorals, des plaines et des basses montagnes. L'espèce explore les bioclimats aride, semi aride et même subhumide et haute montagne, dans toutes les divisions géographiques du Maroc (Fennane et al., 2007). Elle préfère les sols alcalins et même nitrifiés. Cette espèce vit dans des endroits arides et secs et dans des positions ensoleillées (Bouayed et al., 2019). En général, on la trouve du niveau de la mer à 700 m d'altitude. Cette Solanacée n'a pas forcément besoin d'un sol très riche et très drainé, et demande peu d'humidité et une faible pluviométrie. *Withania frutescens* s'acclimate à tout type de lumière. Cependant, l'espèce préfère un emplacement en plein soleil. Cette Solanacée pousse très bien lorsque la température varie de 10 à 35°C, en dessous, elle pousse beaucoup moins vite.

Au Maroc, cette espèce possède une grande répartition géographique, témoin de sa plasticité écologique (fig.3).

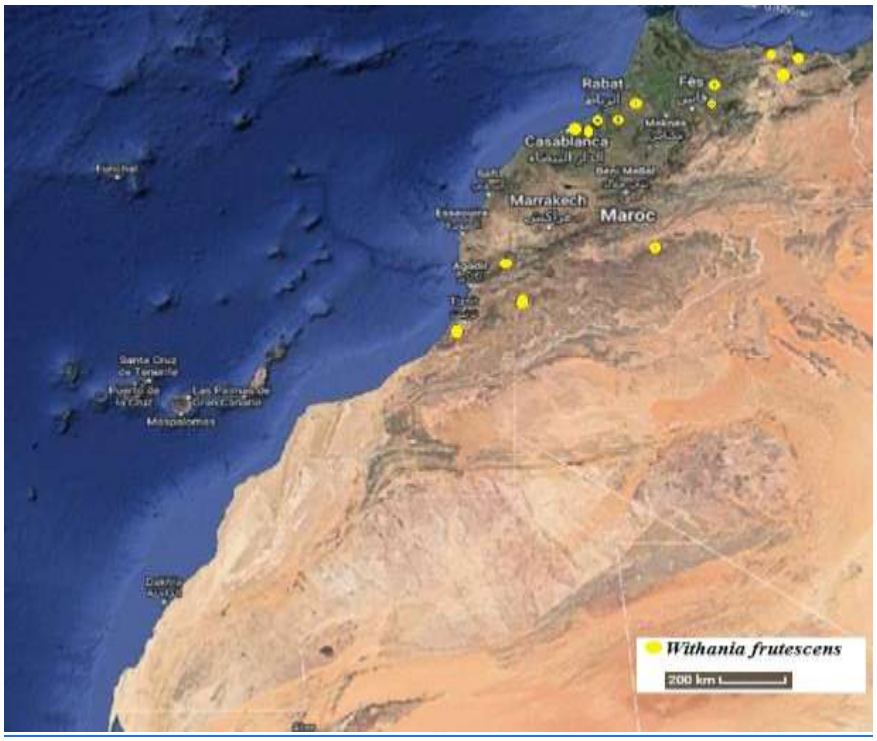



**Figure 3:** Répartition géographique de *Withania frutescens* au Maroc

### 3.5. **Usage médicinal**

Les racines utilisées contre les maux de l'estomac, les feuilles sont utilisées dans le traitement des ulcères (Font Quer, 1990). Le fruit est très diurétique, et mitige aussi la douleur des dents. Le jus de la racine, instillé avec du miel clarifie la vue (Montes, 2004). *W. frutescens* est majoritairement utilisée comme bois de chauffage des fours (Martínez Lirola, 1997), et sert de pâture pour les chèvres (Montes, 2004).

3.6. **Données phytochimiques**

Plusieurs réactions spécifiques opérant dans le temps et l'espace sont responsables de la production de métabolites secondaires dans les plantes médicinales. Aussi, la modification des facteurs environnementaux ou le placement d'une plante en culture tissulaire peuvent également produire un nouveau profil métabolique secondaire, parfois inattendu (Cordell, 2011). Les principaux constituants chimiques de cette plante sont les withanolides principalement localisés dans les feuilles et les racines (Kapoor, 2001).

Les withanolides sont un groupe de lactones stéroïdiennes en C28 construites sur une structure ergostane dans laquelle les C-22 et C-26 sont oxydés pour former un cycle lactone à six chaînons. La structure de base est appelée "squelette de withanolide" (Fig.4) (Tursunova et al., 1977 ; Glotter, 1991 ; Alfonso et al., 1993). Bien que les withanolides soient les principaux composés bioactifs trouvés au niveau de l'extrait de *W.frutescens*, il existe des withanolides spécifiques à chaque espèce du genre *Withania*, comme la Withaferin A, la coaguline et ashwagandhanolide (Subaraju, 2006). Zhao et al. (2002) ont isolé cinq nouveaux dérivés de withanolide à partir des racines avec quatorze composés connus, ils ont également rapporté un nouvel withanolide chloré, 6achloro-5b, 17a-dihydroxywithaferin A (Tong et al., 2011).

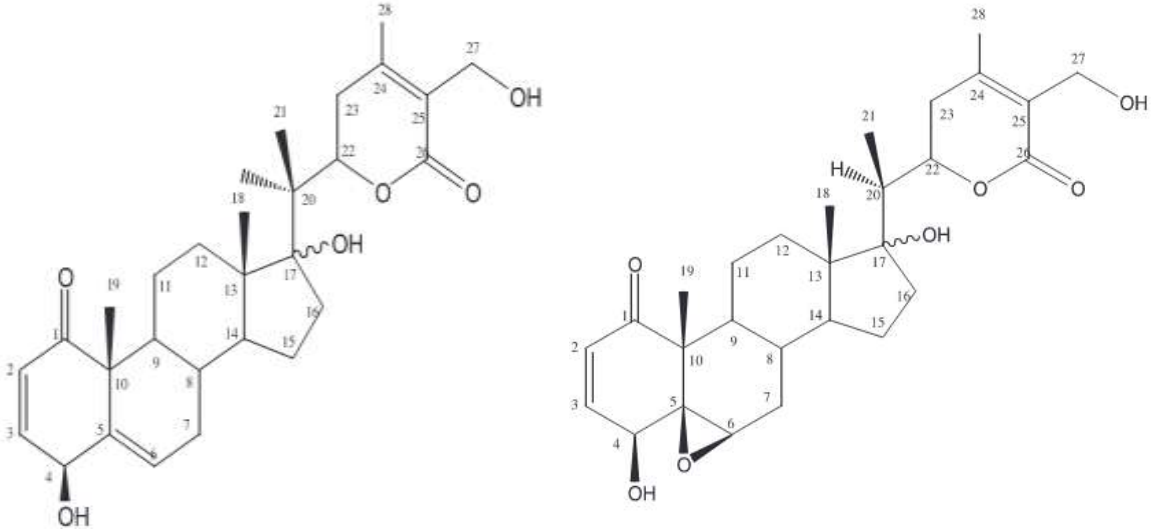


**Figure 4:** Structures des withanolides isolés (El Bouzidi et al., 2013).

## VII. Conclusion

Le changement dans les conditions environnementales à l'échelle mondiale peut agir de manière directe ou indirecte sur la disparition ou la variation de la diversité naturelle, tout en sachant aussi que l'aridité est actuellement en expansion vers le Nord. Le changement du milieu physique (climat) provoque une réduction dans la distribution de certaines espèces végétales face à une nouvelle adaptation. En outre, la surexploitation a conduit à une raréfaction dangereuse de certaines essences à valeur écologique, économique et médicinale. La région Fès/Meknès présente une diversité spécifique et écosystémique remarquable, elle possède des milieux très riches du point de vue floristique. *Withania frutescens* compte parmi les espèces autochtones de la famille des solanacées à grande valeur écologique dans les milieux arides et semi arides. Cette espèce possèderait également des vertus médicinales. C'est l'objet du chapitre qui suit.

# Chapitre 2 : Etude du milieu physique, caractérisation écologique et physiologie d'adaptation de la plante étudiée

## I. Introduction

L'écosystème méditerranéen est considéré comme l'une des zones les plus touchées par le changement climatique global (Benabadji et Bouazza, 2000). Il est donc normal que de sérieux changements se soient produits dans la biodiversité, y compris la dégradation du sol et du couvert végétal (Hassiba. Stambouli-meziane & Mohammed. Bouazza, 2013).

Dans les dernières décennies, la sécheresse vécue dans le nord de l'Afrique a profondément perturbé la couverture végétale, en induisant des phénomènes significatifs de stress hydrique et d'adaptation des plantes et notamment des impacts sur l'équilibre écologique, tels que la dominance, voire l'envahissement des plantes toxiques (Quezel P, 1999 ; Di Ferdinando et al., 2014).

Les plantes sont exposées à de multiples facteurs de stress abiotiques interactifs tels que les températures extrêmes, la sécheresse et le stress hydrique. Ces facteurs de stress pourraient être le résultat du changement climatique mondial. Par conséquent, les événements climatiques extrêmes conduisent à l'aridité et à la dégradation du couvert végétal (Diffenbaugh et al., 2005; Christensen et al., 2007; Valladares et al., 2008). Les conditions écologiques difficiles peuvent représenter un défi complexe pour le développement des plantes (Wollenweber et al., 2005; Valladares et al., 2008). Ces dernières étant fortement influencées par le milieu environnant. Lorsqu'elles subissent des conditions climatiques difficiles, les plantes développent des stratégies d'adaptation. Souvent, la modification des conditions optimales induit une série de changements affectant la morphologie, le métabolisme, la croissance, la nutrition et l'anatomie (Chelli-Chaabouni, 2014).

Le système d'adaptation naturelle peut être défini comme l'une des caractéristiques biologiques qui permettent à une espèce de survivre et de prospérer dans un environnement donné (Atkins et Travis, 2010a). Dans le premier cas, le caractère adaptatif est inscrit dans le génome de la plante et tous les descendants présenteront le même caractère dans la mesure où la reproduction sexuée le permet. Dans le second cas, il s'agit de la capacité naturelle des plantes à survivre dans des conditions environnementales qui peuvent être éloignées de leur optimum écologique. Les contraintes à l'adaptation sont de trois ordres: contraintes climatiques (eau, vent...), contraintes édaphiques (sols salés, sols mobiles...) et contraintes biotiques (compétition, association...) (Malhi et al., 2014).

Ce travail vise à étudier la réponse de *Withania frutescens* (L.) Pauquy aux changements des conditions environnementales en étudiant les facteurs topographiques, climatologiques, morphologiques, histologiques et phytochimiques qui influencent la croissance de la plante.

## II. Matériel et méthodes

### 1. Prospection et étude ethnobotanique de *Withania frutescens*

L'objectif de cette prospection-enquête est de recueillir plusieurs informations concernant la présence de l'espèce, sa reconnaissance par la population locale, son nom vernaculaire, ses modes d'utilisation, son abondance (très abondant, rare ...), et notamment son origine (cultivée, sauvage …). L' enquête ethnobotanique est basée sur une série de collectes réalisées en utilisant un questionnaire préétabli soumis à 141 des personnes, au cours d'un entretien individuel, et pendant la période de floraison de l'espèce aux allentours de la ville de Fès. Durant chaque entretien, les informations sur les personnes questionnées (âge,

niveau scolaire, situation familiale, profession, la partie utilisée, mode d'utilisation…) et sur l'espèce étudiée (Caractères et usages) sont collectées (Annexe). Les données inscrites sur des fiches brutes ont été transférées dans une base de données et traitées par le logiciel de traitement statistique PASW Statistics version 18. (SPSS).

## 2. Caractérisation écologique de la zone d'étude

Le développement d'une plante dans un environnement est lié à la variation de certains facteurs écologiques comme le climat, le sol et la topographie. Et pour caractériser une formation végétale, il est primordial réaliser une étude sur le cortège floristique et identifier les espèces avec leurs types morphologiques et biologiques afin de connaitre la diversité des zones d'études, ainsi que les différents facteurs de perturbation (Ozenda, 1954 ; Greco, 1966).

### 2.1. Description de la zone d'étude

La zone d'étude est située à l'Est Sud Est (ESE) de la ville de Fès au Maroc (Figure 5a et 5b). Elle est caractérisée par la présence d'espèces végétales cultivées et sauvages. 4 stations ont été désignées en fonction de la présence de l'espèce étudiée. La distance moyenne entre les quatre stations sélectionnées est de 5000 m. Les coordonnées, l'altitude et l'exposition de chaque station sont indiquées (Tableau 1).

**Tableau 1**: Coordonnées, altitudes et expositions des stations sélectionnées

| Stations | Coordonnées géographiques | Altitudes | Exposition | Localisation |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 34°01′43″ N ; 4°48′46″ W | 271 m a.s.l. | SW | Zaouit Sidi salem |
| **2** | 34°00′44″ N ; 4°45′09″ W | 542 m a.s.l. | S | Ait jaber |
| **3** | 33°59′57″ N ; 4°45′13″ W | 439 m a.s.l. | S | Zaouit Ras Tbouda |
| **4** | 33°59′39″ N ; 4°47′13″ W | 296 m a.s.l. | SW | Tnine Ras tbouda |

SW: Sud-Ouest; S: Sud; W: Ouest; N: Nord; m.a.s.l: Mètre au-dessus du niveau de la mer.

La zone d'étude s'étend sur un périmètre de plateaux avec peu d'irrégularités et des hauteurs relativement faibles (Figure 5c). La topographie de la zone d'étude a été décrite par le Modèle Numérique de Terrain (MNT), qui a été généré par le MNT du Nord du Maroc et le Modèle Numérique d'Elévation Global ASTER (Figure 5d).

Les résultats du MNT ont révélé que la topographie est un peu accentuée et vallonnée en raison de la nature lithologique de la région. Le MNT a démontré que l'altitude moyenne entre le fond des rivières et les collines environnantes était de l'ordre de 271 m a.s.l. à 542 m a.s.l. La carte des pentes du bassin dérivée du MNT a révélé que la majorité du bassin présente des pentes douces, qui varient entre 6° et 15°. Les pentes les plus fortes sont essentiellement situées dans le réseau hydrographique temporel de la zone d'étude. En revanche, les pentes fortes n'ont été détectées que dans les zones périphériques dotées de réseaux hydrauliques (Figure 5d).

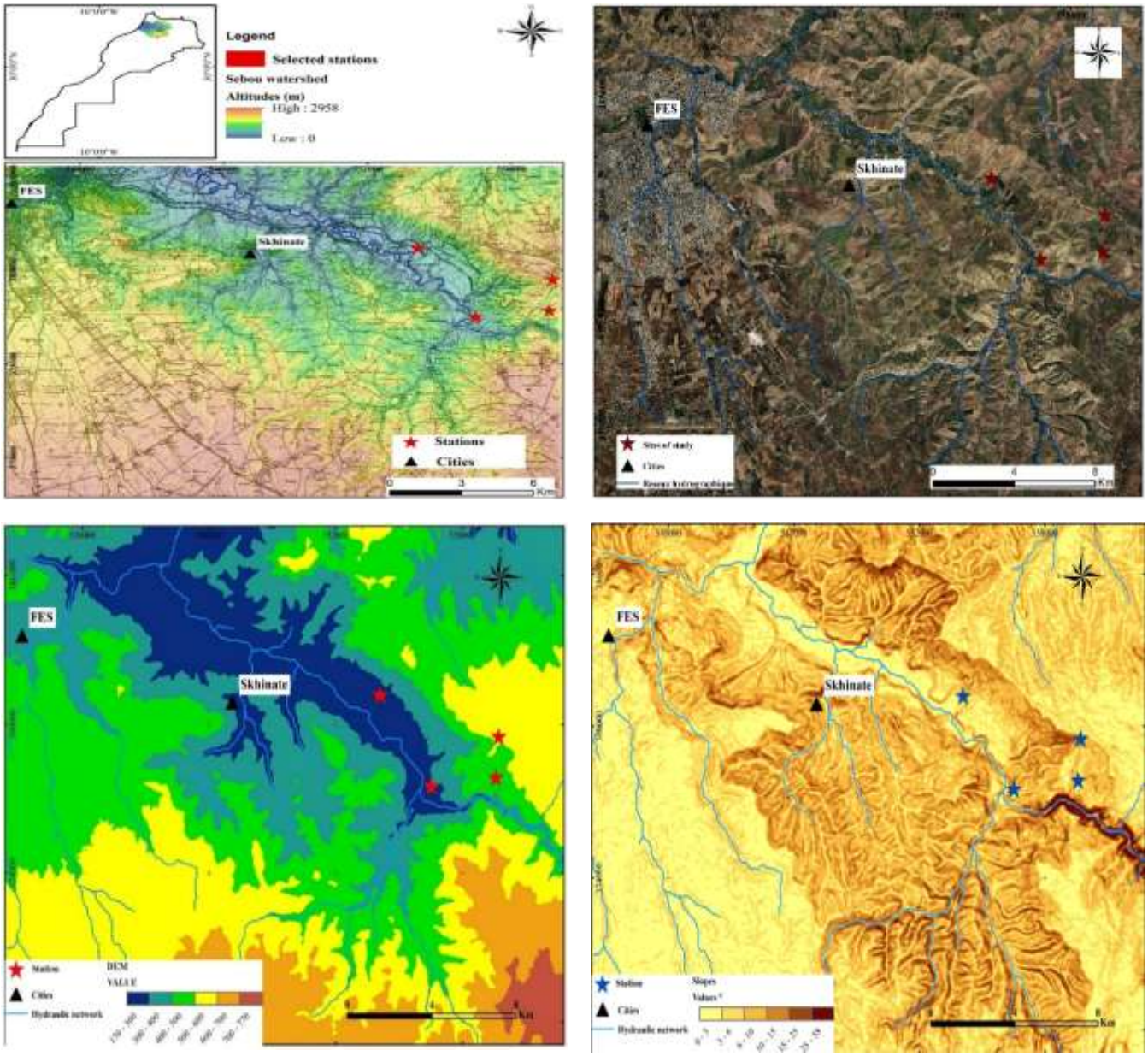



**Figure 5**: Cartes géologiques de la station d'étude (A), carte topographique (B), carte des classes de pente (C) et modèle numérique de terrain (D).

### 2.2. Analyse pédologique du milieu naturel de *W. frutescens*

L'identification des couleurs a été réalisée en utilisant le code Munsell (Ndiaye et al., 2012), le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre. La teneur totale en calcaire du sol et la conductivité ont été mesurées pour déterminer la matière organique du sol (Diallo et al., 2015).

### 2.3. Étude bioclimatique

L'analyse bioclimatique de la zone d'étude a été réalisée durant deux périodes (1960-1970) et (2010-2019). La base de données TerraClimate a été utilisée comme source de données climatiques (Abatzoglou et al., 2018). Les paramètres bioclimatiques (précipitations,

température minimale, maximale…) ont été déterminés à l'aide du diagramme ombrothermique (Bagnouls et H. Gaussen, 1957) (Tableau 2).

L'indice d'aridité permet d'évaluer l'intensité de sécheresse de chaque station d'étude (De Martonne, 1926). Et le climagramme d'Emberger permet de déterminer et localiser les étages bioclimatiques de chaque station d'étude et la relation entre le climat et la végétation (Alcaraz, 1969).

**Tableau 2:** Indice de continentalité, d'aridité et de Quotient pluviothermique et leurs classifications.

| Indice | Formule | Classification | Référence |
|---|---|---|---|
| **Continentalité** | $Am = M\,(°C) - m(°C)$ | Climat insulaire : M-m<15°C<br>Climat littoral : 15°C<M-m<25°C<br>Climat semi-continental :25°C<M-m<35°C<br>Climat continental : M-m>35°C | Debrach (1953) |
| **Aridité** | $I = \frac{P\,(mm)}{T(°C) + 10}$ | Climat très sec (I<10)<br>Climat sec (I< 20)<br>Climat humide (I< 30)<br>Climat très humide (I> 30) | Martonne (1926) |
| **Pluviothermique** | $Q = \frac{200xP(mm)}{M^2(°K) - m^2(°K)}$ | Humides pour Q2> 100<br>Sub-humides pour 25>Q2>50<br>Arides pour 10 > Q2> 25<br>Désertiques (ou saharien) pour Q2< 10 | Emberger (1955) |

Am : amplitude thermique, I : indice d'aridité en mm/°C, M (°C) : moyenne des températures maximales en degré Celsius, m (°C) : moyenne des températures minimales degré Celsius, P : pluviosité moyenne annuelle (mm), $M^2$: moyenne des maxima thermiques du mois le plus chaud en °K (273+ °C), $m^2$: moyenne des minima thermiques du mois le plus froid en °K (273+ °C). Q : quotient pluviothermique d'Emberger.

### 2.4. Cortège floristique

La détermination de la diversité végétale a été réalisée par un inventaire des espèces végétales présentes dans les quatres stations d'étude. L'étude a été basée sur le dénombrement des espèces avec l'identification de leurs types morphologiques et biologiques (El Alalaoui et al., 1999).

## 3. Caractérisation morphologique de l'espèce étudiée

L'étude morphométrique a été réalisée sur 56 pieds sélections dans les quatres stations : 17 individus au niveau de la station 1 (S1) ; 15 individus au niveau de la station 2 (S2) ; 13 individus au niveau de la station 3 (S3) et 11 individus au niveau de la station 4 (S4). Cette étude a été réalisée pendant le mois de Mars où il y une maximum de croissance de la plante dans son milieu naturel. La longueur des tiges et la largeur des touffes de *W. frutescens* ont été mesurées en utilisant les protocoles décrits par Musundire et al. (2012).

### 3.1. Étude morphométrique de *W. frutescens*

L'étude morphométrique a été réalisée sur 56 pieds sélections dans les quatres stations : 17 (S1), 15 (S2), 13 (S3) et 11 (S4). Cette étude a été réalisée pendant le mois de Mars où il y

une maximum de croissance de la plante dans son milieu naturel. La longueur des tiges et la largeur des touffes de *W. frutescens* ont été mesurées en utilisant les protocoles décrits par Musundire et al. (2012).

### 3.2. Analyse histologique des tissus végétaux

Une analyse histologique a été réalisée sur les feuilles, les tiges et les racines de *W. frutescens* afin de déterminer les différents types de tissus présents dans ces organes (HOMS, 1960). Pour cela, nous avons utilisé le vert d'iode pour colorer les tissus lignifiés (Xylème), et le carmin aluné pour colorer les tissus cellulosiques (phloème). Grâce à un examen minutieux au microscope optique, nous avons mesuré l'épaisseur des tissus avec un micromètre à fort grossissement (10x40).

## 4. Techniques de la multiplication de la plante étudiée

Dans la stratégie de conservation, la multiplication par graines est prioritaire pour assurer la diversité génétique des espèces, Toutefois, la multiplication végétative permet d'assurer la survie d'une espèce en créant une descendance génétiquement identique. En effet, contrairement aux animaux et aux humains, les plantes contiennent des cellules méristématiques indifférenciées au début de leur développement, et qui peuvent ensuite se différencier en cellules spécialisées nécessaires à la production des nombreux organes d'une plante en développement. Ainsi, dans des circonstances idéales, un fragment de pousse, une branche, un morceau de racine ou une feuille peut donner naissance à une nouvelle plante possédant la même information génétique que la plante mère (Rambeloarisoa, 2004 ; Kaskins, 1974).

### 4.1. Multiplication par graines

#### 4.1.1. Caractérisation morphologique des fruits et des graines

Les fruits collectés à la surface du sol et les fruits dispersés ont été inspectés visuellement pour la couleur et la forme. Les dimensions des fruits et des graines ont été déterminées avec des pieds à coulisse numériques. Les dimensions des fruits et des graines ont été obtenues à partir d'une moyenne de dix fruits et de 100 graines, respectivement. Pour l'observation de l'intérieur des fruits, ces derniers ont été coupés transversalement et les graines ont été coupées longitudinalement. Des images des fruits et des graines ont été prises avec un appareil photo numérique.

#### 4.1.2. Nettoyage des graines collectés

Les graines matures ont été collectées dans les quatre sites étudiés à partir de 5 à 10 pieds dans chaque zone. Un nettoyage est effectué par passage au tamis, d'abord de maille 3 mm, retenant les grosses impuretés, puis de maille 1 mm, éliminant les poussières et les petites impuretés. Après ce nettoyage par tamisage, l'élimination des dernières impuretés est effectuée manuellement à la spatule puis un rinçage afin d'éliminer les substances recouvrent la graine.

#### 4.1.3. Teneur en eau

La teneur en eau des semences ont déterminé en mesurant à l'aide d'une balance de précision les poids des échantillons frais et desséchés à l'étuve à 45°C pendant 3 à 5 jours (Sanogo et al., 2006; Willan, 1992). Le teneur en eau a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau} = [(Ps-Pf)/Pf]x100$$

Avec Ps : poids sec ; Pf : poids frais.

#### 4.1.4. Test de viabilité des graines

Le test de viabilité des graines a été réalisé au moment de la collecte et après deux mois de conservation à 4°C. Les graines fermes de couleur jaune et sans déformations ont été enregistrées comme saines.

##### 4.1.4.1. Test de flottaison

La solidité des graines a été vérifiée une nouvelle fois à l'aide de la méthode courante des horticulteurs, qui consiste à faire émerger les graines dans l'eau, les graines qui coulent sont considérées comme viables, tandis que celles qui flottent à la surface de l'eau sont considérées comme non viables. Nous avons également confirmé la viabilité de ces graines, en procèdant à la scarification des graines tout en évitant de les endommager, par un trempage dans l'eau de robinet pendant 24 heures, cela permet l'hydratation complète des tissus et de ce fait facilite l'extraction des téguments.

##### 4.1.4.2. Test de tetrazolium (Chlorure de triphényltétrazolium)

Les graines dénudées, rincées à l'eau distillée, sont complètement immergées dans la solution de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) à 0,5%, à une température moyenne de 40° C pendant 24h. Après coloration, les graines sont rincées plusieurs fois à l'eau distillée pour enlever l'excès de colorant. Par la suite les graines sont classées en deux catégories selon leur mode de coloration. Les graines complètement colorées sont viables, alors que les graines non colorées ne le sont pas (Kearns et al., 1993).

#### 4.1.5. Tests de germination des graines

Les différents lots de graines ont été soumises à une prégermination selon différents traitements, qui ont pour but d'éliminer les dormances des semences, par conséquence, faciliter les échanges entre l'embryon et le milieu extérieur et particulièrement, l'absorption de l'eau (Hoareau, 2012; Nivot, 2005). Des lots de 25 graines sont été utilisés pour chaque traitement avec 3 répétitions. Les différents traitements sont les suivants :

- Scarification chimique à l'acide sulfurique (H2SO4) concentré par trempage pendant 1 minutes, après rinçage abondamment à l'eau courante afin de faire disparaître toute trace d'acide (Niang-Diop et al., 2011) ;

- Scarification chimique à l'eau oxygénée (H2O2), en bref, les graines sont trempées sous agitation dans de l'eau tiède (40°C) pendant 1h, puis dans de l'eau oxygénée H2O2 diluée 50% (v/v) pendant 1h, puis dans de l'eau oxygénée pure pendant 20min (Benamar, 2005) ;
- Scarification chimique par une solution de nitrate de potassium (KNO3) à 0,2%, préparée en dissolvant 2 g de KNO3 dans 1 litre d'eau, est utilisée pour humidifier le substrat de germination au début du test (Rao et al., 2006) ;
- Scarification thermique à l'eau chaude (80 °C) qui permet d'enlever la cuticule cireuse des graines (Li et al., 1999) ;
- Scarification au froid, les graines sont ainsi placées sur du sable dans des sachets en polyéthylène fermés, et conservées à 4 °C pendant 15 jours (Rao et al., 2006) ;
- Scarification mécanique, les graines non germées dans tous les tests précédents ont été légèrement incisées, ensuite, elles sont émergées dans l'eau distillée (30°C) pendant 2h.

Avant chaque traitement de prégerminations, le matériel traité est stérilisé dans une solution d'alcool, le but étant d'éliminer les microorganismes potentiellement nuisibles pour la germination. Par la suite, les graines sont placées dans des boîtes de pétri sur du substrat (sol charbonnière et sable) stérilisé à l'étuve (100 °C pendant 1h), et sur des boites de pétri contenant le papier filtre pulvérisé par un antifongique (Fluconazole 0,20%). Les graines sont arrosées avec de l'eau distillée (tous les deux jours) pour maintenir le substrat humide. Une graine est considérée comme ayant germée dès la sortie de la radicule. Les conditions de température et de lumière consistent en une alternance jour-nuit d'une durée de 12 heures chacune ; Les températures varient de 20 à 30 °C.

Pour mieux appréhender la signification physiologique du comportement germinatif des graines de *W.frutescens*, le nombre de graines germées a été compté quotidiennement (Hajlaoui. et al., 2007). Et le taux de germination (TG) a été calculé selon la formule mathématique (Come, 1971) :

$$Tg\ (\%) = (Ng/Ns)*100$$

Où Tg : taux de germination (%); Ng : nombre de graines germées durant le test ; Ns : nombre total de graines semées au début du test.

### 4.2. Multiplication végétative par bouturage

L'enracinement des boutures des tiges est la méthode de multiplication végétative la plus répandue pour les plantes ligneuses (Gaskins et al., 1974). Cette approche peut être utile à des fins de restauration écologique et pour comprendre les processus physiologiques des boutures. En plus de ces normes, il existe deux groupes pour les caractéristiques physiologiques qui contribuent à la difficulté de la germination des graines :

- des raisons internes liées à des problèmes de processus biochimiques pour le développement des fruits et/ou des graines qui ne sont pas complètement achevés.
- des variables externes liées à l'incapacité de maîtriser des processus de germination des graines entièrement viables, comme la difficulté d'obtenir des

graines, un manque de compréhension biologique de la manière de faire germer les graines, et la présence d'agents qui se nourrissent des graines.

### 4.2.1. Collecte et manipulation des boutures

Pour fournir une base génétique diversifiée, par exemple, lors de la restauration d'un écosystème, il est préférable de prélever des boutures à partir d'un groupe d'au moins 10 plantes mères largement espacées dans le peuplement, et idéalement à partir d'une gamme de 10 à 25 plantes mère à chaque station. Pour préserver la totipotence des boutures, elles ont été collectées à la première heure du matin, et le sac a été arrosé toutes les 60 minutes pendant les collectes et sur de grandes distances.

Deux à trois feuilles étaient conservées à chaque coupe afin de s'assurer que les processus métaboliques ne soient pas interrompus. L'épiderme et le cylindre central étaient traités avec soin pour éviter les cicatrices. Pour éviter la décomposition de l'entre-nœud, les coupes ont été terminées à la base d'un nœud. Le fait de couper obligatoirement la moitié supérieure de la coupe à un angle permet de conserver le plus possible les composants métaboliques de la coupe (qui sont nécessaires à son existence) tout au long de la coupe, et empêche également la dessiccation, qui tuerait les coupes (Palanisamy et al., 1998 ; Tousignant, 1995 ; Husen et al., 2006).

### 4.2.2. Traitements et paramètres de mesure

La multiplication végétative basée la viabilité issue des boutures dépend de trois facteurs : la récupération des tissus blessés, la réactivation des bourgeons dormants et le redéveloppement d'organes auparavant inexistants. Trois variables ont donc été maintenues tout au long des observations : le rythme de formation des cals racinaires, le nombre total des bourgeons, et le nombre total des feuilles produites.

### 4.2.3. Substrat

Un bon substrat doit répondre à des exigences telles que la porosité, l'aération et une rétention d'eau maximale. Dans cette recette, on a combiné le sable, le terreau (acheté chez BRICOMA-Fès), et le sol ordinaire avec un pourcentage de 50%, 25% et 25%, respectivement. Pour cette raison, il est préférable d'éviter de planter les boutures dans un sol biologiquement actif, car cela pourrait favoriser le développement de champignons et d'autres infections qui pourraient éventuellement envahir le système racinaire des boutures.

### 4.2.4. Acide Indol Butyrique

L'Acide Indol Butyrique (AIB) fourni par l'institut national de recherche agronomique à Rabat (INRA-RABAT)), a été utilisé comme hormone de bouturage pour favoriser le problème d'enracinement des boutures de *W. frutescens*. L'AIB a été préparé à différentes concentrations d'ordre de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/64, 1/128 à partir d'une solution mère de 10 mg/ml. Chaque bouture a été immergée dans la solution pendant une minute, et 1 ml de solution AIB a été mis dans chaque trou, quatre heures après que le substrat ait été bien

arrosé. Pour éviter la perte des composants liquides de l'hormone, l'arrosage a été retardé jusqu'à 48 heures après la transplantation.

#### 4.2.5. Repiquage et entretien journalier

Un ou deux nœuds ont été implantés dans le substrat lorsque les boutures ont été transplantées. Pour une rétention maximale du contenu, les boutures ont été plantées en biais. La partie la plus haute, entaillée, était inclinée vers la source de lumière. Comme les boutures luttent contre la dessiccation et la transpiration dès qu'elles sont détachées de leur plante mère, l'humidité et la température sont cruciales pour la survie de la bouture. Avec précaution, les boutures ont été arrosées deux fois par jour, le matin et en fin d'après-midi, afin de maintenir un taux d'humidité constant.

## 5. Caractérisation phytochimique de *Withania frutescens*

L'étude phytochimique permet de connaitre les familles phytochimiques (tanins, flavonoïdes, coumarines…), des extraits des feuilles et des racines de *W.frutescens*. Nous avons procédé, dans une première étape à un screening phytochimique afin de déterminer une quantification phénolique.

### 5.1. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique réalisé dans le but de vérifier la présence ou l'absence de quelques composants phytochimiques qui peuvent être présents dans les extraits aqueux de la plante (les feuilles et les racines), nous avons réalisé des tests classiques basés sur des réactions colorimétriques et précipitation par des réactifs chimiques spécifiques. Une forte présence (+++) ; une moyen présence (++) ; une faible présence (+) ; Absence (-).

#### 5.1.1. Tanins

Ajouter 1 ml d'une dilution aqueuse de FeCl3 à 1% dans un tube à essai contenant 1 ml de l'extrait. Les tanins donnent à une substance une teinte vert foncé ou bleu-noir, ou la font précipiter entièrement (Judith, 2005).

##### 5.1.1.1. Tanins catéchiques

Cinq millilitres d'infusion doivent être mélangés à un millilitre d'alcool chlorhydrique concentré bouillant pendant 15 minutes (5 millilitres d'alcool à 95 degrés Celsius, cinq millilitres d'eau distillée et cinq millilitres de HCl concentré). Les tanins catéchiques provoquent la formation d'un précipité pourpre qui se dissout dans l'alcool amylique (Judith, 2005).

##### 5.1.1.2. Tanins galliques

Pour 30 ml d'infusion, ajouter 15 ml de réactif de Stiany (10 ml de formol à 40% et 15 ml d'acide chlorhydrique fort). Pendant 15 minutes, chauffer au bain-marie à 90 degrés Celsius. Eliminer le précipité par filtration, puis ajouter 5 g d'acétate de sodium en poudre jusqu'à saturation du filtre. La solution de FeCl3 à 1% doit être ajoutée goutte à goutte, jusqu'à un total de 1 ml. Des tanins de Gall ont été détectés dans le précipité qui a été recueilli. A

l'aide d'un filtre, récupérer 10 ml de la solution d'acétate de sodium filtrée et diluez-la jusqu'à saturation. Remplacer une petite quantité par 1% de FeCl3. Les tanins galliques non précipités par le réactif de Stiany sont responsables de l'apparition d'une couleur bleu-noir (Judith, 2005).

#### 5.1.2. Flavonoïdes

Ce test a été evalué par le méllange de 5 millilitres d'extrait avec 5 millilitres d'alcool chlorhydrique (éthanol à 95%, eau distillée, HCl concentré à parts égales en volume), 1 millilitre d'alcool isoamylique et quelques copeaux de magnésium. L'existence d'un flavonoïde libre est indiquée par la présence d'une coloration rose-orange (flavones), rose violacé (flavonones) ou rouge (flavonols, flavanonols) dans la couche surnageante d'alcool isoamylique (genin). Les hétérosides flavoniques réduisent l'intensité des taches. Les chalcones, dihydrochalcones, aurones, catéchines et isoflavones présentent tous une réponse négative (Judith, 2005).

#### 5.1.3. Saponosides

##### 5.1.3.1. Stérols et les triterpènes

Après avoir laissé macérer 1 gramme de poudre dans 20 millilitres d'éther de pétrole pendant 24 heures, l'extrait obtenu a été filtré et porté à un volume de 20 millilitres pour être testé. L'extrait contenu dans une capsule de 10 ml doit être laissé s'évaporer jusqu'à ce qu'il soit sec avant d'être dissous dans 1 ml d'anhydride acétique et 1 ml de chloroforme, respectivement. Créez un contrôle en séparant l'un des tubes à essai. A l'aide d'une pipette, déposer un à deux millilitres de H2SO4 concentré au fond du second tube. Un anneau rouge brunâtre ou violet se forme à l'interface entre les deux liquides, et une couche surnageante verte ou violette indique la présence de stérols et de triterpènes (NENEBI et al., 2008).

##### 5.1.3.2. Hétérosides stéroidiques

A 10 ml d'extrait a été séchée, et elle a été mélangée avec 10 ml de chloroforme anhydre, 5 ml d'anhydre acétique et quelques gouttes de l'acide sulfuriques, agité puis laisser reposer. Le développement d'une coloration violacée virant au vert indique la présence des hétéosides stéroidiques (Boukhira, 2017).

##### 5.1.3.3. Tritépèrnes hétérosides

A 5 ml d'extrait ajouter 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique ; une coloration rouge marronne de la couche d'interphase indique la présence des tritépènes hétérosides.

#### 5.1.4. Coumarines

##### 5.1.4.1. Test de détection

Pour 10 ml de chloroforme, on combine 2 grammes de poudre végétale. Les extraits chloroformiques passent en CCM avec un solvant toluène/acétate d'éthyle après avoir été chauffés pendant quelques minutes et filtrés (93:10). En l'absence et en présence de NH3, le chromatogramme est observé à 365 nm (Dohou et al., 2003).

#### 5.1.4.2. Test de confirmation

Un gramme de poudre végétale et quelques gouttes d'eau sont insérés dans un tube. De l'eau bouillante est utilisée pour stériliser le papier qui recouvre les tubes dans du NaOH dilué. Sous une lumière ultraviolette, une fluorescence jaune montre la présence de coumarines (Dohou et al., 2003).

### 5.1.5. Quinones libres

Dans un tube à essai, combiner 15-30 ml d'éther de pétrole avec 1 gramme de matériel végétal sec et pulvérisé. Les extraits sont filtrés et concentrés dans le rotavapor après avoir été agités et laissés seuls pendant 24 heures. Lorsque la phase aqueuse change de couleur, passant du clair au jaune, au rouge ou au violet, avec l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10, l'existence de quinones libres peut être établie (Dohou et al., 2003).

### 5.1.6. Alcaloïdes

De l'acide sulfurique dilué à 1/20 de sa concentration est ajouté à 20 g de poudre. Après 24 heures de macération, le mélange est filtré. Le procédé consiste à introduire 1 ml de filtrat dans un tube à essai, puis à ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer et 5 gouttes de réactif de Dragendorff, respectivement. L'existence d'alcaloïdes peut être établie en les extrayant si un précipité se forme (Dohou et al., 2003).

### 5.1.7. Glycosides cardiaques

Lorsque 2 ml de chloroforme sont ajoutés à 1 ml de l'extrait, la présence de glycosides cardiaques est indiquée par le développement d'une teinte rouge-brun lors de l'ajout de H2SO4 (Mun Fei Yam et al., 2009).

### 5.1.8. Oses et holosides

Lorsque ces produits chimiques réagissent avec l'acide sulfurique, cela révèle leur existence. On ajoute de l'acide sulfurique concentré après avoir évaporé à sec 5 ml de décocté aqueux à 10%. Après avoir attendu 5 minutes, on ajoute 3-4 gouttes d'alcool infusé au thymol. La présence d'oses et d'holosides, indiquée par l'apparition d'une coloration rouge (DIALLO, 2005).

### 5.1.9. Mucilages

Un précipité floconneux se forme lorsque 5 ml d'alcool à 100 % sont ajoutés à 1 ml de décocté aqueux à 10 %, ce qui permet de détecter les mucilages (Diallo, 2005).

## 5.2. Dosage des composés phénoliques

L'extrait hydro-alcoolique a été le meilleur extracteur des composés phénoliques, c'est pour cela l'éthanol et l'eau sont préférables car ils ont l'avantage d'être non polluants, moins chers et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol (Bilić et al., 2010).

#### 5.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu total en polyphénols a été calculé en combinant 100 ml d'extrait végétal (dans du méthanol à 80%) avec 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteau à la concentration de 1/10, 1 ml d'eau distillée et 1,5 ml de carbonate de sodium (Na2CO3). Et après une incubation de 2 heures à température ambiante et dans l'obscurité, l'absorbance à 765 nm a été mesurée tout en maintenant le contrôle négatif de tous les réactifs étant remplacés par du méthanol comme extrait. En utilisant une courbe d'étalonnage de l'acide gallique et une solution mère de 1 mg/ml, le contenu total en polyphénols a été calculé. En utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, les résultats sont rapportés en microgrammes d'équivalent acide gallique par milligramme d'extrait (µg Eq.AG / mg d'extrait) (Singleton et Rossi, 1965).

#### 5.2.2. Dosage des flavonoïdes

500 ul de chaque extrait à tester ont été mélangés avec 1500 ul de méthanol à 95%, 100 ul d'AlCl3 à 10% (p/v), 100 ul d'acétate de sodium 1 M, et 2,8 ml d'eau distillée, puis soumis à la mesure des flavonoïdes totaux selon la technique décrite par Dehpeur et al. (2009). Après avoir été mélangé, le mélange est laissé à fermenter dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Avec un spectrophotomètre réglé pour lire à 415 nm, un blanc est créé en substituant 95% de méthanol à l'extrait. La courbe d'étalonnage de la quercétine est utilisée pour convertir les milligrammes de quercétine en grammes de matière végétale sèche (mg Eq.Q/g).

#### 5.2.3. Dosage de tanins condensés

La technique de la vanilline dans un milieu acide, telle que décrite par Ba et al. (2010), est utilisée pour quantifier les tanins condensés. Le réactif de vanilline a été fabriqué en combinant 8% de HCl, 37% de méthanol et 4% de vanilline dans le méthanol (m/v) dans un mélange volumétrique de volume égal. Avant le test, la combinaison a été maintenue à 30 degrés Celsius. Après l'ajout de 200 l de chaque extrait d'intérêt à 1000 µl de réactif à la vanilline, le mélange a été agité et laissé à incuber à 30°C dans l'obscurité pendant 20 minutes. A l'aide d'un spectrophotomètre, nous avons déterminé l'absorbance à 500 nm en comparant à un blanc de 37% de méthanol et 8% de HCl. En utilisant la courbe de calibration du catéchol, les résultats sont rapportés en milligrammes d'équivalent catéchol par milligramme de matériel végétal sec.

## 6. Variabilité temporelle des polyphénols totaux

Le suivi de la teneur en polyphénols totaux dans le temps a été réalisé en vue de déceler une variabilité qui serait relative à l'adaptation de cette plante en présence d'un stress abiotique. Et que la caractérisation phytochimique des composés phénoliques permettrait de comprendre une adaptation chimique face à une variation des facteurs écologiques.

### 6.1. Variation temporelle de la teneur en polyphénols

Cette partie a été réalisée dans le but d'étudier la variation dans le temps des composés phénoliques totaux au niveau des quatre stations. Les échantillons ont été prélevés au hasard

chaque semaine, et quand la plante commence sa croissance. Ce dosage a été réalisé sur 56 pieds : 17 (S1), 15 (S2), 13 (S3) et 11 (S4).

L'extrait hydro-alcoolique a été préparé par un mélange d'éthanol et l'eau distillé (7/3) dans une concentration de 10% (poids/volume). 500 µL de réactif de Folin (1/10) est ajouté à 100 µl d'échantillon diluée. Après 4 min, 400µL de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 2h d'incubation à la température ambiante, l'absorbance est mesurée par le spectrophotomètre à 760 nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée par l'équation de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique, elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (mg EAG/g E).

### 6.2. Identification des composés phytochimiques

Des feuilles de *Withania frutescens* ont été collectées dans les quatres stations pendant le mois de Mars où il y a un maximum de floraison, l'extrait hydro-éthanolique des feuilles a été soumis à une analyse chimique pour évaluer les effets du microclimat sur la composition phytochimique. Les différentes stations sélectionnées ont été signalées comme ayant des microclimats et des altitudes différents de sorte qu'ils pourraient influencer la composition chimique des plantes étudiées.

L'identification phytochimique de l'extrait des feuilles de *W. frutescens* des stations a été effectuée par GC-MS après silylation par N-méthyl-Ntriméthylsilyl (MSTFA). Brièvement, un total de 3 mg de l'échantillon étudié a été mélangé avec 200 µL de MSTFA avant d'être chauffé à 37°C pendant 30 min. Ensuite, 0,1 µL de l'extrait a été injecté dans un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectrophotomètre de masse (modèle 5973 de la marque Agilent Technologies) pour analyse. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur avec une plage de pression typique (psi) de 0,9 mL/sec. Le programme de température du four a été réglé entre 70 et 270 °C à 4 °C/min, puis maintenu à 270 °C pendant 20 minutes. La température de l'injecteur a été fixée à 280°C et celle du détecteur à 290°C. L'injection a été réalisée en mode fractionné.

### 7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de logicielle de CANOCO version 4.5 et de logicielle de GraphPad prism version 7. Les résultats ont été exprimés en moyennes±SD d'essais triples.

## III. Résultats et discussion

### 1. Enquête sur la répartition et les usages de l'espèce place de *W. frutescens*

L'objectif initial de cette prospection- enquête, au niveau de la zone d'étude, était de recueillir un maximum d'informations sur la répartition de l'espèce afin d'entamer l'étude écologique et de relever ses usages traditionnels. 141 personnes ont fait l'objet de cette enquête.

### 1.1. Profils des informateurs

Les personnes questionnées sont répartis comme suit : une prédominance des personnes âgées de 20 à 30 (35%), un taux de 30% pour la tranche d'âge de 30 à 40 ans, et un pourcentage moins important (12%) des personnes âgées de 40 à 50 ans, alors que les tranches supérieurs à 50 ans ont été les moins importantes (≤10%), (Figure 6).

Concernant le sexe, on constate qu'il y a une prédominance des hommes 65% et un pourcentage de 35% pour le sexe féminin. La population étudiée est composée de 44% de personnes mariées et de 56% des personnes célibataires. Concernant le niveau d'étude, 15% sont non scolarisés, alors que les 85% correspondent à différents niveaux intellectuels (28% primaires, 46% secondaires, 11% universitaires).

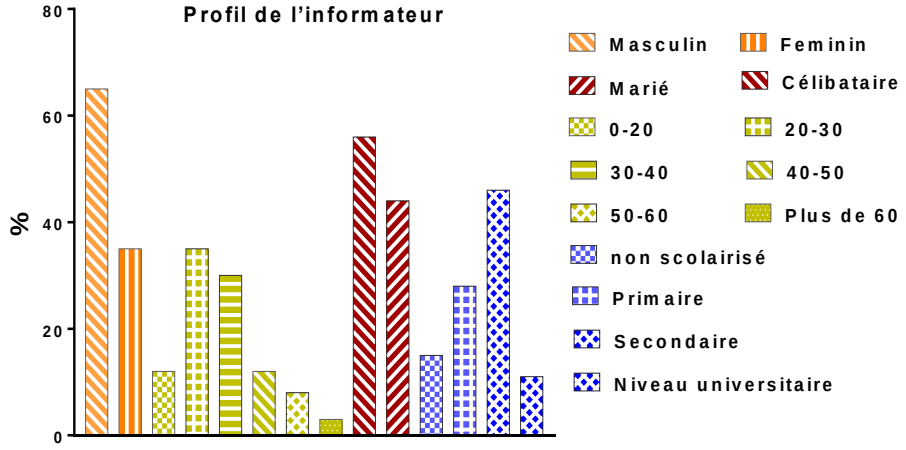



**Figure 6**: Informations sur les profils des informateurs (âge, niveau scolaire…)

### 1.2. Usages de la plante

Concernant l'utilisation de la plante dans la phytothérapie traditionnelle par la population autochtone, 92% de la population questionnée confirment son usage thérapeutique. Les feuilles sont les plus citées (31%) suivies par les écorces (29%) et les racines (24%). Les collectes s'effectuent principalement au printemps (39%), alors qu'elles sont étalées sur les autres saisons avec un faible pourcentage 11% en été. La plante est séchée à l'obscurité (93%) ou elle est exposée à la lumière (6%).

La consommation de la plante est sous forme d'une poudre (42%) ou tisane (10%) et le mode de préparation par infusion (35%) ou par décoction (13%). Les doses citées par la population ont été signalées forme des pincées (62%) ou cuillerée (38%) avec une administration orale (78%) pendant une semaine (86%), Figure 7.

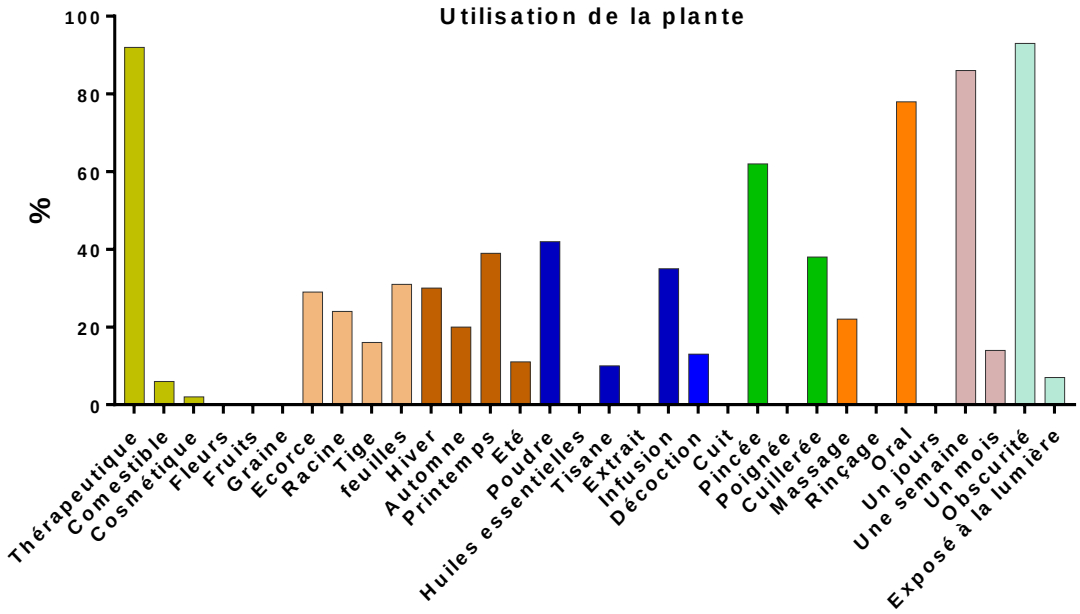



**Figure 7**: Usages de la plante par la population, parties utilisées, période de collecte, modes, posologie et durée d'usage.

### 1.3. Origine et état de conservation de l'espèce

La majorité de la population a signalé que la plante est sauvage (94%) contre 6% cultivée ou préservée en périphérie des parcelles agricoles comme des limites et des barrières naturelles de leurs zones agricoles. Concernant la distribution, (83%) des personnes ont signalé que la plante est rare alors que 17% la qualifient de très rare et localisée uniquement à l'intérieure des jujubiers (Figure 8a).

### 1.4. Types de maladies traitées

Les types des maladies traitées par la population enquêtée sont des infections digestives (73%) comme les intoxications, diarrhée, douleur d'estomac et trouble digestif. certains ont mentionné que la plante est administrée à leurs moutons trois à cinq jours avant l'Aid-Adha afin de nettoyer les organes digestifs de ces moutons. D'autres ont mentionné que la poudre de la plante est présentée aux brebis pendant les trois jours de la mise bas afin de garder une bonne digestion et une bonne période de lactation. D'autre part, la plante a été signalée être utilisée contre des affections neurologiques (17%), la population l'utilise en tisane pour soulager la douleur. Et contre des affections dermatologiques (10%), surtout contre les infections pathologiques ou les inflammations, l'infusion des feuilles a été citée pour soigner les plaies et les blessures. Dans ce cas, la poudre est mélangée avec l'eau tiède pendant quelques heures après une filtration par un tissu à maille fines, la solution est mise au contact des zones infectées pendant quelques jours jusqu'à l'amélioration parfois jusqu'à la guérison définitive.

Il a été déclaré que le résultat du traitement est efficace (87%) dont l'amélioration (50%) et la guérison (37%). Alors que 13% ont déclaré l'inefficacité du traitement par cette plante, Figure 8b.

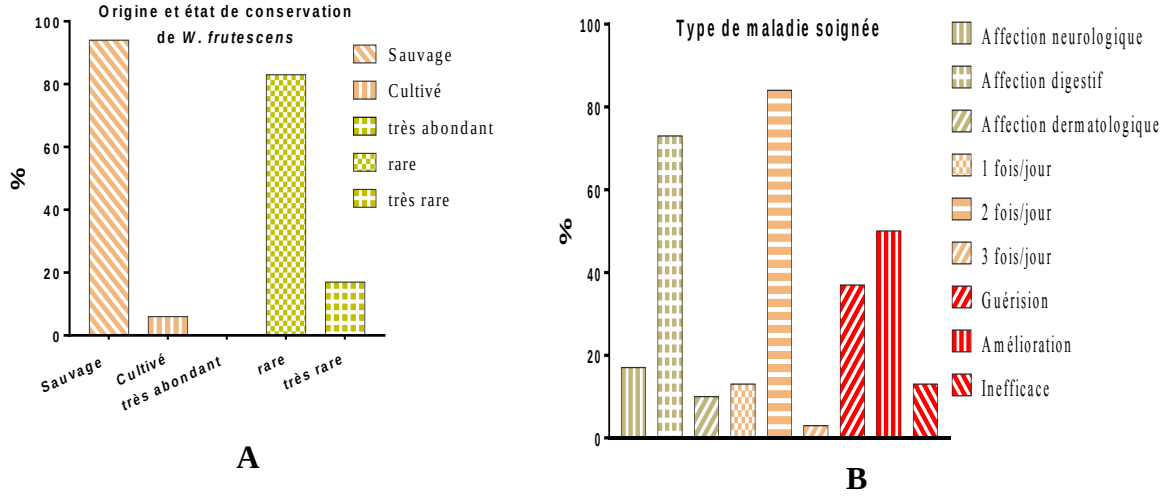



**Figure 8**: Origine et état de conservation (A) et maladies soignés par cette plante (B).

## 2. Caractérisation écologique de la zone d'étude

### 2.1. Étude pédologique

Le sol est la couche supérieure de la terre dans laquelle les plantes se développent, mais chaque espèce vivante a ses exigences en termes de minéraux et d'eau (Gobat et al., 2010). L'analyse de la carte du sol (Figure 9), a montré que *W. frutescens* peut pousser dans quatre types de sols. Dans la première station (A1) avec un apport de lithosol et un vertisol dans la deuxième station (A2). *W. frutescens* a été trouvé dans les stations A3 et A4 qui étaient caractérisées par la présence de sols calcimagnétiques et lithosol, respectivement. De manière générale, les sols des stations étaient très diversifiés avec des caractéristiques physico-chimiques variées. Cette diversité est impactée par la lithologie du substrat géologique, la topographie et les événements météorologiques (climat) (Abdelaziz, 1980).

Dans l'étude actuelle, la texture du sol était limoneuse dans toutes les stations étudiées (Tableau 3). Le calcaire était présent dans les sols des stations d'étude avec une moyenne allant de 10,8 à 15,80 %, ce qui peut expliquer la tendance à l'équilibre physique et chimique. De plus, le Ca joue un rôle prépondérant dans le comportement physique du sol par son pouvoir floculant. Le pH est généralement resté neutre (entre 7 et 7,2). La matière organique, la conductivité électrique et la salinité étaient plus faibles dans ces stations (Tableau 3).

Des études ont montré que la présence de calcaire dans le sol peut provoquer des troubles dans la croissance et la physiologie de la plante par la modification de la teneur de la matière organique totale. Et à cet effet, il y a formation d'une matière organique insoluble (humine), résistante à l'action des micro-organismes et protégée physiquement par la présence de ce minéral et elle peut influencer le pH du sol, sa présence peut augmenter le pH (7 à 8,5), alors le pH devient alcalin à basique dans ce type de milieu (Bussières, 2000). D'autre part, il provoque une oxydation rapide de la lignine ce qui ralentirait sa fragmentation et bloquerait le cycle certains minéraux.

Le Ca peut influencer la granulométrie du sol. Sa forte concentration après une pluie peut former des agrégats durables et il peut être considéré comme facteur limitant pour la formation végétale dans une période où il y un manque de pluie (Tacon, 2001).

**Tableau 3**: Caractéristiques physico-chimiques du sol dans les stations d'étude

| | **S1** | **S2** | **S3** | **S4** |
|---|---|---|---|---|
| **Profondeur du sol** | 0-30 cm | 0-30 cm | 0-30 cm | 0-30 cm |
| **Texture du sol** | Limoneuse | Limoneuse | Limoneuse | Limoneuse |
| **Couleur MUNSELL** | 7,5 YR (5/2) | 7,5 YR (4/2) | 7,5 YR (4/2) | 7,5 YR (4/2) |
| **pH** | 7,035±0,021 | 7,095±0,091 | 7,225±0,077 | 7,175±0,148 |
| **CaCo3(%)** | 13,765±0,473 | 15,75±0,77 | 10,865±0,586 | 10,855±0,60 |
| **Conductivité (µS/cm)** | 0,425±0,106 | 0,625±0,035 | 0,675±0,035 | 0,75±0,141 |
| **Carbone (%)** | 2,165±0,021 | 2,32±0,028 | 2,725±0,035 | 2,5±0,070 |
| **Estimation % de la matière organique** | Moyenne | Moyenne | Moyenne | Moyenne |

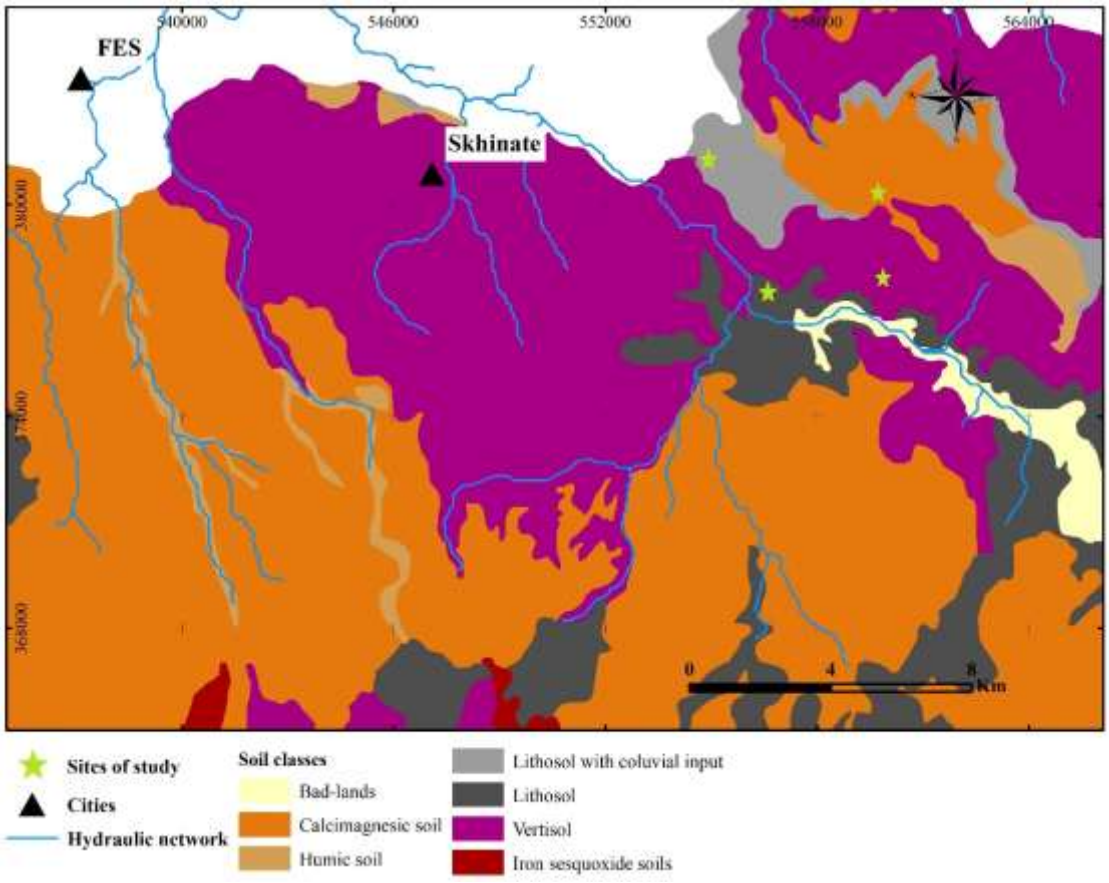



**Figure 9**: Carte géologique montre les différents types du sol dans la zone d'étude.

2.2. **Evolution des conditions microclimatiques**

La classification thermique des climats proposée par Debrach, 1953 (Debrach, 1953), a été utilisée pour réaliser le présent travail. L'amplitude thermique se situait entre 31,60°C à 34,55 °C au cours de l'ancienne période (1960-1970) et entre 32,75 °C à 34.63 °C pour la nouvelle période (2010-2019). Nous avons pu reporter que l'amplitude thermique de toutes les stations a augmenté. Et selon l'indice de continentalité, nous avons constaté que les stations des périodes anciennes (1960-1970) et des périodes nouvelles (2010-2019) étaient soumises à des climats semi-continentaux (Tableau 4). Selon l'indice d'aridité, toutes les zones d'étude appartenaient au régime climatique humide et sec avec l'écoulement temporaire et la formation herbacée.

Les résultats du quotient pluviothermique montrent que les stations appartenaient à l'étage biochmiatique Sub-humide à une température hivernale (H.T ; Sub. H) pendant la période ancienne (1960-1970). Alors que la nouvelle période (2010-2019) montre une aridité. L'étage bioclimatique est devenu Semi-aride (Tableau 4).

Le diagramme Ombrothermique de chaque station reporte en abscisses les mois et en ordonnées les précipitations (en bleu), et les températures (en rouge) avec une échelle de P = 2T. Une période est dite sèche ou une saison aride, si la température est supérieure aux précipitations, ce qui permet de déterminer la durée de la période sèche (Figure 10).

**Tableau 4**: Détermination des synthèses bioclimatiques selon les indices climatiques de continentalité, d'aridité et de rapport pluviométrique dans les quatre stations.

| | | | Indice de continentalité | | Indice d'aridité | | Q2 pluvithermique | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | P | M-m | Type de climat | Indice | Type de climat | Q2 | Etage Bioclimatique |
| **Station 1** | AP | 624.5 | 31.6 | Semi-continental | 20.61 | humide | 67.38 | H, T; Sub, H |
| | NP | 527 | 32.75 | Semi-continental | 16.93 | Sec | 54.71 | H,T; Semi,A |
| **Station 2** | AP | 647.5 | 31.6 | Semi-continental | 21.98 | humide | 70.06 | H, T; Sub, H |
| | NP | 543.5 | 33.5 | Semi-continental | 17.76 | Sec | 55.25 | H,T; Semi,A |
| **Station 3** | AP | 623.5 | 31.75 | Semi-continental | 21.22 | humide | 67.16 | H, T; Sub,H |
| | NP | 526 | 33.55 | Semi-continental | 17.17 | Sec | 53.39 | H,T; Semi,A |
| **Station 4** | AP | 225.91 | 34.55 | Semi-continental | 8.68 | Sec | 20.41 | H, T; A |
| | NP | 294.48 | 34.63 | Semi-continental | 11.38 | Sec | 25.47 | H, T; A |

H, T : température hivernale ; Sub, H : subhumide ; Semi, A : semi-aride ; A : aride ; NP : nouvelle période (2010-2019) ; AP : ancienne période (1960-1970) ; P : précipitations (mm) ; M-m : amplitude thermique (°C) ; Q2 : quotient pluviométrique.

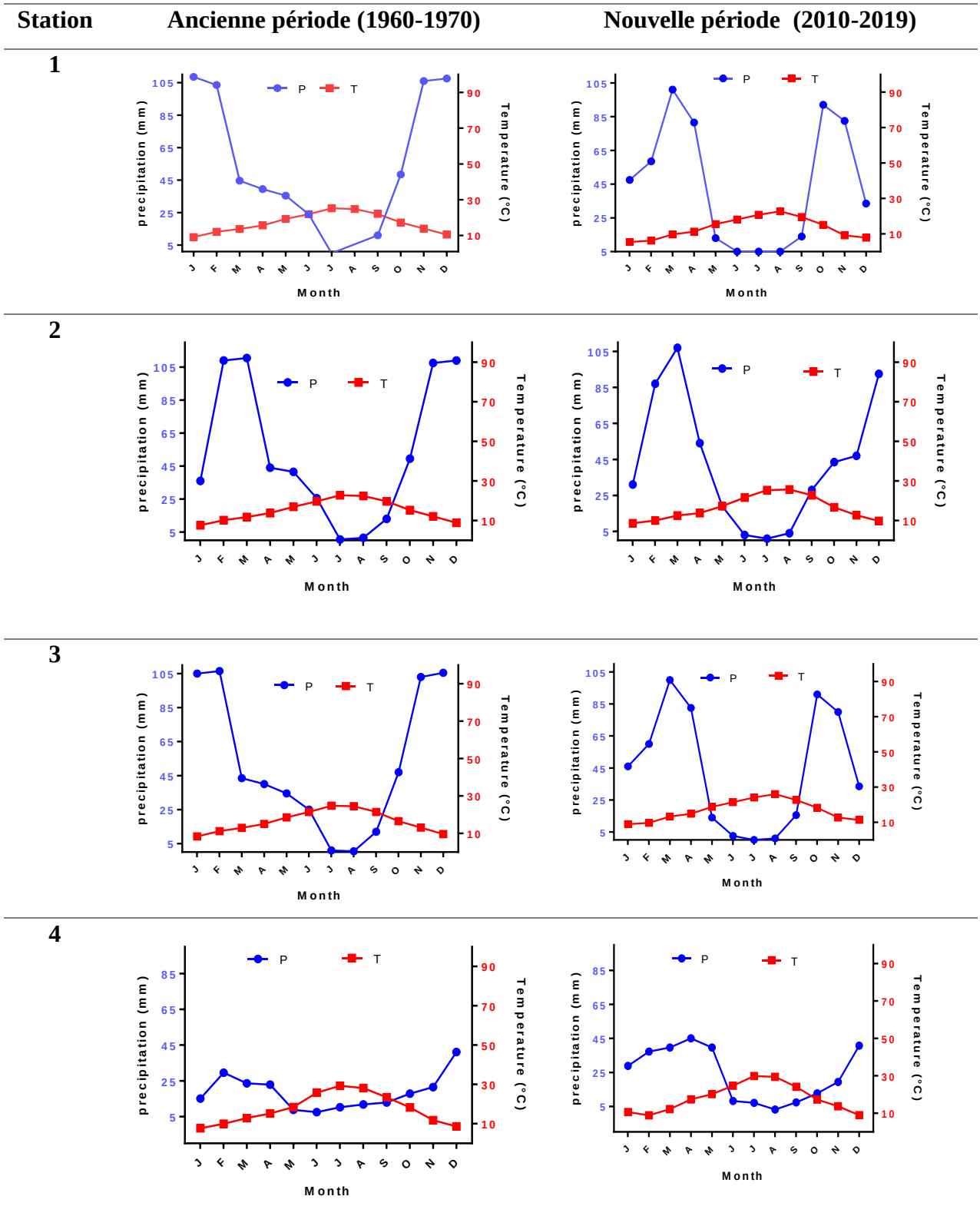



**Figure 10**: Diagramme ombrothermique des stations étudiées pour la nouvelle période (2010-2019) et l'ancienne période (1960-1970).

Cette étude bioclimatique nous a permis de mettre en évidence un climat de type méditerranéen dans la zone d'étude. Ce climat avait été caractérisé par deux périodes: un hiver

court et froid d'octobre à mars, caractérisé par des précipitations irrégulières, et un été sec marqué par une absence de précipitations et des températures élevées allant jusqu'à 7 à 8 mois. En général, le climat était relativement sec dans toute la région avec des précipitations inférieures à 600 mm. Les précipitations saisonnières ont montré que l'hiver et le printemps étaient les saisons les plus humides (Figure 10), mais avec une augmentation de la période sèche dans toutes les stations pendant la nouvelle période. Ces résultats montent le déplacement de l'aridité sur ces zones et qui se traduit par une expansion de la saison sèche.

Toutes ces indications ont mis en évidence une aridité intense pour les stations étudiées, qui peut être exprimée par une saison sèche qui s'étend de mai à septembre avec une évapotranspiration potentielle élevée et des précipitations presque nulles (Emberger, 1930). Par conséquent, ces conditions climatiques difficiles perturbent la croissance des plantes ainsi que leurs formations dans les stations étudiées. Cela conduit finalement à la substitution de la végétation mésophile par la végétation xérophile à des degrés divers (Abdelaziz, 1980).

Les précipitations jouent un rôle majeur dans la définition de la sécheresse climatique globale, et le déficit pluviométrique est l'une des principales composantes du climat qui contribue à la désertification des zones sèches. Le régime pluviométrique est influencé par deux groupes de facteurs: les facteurs géographiques (altitude, latitude, distance à la mer, orientation des pentes) et les facteurs météorologiques: masses d'air, centre d'action, trajectoire des systèmes de basse pression (Halimi, 1980).

### 2.3. Diversité végétale

L'analyse de la richesse floristique des différents groupements, ainsi que leurs caractères biologiques et morphologiques permet de mettre en évidence leur état de conservation et, par conséquent, leur valeur patrimoniale (Dahmani, 1997).

Le cortège floristique a révélé que la flore des zones d'étude est composée de 74 espèces appartenant à 32 familles (Tableau 5). Les familles les plus présentes dans la première station sont les Poacées (28 ,12%) sur un total de 62 espèces, alors que la deuxieme station est dominée par les Asteraceae (50%) suivie par les Poacées (34,37%) avecun total de 68 espèces. Au niveau de la troisième station, les Astéracées sont les plus dominantes avec un taux de 46,87% suivie par les Poacées (31,25%) avec un total de 65 espèces. Le cortège floristique de la quatrième station est dominé par la famille des Astéracées (43,75%) suivie par les Poacées (31,15%), avec un total de 48 espèces.

Quézel et al.,1992, précisent que l'installation des espèces comme *Chamaerops humilis*, *Chrysanthemum coronarium*, *Asphodelus microcarpus*, *Asparagus albus*, *Ulex boivini* renseigne sur la manifestation d'une certaine dégradation. D'autres études écologiques ont montré que les milieux contenant *Chamaerops humilis*, *Asphodelus microcarpus*, *Calycotome spinosa*, *Asparagus albus*, sont des milieux dégradés et montrent une prolifération des espèces épineuses qui indiquent leur dégradation par les agents anthropozoïques (Daget, 1980 ; Loisel, 1993). Par ailleurs, la présence de certaines espèces comme *Daucus carota*, *Plantago lagopus*, *Pallenis spinosa*, indiquent également un milieu dégradé qui est occupé par des espèces xériques plus résistantes aux conditions environnementales devenues de plus en plus sévères. Ce type de plantes se développe dans un environnement bioclimatique semi-aride à aride.

De nombreux autres travaux ont été réalisés afin de mettre en évidence la relation entre la distribution des types biologiques et les facteurs environnementaux, en particulier le climat (température et précipitations) (Raunkiaer, 1934 ; Daget, 1980 ; Danin, 1990) et, d'autre part, les relations entre la distribution des types biologiques et "l'altitude et la nature du substrat" (Floret et al., 1990).

Les résultats obtenus relatifs à de la proportion des types biologiques ont révélé que les herbacés annuelles sont les plus dominantes dans les quatres stations avec respectivement un taux de 68,85 (S1), 70,15% (S2), 69,70% (S3) et 71,43% (S4). L'inventaire a également permis de révéler la faible abondance des ligneux vivaces (inférieure à 5%).

Du point de vue morphologique, les communautés végétales des stations d'étude sont marquées par une hétérogénéité entre les ligneux et les herbacés, et entre les pérennes et les annuels. La variation des facteurs écologiques (biotiques et abiotiques) pourrait induire des changements dans la distribution des plantes, qui peuvent être associés à l'émergence de plantes herbacées lorsque les conditions environnementales sont défavorables (Stambouli et al., 2013).

L'analyse du type biologique peut nous donner des informations sur l'influence de l'environnement sur la végétation locale. Ces types biologiques sont considérés comme une expérience de la stratégie d'adaptation de la flore et de la végétation aux conditions environnementales et nous permettent de reconnaître, en ce qui concerne les "plantes vasculaires", les cinq principaux types biologiques suivants : phanérophytes, chamaephytes, hémicryptophytes, géophytes et thérophytes (Somersalo et al., 2003).

La forme biologique des plantes a été modifiée en raison des conditions environnementales difficiles (Polunin, 1967). Effectivement, dans notre étude, les thérophytes représentent la forme de vie la plus élevée dans toutes les stations étudiées, avec un taux entre 56,52% et 63,08%, suivie par les chaméphytes (12,35-15,22%), les hémicryptophytes (10,47-13,04%), les géophytes (10,43-13,14%) et les phanérophytes (1,64-2,98%), Tableau 6.

Généralement, les thérophytes sont des plantes annuelles à cycle biologique court: la germination, la croissance, la floraison et la mise à fruit s'effectuent en quelques jours (Ozenda, 2000 ; Raynal, 1998 ; Lemée, 1967). C'est par exemple, *Convolvulus tricolor* (Convolvulacées), *Schismus barbatus* (Poacées), *Plantago albicans* (Plantaginacées). Cette adaptation est constituée par un appareil végétatif simple et par une croissance et un développement rapide. Ces végétaux se développent durant la brève saison des pluies et évitent ainsi la sécheresse. Ces plantes forment des tapis verts et parallèlement quelques géophytes se développent également très rapidement (Oliver et al., 2001). En effet, ces conditions conduisent cette végétation à des formations composées d'espèces plus résistantes, colonisant le milieu naturel, et remplaçant la famille des ligneux, devenue trop fragile. Ces espèces comprennent : *Chamaerops humilis*, *Chrysanthemum coronarium*, *Asphodelus microcarpus*, *Urginea maritima* (Somersalo et al., 2003 ; Quézel et al.,1992).

D’autre part, les facteurs anthropozoïques jouent un rôle majeur dans l'organisation des structures végétales. En effet, le taux de croissance de la population rurale a déterminé une transformation radicale de l'utilisation de l'environnement en rapport avec la biodiversité végétale autochtone. Le pâturage dans cette zone est réalisé durant toute l'année. En été, les troupeaux et les bétails occupent les terres agricoles après la récolte, et le reste de l'année, ils pâturent dans ces zones d’étude. Face à cette situation, le surpâturage est devenu de plus en plus dramatique, simultanément aux résultats qui ont été recueillis dernièrement notamment : un déséquilibre dans la composition floristique, une régression du tapis végétal, une destruction des horizons de surface, une érosion du sol, une absence de la régénération naturelle de la végétation ligneuse, et une occupation des milieux naturels par les thérophytes (Merioua 2007).

**Tableau 5**: Espèces végétales enregistrées dans les formations de *Withania frutescens*(L.)

| Espèces | Familles | T biolo | T morphol | Stations | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| ***Aegilops ovate*** | Poacées | CH | H.A | - | + | + | + |
| ***Agropyron repens*** | Poacées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Ajuga iva*** | Lamiacées | TH | H.A | - | + | + | - |
| ***Anagallis arvensis phornicea*** | Primulacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Anagallis arvensissubsp latifolia*** | Primulacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Anisantha rubens*** | Poacées | TH | H.A | + | + | - | + |
| ***Arenaria emarginata*** | Caryophylacées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Arisarum vulgare*** | Aracées | TH | H.V | + | + | + | - |
| ***Aristolochia longa*** | Aristolochiacées | GE | H.A | + | + | + | + |
| ***Asparagus albus*** | Asparagacées | GE | H.V | + | + | - | + |
| ***Asteriscus maritimus*** | Astéracées | CH | H.V | + | + | + | + |
| ***Atractylis carduus*** | Astéracées | HE | H.V | + | + | + | + |
| ***Atractylis concellata*** | Astéracées | HE | H.A | + | + | + | + |
| ***Avena sterilis*** | Poacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Ballota hirsute*** | Lamiacées | GE | H.A | + | + | + | + |
| ***Bellis annua*** | Astéracées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Brachypodium distachyon*** | Poacées | TH | H.A | - | + | + | + |
| ***Briza minor*** | Poacées | TH | H.A | + | + | - | + |
| ***Bromus madritensis*** | Poacées | TH | H.A | + | - | + | + |
| ***Bryonia dioica*** | Cucurbitacées | GE | H.V | + | + | + | - |
| ***Calendula arvensis*** | Astéracées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Carduus pycnocephalus*** | Astéracées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Centaurea pubescens*** | Poacées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Centaurea pungens*** | Astéracées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Chamaerops humilis*** | Palmacées | CH | H.V | + | + | + | + |
| ***Chrysanthemum Coronarium*** | Astéracées | TH | H.V | + | + | + | - |
| ***Convolvulus althaeoides*** | Convolvulacées | TH | H.A | + | + | + | + |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Convolvulus tricolor*** | Convolvulacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Cynodon dactylon*** | Poacées | GE | H.V | - | + | + | + |
| ***Cynoglosum cherifolium*** | Boraginacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Dactylis glomerata*** | Poacées | HE | H.V | + | + | + | + |
| ***Daucus carota*** | Apiacées | GE | H.A | + | - | + | + |
| ***Erodium moschatum*** | Geraniacées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Eryngium maritimum*** | Apiacées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Euphorbia peplus*** | Euphorbiacées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Fagonia cretica*** | Zygophyllacées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Fedia cornucopiae*** | Valerianacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Fumana thymifolia*** | Cistacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Hordeum murinum*** | Poacées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Inula viscosa*** | Astéracées | HE | H.V | + | + | + | + |
| ***Lagurus ovatus*** | Poacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Leucanthemum paludosum*** | Astéracées | TH | H.A | - | + | + | - |
| ***Malva sylvestris*** | Malvacées | TH | H.A | - | + | + | - |
| ***Marrubium vulgare*** | Lamiacées | HE | H.A | + | + | + | + |
| ***Medicago minima*** | Fabacées | TH | H.A | - | + | + | + |
| ***Mercurialis annua*** | Euphorbiacées | GE | H.A | + | + | + | - |
| ***Nerium oleander*** | Apocynacées | CH | L.V | + | + | + | - |
| ***Olea europaea*** | Oleacées | PH | L.V | - | + | - | - |
| ***Pallenis maritima*** | Astéracées | CH | H.V | + | + | - | + |
| ***Pallenis spinosa*** | Astéracées | HE | H.V | + | + | + | + |
| ***Papaver rhoeas*** | Papaveracées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Phagnalon saxatile*** | Astéracées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Plantago albicans*** | Plantaginacées | TH | H.A | + | + | - | + |
| ***Plantago coronopus*** | Plantaginacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Plantago lagopus*** | Plantaginacées | TH | H.A | + | - | - | + |
| ***Reichardia tingitana*** | Astéracées | CH | H.V | + | + | + | + |
| ***Reseda alba*** | Résédacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Rubia peregrine*** | Rubiacées | HE | H.A | + | - | - | - |
| ***Rumex bucephalophorus*** | Polygonacées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Senecio leucanthemifolius*** | Astéracées | TH | H.A | - | + | + | + |
| ***Senecio vulgare*** | Astéracées | TH | H.A | + | + | + | + |
| ***Sideritis Montana*** | Lamiacées | CH | H.A | + | + | + | + |
| ***Sinapis alba*** | Brassicacées | TH | H.A | - | + | + | + |
| ***Sinapis arvensis*** | Brassicacées | TH | H.A | - | - | + | + |
| ***Smilax aspera*** | Liliacées | TH | H.V | + | + | + | - |
| ***Smyrnium olusatrum*** | Apiacées | HE | H.A | + | + | + | - |
| ***Tamus communis*** | Dioscoréacées | GE | H.A | + | + | + | - |
| ***Thapsia garganica*** | Apiacées | CH | H.V | - | + | + | - |
| ***Trifolium campestre*** | Fabacées | TH | H.A | + | + | + | + |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Trifolium spumosum*** | Fabacées | TH | H.A | + | + | + | - |
| ***Ulex parviflorus*** | Fabacées | CH | H.V | + | - | + | - |
| ***Urginea maritime*** | Liliacées | GE | H.V | + | - | + | + |
| ***Withania frutescens*** | Solanacées | PH | L.V | + | + | + | + |
| ***Ziziphus lotus*** | Rhamnacées | PH | L.V | + | + | - | + |

Ph : Phanérophytes, Ch : Chamaephytes, He : Hémicryptophytes. Ge : Géophytes, Th : Thérophyte, H.A : Herbacées annuelles, H.V : Herbacées vivaces, L.V : Ligneux vivaces.

**Tableau 6**: Pourcentages des formes de vie végétale et des types morphologiques dans la zone d'étude.

| | **Types biologies** | | | | | **Types morphologiques** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Station** | **PH** | **TH** | **CH** | **HE** | **GE** | **HA** | **HV** | **LV** |
| **1** | 1,64 | 59,01 | 13,20 | 13,01 | 13,14 | 68,85 | 27,87 | 3,28 |
| **2** | 2,98 | 62,69 | 13,43 | 10,47 | 10,43 | 70,15 | 25,37 | 4,48 |
| **3** | 1,54 | 63,08 | 12,35 | 10,77 | 12,26 | 69,70 | 27,27 | 3,03 |
| **4** | 2,17 | 56,52 | 15,22 | 13,04 | 13,08 | 71,43 | 26,53 | 2,04 |

Ph : Phanérophytes, Ch : Chamaephytes, He : Hémicryptophytes. Ge : Géophytes, Th : Thérophyte, H.A : Herbacées annuelles, H.V : Herbacées vivaces, L.V : Ligneux vivaces.

## 3. Caractérisation morpho-écologique de l'espèce étudiée

### 3.1. Étude morphométrique de *W. frutescens*

La morphométrie représente la relation entre la forme et la taille; les changements morphologiques sont strictement induits par les variations de croissance (Musundire et al., 2012). Les résultats de l'étude morphométrique de *W. frutescens* ont montré que la largeur moyenne des touffes *W. frutescens* a été de l'ordre 3,10 m (S1), 2,30 m (S2), 1,30 m (S3) et 1,20 m (S4) (Figure 11a). Et la longueur de l'ordre de 1,35 m (S1), 1,80 m (S2), 2,10 m (S3) et 1,10 m (S4).

Ces résultats montrent que les plantes de *W. frutescens* dans la station 3 ont une meilleure croissance en longueur tandis que les plantes de la station 4 sont les plus petites de taille (Figure 11a et 11d). Les changements morphométriques observés chez *W. frutescens* sont probablement dus au fait que l'espèce a subi des actions anthropozoïques et un pâturage intensif (Abdelaziz, 1980).

L'analyse de la surface foliaire des plantes dans la zone d'étude permet de comprendre le mécanisme d'adaptation et d'acclimatation en conditions de sécheresse. Les résultats obtenus montrent que les plus grandes feuilles sont enregistrées au niveau de la station 3 avec une surface moyenne de l'ordre de 15,13cm$^2$ suivie de la station 2 avec une surface de l'ordre de 7,51cm$^2$, alors que les plus petites surfaces foliaires ont été notées au niveau des stations 1 et 4 (Figure 11b et et 11c).

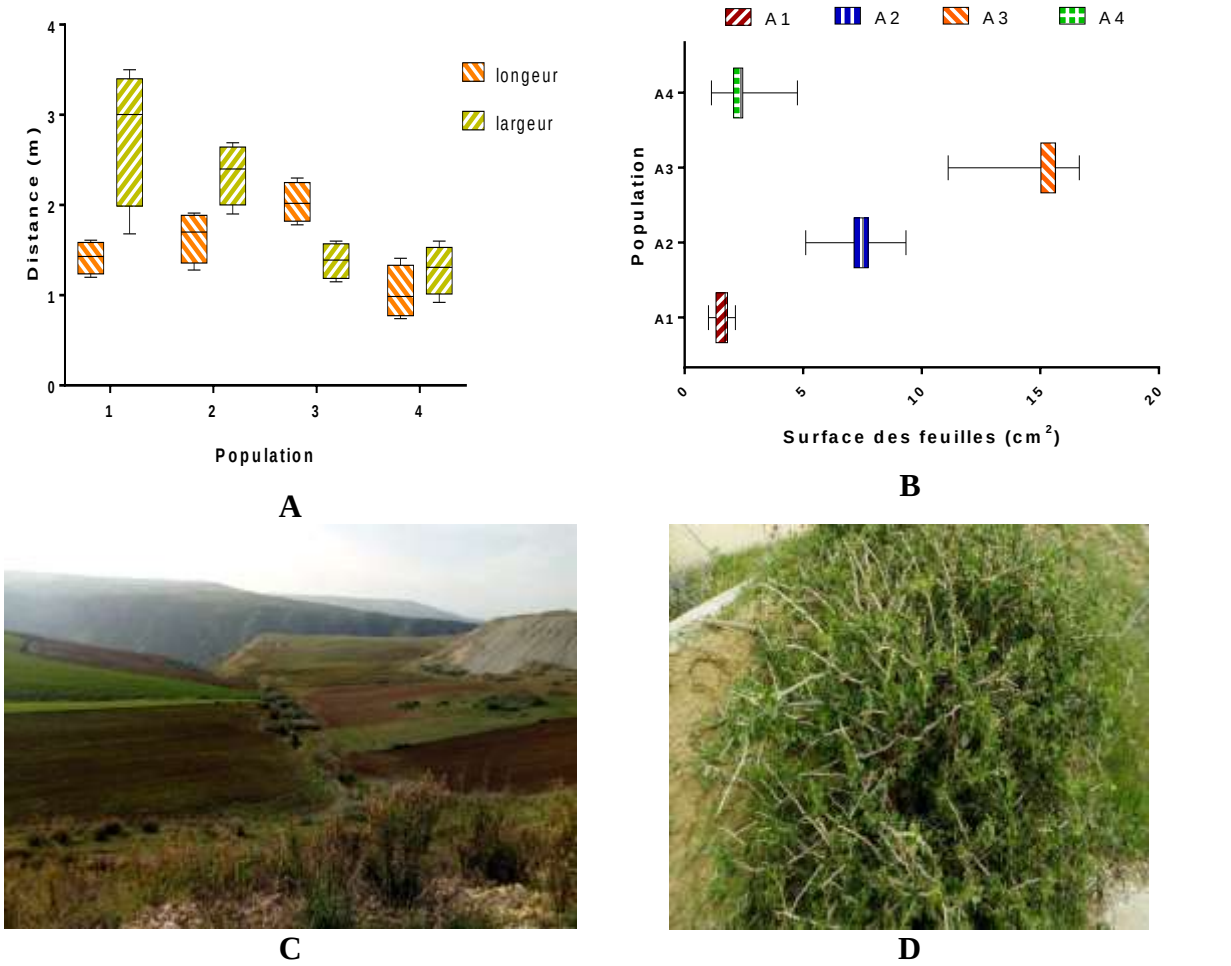



**Figure 11**: Longueur et largeur (A), surface foliaire (B), milieu naturel de station 3 (C) et de station 4 (D) de *Withania frutescens* (L.) Pauquy.

### 3.2. Étude histologique de *W. frutescens*

L'étude histologique réalisée sur les feuilles, les tiges et les racines de *W. frutescens* permet d'expliquer certaines modifications histologiques. Les résultats obtenus ont permis de décrire les tissus de l'organe de l'extérieur vers l'intérieur comme suit: épiderme, parenchyme cortical, faisceaux libéro-linéaires (phloème, xylème), et parenchyme palissadique chlorophyllien. Ces résultats ont montré que le parenchyme cortical (1,33 µm) et le parenchyme palissadique (1,46 µm) étaient les plus épais, alors que le xylème (1,08 µm) était moins épais par rapport aux premiers tissus (Figure 12a). De plus, une alternance entre phloème et épiderme a également été observée. Les tissus étaient caractérisés par l'absence de collenchyme et la présence d'une corrélation significative au niveau des cellules épidermiques, qui forment un ensemble compact offrant aux organes végétaux une protection mécanique efficace contre l'évapotranspiration, (Collin, 2001; De Micco et Aronne, 2012).

L'observation des coupes histologiques des tiges a indiqué que les caractéristiques tissulaires suivantes; de l'extérieur vers l'intérieur: épiderme; parenchyme cortical; faisceaux libéro-linéaires: xylème primaire, xylème secondaire et phloème; parenchyme médullaire (Figure 12 b). L'étude histométrique menée sur les tiges de *W. frutescens* a révélé une épaisseur importante pour le parenchyme cortical (7,25µm) et le xylème (5,59µm) qui assure

la conduction de la sève brute (eau et sels minéraux) de bas en haut (Figure 12 et 13), (Collin, 2001 ; De Micco et Aronne, 2012).

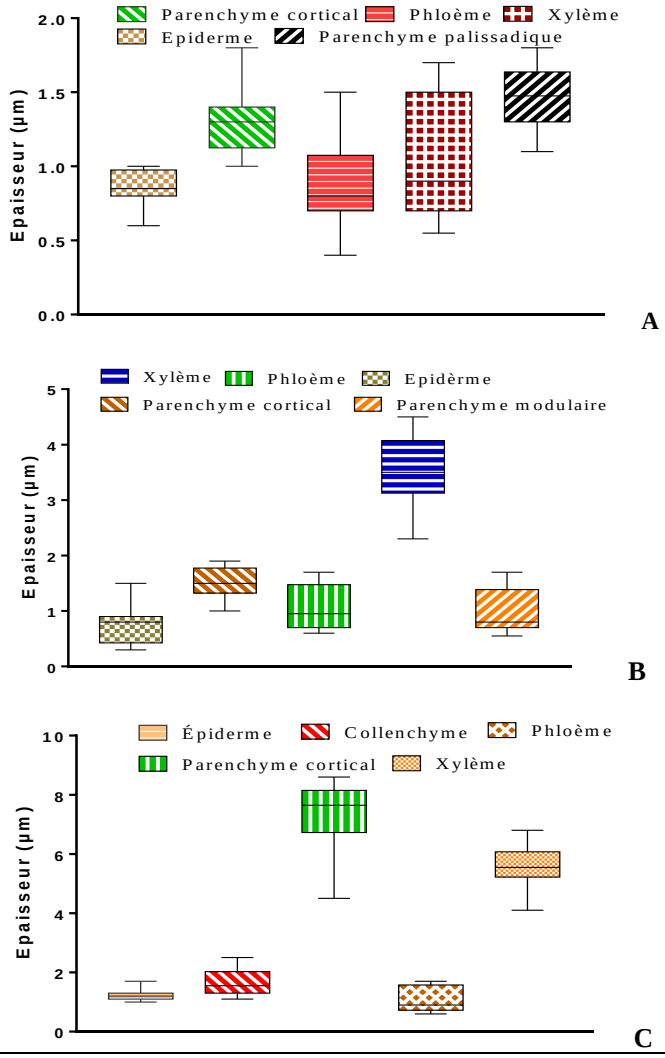
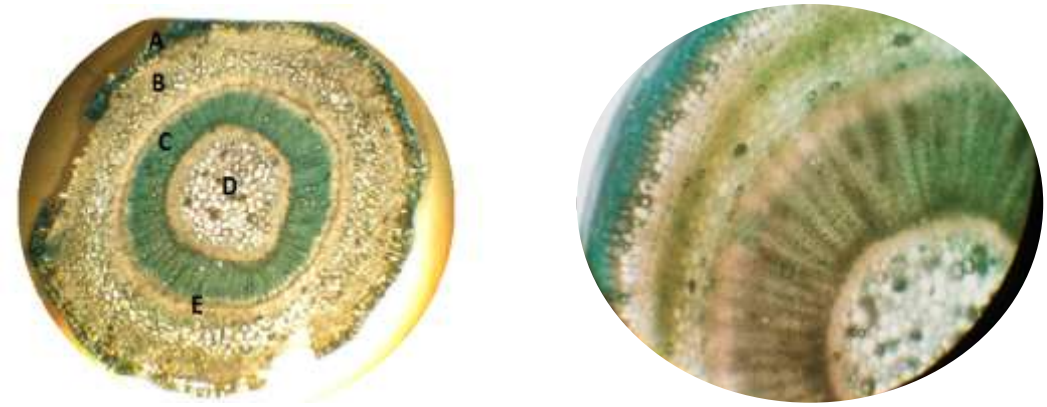



**Figure 12**: Épaisseur du tissu des feuilles (A), des racines (B) et des tiges (C) de *Withania frutescens* (L.) Pauquy.

Les coupes transversales des racines de *W. frutescens* se sont révélées être à symétrie axiale. On distingue deux parties, l'écorce (épiderme et parenchyme cortical) et le cylindre central (parenchyme médullaire et les faisceaux libéro-linéaires: xylème et phloème). L'évaluation histométrique a révélé que le xylème domine avec une très grande épaisseur (3,48 µm), suivi par le parenchyme cortical (1,51 µm), le phloème (1,05 µm), le parenchyme médullaire (0,96 µm) et l'épiderme (0,75 µm) (Figure 12c). L'étude histologique de *W. frutescens* a révélé que les jeunes feuilles, les tiges et les racines étaient différentes en termes de taille et de forme des cellules ainsi que de leurs parois squelettiques. Les résultats rapportés dans l'étude actuelle montrent une différence dans l'épaisseur des tissus des organes de la plante selon le site de collecte. En effet, les dimensions des tissus fournissent des informations sur l'état physiologique de la plante et celui de son environnement (stress salin et hydrique, etc...).

Dans la présente étude, le parenchyme palissadique chlorophyllien apparaît plus développé dans les feuilles. Ce résultat peut être expliqué par le rôle fonctionnel des feuilles dans l'assimilation. La présence de tissus de soutien de type collenchyme dans la racine et la tige, qui contribuent à la rigidité et à la solidité de la plante. Le xylème et le phloème occupent un espace important dans les feuilles et les racines. Ces caractéristiques histologiques permettent aux espèces végétales de conserver un taux d'hydratation suffisant et d'assurer également les phénomènes d'osmose (Collin, 2001; De Micco et Aronne, 2012).

Dans des conditions environnementales difficiles, les plantes peuvent développer de nouvelles formes en réponse aux changements environnementaux. Dans ce sens, des variations morphologiques et physiologiques se sont produites chez les plantes ainsi que des modifications structurelles au niveau des tissus pour continuer à survivre. En effectuant une comparaison de certaines périodes climatiques, nous avons constaté une augmentation de la durée de la période sèche et une diminution de la période humide. Ainsi la modification des tissus peut être attribuée à un mécanisme d'adaptation des plantes à la sécheresse (Calatayud et al., 2013).




Grossissement de 10 fois (10X) Grossissement de 40 fois (40X)

**Figure 13**: Coupe histologique au niveau de la tige de *Withania frutescens*. A : epiderme ; B : parenchyme cortical ; C : xylème ; D : parenchyme médullaire ; E : Phloème

## 4. Multiplication par graines de la plante étudiée

Les fruits de *W.frutescens* sont des baies atteignant 7-10 mm de diamètre, rougeâtres avec un endocarpe charnu, jaunâtre et parfumé. Il y a en moyenne 10 graines par fruit. La teneur en eau est de l'ordre de 12,48% et les graines présentent un tégument rigide brun, la longueur, la largeur et l'épaisseur moyennes des graines sont de 3-5 mm, 2-3 mm et 1-1,5 mm, respectivement (Figure 14a). Les tests de viabilité (test de flottaison et de TTC) ont révélé que toutes les graines sont viables à la période de récolte et après une conservation à 4°C pendant deux mois.

Une graine mature normale pèse 21,48mg. L'embryon est en forme de spirale et est entouré par l'endosperme. Les cotylédons sont recourbés vers l'intérieur tandis que l'hypocotyle et la radicule sont courbées et situés le long de la périphérie de la graine (Figure 14b). L'endosperme est constitué de deux parties, l'une qui enveloppe la pointe de la radicule

appelée coiffe de l'endosperme ou endosperme micropylaire et la partie restante appelée endosperme latéral.




**A** **B**

**Figure 14**: Fruits et graines de *W. frutescens* à différents stade de maturation (A) et coupe longitudinale de la graine (B). EC : Le chapeau de l'endosperme ; EL : l'endosperme latéral ; R : l'extrémité de la radicule ; H : l'hypocotyle ; C : les cotylédons ; T : testa.

La morphologie interne de la graine de *W. frutescens* est très similaire à celle de la tomate, et le diamètre moyen et l'épaisseur de la paroi cellulaire des cellules de la coiffe de l'endosperme sont statistiquement inférieurs à ceux des cellules de l'endosperme latéral. Ces différences indiquent la préférence ou la prédestination de la région où la pousse de la radicule se produira.

L'évaluation de la germination des graines de *W. frutescens* par sept méthodes a montré qu'il y a une différence significative dans le taux de germination entre les différents traitements. Le contrôle (eau) n'a présenté aucune germination (Figure 15). Par contre les graines percées manuellement (orifices), ont montré un taux de 88,49% suivi par le traitement par l'eau oxygénée (H2O2) et l'eau chaude avec 16,34% et 12,69%, respectivement.

Les résultats représentés sur la figure 16 montrent la germination sur papier filtre, mais aucune germination n'a été observée dans le sable utilisée comme substrat, ce qui signifierait que la plante a besoin de lumière au cours du stade de germination.

Le développement des semis est caractérisé par l'élongation et la formation de racines secondaires à 3 jours après la poussée des radicules. Le verdissement des cotylédons par la chlorophylle a commencé au 4$^{ème}$ jour et l'ouverture des cotylédons, 5 à 6 jours après la poussée des radicules (Figure 16).

Des études antérieures, ont montré que dans les graines de tomate (*S. lycopersicon*), de café (*Coffea arabica*), de fenugrec (*Trigonella foenom-graecum*), de caroube (*Ceratonia siliqua* L.) et de carvi (*Carum carvi*L.) les cellules de la coiffe de l'endosperme étaient également nettement différentes du reste de l'endosperme, suggérant un rôle dans la facilitation de la poussée des radicules (Toorop *et al.,* 2000 ; DaSilva *et al.,* 2004 ; Gong *et al.*, 2005).

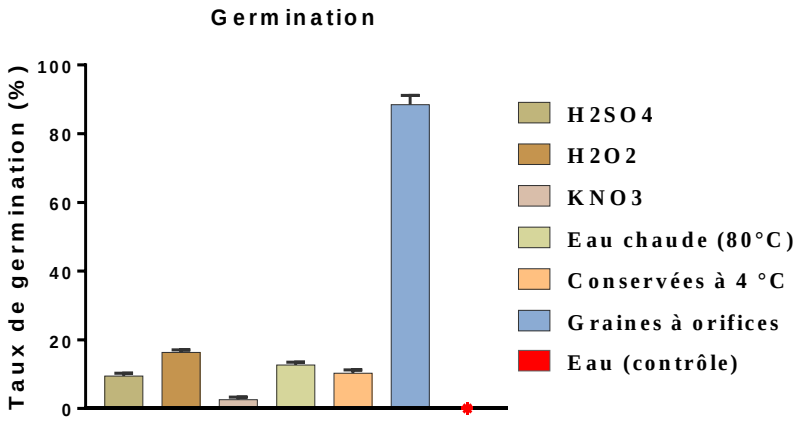



**Figure 15**: Résultats de germination des graines de *W. frutescens* par les différents tests



**A** **B**

**Figure 16**: Germination des graines de *W. frutescens* en fonction du temps (A) et dans un milieu imbibé (B).

Les graines de *W. frutescens* présentent le schéma triphasique commun d'absorption d'eau au cours des 72 h d'évaluation. La phase I se caractérise par une absorption d'eau relativement rapide par les graines et une augmentation de leur poids frais jusqu'au début de la phase II, après environ 12 h d'imbibition. Au cours de la phase II, les graines sont restées, en moyenne, sans augmentation significative du poids jusqu'à environ 45 h après le début de l'imbibition, lorsque le poids frais des graines a de nouveau augmenté, en conséquence de la poussée radiculaire des premières graines (les plus rapides) de la population. Cependant, le début de la phase III pour la moyenne de la population était autour de 50 h. Après la rupture du testa, les graines nécessitaient encore des conditions de germination pendant 1 à 2 jours supplémentaires pour une rupture visible de la coiffe de l'endosperme et une poussée de la radicule (Figure 17a).

Le testa peut également contribuer à la force de perforation requise, dans un certain nombre d'espèces de solanacées, y compris le tabac et le *pétunia*, la rupture du testa précède la poussée de la radicule en raison de l'absorption d'eau et du gonflement de l'embryon (Petruzzelli *et al.*, 2003). Chez *W. frutescens*, le gonflement de l'embryon s'est produit dans la phase III de la germination (Figure 17b).

Dans les graines de *W. frutescens*, le poids frais des embryons de graines imbibées d'eau a montré une augmentation significative. Cela indique que l'embryon s'est développé pendant l'imbibition et peut potentiellement contribuer à la deuxième étape de l'affaiblissement du capuchon de l'endosperme par l'augmentation de son potentiel de pression (turgescence).

Les expansines sont des protéines impliquées dans l'expansion cellulaire par leur capacité à fragiliser la paroi cellulaire, s'interposant entre la cellulose et les chaînes du xyloglucane et rompant les liaisons non covalentes entre les polymères de la paroi cellulaire (Cosgrove, 1999, 2000). Le gène *leEXP8*, codant pour une expansine dans la graine de tomate, est exprimé uniquement dans la zone d'élongation de la radicule et son expression est sous le contrôle de l'acide gibbérellique et de l'ABA (Chen *et al.* , 2001).

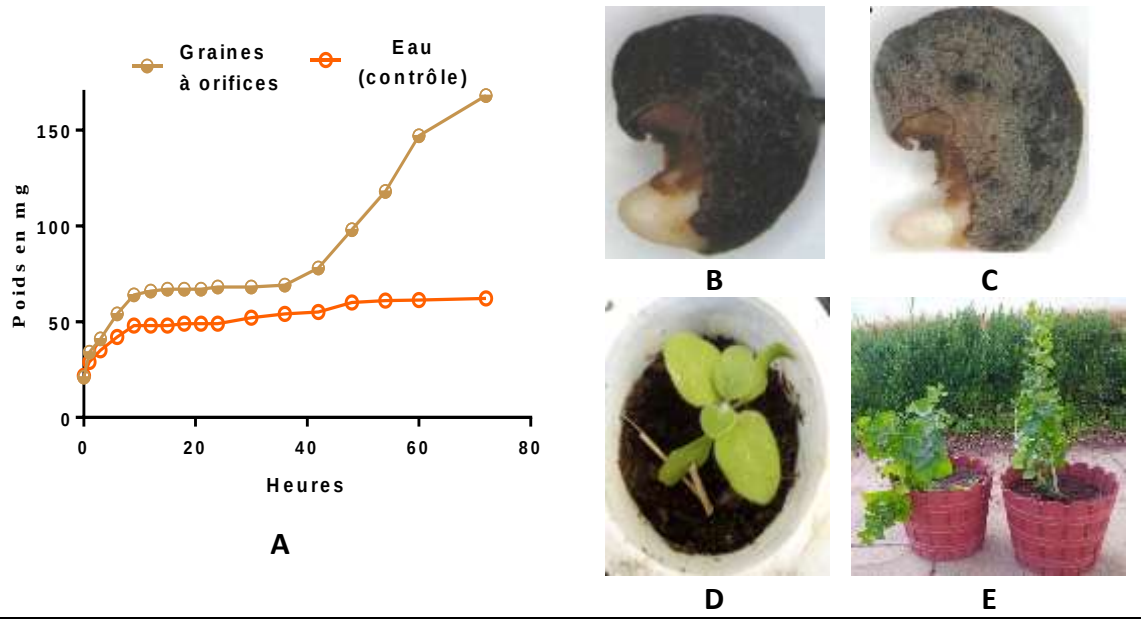



**Figure 17**: Evolution du poids la graine en fonction du temps (A), la création des orifices au niveau de la graine (B et C), développement de la plante après une germination (D et E).

Afin de résoudre le problème de la pourriture du système racinaire des plantules pendant la transplantation, le sol a été stérilisé par une haute température. Après quelques mois de cette transplantation, certaines plantes ont été transférées à côté de la serre de notre faculté des sciences (Figure 17d et 17e). Il est à signaler que les graines de *W. frutescens* sont fragiles pendant la période de germination et pendant la transplantation ce qui pourrait expliquer le faible taux de réussite de la technique multiplication par germination utilisée. Dans cette partie, nous avons également étudié la multiplication végétative de l'espèce et principalement le bouturage.

## 5. Multiplication végétative par bouturage

La technique du bouturage assure une restauration écologique face à des contraintes de l'impossibilité de germination des graines d'une espèce naturellement ou un faible taux de germination sachant que l'espèce a été limitée dans un milieu ou dans un état critique. Les résultats de la multiplication par bouturage (Figure 18a, 18b, 18c et 18d) montrent qu'il n'y a pas de différence de la croissance de la partie aérienne des boutures sur les différents types des sols utilisés dans cette expérience (nombre des feuilles (Nfe), nombre des fleurs (NFL) et nombre des nœuds (ND)). Cependant chez les arbres ligneux, la concentration en sels minéraux sont préférables et importantes pour l'enracinement (Patil et al., 2016).

Les cultures sont restées vertes et saines, montrant également un effet indirect sur la quantité de pousses régénérées. Et le développement de nouvelles pousses axillaires après deux semaines d'excision du bourgeon apical a été observé chez de nombreuses plantules comme une conséquence de la suppression de la dominance apicale et de l'induction d'autres dominances méristématiques (Karalija et al., 2017).

Le suivi des paramètres de croissance pendant 12 semaines, montre que les boutures de *W. frutescens* ont présenté une croissance depuis la deuxième semaine et les paramètres ont été en évolution jusqu'à la dernière semaine. Tel que le Nfe de l'ordre de 4,89±2,53 pendant la troisième semaine et de l'ordre de 22,88±8,71 à la dernière semaine (12 semaines), (Figure 18c).

Le NFL était de l'ordre de 4,64±1,68 pendant la dernière semaine et le ND de l'ordre de 5,60±1,78 (Figure 18d). Mais pendant le suivi de l'évolution de la croissance des boutures, le taux d'apparition des cals racinaires des bouture était de l'ordre de 2,51±0,74% pour les boutures qui ne sont pas traités par l'AIB, a été observé (Figure 18e).

Le développement d'un système racinaire bien formé et fonctionnel est l'une des étapes essentielles pour l'absorption de l'eau et des minéraux et pour un développement réussi. Ainsi, la ramification des racines est une étape critique pour surmonter le mauvais développement du système racinaire. Alors l'utilisation des conditions de culture a été liée avec le contact entre les racines, l'air et les substrats du milieu, afin d'améliorer la ramification des racines et assurer la survie des plantules (Nowak et al., 2003).

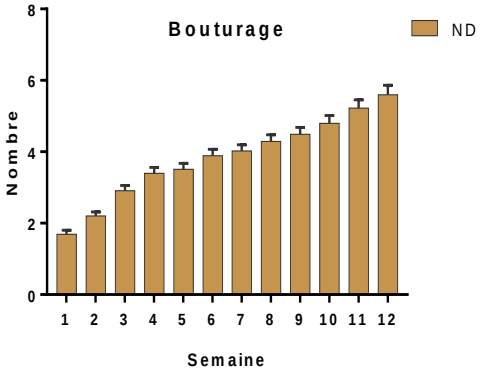
Néanmoins, le traitement des boutures par l'AIB, a montré un taux d'apparition de cals racinaires de l'ordre de 23,45±5,09% comme un pic dans une concentration de 312,50 µg/mL d'AIB. Par contre à la forte concentration (5 mg/mL) et la faible concentration (78,10 µg/mL), ont présenté un taux de l'ordre de 0,0±0 et 8,91±1 ,42% (Figure 18e), respectivement. Ces résultats montrent qu'à la faible concentration, on peut assister au développemnt des cals racinaires contrairement aux fortes concentrations où ce taux est nul. La nature et la concentration des auxines sont spécifiques à chaque espèce. Dans notre étude, l'induction racinaire n'a été possible que dans un milieu avec l'auxine. D'autres résultats indiquent que l'AIB est le plus adéquat pour l'induction racinaire (Panwar et al., 2018; Dasilva et al., 2018), elle est considérée comme l'auxine la plus efficace dans le processus d'enracinement (Nowak et al., 2003).

Le traitement auxinique s'explique par l'effet qu'exerce l'application des auxines artificielles sur l'équilibre existant entre les substances hormonales endogènes ayant pour résultat l'amélioration de l'enracinement (Hartmann, 1952 ; Haissig, 1974 ; Fontanazza et

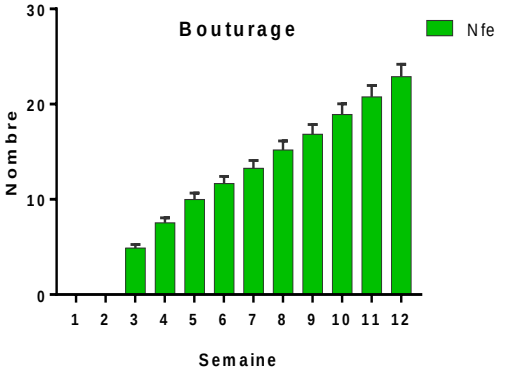
Rugini, 1981 ; Hartmann et al., 1990). Les auxines manifestent leur action sans risque de détériorer les organes bouturés. Et la capacité rhizogène de la bouture dépend des facteurs liés à la bouture elle-même et des facteurs exogènes liés aux conditions dans lesquelles la bouture est soumise (Eddaha, 1990 ; El Abidine, 2001).



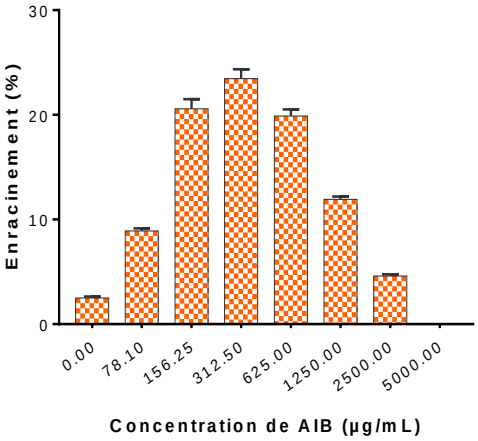
A



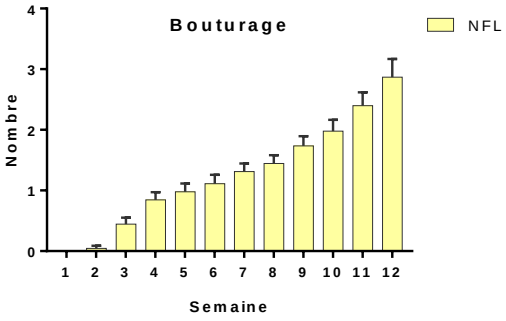

B




C




E




D

**Figure 18**: Test de multiplication de la plante par bouturage (A), résultats du suivi de la croissance de la partie aérienne (B, C et D) et boutures enracinées (E). ND : nombre des nœuds ; Nfe : nombre des feuilles ; NL : nombre des fleurs.

## 6. Caractérisation phytochimique de l'espèce étudiée

### 6.1. Criblage phytochimique

Les tests qualitatifs et quantitatifs du criblage phytochimique des différents extraits des feuilles (EFWF) et des racines (ERWF) de *Withania frutescens* collectées dans chaque station,

ont révélé que les quatre stations possèdent les mêmes familles phytochimiques pour chaque extrait. Nous avons constaté une présence importante des saponines, des mucilages, des glycosides cardiaques, des coumarines et des alcaloïdes dans les deux types d'extraits étudiés. L'étude a révélé également l'absence des quinones libres (anthracénique combiné : C-hétérosides) et des polyphénols en particulier les flavonoïdes et les tanins gallique au niveau des extraits des racines (ERW). Et l'absence des tanins catéchiques et des quinones libres (anthracénique combiné : o-hétérosides) au niveau des extraits des feuilles (EFWF) Tableau 7.

**Tableau 7**: Résultats du criblage phytochimique des extraits étudiés (feuilles et racines)

| Familles phytochimiques | | | EFWF | ERWF |
|---|---|---|---|---|
| **Tanins** | T.Catéchiques | | - | + |
| | T. Galliques | | + | - |
| **Flavonoïdes** | | | + | - |
| **Saponines** | Stérols et terpènes | | ++ | + |
| | Hétérosides stéroidiques | | + | ++ |
| | Tritépèrnes hétérosides | | ++ | + |
| **Coumarines** | | | ++ | +++ |
| **Quinone libre** | Anthraquinones libres | | + | + |
| | Anthracéniques combinés | O-hétérosides | + | - |
| | | C-hétérosides | - | + |
| **Alcaloïdes** | | | + | + |
| **Glycoside cardiaque** | | | + | + |
| **Mucilages** | | | ++ | +++ |

### 6.2. Dosage des composés phénoliques

Les polyphénols totaux ont été estimés par le réactif de Folin-Ciocalteu, et les résultats obtenus sont exprimés en milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EGA/g E), en utilisant l'équation suivante de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée pour l'acide gallique : $Y= 11,325X + 0,0209$ et $R^2 = 0,9948$. Les résultats montrent une teneur moyenne en phénols totaux de l'extrait des racines entre 53,33 ± 1,20 et 27,01 ± 0,85 mg EGA/g d'extrait, et celle de l'extrait des feuilles entre 12,04 ± 0,61 et 8,14 ± 0,38 mg EGA/g d'extrait.

La détermination des concentrations des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($Y = 0,0006X - 0,0048$ et $R^2 = 0,9863$) réalisée par quercitine à différentes concentrations dans les mêmes conditions opératoires. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercitine par un gramme de l'extrait. La teneur des flavonoides dans

l'extrait des feuilles a été entre 3,48 ± 0,68 et 5,27 ± 0,42 mg Eq.Q/g, alors que les extraits des racines n'ont montré qu'une faible concentration entre 0,28 ± 0,02 et 0,76 ± 0,05 mg Eq.Q/g.

La détermination de la teneur des tanins dans les extraits a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire (Y= 0,6042X + 0,065 et $R^2$ = 0,9942 à une absorbance dans 500 nm), réalisée par catéchol dans les mêmes conditions d'échantillons. La teneur en tanins dans l'extrait des feuilles a été entre 4,57 ± 0,36 et 5,03 ± 0,95 mg Eq.Cat/g et celle de l'extrait racinaire entre 5,35 ± 0,51 et 6,48 ± 0,84 mg Eq.Cat/g.

La variabilité qualitative et quantitative du contenu polyphénolique d'une plante à l'autre et d'une partie à une autre est probablement due aux conditions climatiques et environnementales (zone géographique, sécheresse, exposition, attaque de maladies...), à la période de récolte et au stade de développement de la plante. Aussi, la variation de la teneur en polyphénols totaux en fonction de la partie de la plante revient au fait que les polyphénols ne sont pas distribués uniformément dans les parties de la plante (Kukic et al., 2008).

Nous avons étudié, dans la partie qui suit, la variabilité quantitative des polyphénols totaux en fonction d'une part des mois et des saisons, qualifiée de variabilité temporelle, et d'autre part entre les quatre stations d'étude en fonction du microclimat, qualifiée de variabilité spatiale. Suivie par l'identification des composés phytochimiques au niveau des feuilles (variabilité qualitative) au niveau des 4 stations.

## 6.3. Etude de la variabilité spatio-temporelle des polyphénols totaux au niveau des feuilles

### 6.3.1. Variation temporelle de la teneur en polyphénols

Au cours du cycle biologique de la plante, et en fonction des pluies, les feuilles apparaissent après la période sèche.

La détermination des polyphénols totaux au cours de la première semaine de l'apparition des feuilles et trois semaines après nous a permis d'observer la variation des concentrations en polyphénols dans les quatre stations d'étude. Un suivi mensuel des polyphénols totaux, au niveau des quatre stations, nous a permis d'observer la variation des concentrations en polyphénols en fonction des saisons et de l'espace (stations).

Des niveaux élevés de teneur en polyphénols ont été enregistrés pendant la période sèche (mois juin) dans toutes les stations. Cette période correspond à un stress hydrique (absence de pluie), et des températures croissantes (Tableau 8). Les stations 1 et 4 présentaient des concentrations élevées de polyphénols: 14,55 mg GAE/g et 14,25 mg GAE/g, respectivement. Ces stations sont exposées au Sud et à la chaleur atmosphérique, ce qui peut expliquer cette variation (Saima et al., 2009). En juillet, il a été constaté que la majorité des feuilles sont tombées dans les deux stations (1 et 4), contrairement aux autres stations. Cet effet peut être dû au microclimat de la station puisque les stations 1 et 4 étaient exposées au sud et à une faible altitude contrairement aux stations 2 et 3 qui sont situées dans une vallée avec une faible altitude (Abdelaziz, 1980).

**Tableau 8**: Variabilité quantitative mensuelle des polyphénols totaux (mg GAE/g) chez *Withania frutescens* (L.) Pauquy en fonction des mois et des stations.

| | Station d'étude | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Mois** | **P1** | **P2** | **P3** | **P4** |
| **Octobre** | 4,13±0.42 | 4.04±0.60 | 3.72±0.08 | 4.38±0.51 |
| **Novembre** | 4.85±0.26 | 4.84±0.93 | 4.21±0.28 | 5.54±0.65 |
| **Décembre** | 5.57±0.07 | 5.88±0.71 | 4.79±0.20 | 6.22±0.47 |
| **Janvier** | 7.26±0.46 | 6.24±0.56 | 5.23±0.65 | 7.29±0.58 |
| **Février** | 8.42±0.32 | 6.50±0.58 | 5.75±0.73 | 8.61±0.57 |
| **Mars** | 10.04±0.42 | 7.05±0.59 | 6.22±0.61 | 10.07±0.49 |
| **Avril** | 11.37±0.30 | 7.61±0.38 | 6.67±0.61 | 12.01±0.71 |
| **Mai** | 13.55±0.67 | 7.95±0.47 | 7.24±0.62 | 13.28±0.76 |
| **Juin** | 14.55±0.47 | 8.39±0.24 | 7.68±0.73 | 14.25±0.47 |
| **Juillet** | - | 8.76±0.24 | 8.20±0.41 | - |

***P** : population

Des études antérieures ont montré qu'en réponse à l'action concomitante de multiples facteurs de stress abiotiques et de conditions difficiles, les plantes activent la biosynthèse de polyphénols multifonctionnels comme réponse d'adaptation à la sécheresse (Tattini et al., 2000). En outre, les polyphénols ont le plus grand potentiel pour remplir de multiples fonctions dans les plantes exposées à des stress abiotiques (Agati et al., 2012, 2013).

La teneur en polyphénols augmente dans les plantes exposées à divers facteurs de stress abiotiques, en particulier dans la paroi cellulaire (Bussotti et al., 1998; Reig-Armiñana et al., 2004; De Micco et Aronne, 2012). Ces métabolites secondaires sont impliqués dans l'épaississement de la paroi cellulaire des plantes, ce qui entraîne des changements dans les fonctions des organes de la plante, et augmente le renforcement des tissus par rapport à la tolérance à la sécheresse. En outre, le renforcement mécanique des parois cellulaires induit par les polyphénols, couplé à des effets chimiques, peut également améliorer la résistance et l'adaptation aux stress abiotiques et biotiques (Bennett et al., 1996; McLusky et al., 1999; Agati et al., 2012; Gunnaiah et al., 2012).

### 6.3.2. Identification des composés phytochimiques au niveau des feuilles

Dans la présente recherche, nous avons étudié l'effet possible des conditions microclimatiques sur le contenu chimique de *W. frutescens* poussant dans les quatre stations étudiées. L'étude comparative, à l'aide de GC/MS (Silylation), a été menée pour vérifier s'il y a une variation du contenu chimique dans les échantillons prélevés dans des conditions environnementales différentes. Nos résultats montrent différents profils chimiques des plantes collectées dans les 4 stations, aussi bien en ce qui le type principalement pour les composants majoritaires et également le nombre de composés (tableau 9).

La station A1 a été identifiée avec huit composés, parmi lesquels, le 1,1'-Biphényle, 3'-(1,1-diméthyléthyl)-5'-méthyl-2,6-dinitro et le 2-Chloroquinone était les composants principal avec une abondance de l'ordre de 29,16% et 17,91% respectivement. Et pour la station A2, l'analyse chromatographique en phase gazeuse a montré que plus de 16 composés ont été identifiés avec des pourcentages différents, tels que l'Apigenin 7-*O*-allosyl-(1->2)-glucoside et la Quercetin-3-*O*-glucuronide isomer avec 28,36% et 26,54% respectivement. Dans la station A3, la composition chimique des plantes a été identifiée avec six composés, parmi lesquels le 1-méthyl-2-(p-nitrophényl)-benzimidazole était le plus dominant avec une dominance relative de 40,73%. Alors que l'extrait de la station A4 était le plus riche, en nombre, avec 29 composés et principalement constitué du 2-phénazine carbonitrile (10,64%), Terpinenol-4 (10,04%) et 4H-1-benzopyran-4-one,2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2phenyl(S)(8,76%), tableau 9 et figure 19.

L'analyse chromatographique des extraits étudiés a affirmé la présence de 59 composés (tableau 9), et parmi eux, Benzothiazole, 2-[(2-methoxyphenyl)dithio], connu pour ses propriétés antimicrobiennes, anticonvulsives, neuroprotectrices, anti-inflammatoires, antitumorales [Jagbir Gagoriaet al , 2015 ; Alessandra Ammazzalorso et al 2020 ; Marina Gjorgjieva,, 2018], le 2-Chloroquinone qui est bien connu comme un antioxydant, antipaludéen et immunostimulant (Neil M. Atherton et al1978 ; Phillip M. Hudnall, 2012). Terpinenol-4 s'est révélé être un antibactérien, antifongique, anticancéreux et anti-inflammatoire (M. N. M. Nogueira, 2014; Chen-Wei Su; 2018). Le Morpholine-4-carbaldehyde-[(4',4',6',6'-tetramethyl-1-thiaspiro[2.3]hex-5'-ylidene)hydrazone] et le Morphinan-6-ol,7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methyl-, (5.alpha.,6.alpha.) ont une activité analgésique (Haddou et al., 2014; Leland et Kotick, 1980). L'acide malique connu pour ses divers usages dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et chimiques (Na Wu, 2022). De plus, l'acide Hexadecanoique et l'acide Palmitique ont été confirmés précédemment comme ayant des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, et antidiabétiques (Glen D Lawrence, 2021; filippou et al , 2014. Hall et al., 2016; Lovejoy et al 2002; Stentz et al 2006; Storm et al 1997; Zhao et al 2016). L'acide Salvianolique s'est révélé avoir des activités anticancéreuses, anti-inflammatoires et cardioprotectrices (Tian Qin et al, 2019).

Ces résultats pourraient expliquer les propriétés thérapeutiques énormes de l'espèce comme antalgique, antiinflammatoire, antioxydante, antifongique, antidiabétique et cicatrisante que nous avons traité, plus loin, dans les chapitres 3 et 4.

L’analyse chimique a permis aussi de révéler que les feuilles de *Withania frutescens* renferment des composés terpéniques (composés volatiles) comme terpinenol-4, thuja-2,4 (10)-diene et 1-naphtalenethiol. Cette indication montre que cette plante contient des huiles essentielles. Et à notre connaissance, il n’y pas d’études antérieures qui mentionnent que *W. frutescens* renferme des huiles essentielles ou des travaux qui évaluent les effets pharmacologiques de ces huiles.

L’analyse de la composition chimique des extraits des plantes des différentes stations a montré une variation quantitative et qualitative du profil chimique en fonction des stations étudiées. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans des travaux antérieurs, qui ont montré que les changements qui se produisent dans le climat et les paramètres physico-chimiques du sol affectent la composition chimique des plantes. De plus, les plantes cultivées sous stress mobilisent l'ensemble des voies métaboliques pour s'acclimater et survivre dans leur environnement naturel (Chaves et al., 2010).

La multiplicité des rôles fonctionnels des polyphénols dans les interactions plante-environnement est cohérente avec leur présence dans les cellules et de compartiments sous-cellulaires. L'accumulation massive des polyphénols dans les feuilles est cohérente avec les fonctions de filtrage des UV (Rozema et al., 1997). Les polyphénols de surface sont des absorbeurs UV efficaces, ainsi que des agents anti-herbivorie (Fermer et al., 2002). Étant donné que les polyphénols sont synthétisés via un complexe multi-enzymatique bien caractérisé localisé dans la surface cytoplasmique du réticulum endoplasmique, des systèmes de transport efficaces des polyphénols délivrent ces métabolites à travers différents compartiments limités par la membrane (Kitamura et al.,2006). Il a été rapporté depuis longtemps que les chloroplastes contiennent des polyphénols et semblent être capables de la biosynthèse des composés phénoliques (Hernández et al., 2009, Pollastriet al., 2011). Et ils ont la capacité à interagir physiquement et chimiquement avec les membranes biologiques, qui dépend fortement de la capacité hydrophile et du nombre de groupes hydroxyle dans une molécule (Korn et al., 2008, Hannah et al., 2006). Ceci est cohérent avec la capacité effective des flavonols à interagir avec la tête polaire des phospholipides à l'interface eau-lipide des membranes, ce qui entraîne l'ordre des lipides et la prévention des dommages oxydatifs (Erlejman et al., 2004). L'augmentation des flavonoïdes de la paroi cellulaire, à mesure que les feuilles vieillissent, s'accompagne d'une diminution des flavonoïdes solubles (Strack et al., 1988). Cela suggère qu'un efflux vacuolaire de ces métabolites et un dépôt dans la paroi cellulaire se sont produits (Zhao et al., 2009).

Les différences de niveaux phénoliques (au sein d'une plante, entre les individus au sein d'une espèce et entre les espèces) sont une réponse à la pression oxydative qui entraîne une augmentation des niveaux phénoliques. Par exemple, les basses températures (qui diminuent les taux de rotation des enzymes photosynthétiques) ou la sécheresse (qui induit la fermeture des stomates des feuilles et à leur tour la limitation du dioxyde de carbone photosynthétique) limitent la photosynthèse, augmentent le stress oxydatif et pourraient donc induire une augmentation de niveaux phénoliques. Les résultats préliminaires du feuillage des semis d'*Eucalyptus nitens* adapté à la sécheresse contenant des niveaux phénoliques deux fois plus

élevés que ceux non adaptés à la sécheresse Grace et al. (1998). Aussi, des études ont montré que les polyphénols étaient environ deux fois plus important dans le feuillage en hiver par rapport à l'été, et en outre, il a une plus grande capacité antioxydante *in vitro* (Courtois et al. 1999, Loggini et al. 1999, Sairam et Saxena 2000, Sgherri et al. 2000, Close et al. 2001).

Cependant, les herbivores ont le potentiel de réduire la valeur adaptative des plantes par la perte de feuillage et la réduction des taux de croissance. De plus, les composés phénoliques peuvent avoir des effets négatifs sur les herbivores (Foley et Hume 1987, Mehansho et al. 1987, Robbins et al. 1987, Bergeron et Jodoin 1991, Murdiati et al. 1992, McArthur et Sanson 1993, Chung-McCoubrey et al. 1997). Par conséquent, il est possible que les herbivores aient été les agents sélectifs de certains composés phénoliques. Les plantes produisent une large gamme de molécules antioxydantes et d'enzymes de piégeage qui peuvent éteindre les espèces chimiques réactives, minimisant ainsi les photodommages potentiels (Conklin et al. 1996, Conklin et al. 1997, Asada 1994, Foyer et al. 1994).

**Tableau 9:** Identification des composés phytochimiques contenus dans l'extrait des feuilles de *W. frutescens*

| T.R | Composés identifiés | Pourcentage relatif (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **A1** | **A2** | **A3** | **A4** |
| **18,10** | 3-Methoxy-4-methyl-6-phenyl-5-oxo-4,5-dihydro-triazine | 6,57 | - | - | - |
| **15,20** | 1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol | - | - | - | 1,19 |
| **15,09** | Terpinenol-4 | - | - | - | 10,04 |
| **14,98** | 2,3-Trimethyl-1,2-heptadien-4-ol | - | 3,06 | - | - |
| **14,86** | 6,6-Dimethyl-2-methylenebicyclo[3.1.1]heptan-3-one | - | - | - | 2,67 |
| **14,61** | Benzothiazole, 2-[(2-methoxyphenyl)dithio]- | 11,92 | - | - | - |
| **14,16** | Bicyclo [3.1.1] heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene | - | - | - | 6,26 |
| **14,10** | Tricyclo [2.2.1.02,6]heptane, 1-ethyl-3-methoxy | - | 1,27 | - | - |
| **13,90** | 1-Isopropyl-4-methylbicyclo[3.1.0]hexan-3-one | - | - | - | 1,24 |
| **13,59** | Bicyclo[3.1.0]hexan-3-one, 4-methyl-1-(1-methylethyl) | - | - | - | 1,10 |
| **13,35** | 1H-Purine-2,6-dione,3,7-dihydro-3-methyl-8-(4-phenylamino-2-thia-4-oxobutyl)- | 14,26 | - | - | - |
| **13,32** | 2,5,5-trimethylhepta-2,6-dien-4-ol | - | - | - | 1,84 |
| **13,28** | Cuproine | - | - | - | 2,34 |
| **13,16** | Thuja-2,4(10)-diene | - | 2,16 | - | - |
| **13,06** | butanedioic acid,( trimethylsilyl oxy); bis (trimethylsilyl) | - | - | - | 1,33 |
| **13,04** | Cyclohexene, 3,5,5-trimethyl-3-phenyl-1-(trimethylsilyloxy)- | 6,92 | | - | - |
| **13,01** | Bicyclo [2.2.1] heptan-2-ol, 2,3,3-trimethyl- | - | 5,24 | - | - |
| **12,97** | Malic acid, o-trimethylsilyl), bis (trimethylsilyl) | - | - | - | 2,77 |
| **12,93** | 2,2'-biquinoline | - | - | - | 3,00 |
| **12,84** | Bicyclo [3.1.1] heptan-3-ol, 2,6,6-trimethyl- | - | 0,94 | - | - |
| **12,68** | 3-oxovaleric acid | - | - | - | 0,65 |
| **12,52** | Hexadecanoic acid | - | - | - | 1.17 |
| **12,30** | Lithospermic acid A | - | | 17,66 | - |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **12,24** | 17-Pentatriacontene | - | | 13,39 | - |
| **11,87** | Palmitic acid | - | - | - | 1,00 |
| **11,71** | 1,2-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)- | - | 1,96 | - | - |
| **11,12** | cyclopentadieneacrylic acid | - | - | - | 0,68 |
| **11,07** | 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, propanoate | - | 1,20 | - | - |
| **10,94** | 2-Phenylethyl alcohol | - | 2,36 | - | - |
| **10,90** | Ferrocene (2-carboxyethenyl) | - | - | - | 0,75 |
| **10,81** | Butanoic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester | 9,80 | | - | - |
| **10,80** | Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)- | - | 2,05 | - | - |
| **10,78** | 4H-1-benzopyran-4-one,2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2phenyl(S) | - | - | - | 8,76 |
| **9,70** | Pyrido (3,2-d) pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione,1,3,6,trimethyl | - | - | - | 3,66 |
| **9,64** | Bicyclo[2.2.1]hept-2-ene, 1,7,7-trimethyl- | - | 4,56 | - | - |
| **9,59** | Trimethylsilyl ether of glycerol | - | - | - | 0,86 |
| **9,48** | 2-Chloroquinone | 17,91 | | - | - |
| **9,37** | 2-cyanophenazine | - | - | - | 7.67 |
| **9,36** | 1-*O*-Caffeoyl glucose | - | 10,15 | - | - |
| **9,25** | 1,1'-Biphenyl, 3'-(1,1-dimethylethyl)-5'-methyl-2,6-dinitro | 29,16 | | - | - |
| **9,14** | Apigenin 7-*O*-allosyl-(1->2)-glucoside | - | 28,36 | - | - |
| **9,10** | 2-phenazine carbonitrile | - | - | - | 10,64 |
| **9,09** | 1-methyl-2-(p-nitrophenyl)-benzimidazole | - | | 40,73 | - |
| **9,0** | 2H-1,4-Benzodiazepin-2-one, 1,3-dihydro-7-nitro-5-phenyl | - | | 9,95 | - |
| **8,61** | Cyclopentan ecarboxylic acid, 3-methyl-2-oxo, ethyl ester | - | - | - | 0.83 |
| **8,57** | m-phenylphenol | - | - | - | 1,04 |
| **8,39** | Tetramethylethylene-1,4-diol 2Tms | - | - | - | 7,58 |
| **8.24** | Morpholine-4-carbaldehyde-[(4',4',6',6'-tetramethyl-1-thiaspiro[2.3]hex-5'-ylidene)hydrazone] | - | - | 12.43 | - |
| **7.87** | 3-biphenylol | - | - | - | 2.92 |
| **7.79** | Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl- | - | 3.90 | - | - |
| **7.77** | Morphinan-6-ol,7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methyl-, (5.alpha.,6.alpha.) | 3,44 | - | - | - |
| **7.47** | 1-Naphtalenethiol | - | - | | 0.72 |
| **7.06** | Benzeneethanal, 4-[1,1-dimethylethyl]-.alpha.-methyl- | - | | 5.96 | - |
| **5.12** | Pyradiazine,3-chloro-6-(methylthio) | - | - | - | 1.72 |
| **5.02** | Salvianolic acid F derivative | - | 0,83 | - | - |
| **4.95** | Methanamine,N,N-di(2-trimethylsilyloxyethyl) | - | - | - | 13,34 |
| **4.95** | Quercetin-3-*O*-glucuronide isomer | - | 26,54 | - | - |
| **4.85** | Silanamine, N,1,1,1-Tetramethyl-N-(Trimethylsilyl) | - | 0,51 | - | - |
| **4.67** | 3H-pyrazol-3-one, 2-4-dihydro-5-phenyl | - | - | - | 2.29 |

*T.R : Temps de retention

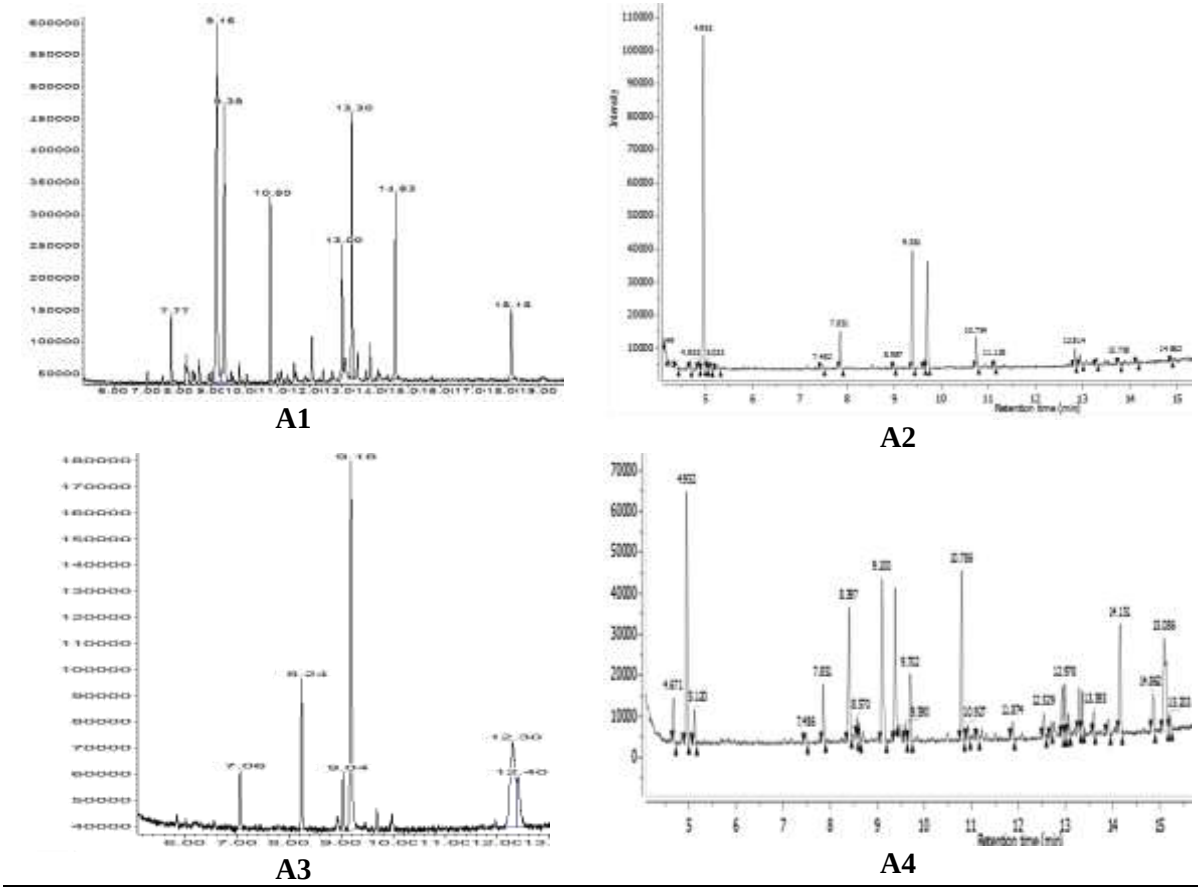



**Figure 19:** Profil chromatographique en phase gaseuze (GC/MS) des composés phytochimiques de l'extrait de *W. frutescens* dans les quatre stations.

## IV. Conclusion

Dans la présente étude, nous avons présenté des éléments des mécanismes de réponses de *W. frutescens* à divers stress abiotiques et biotiques. Les réponses de *W. frutescens* au stress environnemental ont été discutées à la lumière des aspects topographiques, climatologiques, morphologiques, histologiques et phytochimiques. La compréhension des mécanismes possibles impliqués dans les conditions de stress peut être une question clé pour la gestion appropriée des ressources naturelles.

Nous pouvons confirmer que *W. frutescens* a développé différentes stratégies d'adaptation pour persister dans des conditions écologiques difficiles. L'évaluation de la germination et du bouturage a révélé que la plante a un taux important de régénération en conditions expérimentales.

L'usage de cette plante par la population autochtone contre certaines infections a été signalé. L'évaluation et la validation scientifique de l'utilisation de cette espèce comme un traitement de certaines maladies nécessite une étude pharmacologique *in vitro* et *in vivo* afin de valoriser son potentiel thérapeutique. Ce travail fera l'objet du chapitre qui suit.

## *Chapitre 3* : Evaluation des activités biologiques des extraits des feuilles et des racines de *Withania frutescens*

## I. Introduction

Les plantes possèdent la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques complexes, de nombreuses molécules bioactives qui appartiennent aux métabolites primaires (protéines, acides aminés...) ou bien secondaires (polyphénols, alcaloïdes, flavonoïdes...) qui jouent un rôle crucial dans leur développement normal ainsi que dans leurs fonctions d'adaptation aux conditions environnementales. Elles contiennent une immense variété de molécules bioactives à usage thérapeutique, agroalimentaire, et cosmétique (Chabrier, 2010).

Au cours des dernières décennies, les médicaments à base de plantes sont les plus utilisés à cause de leur efficacité, coût relativement bas et aussi leurs effets secondaires faibles (Ekor, 2014). De nos jours, plusieurs recherches sont menées sur le pouvoir thérapeutique de nombreuses plantes médicinales. Cependant, l'utilisation des plantes pour la médication sans rapport scientifique valide sur les profils toxiques des plantes peut causer de sérieux problèmes pour la santé humaine (De Broe et al., 2016).

L'étude toxicologique est nécessaire pour déterminer les doses toxiques potentielles des plantes ou de leurs dérivés. Plusieurs facteurs influençant le profil toxicologique doivent être pris en compte, notamment le stade de croissance, la maturité des plantes et les parties de plantes utilisées (feuilles, racines, écorce, fleurs, graines, etc.), les conditions de stockage des produits (fraîchement récoltés ou stockés pendant une longue période), ainsi que la variation saisonnière du contenu phytochimique (El Hilaly et al., 2004).

Ce chapitre vise à étudier le profil pharmacologique *in vivo* de *W. frutescens* par l'étude du pouvoir antioxydant, antimicrobien, anti-inflammatoire et antidiabétique ainsi que la toxicité subaiguë et aigue. Cette démarche tente à optimiser l'utilisation effisciente et sûre des différentes parties de cette plante comme phytoremède.

## II. Matériel et méthodes

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans le présent travail, comporte les parties aériennes (feuilles) et les parties souterraines (racines) de *W. frutescens* (Figure 20). Les différentes parties ont été récoltées au printemps, mois de Mars à Avril (2017) car c'est la saison où le développement et la floraison sont au maximum, d'autant plus que la population autochtone collecte la plante dans cette période.

L'ERWF et l'EFWF sont préparés à partir de la poudre de cette plante, 50 g de la poudre est mélangée avec 350 ml d'éthanol et 150 ml de l'eau distillée afin d'obtenir une extraction de 10%. Après une macération pendant 24h, le mélange a été filtré et séché par un rotavapeur, et l'extrait séché a été conservé à 4°C afin de réaliser des tests pharmacologiques.



Partie aérienne (feuilles) Partie souterraine (racines)

**Figure 20** : Parties étudiées de *Withania frutescens*

## 2. Activité antioxydante de l'ERWF et de l'EFWF

Le pouvoir antioxydant des deux extraits testés a été évalué *in vitro* en utilisant quatre tests, le test du DPPH·, test du pouvoir réducteur (FRAP), capacité anti-oxydante total (CAT) et le test de la décoloration du ß-carotène.

### 2.1. Piégeage du radical libre DPPH·

Le test de DPPH· est réalisé en suivant la méthode décrite par Bektas (Baktas et al., 2005). Cent microlitre de chaque extrait testé sont mélangés avec 750 µl d'une solution méthanolique de DPPH· (0,004%). Après une incubation dans la température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 517nm. Le contrôle négatif contient tous les réactifs en remplaçant l'échantillon par le méthanol. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de DPPH·, ce pourcentage est calculé selon la formule suivante :

$$PI(\%)= (A_0\text{-}A/A_0)*100$$

PI : Pourcentage d'inhibition ; A0 : Absorbance de la solution du DPPH· sans l'échantillon (contrôle négatif) ; A : Absorbance de la solution du DPPH · en présence de l'échantillon.

### 2.2. Test du pouvoir réducteur

Ce test a été effectué selon la méthode de Moattar (Moattar et al., 2016) ; 500 µl d'une solution de phosphate buffer (0,2M ;pH=6,6) et 500 µl de potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] (1%) sont ajoutés à 100 µl des différentes concentrations des échantillons préparés dans le méthanol. Après incubation 20 minutes dans le bain-marie à 50°C ; 500 µl d'une solution aqueuse de TCA à 10%, 500 µl de l'eau distillé et 100 µl de $FeCl_3$ (0,1%) sont ajoutés au milieu réactionnel. Puis l'absorbance est déterminée à 700nm contre un blanc contenant tous les réactifs en absence de l'échantillon testé. Les résultats sont exprimés en concentration effective à 50 % (CE-50) qui traduit la concentration d'antioxydant nécessaire pour l'obtention d'une absorbance de 0,5 nm.

2.3. Test de la capacité anti-oxydante totale

La capacité antioxydante totale a été estimée selon la méthode décrite par Mašković (Mašković et al., 2012). 25 µl de chaque extrait a été mélangé avec 1 ml du réactif (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de Phosphate de sodium et 4mM de molybdate d'ammonium). Les tubes contenant la solution de réaction ont été incubés à 95°C pendant 90 min. Ensuite, l'absorbance a été mesurée par le spectrophotomètre à 695nm avec un blanc contenant 25 µl du méthanol à la place de l'extrait, après refroidissement à une température ambiante. La capacité anti-oxydante totale a été exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extraits (mg EAA/g d'extraits) à partir d'une courbe d'étalonnage de l'Acide ascorbique.

2.4. Test de décoloration du ß-carotène

Le test de décoloration du ß-carotène a été effectuée comme décrit précédemment (Chanwitheesuk et al., 2005). 1 ml de la solution du ß-carotène dans du chloroforme (2 mg/10 ml) a été introduit dans une fiole, qui contient 10 µl d'acide linoléique et 100 mg de Tween 80. Par un évaporateur rotatif sous vide, le chloroforme a été évaporé à 45 °C pendant 5 minutes. 25 ml d'eau oxygénée ont été ajoutés au résidu. L'eau a été ajoutée lentement au mélange et on agite énergiquement pour former une émulsion. À 2,5 ml du mélange précédent, 100 µl de chaque extrait dilué dans le méthanol, ont été ajoutés dans des tubes. Après une incubation de 2 heures dans un bain d'eau à 50°C, l'absorbance a été mesurée à 470nm. Le pourcentage de l'activité antioxydante a été calculé à partir de l'équation suivante (Zagar et al., 2011).

$$AA\% = (A_E/A_{BHT})*100$$

AA% : pourcentage de l'activité anti-oxydante ; $A_E$ : l'absorbance après 120 min avec le contrôle négatif ; $A_{BHT}$ : l'absorbance après 120 min du BHT.

Un blanc contenant la solution mère sans β-carotène a été utilisé pour amener le spectrophotomètre à zéro. Le pourcentage de l'activité anti-oxydante a été comparé avec le standard BHT qui a été utilisé dans les mêmes conditions des extraits.

## 3. Pouvoir antimicrobien d'ERWF et d'EFWF

Dans la médecine traditionnelle, *W. frutescens* est utilisée pour traiter les intoxications, Par ailleurs et comme le montre les résultats de l'enquête, la population autochtone utilise la poudre des feuilles comme traitement de certaines infections digestives (diarrhée…). Cette étude vise la confirmation du pouvoir antibactérien et antifongique des extraits de cette plante.

3.1. Pouvoir antibactérien

Pour tester l'activité antibactérienne de nos extraits, cinq souches ont était choisies à savoir : *Staphylococcus aureus* (FMD-17), *Escherichia coli* (FMD-Es-18), *Acinetobacter baumanii* (FMD-Ab-18), *Klebsiella pneumoniae* (FMD-Kp-18) et *Streptococcus pneumoniae* (FMD-Spn-18), qui sont fournies par le laboratoire de microbiologie du CHU-Fès, Maroc. Ces souches bactériennes sont responsables d'infections nosocomiales qui constituent un problème majeur de santé publique. L'émergence de la multi-résistance chez ces bactéries est

une des principales causes des échecs de ces traitements. Les antibiotiques utilisés dans notre étude sont : Kanamycine, Oxacilline, Ceftizoxime, et Streptomycine, à une charge de 10 µg/disque. Notre choix s'est porté sur ces antibiotiques vu qu'ils possèdent un large spectre d'action, à la fois actif sur les bactéries à Gram-positif et sur les Gram-négatif, permettant ainsi de déterminer la sensibilité de toute la gamme de bactéries étudiées vis-à-vis de ces antibiotiques. L'ERWF et l'EFWF sont testées sur les souches bactériennes préalablement sélectionnées, d'une part brut avec la méthode des disques et d'autre part dilué dans l'agar 0,2% pour la détermination de la CMI.

A partir des cultures pures, l'inoculum est préparé : On racle 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques, on décharge l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 % NaCl. Après homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la standardisation de la densité optique à 0,5 Mc Farland est réalisée par spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique obtenue doit être comprise entre 0,08 et 0,1 nm ce qui correspond à une concentration de $10^7$ à $10^8$ UFC/ml selon Mc Farland.

### 3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

#### 3.2.1. Méthode des disques

La technique utilisée est celle de la diffusion sur disque en milieu gélosé ou encore méthode des disques (Dayal et al., 2011). Le test est effectué en cultivant les bactéries sur un milieu de Muller Hinton. Chaque boite de Pétri de 90mm a reçu 20 ml du milieu de culture et est ensemencée par la méthode d'inondation. Les disques stériles (6 mm) sont déposés à la surface du milieu, ces disques sont chargés de 10µl d'extrait. Ensuite, ils ont été incubés, inversés à l'obscurité dans une étuve à une température de 37°C durant 24h. Ainsi quatre antibiotiques ont été testés sur les mêmes souches et dans les mêmes conditions afin d'évaluer l'efficacité de nos extraits.

#### 3.2.2. Détermination des valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les CMI des extraits de *Withania frutescens* contre les souches bactériennes testées sont déterminées par la méthode de microdillution (Gulluce et al., 2007). A partir de la solution mère des extraits à 1mg/ml dans l'agar (0,2%), 200 µl de la solution mère d'extrait initialement préparée d'une concentration égale à 1 mg/ml sont ajoutés dans les puits de la première colonne, et le reste des puits sont remplis avec 100 µl de MHB ensuite 100 µl de chaque dilution sont transférés dans les 10 puits consécutifs. Finalement, 50 µl de l'inoculum préalablement préparé sont ajoutés aux puits de microplaque à l'exception des puits de la première colonne (avec une souche par ligne de microplaque). La dernière colonne contenant 100 µl de MHB sans extrait et 50 µl de l'inoculum est utilisée comme contrôle négatif, et le volume final dans chaque puits est de 150 µl. Les plaques sont couvertes avec du parafilm stérile et ensuite incubées à 37 °C pendant 18 heures.

La croissance bactérienne est indiquée par la présence d'un "culot" blanc sur le fond du puit, et à titre d'indicatif de la croissance de microorganismes, 10 µl de TTC à une

concentration de 5 mg/ml sont ajoutés aux puits et incubés à 30 °C pendant 30 minutes, et les puits coloré indiquent la présence des organismes biologiquement actifs (bactéries viables).

## 4. Activité antifongique de l'ERWF et de l'EFWF

La souche fongique utilisée est *Fusarium oxysporum* (LBFs-16), fournit par le laboratoire de Biotechnologie faculté des sciences Dhar El-Mahraz Fès. La méthode de contact direct qui permet la mise en évidence de l'activité antifongique d'ERWF et d'EFWF. Chaque extrait tester est incorporée à des concentrations variables dans le milieu de culture gélosé.

### 4.1. Préparation de la suspension fongique

Les spores des jeunes cultures de la souche sont récupérées après raclage de la surface des boites de Pétri, avec un volume de 3 ml de l'eau physiologique stérile, à partir de cette suspension. Ainsi, la densité optique de la suspension fongique dans NaCl (0,9%) a été mésurée à 630 nm. Dans le but de déterminer la concentration de la suspension de spores à $10^7$ spores/ml, on estime qu'une DO de 0,04 correspond à une concentration de $10^7$ spores/ml.

### 4.2. Préparation des milieux de cultures

Compte tenu de la non miscibilité des extraits étudiés à l'eau et par conséquence au milieu de culture, une mise en émulsion de ces deux extraits a été réalisée par l'Agar 0,2% afin d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des composés à l'état dispersé (Remmal et al., 1993). Les milieux de différentes concentrations (v/v) de 1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600; 1/3200, des extraits avec l'Agar 0,2%, sont incorporées dans le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar). Après autoclavage à 120°C, pendant 20 min, ces concentrations sont préparées de la façon suivante :

- Milieu 1 : (Témoin négatif et positif) : 40 ml PDA seul.
- Milieu 2 : 36 ml PDA + (0,4 ml Extrait + 3,6 ml d'agar 0,2%). 1/100
- Milieu 3 : 38 ml PDA + (0,2 ml Extrait + 1,8 ml d'agar 0,2%). 1/200
- Milieu 4 : 39 ml PDA + (0,1 ml Extrait + 0,9 ml d'agar 0,2%). 1/400
- Milieu 5 : 39,5 ml PDA + (0,05 ml Extrait + 0,45 ml d'agar 0,2%). 1/800
- Milieu 6 : 39,75 ml PDA + (0,025 ml Extrait + 0,225 ml d'agar 0,2%). 1/1600
- Milieu 7 : 39,75 ml PDA + (0,0125 ml Extrait + 0,1125 ml d'agar 0,2%). 1/3200

### 4.3. Ensemencement et incubation des boites de pétri

A l'aide d'une micropipette, nous déposons 10 µl sous forme de spot d'inoculum dans chaque milieu à l'exception du témoin négatif qui ne contient que le milieu seul. Les boites de pétri sont ensuite fermées hermétiquement par le para-film et incubées à 27°C, pendant 6 jours.

### 4.4. Paramètres étudiés

Dans cette étude, on a testé l'influence des deux extraits de la plante sur la croissance mycélienne. Dans le but d'estimer l'évolution de la croissance mycélienne qui est effectuée

quotidiennement, par la mesure du diamètre de la colonie mycélienne du champignon. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec celles des témoins, qui sont démarrés dans les mêmes conditions et le même jour du test.

#### 4.4.1. Taux d'inhibition (TI%)

Les taux d'inhibition de la croissance de la souche fongique par rapport au témoin, sont calculés selon la formule mathématique suivante :

$$TI(\%) = 5[(dc-dE)/dc]*100$$

Où TI (%) = Taux d'inhibition exprimé en pourcentage ; dC = Diamètre de colonies dans les boîtes ; dE = Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait de plante.

#### 4.4.2. Détermination de CMI

La concentration correspond à la plus faible concentration en extraits (CMI) pour laquelle on n'observe pas de pousse visible à l'œil nu sur le milieu solide (Ouraïni et al., 2005). Elle mesure donc, un effet fongistatique et ne renseigne pas sur l'état de la population du champignon, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier. Les boites de pétri qui contient des concentrations et montrent l'absence de la croissance mycélienne, elles ont été sélectionnées pour déterminer la CMI.

#### 4.4.3. Détermination de la vitesse de croissance

La vitesse de la croissance mycélienne de la souche fongique de chaque concentration est déterminée par la formule mathématique suivante (Cahagnier et al., 2000) :

$$\mathbf{VC} = \mathbf{D_1}/\mathbf{Te_1} + (\mathbf{D_2} - \mathbf{D_1})/\mathbf{Te_2} + (\mathbf{D_3} - \mathbf{D_2})/\mathbf{Te_3} + \cdots + (\mathbf{D_n} - \mathbf{D_{n-1}})\mathbf{T_n}$$

Où D : Diamètre de la zone de croissance de chaque jour (mm) ; Te : Temps d'incubation (jour).

## 5. Evaluation de la toxicité de l'ERWF et l'EFWF

Cette partie a pour but d'évaluer la toxicité aigue et subaigue des extraits de *W. frutescens*, chez l'animal selon les guidlines OCDE (425 et 423)

### 5.1. Animaux utilisés

Le protocole expérimental utilisé dans cette étude est conforme aux recommandations standards pour le soin des animaux utilisés dans la recherche et l'enseignement (Olfert et al., 2011).

Des souris (Albinos Swiss) obtenues auprès du Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agro-Alimentaire et Santé, Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès (2019), pesant 22 à 27 g et âgées de 8 semaines ont été utilisées pour réaliser la présente étude. Les animaux ont été logés dans des cages (cinq souris/cage) dans un environnement contrôlé avec

une température maintenue à 22±2 °C et un cycle lumière-obscurité de 12 h pour une période d'acclimatation de deux semaines (Chebaibi et al., 2019). Les animaux ont été nourris avec des granulés standards pendant la période d'étude et ont eu un accès libre à l'eau.

### 5.2. Préparation des solutions d'essai

L'extrait hydro-éthanolique a été solubilisé dans de l'eau physiologique (NaCl, 0,9%), puis le mélange a été homogénéisé par agitation (3-5 min) avec un agitateur magnétique. La solution obtenue a été conservée dans un réfrigérateur après chaque administration orale (Chebaibi et al., 2019). Le volume de la solution choisie pour l'administration a été déterminé par la formule suivante :

$$V = (D \times P)/C$$

Avec V : volume de la solution choisie pour être administrée (mL) ; D : dose (mg/kg) ; P : poids de l'animal (kg) ; C : concentration de la solution choisie pour être administrée (mg/mL).

### 5.3. Test de la toxicité aiguë

La toxicité aiguë de chaque extrait a été évaluée chez la souris selon les directives 423 (OCDE, 423). Nous avons choisi des doses différentes dans chaque extrait de cette plante. Après le traitement, les animaux ont été observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes et régulièrement pendant les 24 heures suivantes avec une attention particulière pendant les 4 premières heures. Les animaux ont été ensuite observés quotidiennement pendant 14 jours. Les observations ont porté sur les changements comportementaux. Une attention particulière a été accordée à l'observation des diverses manifestations de tremblement, de convulsions, de salivation, de diarrhée, de léthargie et de sommeil. Le poids corporel a également été mesuré chaque jour pendant toute la période d'administration (Chebaibi et al., 2019).

### 5.4. Toxicité subaiguë

L'étude de toxicité subaiguë a été conçue conformément à l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE, 425). Lignes directrices pour l'analyse des produits chimiques dans l'étude de toxicité orale à doses répétées de 28 jours chez les rongeurs (Ramadan et al., 2012). Pour l'étude subaiguë, les souris jeunes et en bonne santé ont été divisées en trois groupes de cinq individus chacun. Les souris ont reçu des doses orales de 400 (groupe II) et 2000 (groupe III) mg/kg/jour alors que les souris témoins ont reçu de l'eau distillée pendant 28 jours. Les signes et symptômes de toxicité ont été observés pendant toute la période d'administration et le poids corporel a été mesuré chaque semaine pendant 28 jours. A la fin de la période expérimentale, tous les animaux survivants ont été euthanasiés pour le prélèvement de sang et d'organes.

#### 5.4.1. Analyse de la biochimie du sérum

L'analyse biochimique du sérum a été effectuée à la fin de l'expérience. Le sang collecté a été transféré dans des tubes heparinés pour être centrifugé à 3500 rpm pendant 10 minutes.

Le sérum a été récupéré et stocké dans des tubes et conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse (Chebaibi et al., 2019). La créatinine, l'urée, l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) ont été évaluées. La mesure des paramètres biochimiques (ASAT, ALAT, urée et créatinine) a été réalisée à l'aide d'un automate Hycel Lisa 300.

#### 5.4.2. Évaluation histopathologique

Les animaux ont été anesthésiés et soumis à une dislocation cérébrale pour le prélèvement des organes vitaux. Les reins, le foie et la rate ont été excisés et pesés pour calculer le poids relatif. Les organes excisés ont été conservés dans du formol à 10% pour une analyse histopathologique ultérieure (Chebaibi et al., 2019).

## 6. Activité anti-inflammatoire de l'ERWF et de l'EFWF

L'utilisation de la plante par voie orale et par voie cutanée par la population autochtone afin de traiter la douleur et les blessures. Nous avons évalué les potentialités antiiflammatoire et antalgique de *W. frutescens* par deux types de préparations. Un extrait à 10% (ERWF et EFWF), et deux formulations sous form de crème de 5% et de 10%.

### 6.1. Préparation de la crème

Les crèmes ont préparé au sein du laboratoire des produits cosmétiques (LECONDOR, Fès). Un gramme de l'extrait (ERWF ou EFWF) a été préparé dans 10 grammes de vaseline neutre à 40 °C. 3 à 5 gouttes de Twin 20 a été ajouté afin d'assurer une miscibilité d'extrait dans ce milieu huileux.

### 6.2. Animaux utilisés

Des rats mâles (100-120 g) obtenus auprès du Centre de Propagation de la Vie Sauvage des Emirats (Missour-Maroc), les animaux ont été logés dans des cages (Cinq rats /cage) dans un environnement contrôlé avec une température maintenue à 22±2°C et à un cycle lumière-obscurité de 12 heures pendant une période d'acclimatation de deux semaines.

### 6.3. Evaluation de l'activité antiiflammatoire de l'EFWF et de l'ERWF

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode de Winter et al., 1962. Des groupes de 5 rats ont été formés. L'extrait a été administré par voie orale à des doses de 300, 400 et 450 mg/kg, le même extrait a été administré par voie locale (application locale) à des doses de 5% et 10% de 90 min avant l'injection de carraghénine 1% (NaCl 0,9%) sous la patte arrière droite.

La circonférence de la pâte a été mesurée avant l'injection de la carraghénine, puis après 3h, 4h, 5h et 6h heures de l'administration du carraghénine sous-cutané. Deux références antiinflammatoires ont été utilisés, l'un oral (Diclofenac 1%) et l'autre cutané (Indométhcine), et le pourcentage d'inhibition de l'inflammation a été ensuite calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{St} - \text{S0})\ \text{Control} - (\text{St} - \text{S0})\ \text{traité}}{(\text{St} - \text{S0})\ \text{Control}} \text{X100}$$

S0 : circonférence avant l'injection de la carraghénine; St : circonférence à un moment donné après l'administration de la carraghénine.

### 6.4. Evaluation de l'activité analgésique

Le test analgésique a été déterminé en estimant le nombre de contorsions abdominales induites par une injection intrapéritonéale (I.P.) d'acide acétique (0,7 %). Des groupes de 5 rats ont été formés. Une heure après l'administration orale des extraits (450 mg/kg). Le syndrome douloureux est évalué en comptant les mouvements d'étirement des pattes arrière et des torsions des muscles dorso-abdominaux. Après 5 minutes (temps de latence) de l'injection de la solution saline d'acide acétique, nous avons compté pour chaque rat le nombre de torsions pendant les 30 minutes suivantes (Hernandez et al., 2002).

### 6.5. Evaluation de l'activité cicatrisante

L'effet de guérison a été évalué par la méthode de la brûlure thermique. Le protocole expérimental utilisé dans cette étude était conforme à la recommandation standard pour le soin des animaux utilisés dans la Recherche (Olfert et al., 2011). Les animaux ont été répartis aléatoirement en 5 lots de 5 rats chacun, les différents lots ont reçu localement soit de la crème neutre (excipient), soit de l'extrait 5%, soit de l'extrait 10% et l'agent cicatrisant de référence sulfadiazine argent 1% comme suit :

- Un groupe témoin ne souffre pas de brûlures thermiques et ne reçoit aucun traitement.
- Un groupe témoin positif de rats recevant localement de la sulfadiazine d'argent à 1% (cicatrisation standard).
- Un groupe témoin négatif de rats traités avec une crème neutre (ne contient pas de molécules cicatrisantes).
- Un groupe expérimental de six rats recevant chacun localement l'extrait à 5% mélangé à la crème neutre.
- Un groupe expérimental de six rats recevant chacun localement l'extrait à 10% mélangé à la crème neutre.

Les brûlures ont été réalisées sur le dos (la région dorsale du rat) préalablement rasé, par un métal chauffé dans de l'eau bouillante (100C°) jusqu'à l'équilibre thermique (atteint à 5 min). Après chauffage, il a été retiré de l'eau, rapidement essuyé, puis appliqué sans pression pendant 5 secondes (Hoşnuter et al. 2004; Hamdi et al. 2002; Cai et al. 2014). Après l'induction des brûlures, les rats des groupes traités ont reçu chacun une application topique du produit destiné à leur lot une fois par jour pendant 25 jours.

Les photographies prises ont été traitées par le logiciel de traitement d'images ImageJ® (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.) que nous avons adapté pour notre étude. Ce programme peut fournir des mesures précises des longueurs et largeurs microscopiques dans n'importe quel système d'unités. Afin de déduire le pourcentage de contraction de la plaie, la surface moyenne des quatre plaies d'un lot a été calculée et comparée à la surface de la brûlure le premier jour, en utilisant l'équation mathématique suivante (Gopinath et al., 2004) :

$$\text{Contraction (\%)} = \frac{\text{taille de la plaie initiale J0} - \text{taille de la plaie à Jn}}{\text{taille de la plaie initiale}} \text{x100}$$

## 7. Evaluation du pouvoir antidiabétique *in vivo* des extraits étudiés

### 7.1. Induction expérimentale du diabète

Les animaux (souris) ont reçu une solution de monohydrate d'alloxan en une seule administration (180 mg/kg) par injection intrapéritonéale (Carvalho et al., 2003). Simultanément, les animaux ont reçu par voie orale une préparation de glucose (0,2 ml/4g/L) pour atténuer tout choc hypoglycémique potentiel dû à l'action de l'alloxan chimique. Après 96 h d'administration d'alloxan, la glycémie plasmatique a été mesurée. Les souris à jeun dont la glycémie était supérieure à 450 mg/dL ont été prises en compte dans les résultats.

### 7.2. Évaluation de l'activité antidiabétique

L'activité antidiabétique des racines et des feuilles de *W. frutescens* a été menée en utilisant cinq groupes de cinq animaux dans chacun. Les groupes ont été conçus comme suit :

- Les groupes 1 et 2 ont été sélectionnés pour être des contrôles normaux et diabétiques respectivement, qui ont reçu le véhicule (0,2 ml de solution saline).
- Le groupe 3 a reçu du Glibenclamide, utilisé comme médicament standard (administration orale, 2 mg/kg).
- Les groupes 4 et 5 ont reçu un extrait de plante à 200 et 400 mg/kg respectivement.
- Pendant la période expérimentale, la glycémie des animaux a été mesurée à 1, 7, 14, 21 et 28 jours. Tous les animaux ont été placés sous contrôle en notant les changements de poids corporel.

### 7.3. Évaluation de l'activité antihyperglycémique

Le test antihyperglycémique a été réalisé pendant 12 heures après la première mesure de la glycémie le premier jour des conditions d'activité antidiabétique. Le test antihyperglycémique a été réalisé en mesurant le FBG dans 1h, 1h30, 3h, 6h, et 12 h des souris après avoir été traitées avec l'extrait végétal aux doses de 200 et 400 mg/kg. Pour effectuer la comparaison, le Glibenclamide a été utilisé comme standard de référence.

## 8. Analyses statistiques

Les résultats présentés dans le présent travail de recherche ont été exprimés en moyenne avec les écarts types des tests en répétitions. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 7.0. La normalité a été vérifiée par l'utilisation de Shapiro-Wilks et l'homogénéité par le test t. L'analyse de la variance a été effectuée par ANOVA et le test HSD (honestly significant difference) de Tukey a été utilisé comme test post hoc pour les comparaisons multiples. Une différence significative a été considérée à $p < 0,05$.

## III. Résultats et discussion

### 1. Rendement d'extraction

La préparation des extraits à partir de la plante étudiée a révélé que les extraits obtenus présentent généralement un aspect visqueux de couleur marron. Le rendement a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec rendu en poudre, les résultats ont été exprimés en pourcentage. Les résultats obtenus montrent que les rendements en extraits sont variables et le rendement le plus élevé est celui de l'ERWF suivi par l'EFWF avec des pourcentages de 26,84% et 23,67% respectivement.

### 2. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits racinaires et des feuilles a été testée par la capacité de piégeage du radical libre DPPH·. Les résultats obtenus dans le test pour mesurer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH· et l'IC-50 sont présentés dans la Figure 21. L'IC-50 est lié à la capacité antioxydante d'un composé phytochimique, car il exprime le besoin du contenu antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la concentration du radical libre. Sur la base des résultats obtenus, on constate que le pourcentage d'inhibition des radicaux libres pour les extraits est inférieur à celui du BHT pour toutes les concentrations utilisées. L'activité anti-radicalaire de l'extrait de racine (IC-50 = 0,36 µg/ml) est supérieure à celle de l'extrait des feuilles (IC-50 = 6,63 µg/ml), cette dernière reste inférieure à celle du BHT (IC-50 = 0,12 µg/ml). Alors que celle de l'extrait de racines est plus proche de l'activité anti-oxydante du BHT. Les études réalisées par El Bouzidi et al., 2013, sur les mêmes parties que nous avons étudié, ont rapporté des valeurs supérieures à nos résultats, ce qui confirme que nos extraits ont un pouvoir antioxydant important.

D'après ces résultats de la figure 22, les deux extraits ont des activités antioxydantes significativement plus faibles que la référence (Quercétine). Ainsi, la concentration efficace à 50% des extraits étudiés semble être la même. Les ions métalliques sont nécessaires au fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien maîtrisé, ces mêmes ions peuvent provoquer une peroxydation lipidique, un stress oxydatif ou des lésions tissulaires (Ozturk et al., 2007).

Pour la méthode FRAP, la révélation du pouvoir réducteur est basée sur le passage de la couleur jaune du ferrocyanure de potassium à une couleur bleu verdâtre dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque échantillon. Ce dernier dépend essentiellement de la quantité de réducteurs présents dans le milieu d'essai. Ceci se traduit par l'augmentation de l'absorbance qui est mesurée à 700 nm. La présence de composés phytochimiques dans les extraits de plantes réduit le complexe $Fe_3^+$/ferricyanure en un ferreux. Il peut évaluer le $Fe_2^+$ en calculant et en suivant l'évolution de la densité de couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (Ozturk et al., 2007; Bougandoura et al., 2013).

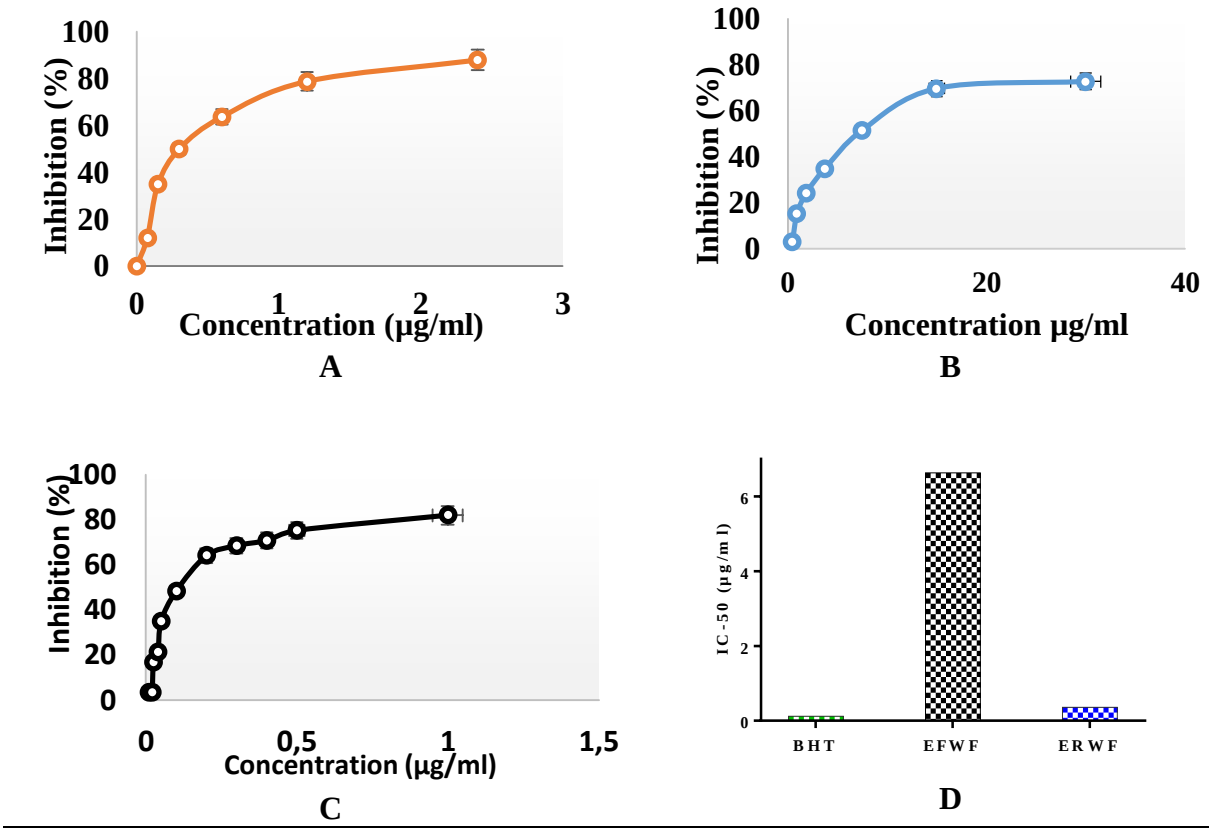



**Figure 21**: Activité antioxydante par la méthode de DPPH· pour l'ERWF (A), l'EFWF (B), BHT (C) et leur IC50 (D).

De nombreuses publications ont montré que l'activité antioxydante est liée au pouvoir réducteur des composants phytochimiques de certaines espèces végétales. La présence de composés hydroxylés dans les composés phytochimiques des extraits de plantes leur confère un pouvoir réducteur et ils peuvent être utilisés comme donneurs d'électrons. Pour cette raison, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et des inactivateurs d'oxydants. Le mécanisme d'autoxydation des extraits végétaux dépend de certains paramètres tels que la température, la concentration en ions métalliques et en polyphénols, le pH et la présence d'agents complexants (Ghedadba et al., 2021).

Le standard utilisé est l'acide ascorbique à différentes concentrations et l'expression de la capacité antioxydante totale (Figure 22), est en milligrammes d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g). Le taux du pouvoir antioxydant des extraits étudiés a été obtenu à partir d'une courbe de calibration de l'acide ascorbique. L'extrait de la partie souterraine de la plante étudiée a la meilleure capacité antioxydante totale d'environ 477,65±37,60 mg/g, tandis que l'extrait des feuilles a une activité d'environ 317,03±46,61 mg/g.

La décomposition des acides gras est l'une des causes de la détérioration de certains aliments. L'utilisation de conservateurs naturels est importante dans l'industrie alimentaire, notamment pour inhiber l'oxydation des acides gras. Dans ce test, le β-carotène est utilisé pour inhiber l'oxydation de l'acide linoléique. La diminution de la DO du contrôle négatif est la

plus importante suivie par l'extrait de feuilles, l'extrait de racines et enfin le BHT. Ce changement d'absorbance à différents intervalles de temps montre que nos extraits semblent être efficaces comme inhibiteur d'oxydation de l'acide linoléique. Nous constatons que l'estimation du β-carotène existe des deux extraits, du BHT et du contrôle négatif diminue progressivement, cette diminution est importante au début alors qu'après 100 min devient très faible.

La diminution de la DO du contrôle négatif est la plus importante suivie par l'extrait de feuilles, l'extrait de racines et enfin le BHT. Ce changement d'absorbance à différents intervalles de temps montre que nos extraits semblent être efficaces comme inhibiteur d'oxydation de l'acide linoléique (Figure 23).

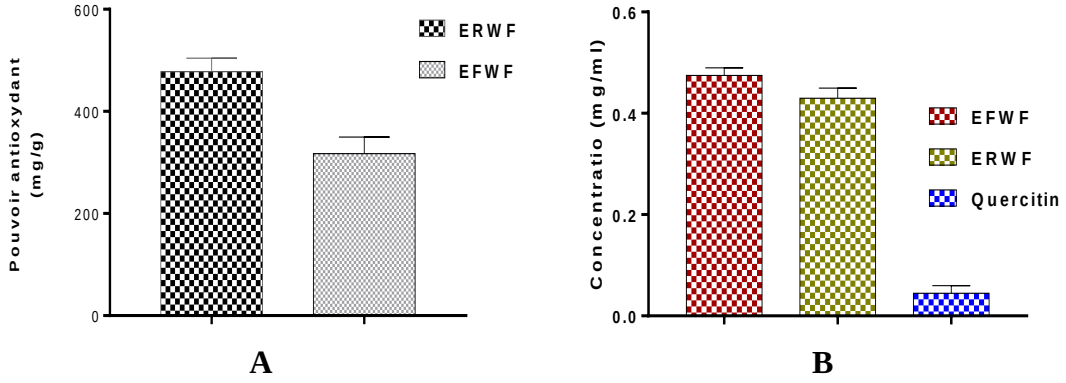



**Figure 22**: Résultats de la capacité antioxydante par la methode de phosphomolybdate (A) et la concentration efficace 50% (CE-50) des extraits et de la quercétine en utilisant la méthode FRAP (B)

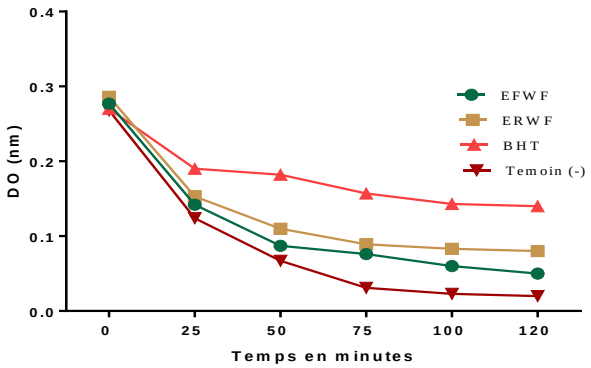



**Figure 23:** Absorbance du β-carotène en présence des extraits étudiés, du BHT et du contrôle négatif.

Ces résultats montrent que les extraits étudiés et le BHT inhibent l'oxydation de l'acide linoléique par rapport au contrôle négatif. Il faut noter que l'inhibition de l'oxydation était moins importante pour les feuilles (57%) que pour les racines (63%), l'activité antioxydante des deux extraits reste donc moins importante que l'antioxydant BHT utilisé comme référence. Le test antioxydant des extraits est confirmé par les quatre méthodes utilisées.

D’autres recherches ont soulevé une disparité de très grandes différences sur la corrélation entre le contenu phénolique et le pouvoir antioxydant, ce qui a poussé la recherche scientifique plus loin vers la structure moléculaire des composés phytochimiques pour connaître le mécanisme de réaction de certains composés phytochimiques précisément le contenu phénolique. Certaines études ont montré une bonne corrélation entre les IC50 et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, tandis que d'autres n'ont pas mis en évidence cette correlation (Athamena et al., 2010; Mariod et al., 2010).

De plus, l'activité antioxydante est positivement corrélée avec la structure chimique des produits phytochimiques. En général, les polyphénols ayant un nombre élevé de complexes hydroxyle ont une activité antioxydante élevée en raison de leur capacité à donner plus de sites libres sur les molécules pour piéger les radicaux libres (Heim et al., 2002; Torres et al., 2007). Ceci peut expliquer en partie pourquoi l'activité anti-radicale libres dépend du nombre, de la position et de la nature des substituants sur les cycles B et C (groupes hydroxyle, métaxyle, glycosylés) et du degré de polymérisation. Ainsi, l'effet antioxydant ne dépend pas seulement de la concentration mais aussi de la structure (Roodrigez et al., 2018).

### 3. Activité antibactérienne

Le test qualitatif de l'activité antibactérienne des échantillons de racines et de feuilles contre les bactéries testées a été réalisé par la méthode du disque sur milieu solide. Les zones d'inhibition des extraits et des antibiotiques sont regroupées dans le tableau 10.

D'après les valeurs enregistrées dans le tableau 10, les extraits ont une activité antibactérienne modérée contre toutes les souches étudiées (diamètre des zones d'inhibition entre 8 et 14 mm). L'extrait des parties souterraines était plus ou moins efficace par rapport à l'extrait des feuilles.

**Tableau 10**: Pouvoir antibacterien d’ERWF, d’EFWF et les antibiotiques sur milieu solide.

| | **Diamètre de la zone d’inhibition (mm)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | **Antibiotiques** | | | |
| | **ERWF** | **EFWF** | **OX** | **S** | **K** | **ZOX** |
| ***E. coli*** | 13,5±0,7$^{a}$ | 11,0±1,4$^{a}$ | 29,5±2,1$^{c}$ | 16,0±1,4$^{b}$ | 17,5±0,7$^{b}$ | 13,0±1,4$^{a}$ |
| ***S. aureus*** | 13,0±1,4$^{a}$ | 13,5±0,7$^{a}$ | 24,0±1,4$^{c}$ | 20,0±1,4$^{c}$ | 17,0±1,4$^{b}$ | 14,5±0,7$^{a}$ |
| ***A. baumanii*** | 12,0±1,4$^{c}$ | 9,5±0,7$^{b}$ | 0$^{a}$ | 16,0±1,4$^{c}$ | 15,0±1,4$^{c}$ | 20,0±1,4$^{d}$ |
| ***S. pneumoniae*** | 11,5±0,7$^{b}$ | 10,5±2,1$^{b}$ | 0$^{a}$ | 19,5±0,7$^{d}$ | 15,0±1,4$^{c}$ | 21,0±1,4$^{d}$ |
| ***K. pneumoniae*** | 11,5±0,7$^{a}$ | 12,0±1,4$^{a}$ | 30±1,4$^{d}$ | 21,5±2,1$^{c}$ | 16,5±0,7$^{b}$ | 12,5±0,7$^{a}$ |

kanamycin (K); Oxacillin (OX); Ceftizoxime (ZOX); Streptomycin (S). Les valeurs ayant la même lettre (a, b, c et d), ne représentent pas une différence significative.

Toutes les souches se sont révélées sensibles aux antibiotiques testés avec différents diamètres, à l'exception de deux souches, *Acinetobacter baumanii* et *Streptococcus pneumoniae*, qui se sont révélées résistantes à l'Oxacilline. La concentration minimale inhibitrice des extraits étudiés est en accord avec les résultats obtenus lors du test préliminaire

par la méthode de l'aromatogramme, c'est-à-dire que plus le diamètre autour du disque est grand, plus la CMI est intéressante et c'est le cas pour *A. baumanii* qui donne une CMI de 2,8 mg/ml pour l'extrait de racines (Figure 24).

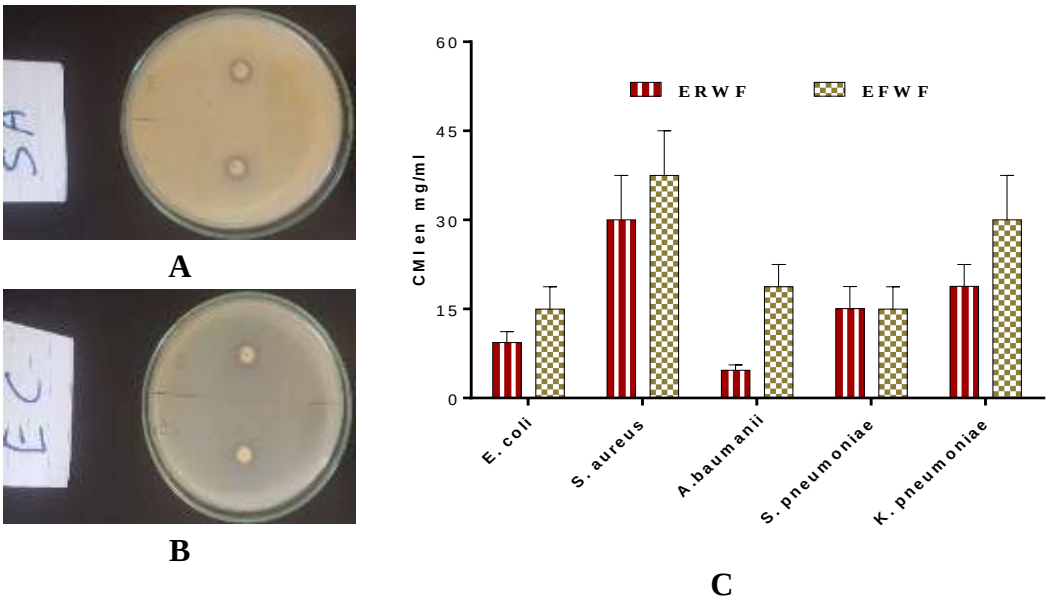



**Figure 24**: Photos de la zone d'inhibtion sur milieu solide de *S. aureus* (A) et *E. coli* (B), et la concentration minimale pour inhiber la croissance bactérienne sur milieu liquide (C).

Les extraits sont évalués avec des souches bactériennes à Gram-positif et d'autres Gram-négatives. La majorité des études sur l'action des substances phytochimiques contre les organismes de décomposition des aliments et les micro-organismes pathogènes d'origine alimentaire s'accordent à dire qu'en général, les substances phytochimiques sont plus efficaces contre les souches bactériennes à Gram-positif que contre les souches à Gram négatif (Delaquis et al., 2002 ; Yu et al., 2020). La faible sensibilité des micro-organismes Gram-négatifs aux agents antibactériens pourrait s'expliquer par le fait qu'ils possèdent une membrane externe sur une paroi cellulaire, ce qui réduit le passage des molécules hydrophobes à travers son revêtement de lipopolysaccharides. De plus, en raison de la nature lipophile de la membrane des bactéries, certains composés phytochimiques peuvent facilement traverser les parois cellulaires et la membrane cytoplasmique de ces microbes, et ils peut provoquer la lyse bactérienne (Bakkali et al., 2008 ; Yu et al., 2020).

### 4. Activité antifongique

Dans un premier temps, la croissance mycélienne de la souche fongique testée est normale (témoin), ce qui n'est pas le cas en présence des deux extraits. Ce paramètre évolue au cours du temps et de l'incubation. L'évaluation du diamètre de la croissance mycélienne est présentée sur la figure 25. Il faut noter que le degré d'efficacité des extraits sur la croissance mycélienne de la souche fongique est observé jusqu'à une concentration de 2,3 mg/ml pour la partie souterraine et de 4,5 mg/ml pour la partie aérienne. Au-delà de ces deux concentrations, aucune croissance n'a été observée (Figure 25a). En revanche, les concentrations plus faibles que celles mentionnées ci-dessus ont un léger effet sur les deux échantillons étudiés par rapport au témoin (Figure 25b).

La croissance mycélienne de la souche fongique a commencé dès le premier jour d'incubation pour les concentrations de 0,28, 0.56 et 1,12 mg/ml respectivement, (Figure 25c). Pour la concentration 2,25 mg/ml, la souche a montré une croissance après quatre jours, ce qui explique l'effet fongistatique de l'extrait. Concernant les concentrations de 9 et 4,5 mg/ml, aucune croissance n'a été notée.

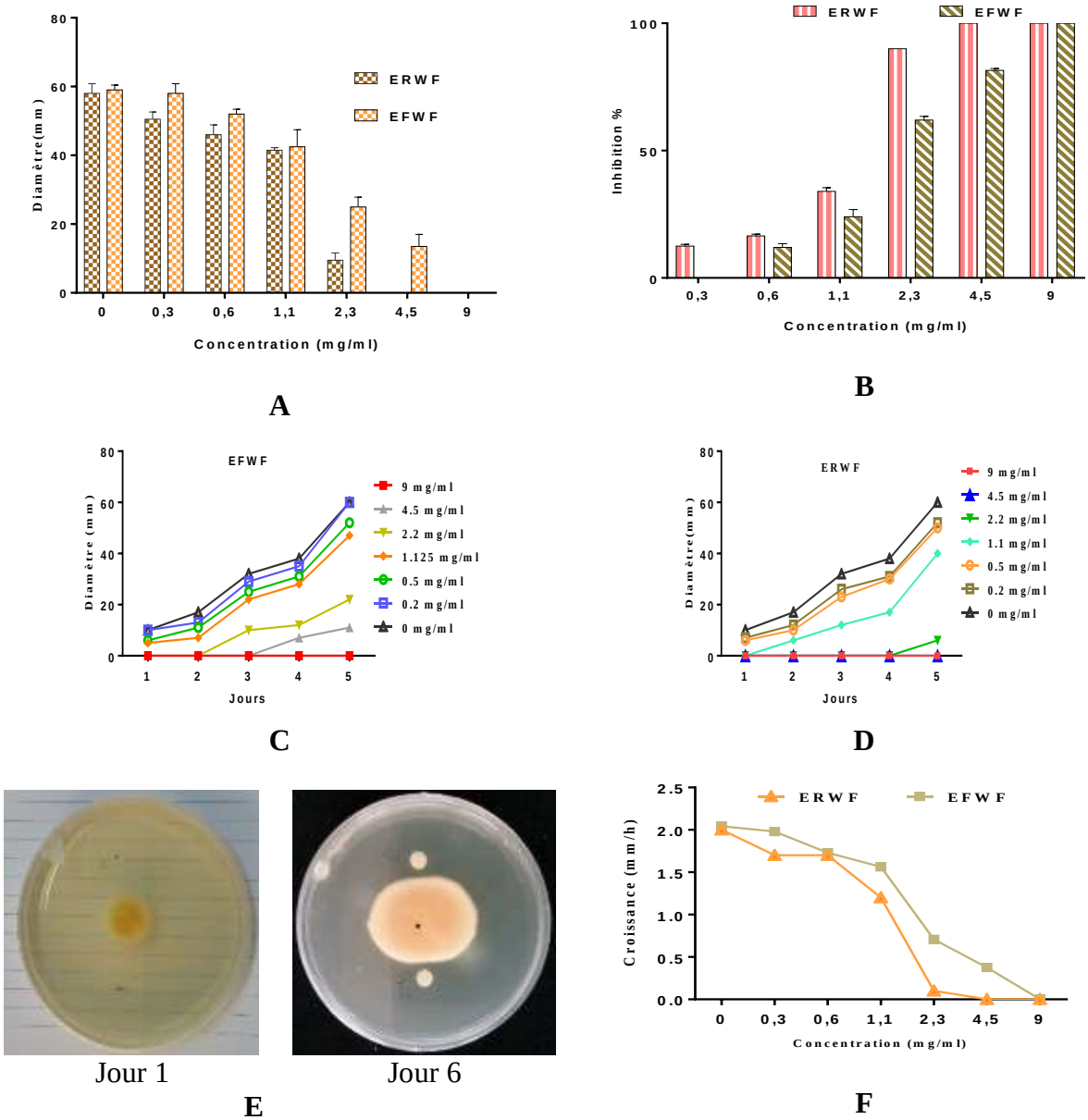



**Figure 25**: Pouvoir antifongique des extraits racinaire et foliaire de *W.frutescens.*

D'après la figure 25d, la croissance mycélienne de la souche fongique aux concentrations de 0,28, 0,56 et 1,12 mg/ml est proche du témoin et a été observée dès le premier jour. Pour les concentrations de 2,25 mg/ml et 4,50 mg/ml, une légère croissance n'est observée qu'après 2 et 3 jours, respectivement. Pour la concentration de 9 mg/ml, il y a une inhibition totale de la souche. Et le taux de croissance le plus élevé est exprimé par le témoin et que ce taux diminue en augmentant la concentration des extraits. L'effet de l'échantillon

aérien sur le taux de croissance mycélienne est plus important qu'en présence de l'autre extrait racinaire.

Il semble qu'il existe des espèces végétales qui pourraient être utilisées dans la lutte contre de nombreuses souches fongiques responsables de différentes formes phytopathogènes (Salhi et al., 2015). L'efficacité des extraits étudiés *in vitro* pourrait être expliquée par la richesse de *Withania frutescens* en composés biologiquement actifs, qui nécessitent une purification après extraction et une identification pour connaître la structure moléculaire responsable de l'effet antimicrobien et l'effet synergique de ces composés. L'élaboration d'une molécule à activité antifongique est liée à l'ultrastructure des trois barrières de la cellule fongique : la paroi chitineuse, les ergostérols membranaires, le matériel génétique (Kolai et al., 2012), et les molécules antifongiques elles-mêmes peuvent provoquer une résistance à la souche fongique (Prasard et al., 2004).

## 5. Toxicité aiguë

Le poids corporel des animaux et l'apparence physique sont des facteurs préliminaires utilisés pour identifier les effets toxiques survenus chez les souris (Sireeratawong et al., 2008).

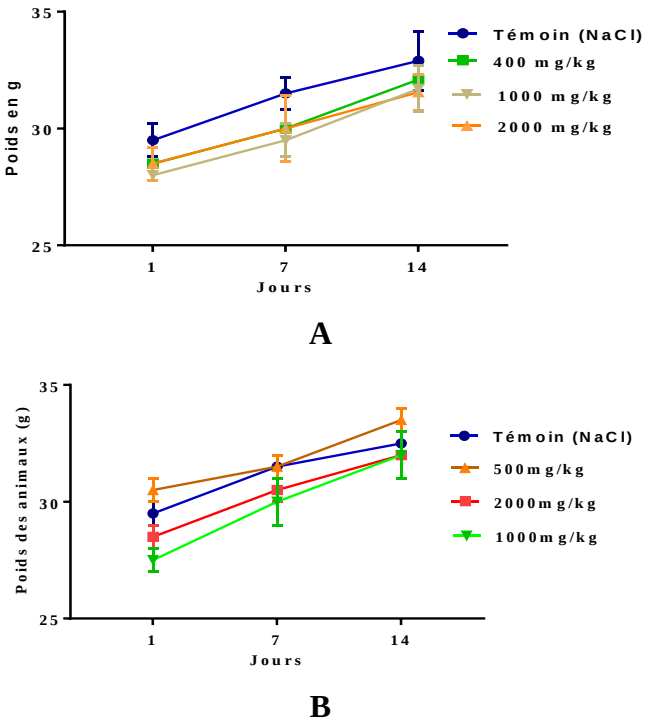



**Figure 26**: Evolution du poids corporel après 14 jours de traitement avec l'extrait des feuilles (A) et l'extrait des racines (B) de *W. frutescens.*

Le poids corporel des souris traitées par les différentes doses n'a pas été affecté de manière négative pendant la période expérimentale (14 jours) (Figure 26). Aucun symptôme clinique n'est apparu chez les souris traitées avec 400 mg/Kg (extrait des fuilles), 500 mg/Kg (extrait des racines) et 1000 mg/kg.

Les animaux ayant reçu 2000 mg/kg ont manifesté une certaine sédation pendant les 40 premières minutes qui ont suivi le gavage. Cet effet pourrait être dû au fait que la famille des solanacées et plus particulièrement le genre *Withania* induit des effets de relaxation comme cela a été rapporté dans des données antérieures (Bhattacharya et al., 2003). Le genre *Withania* est considéré comme une source prometteuse de substances adaptogènes et anti-stress (Bhattacharya et al., 2003).

## 6. Toxicité subaiguë

Le poids des animaux au premier jour était de 23±1g, il y a une petite différence entre le poids corporel des animaux, cela est dû à la sélection aléatoire dans le choix des animaux. L'examen physique et comportemental n'a révélé aucun effet indésirable lié au traitement chez les souris ayant reçu 400 mg/kg, 500mg/kg et 2000 mg/kg par rapport au groupe témoin. Cependant, tous les animaux traités avec la dose maximale, ont pris du poids. Ces résultats pourraient indiquer que l'administration de l'extrait de feuilles de *Withania frutescens* jusqu'à 2000 mg/kg à des souris pendant 28 jours n'a pas d'effet négatif sur l'apparence physique et le poids corporel. La consommation de nourriture et d'eau des animaux recevant l'extrait étudié n'a pas été directement affectée par rapport au groupe témoin (Figure 27a et 27b). Ce résultat est en accord avec d'autres données qui ont montré que les humains prenant l'extrait de *Withania somnifera*, ont gagné du poids et de l'appétit (Aphale et al., 1998 ; prabu et al., 2013).

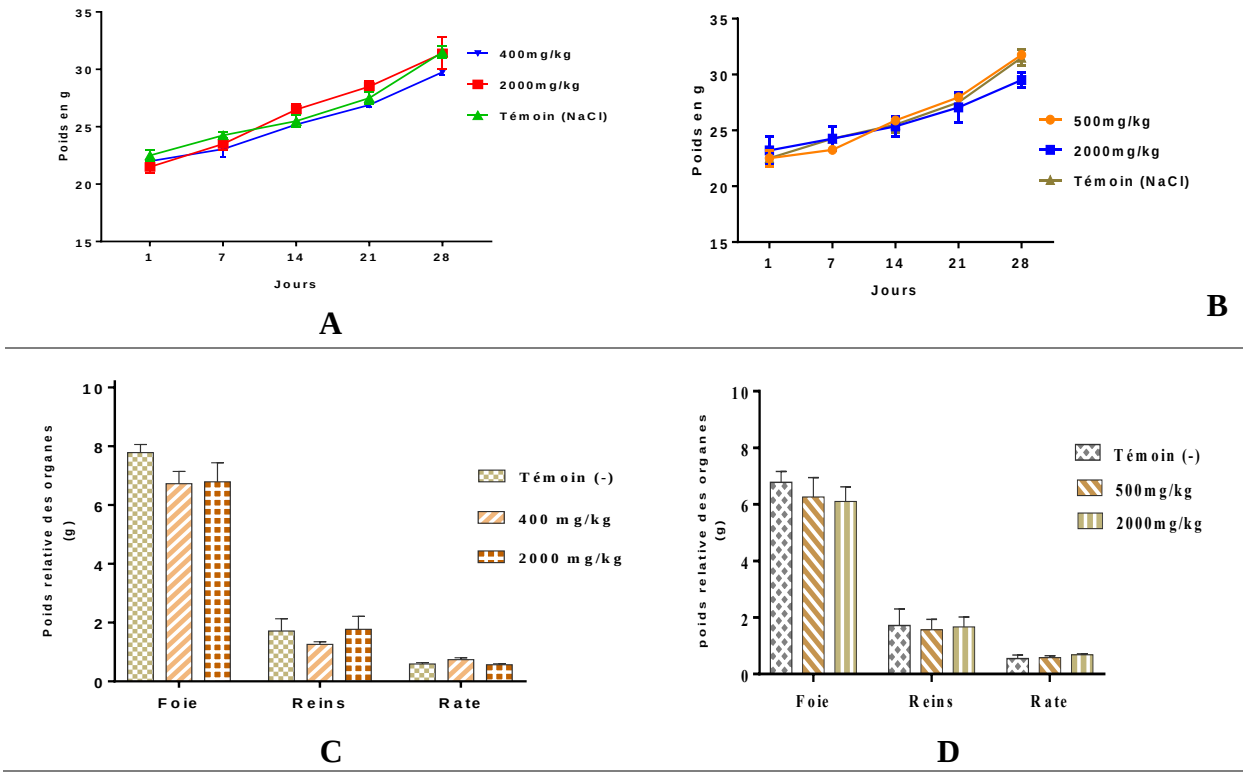



**Figure 27**: Evolution du poids corporel des animaux traitent par l'EFWF (A) et par l'ERWF (B), et poids relatif des organes des reins, du foie et de la rate après 28 jours de traitement avec l'EFWF (C) et avec l'ERWF (D).

Après 28 jours d'administration de l'extrait, les souris ont été sacrifiées pour le prélèvement d'organes tels que le foie, les reins et la rate, ces organes ont été pesées pour calculer le poids relatif de chacun. Le poids relatif des reins, du foie et de la rate des animaux traités n'a pas montré de changement significatif par rapport au groupe témoin (Figure 27c et 27d). Ces résultats sont en accord avec des données antérieures qui ont rapporté que l'administration de toxiques naturels ou chimiques aux animaux peut causer une variation du poids de leurs organes internes (Raza et al., 2002) et donc nous pouvons confirmer la sécurité de l'extrait testé chez l'animal à une dose allant jusqu'à 2000 mg/kg/jour administrée par voie orale.

Les résultats des paramètres biochimiques analysés tels que l'urée, la créatinine et les aminotransférases (ALAT et ASAT) (Figure 28), ont montré que les paramètres sériques des souris traitées avec une dose allant jusqu'au maximum (2000 mg/kg de corps) n'étaient pas directement affectés par rapport aux souris témoins. Ces résultats étaient en accord avec ceux de la toxicité aiguë qui n'ont montré aucun symptôme clinique ni aucun changement de comportement chez les souris traitées avec des doses similaires.

Dans le présent travail, l'hépatotoxicité potentielle de l'extrait a été évaluée en mesurant les activités enzymatiques des aminotransférases (ALAT et ASAT). Une augmentation anormale des activités des aminotransférases (ALAT et ASAT) pourrait fréquemment faire référence à une hépatotoxicité (Chebaibi et al., 2019 ; Fortson et al., 1985). Cependant, aucun changement n'a été notée quant à l'activité aminotransférase des souris traitées par rapport au groupe témoin.

La fonction rénale a également été évaluée pour les effets toxiques potentiels induits par l'extrait en mesurant l'urée et la créatinine en concertation puisque tout changement significatif dans ces paramètres pourrait se référer à une néphrotoxicité (Mukinda et al., 2010 ; Gnanami et al., 2008). Et par conséquence, les résultats n'ont montré aucun effet négatif sur la concentration de l'urée ou de la créatinine par rapport au groupe de contrôle ($p > 0,05$).

L'étude histologique du tissu hépatique des animaux traités après 28 jours de traitement a été soumis aux analyses des paramètres suivantes : canaux biliaires, veine hépatique, artère de la zone portale, graisse hépatique, aucune modification n'a été détectée par rapport aux souris témoins. Ces résultats sont cohérents avec ceux des paramètres biochimiques, qui n'ont montré aucune altération de l'ASAT ni de l'ALAT.

Les tissus rénaux ont également été examinés à la recherche d'une éventuelle altération du tubule distal, du proximal et du glomérule. En conséquence, aucun changement morphologique n'a été remarqué par rapport aux souris témoins traitées avec de l'eau physiologique pendant toute la période d'administration (Figure 29).

Ces résultats ont également été confirmés par les résultats des paramètres biochimiques (urée et créatinine) puisqu'aucune modification n'a été rapportée pour eux. La rate joue un rôle crucial dans l'organisme en tant que filtre du sang, dans lequel les globules rouges sont recyclés. Les résultats de l'examen histologique du tissu splénique excisé chez les animaux

traités avec la dose maximale (2000 mg/kg de corps) n'ont révélé aucune modification structurelle. Ces résultats pourraient confirmer l'innocuité de l'extrait étudié jusqu'à 2000 mg/kg de corps puisqu'aucun effet indésirable n'a été observé sur le système hématopoïétique (Verhelst et al., 2002).

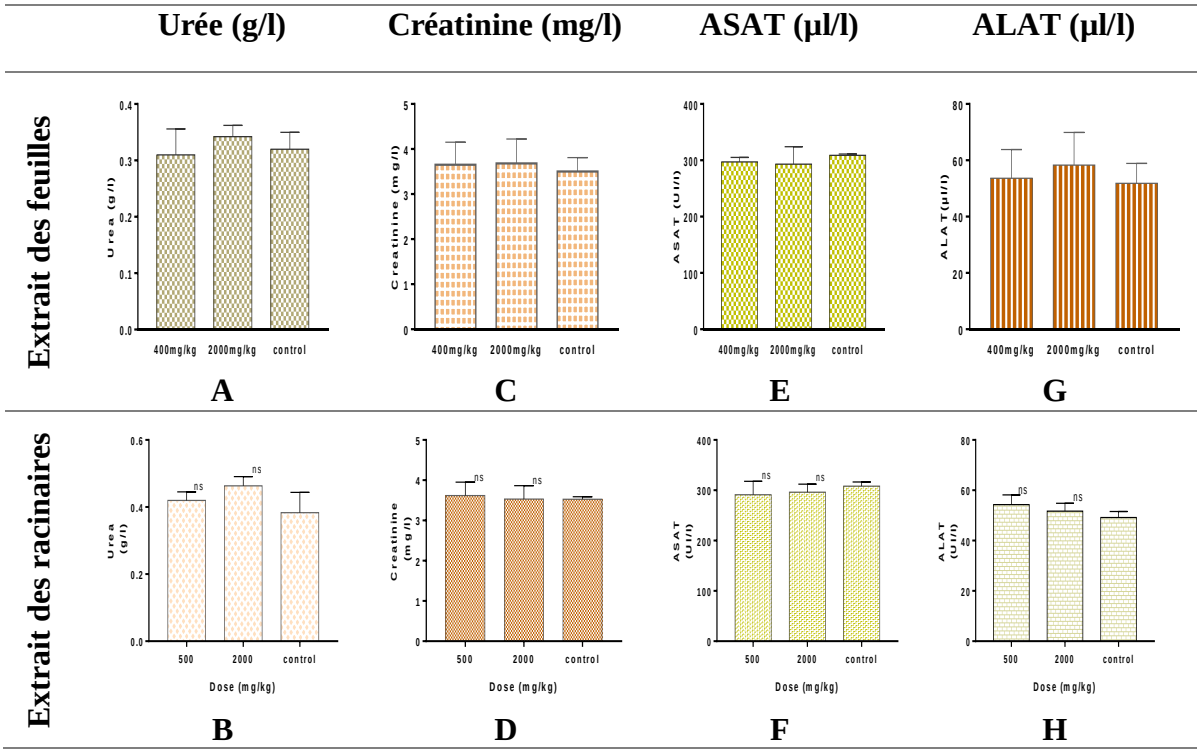



**Figure 28**: Effet de l'extrait de *W. frutescens* sur les paramètres sériques des animaux (A : Urée, B : Créatinine, C : ASAT, D : ALAT). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, n = 5.

Les transaminases ou amino-transférases sont des enzymes qui catalysent le transport des radicaux alpha-amino de l'alanine et de l'acide aspartique vers l'acide alpha-cétoglutarique. Les transaminases se trouvent normalement dans le foie, les muscles, les reins, le pancréas et d'autres tissus. Ces enzymes sont synthétisées dans le cytoplasme des cellules et déchargées dans la circulation sanguine lorsque les cellules sont endommagées (Etame Loe et al., 2017). Une augmentation plasmatique des activités des transaminases entraîne fréquemment des cas de myopathie, de rhabdomyolyse, ou d'infarctus du myocarde, de cirrhose du foie et d'hémolyse (Etame Loe et al., 2017). L'analyse de l'urée et de la créatinine des souris traitées avec l'extrait végétal dans ce travail n'a révélé aucun changement significatif de leurs valeurs par rapport au groupe témoin et cela pourrait confirmer la sécurité de l'extrait chez les souris jusqu'aux doses testées puisque l'augmentation plasmatique de l'urée et de la créatinine est considérée comme un marqueur primaire de la néphrotoxicité (Palani et al., 2009).

Les résultats de la toxicité aiguë de l'ERWF et de l'EFWF n'ont montré aucun effet toxique sur les paramètres sériques ni sur le comportement des animaux, comme le confirme également l'examen histologique qui a montré l'absence de changements morphologiques et

structurels dans les organes des souris traitées. L'utilisation de cette espèce dans la pharmacopée traditionnelle contre l'intoxication pourrait signifier que la plante a vrai et effecient potentiel pharmacologique (Bellakhdar, 1998).

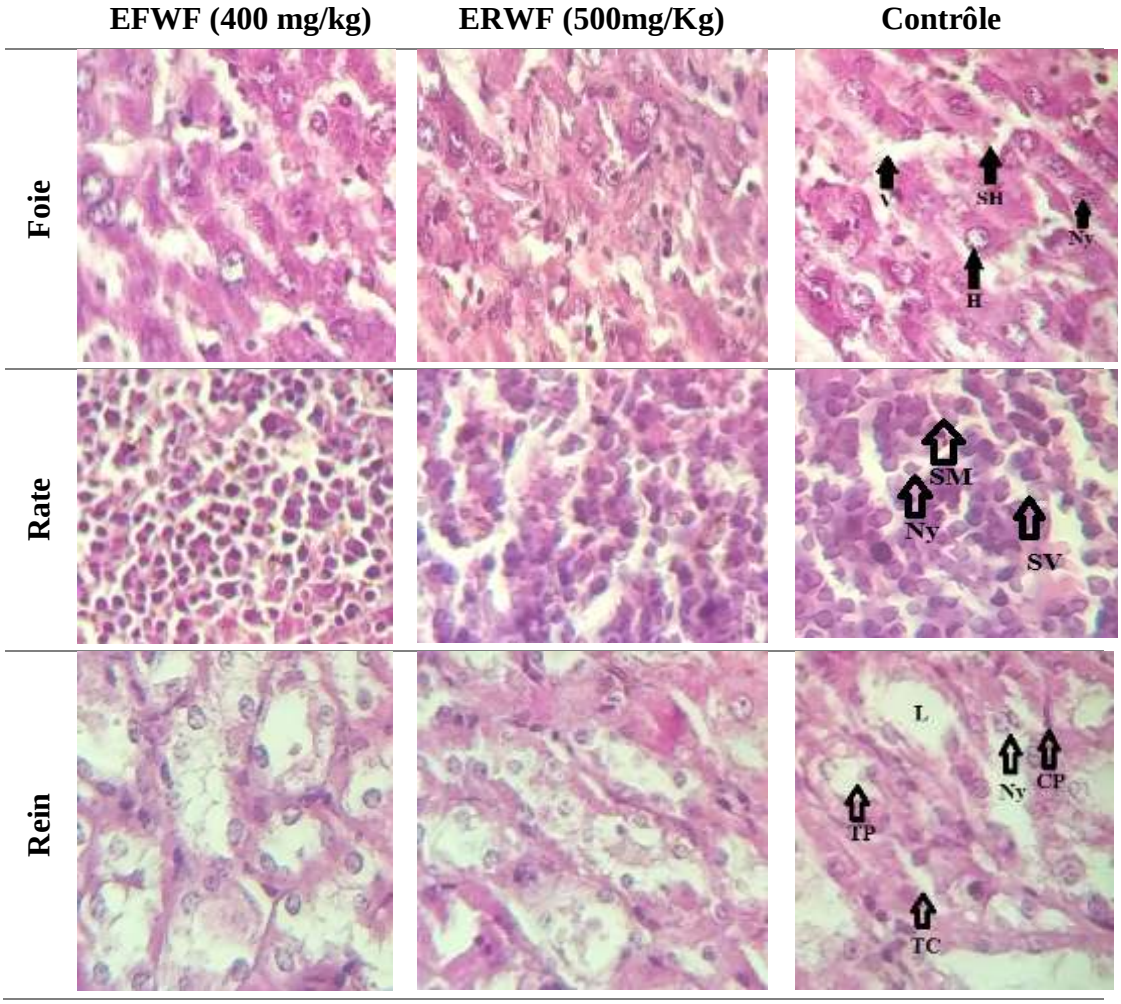


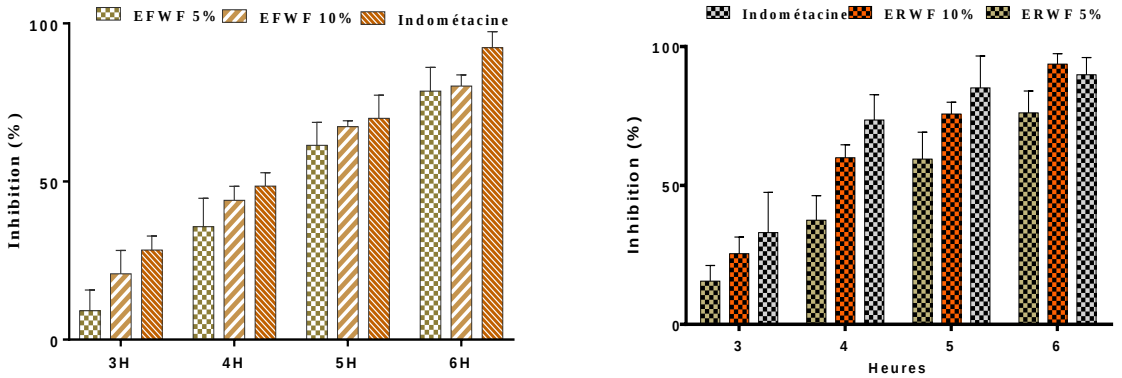

**Figure 29:** Photomicrographies de tranches de foie, de reins et de rates d'animaux ayant reçu l'extrait de *W. frutscens* pendant 28 jours (Hématoxyline/Eosine, X 40). V=veine, SH=sinus hépatique, H=hépatocyte, Ny=noyau, SM= sinus marginal, SV=sinus veineu, L=lumière, TC=tube collécteur, CP=capillaire péritubulaire, TP=tube proximal.

### 7. Pouvoir anti-inflammatoire des extraits de *W. frutescens*

L'inflammation induite par l'injection de carragénine est largement utilisée comme test pour évaluer les effets anti-inflammatoires périphériques.

L'extrait des feuilles administré localement à travers la peau, à des doses de 5% et 10%, semble avoir un effet anti-inflammatoire plus important que l'Indométacines. La crème à 10% a réduit plus significativement le gonflement des pattes injectées par la carragénine, avec une inhibition maximale d'ordre de 80,17%±7,89. Et la crème de 5%, l'activité anti-inflammatoire était moins importante avec une inhibition maximale d'ordre de 78,57%±16,83.

L'extrait racinaire administré localement par voie cutanée, à des doses de 5% et 10%, a un effet anti-inflammatoire supérieur à celui de l'Indométacine. Tel que, la crème 10% a une inhibition maximale d'ordre de 96,87%±5,85. Et la crème de 5%, l'activité anti-inflammatoire est moins importante avec une inhibition maximale de l'ordre de 76,14%±7,88 (Figure 30b).

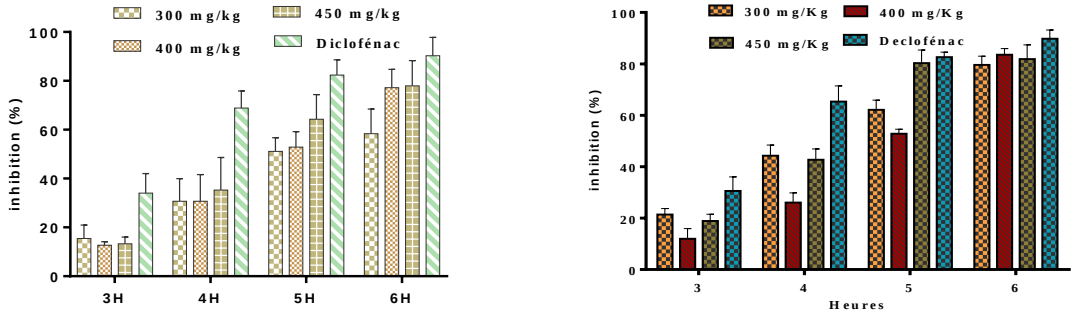



**A** **B**

**Figure 30**: Pouvoir antiiflammatoire par voie cutané de l'extrait des feuilles (A) et racinaires (B).

L'administration de l'EFWF par voie orale, a un effet anti-inflammatoire, avec une inhibition maximale de 82,20 % ± 8,69 à la dose de 450 mg/kg, suivi de 78,20 % ± 10,53 à la dose de 400 mg/kg alors que le Diclofenac (1%) a une inhibition de 90,28 %±7,50 (Figure 31a).

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par voie orale de ERWF a montré que ce dernier, a un effet anti-inflammatoire, avec une inhibition maximale de 78,87% ±7,08 à la dose de 450 mg/kg, suivi par la dose de 400 mg/kg qui inhibe l'œdème de 75,14%±6,39 tandis que le Diclofénac exerce une inhibition de 89,75%±3,44 (Figure 31b).




**A** **B**

**Figure 31**: Pouvoir anti-inflammatoire par voie orale de l'EFWF (A) et de l'ERWF (B).

Cette activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique, administré par voie orale ou locale, peut s'expliquer d'une part par la différence de la composition chimique et d'autre part par l'existence probable de composés phénoliques polaires. En outre, les composés phénoliques, représentés principalement par les flavonoïdes et les tanins, présentent actuellement un grand intérêt scientifique, car ils sont considérés comme de puissants agents antioxydants, antimicrobiens et anti-inflammatoires (Chen at al., 2008 ; Bose et al., 2007 ; Akindele et al., 2007). En outre, cette plante est riche en composés phytochimiques (tanins, mucilages, alcaloïdes, coumarines, quinone libre...) (Elmoussaoui et al., 2019). La crème à 10% a montré une inhibition significative de l'œdème de la patte du rat, induit après l'injection de la carraghénine avec une efficacité maximale à 5 et 6 heures.

En effet, l'injection et l'induction de la carragénine ont provoqué la sécrétion de plusieurs médiateurs chimiques responsables du processus inflammatoire. Cette réponse inflammatoire est biphasique, avec une phase initiale d'environ une heure due à la libération d'histamine et de sérotonine, tandis que la bradykinine est plutot libérée dans la deuxième phase (1,5 à 3 heures), et que la biosynthèse des prostaglandines se produit après la troisième heure (Reanmongkol et al., 2009). Ces médiateurs chimiques augmentent la perméabilité des capillaires sanguins dans les parties enflammées. En conséquence, un exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est à l'origine d'un œdème localisé, qui comprime à son tour les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (Rousselet et al., 2005). En tenant compte de ces indications, il a été proposé que l'effet observé puisse être dû à la capacité de l'extrait de *Withania frutescens* à inhiber la synthèse des prostaglandines par la voie de la cyclooxygénase (Reanmongkol et al., 2009).

## 8. Activité analgésique des extraits de *W. frutescens*

L'évaluation de l'activité analgésique d'EFWF étudié a été réalisée par la méthode de l'acide acétique. Seule la dose de 450 mg/Kg, considérée comme dose efficace, a été étudiée pour son éventuelle activité analgésique et cette dernière était la même que celle utilisée pour l'extrait de *Withania somnifera* qui appartient à la même famille que *Withania frutescens* (Mishra et al., 2000).

Les contractions abdominales des rats traités avec l'EFWF, à la dose 450 mg/kg sont significativement plus faibles que celles du groupe contrôle qui n'a reçu que la solution physiologique de NaCl avec 55,60±5,94 et 90,4±5,27, respectivement. Les rats traités avec le tramadol présentent un effet légèrement plus important que celui des rats traités avec l'EFWF avec 44,0±8,09 contractions abdominales, et le pourcentage d'inhibition de l'extrait test et de référence était de 51,40±7,71% et 38,58±3,91%, respectivement. Alors que les contractions abdominales des animaux traités avec l'ERWF sont significativement plus faibles que celles du groupe contrôle qui a reçu uniquement une solution physiologique de NaCl avec 41,20±2,30 et 82,20±5,04 respectivement (Figure 32).

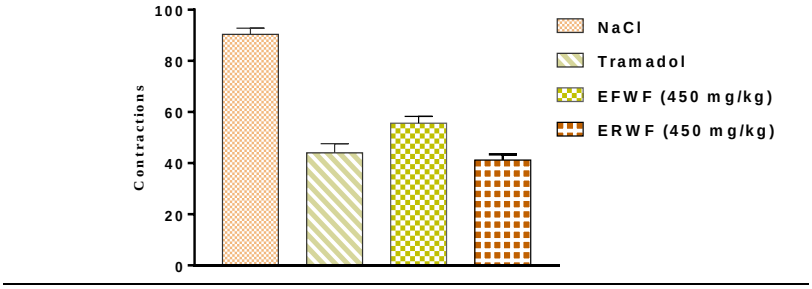



**Figure 32**: Activité antalgique de l'ERWF et de l'EFWF

Les contractions induites par l'injection intrapéritonéale d'acide acétique sont une méthode utilisée pour étudier l'effet analgésique périphérique d'une substance. La douleur provoquée par l'injection de cette dernière est due à la libération de sérotonine, d'histamine, de bradykinine et de prostaglandines (PGEβα, PGFβα). Ces médiateurs induisent une stimulation des neurones périphériques puis une augmentation de la perméabilité vasculaire (Vanderlinde et al., 2009 ; Reanmongkol et al., 2009). L'EFWF et l'ERWF de la plante étudiée ont inhibé

significativement la torsion abdominale de manière dose-dépendante. Cet effet analgésique peut être attribué à l'inhibition de la libération de médiateurs chimiques responsables de la douleur abdominale.

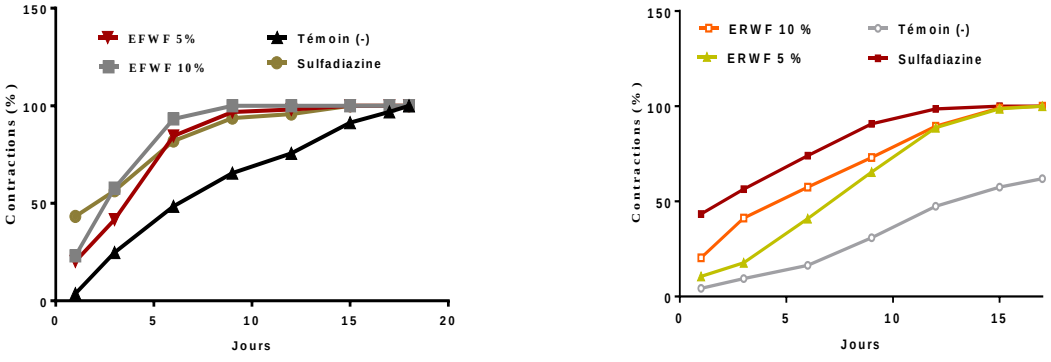
### 9. Activité cicatrisante

L'évolution de la taille des plaies traitées avec l'extrait 10% et 5% par rapport à celle des plaies non traitées a montré que pendant les premiers jours après la brûlure, les rats des deux groupes traités avec l'extrait 5% et 10% n'ont pas montré de réduction significative de la taille des plaies induites par la brûlure cutanée par rapport aux rats non traités.

Après une semaine du traitement par l'EFWF, le lot de l'extrait de 10 % et de 5 % présentent des pourcentages de contraction de 57,43±7,47 % et 40,89±5,17 %, respectivement. Et Après 15 jours, les plaies du lot traité avec les extraits à 10 % et 5 % ont complètement cicatrisé (Figure 33a).

Concernant l'ERWF à 5% et à 10%, l'activité cicatrisane a été de l'ordre de 93,20±3,36% et 84,50±,84 %, respectivement. Au jour 15, les plaies du lot de l'extrait 10% et de l'extrait 5% ont totalement cicatrisé (Figure 33b).

Sur la base des résultats obtenus, nous avons pu confirmer que la crème à base d'extraits de *W. frutescens* présente un effet cicatrisant remarquable qui peut être dû à la richesse de cette plantes aux composés bioactifs. Le criblage phytochimique nous a permis d'identifier les principaux métabolites secondaires de *W. frutescens* présentés par, des flavonoïdes, des coumarines, des oses, des holosides et des mucilages. D'après les résultats obtenus, on peut dire que la pommade à base de l'extrait de *Withania frutescens* a une activité cicatrisante dose-dépendante, puisque les réductions de surface et les pourcentages de rétraction enregistrés sur les plaies traitées avec l'extrait à 10% dépassent ceux traités avec l'extrait à 5%. Comme tout produit naturel, l'effet cicatrisant de l'extrait est dû à sa richesse aux différents composants phytochimiques. Selon Bahramsoltani et al., (2014), les produits naturels cicatrisants manifestent leurs effets par l'un des mécanismes suivants : antimicrobien, anti-inflammatoire, antioxydant, stimulation de la synthèse du collagène, prolifération cellulaire.




**A** **B**

**Figure 33**: Activité cicatrisante de l'extrait des feuilles (A) et de l'extrait des racines (B) à 5% et 10%.

## 10. Evaluation du potentiel antidiabétique des extraits de *W. frutescens*

La présente étude avait pour but d'examiner l'effet antidiabétique *in vivo* de l'extrait hydroéthanolique des racines et des feuilles de *W. frutescens* chez des souris diabétiques et normales induites par l'alloxane. L'alloxane est sélectivement toxique pour la cellule bêta du pancréas par la formation d'espèces réactives de l'oxygène, y compris l'oxyde nitrique (Carvalho et al., 2003). En raison de la dose d'induction de monohydrate d'alloxane (180 mg/kg). Le modèle de souris diabétique présent un état hyperglycémique sévère (FBG>450 mg/dl) par rapport aux souris normales. Le tableau 11, représente les différents changements qui se sont produits dans la glycémie à jeun (FBG) pendant toute la période expérimentale.

Au cours de la première semaine de traitement, aucune diminution significative n'a été observée pour les deux doses d'ERWF et d'EFWF (200 et 400 mg/kg), par rapport au contrôle positif (glibenclamide). Concernant l'EFWF, Il n'y a pas non plus de différence significative entre la diminution de la FBG des deux doses au cours de cette semaine (433,0±2,3 mg/dL pour la dose de 200 mg/kg et 425,0±2,0 mg/dL pour la dose de 400 mg/kg contre 321,0±2,3 mg/dL noté pour le glibenclamide). Cependant, cette réduction devient très significative au cours des trois semaines qui suivent deux doses ($p < 0,001$) et la différence dans la diminution du niveau de FBG devient évidente à la fin du test avec 266,0±1,9 mg/dL noté pour la dose de 200 mg/kg et 148,0±1,4 mg/dL, pour la dose de 400 mg/kg comparé au glibenclamide 133,0±1,8 mg/dL (Tableau 11).

Le pouvoir antidiabétique de ERWF pendant la 2ème semaine de la période expérimentale, une réduction significative de la FBG a été observée aussi bien pour l'ERWF que pour le glibenclamide (366,0±2,7 mg/dl pour la dose de 200 mg/kg ; 355,0±1,8 mg/dl pour la dose de 400 mg/kg et 281,0 ± 2,6 pour le glibenclamide). A la fin du test, ERWF a induit une réduction importante puisqu'il a ramené la FBG presque au niveau du contrôle positif (223,0±1,9 mg/dl pour 200 mg/kg ; 199,0±1,4 mg/dl pour 400 mg/kg ; 133,0±1,8 mg/dl pour le glibenclamide). Ces résultats mettent en évidence un effet antidiabétique modéré de l'ERFW par rapport au médicament antidiabétique standard. Ces résultats montrent que l'ERWF et l'EFWF présentent une meilleure activité sur la glycémie à jeun avec la dose de 400 mg/dl, une réduction qui peut atteindre l'effet du glibenclamide avec un temps d'utilisation plus long. L'extrait de *W. frutescens* (ERWF et EFWF) n'a peut-être pas une action directe sur les principaux acteurs de la régulation de la glycémie, comparé au glibenclamide, un médicament hypoglycémiant oral qui contrôle directement la libération d'insuline par les cellules bêta (raad et al., 2013).

Comme le montre le tableau 12, pendant les 12 heures du test, les différentes doses de l'extrait de racines n'ont pas réussi à réduire le FBG. Le niveau de glucose dans le sang a été soumis à une légère diminution dans le temps jusqu'à la 6ème heure du test pour l'ERWF (256 mg/dl pour 200 mg/kg et 211 mg/dl pour 400 mg/kg) et l'EFWF (259 mg/dl pour 200 mg/kg et 218 mg/dl pour 400 mg/kg). Cependant, lorsque l'effet du temps s'est terminé, le FBG a recommencé à augmenter à la 12ème heure du test pour l'ERWF (297 mg/dl pour la dose de 200 mg/kg et 267 mg/dl pour la dose de 400 mg/kg) et l'EFWF (301 mg/dl pour 200 mg/kg et 271 mg/dl pour 400 mg/kg), Tableau 12. Ainsi, le test antidiabétique a confirmé

notre suggestion sur l'effet à long terme de l'ERWF et l'EFWF. Ceci confirme que les extraits EFWF et ERWF agissent sur le longterme.

Ces résultats indiquent que l'effet antidiabétique de *W. frutescens* nécessite un temps plus long pour apparaître et se mettre en place, ce qui suggère que les différentes molécules contenues dans l'extrait agissent indirectement contre les principaux acteurs responsables des niveaux élevés de glucose dans le sang.

**Tableau 11**: Effet de l'extrait végétal sur le développement des paramètres biochimiques

| | | Glycémie à jeun (mg/dl) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Jour 1 | Jour 7 | Jour 14 | Jour 21 | Jour 28 |
| **Contrôle normal (non diabétique)** | | 92,02±3,51 | 92,13±2,69 | 92,02±3,0 | 92,11±2,35 | 92,21±3,07 |
| **Contrôle négatif (diabétique)** | | 475,02±5,85 | 469,0±2,05 | 487,14±1,28 | 493,25±1,22 | 534,33±3,69 |
| **Gibenclamide (2 mg/kg)** | | 500,96±3,25 | 321,20±2,41 | 281,11±2.6 | 186.33±1.43 | 133.26±1.8 |
| **ERWF** | 200mg/kg | 503,06±1,56 | 423,14±3,06 | 366,0±2,77 | 286,14±1,89 | 223,10±1,9 |
| | 400mg/kg | 510,0±2,58 | 428,12±1,72 | 355,36±1,8 | 266,81±2,36 | 199,71±1,47 |
| **EFWF** | 200mg/kg | 495,29±3,68 | 433,32±2,33 | 359,15±1,25 | 290,48±2,91 | 266,96±2,31 |
| | 400mg/kg | 503,02±1,45 | 425,22±1,25 | 357,74±1,45 | 219,39±1,69 | 148,0±1,84 |

**Tableau 12**: Effet antihyperglycémique d'ERWF et d'EFWF sur des souris diabétiques induites par l'alloxane pendant 12 heures

| | | Glycémie à jeun (mg/dl) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **0** | **1h** | **1h30** | **3h** | **6h** | **12h** |
| **Gibenclamide (2 mg/kg)** | | 502,0±1,58 | 311,27±2,01 | 279,25±1,28 | 216,74±1,47 | 183,44±2,51 | 234,36±1,49 |
| **EFWF mg/kg** | 200 | 496,25±1,89 | 452,10±2,26 | 395,24±1,41 | 318,53±1,77 | 259,36±3,43 | 301,17±1,02 |
| | 400 | 501,47±2,11 | 416,96±1,47 | 355,26±1,74 | 296,27±2,55 | 218,69±1,20 | 271,79±2,36 |
| **ERWF mg/kg** | 200 | 504,55±1,58 | 439,66±1,92 | 372,54±1,28 | 291,49±1,69 | 256,48±2,59 | 297,20±2,11 |
| | 400 | 509,36±1,92 | 413,57±1,32 | 326,55±1,40 | 287,20±2,09 | 211,73±1,84 | 267,19±1,24 |

Les souris diabétiques non traitées ont montré une forte diminution du poids corporel associée à une hyperglycémie (Tableau 13). L'altération du poids corporel des souris diabétiques était potentiellement due au catabolisme massif des lipides et des protéines utilisés comme source alternative d'hydrates de carbone. Cette hypothèse est bien confirmée par d'autres études (Contreras et al., 2016), où il a été signalé que l'apport d'insuline est impliqué dans la régulation de la synthèse des protéines et de la protéolyse dans le muscle squelettique. Pendant toute la période expérimentale, les souris diabétiques traitées avec l'extrait végétal ont montré une augmentation du poids corporel, ce qui pourrait confirmer le rôle protecteur de l'ERFW et l'EFWF probablement dans la régulation de la synthèse des

protéines et de la protéolyse puisque l'altération du poids corporel se produit fréquemment dans des conditions de toxicité (Contreras et al., 2016).

**Tableau 13**: Effet de l'extrait végétal sur le poids corporel

| Traitement | | Développement du poids (g) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Jour 1** | **Jour 7** | **Jour 14** | **Jour 21** | **Jour 28** |
| **Contrôle normal (non diabétique)** | | 23,40±3,30 | 24,70±3,50 | 25,3±2,4 | 26,90±3,30 | 27,2±3,50 |
| **Contrôle négatif (diabétique)** | | 23,90±2,10 | 21,80±3,20 | 20,2±2,7 | 19,30±2,40 | 17,8±2,20 |
| **Gibenclamide (2 mg/kg)** | | 24,40±2,60 | 23,20±1,60 | 24,3±2,3 | 25,9±2,50 | 25,8±1,77 |
| **ERWF** | 200mg/kg | 24,80±2,20 | 24,00±1,90 | 24,4±1,8 | 25,0±2,0 | 26,2±2,20 |
| | 400mg/kg | 23,90±2,40 | 23,40±2,30 | 24,1±1,9 | 24,90±2,20 | 26,4±2,10 |
| **EFWF** | 200mg/kg | 24,80±1,90 | 24,10±2,00 | 24,9±1,8 | 25,80±2,10 | 26,70±1,80 |
| | 400mg/kg | 23,90±2,10 | 23,30±2,20 | 24,80±1,9 | 25,60±2,10 | 27,30±2,40 |

Les analyses des paramètres biochimiques du sérum montrent des niveaux élevés de transaminases chez les souris diabétiques (non traitées), qui sont des biomarqueurs de la fuite du contenu cellulaire associée à la perte de l'intégrité fonctionnelle de la membrane cellulaire hépatique (Bourhia et al., 2019). Une diminution substantielle des niveaux de transaminases (ASAT et ALAT) a été rapportée chez les animaux diabétiques traités avec diverses doses d'extraits de plantes par rapport aux contrôles diabétiques (Tableau 14). Ces résultats peuvent suggérer que l'extrait a une fonction hépatoprotectrice. De plus, des niveaux sanguins élevés d'urée et de créatinine ont été détectés dans les animaux diabétiques (non traitées), ce qui peut informer sur les dommages rénaux potentiels attaqués chez les souris (Carvalho et al., 2003). Nous avons remarqué que les taux plasmatiques d'urée et de créatinine sont revenus à des valeurs proches de la normale chez les souris diabétiques soumises au traitement par l'extrait de *W. frutescens*. Par conséquent, nous pouvons confirmer que cette extrait a un effet protecteur rénal en plus de sa fonction hépatoprotectrice.

**Tableau 14**: Effet de l'extrait de *W. frutescens* sur les paramètres biochimiques

| | | Paramètres biochimiques | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **ASAT** | **ALAT** | **Urea** | **Creatinine** |
| **Contrôle normal (non diabétique)** | | 253±33,73 | 45±6,58 | 0,25±0,04 | 3,3±0,44 |
| **Contrôle négative (Diabétique)** | | 502±48,85 | 134±21,26 | 0,64±0,06 | 5,9±0,83 |
| **Gibenclamide (2 mg/kg)** | | 298±25,66 | 77±9,80 | 0,29±0,04 | 4,3±0,44 |
| **ERWF** | 200mg/kg | 243±27,42 | 57±7,26 | 0,35±0,05 | 3,80±0,46 |
| | 400mg/kg | 276±23,01 | 52±6,82 | 0,34±0,04 | 3,70±0,32 |
| **EFWF** | 200mg/kg | 211 ± 23,6 | 47 ± 8,2 | 0,25 ± 0,04 | 3,9 ± 0,36 |
| | 400mg/kg | 198 ± 22,1 | 50 ± 6,7 | 0,29 ± 0,05 | 3,6 ± 0,28 |

Les plantes sont utilisées depuis longtemps pour traiter le diabète, et des études récentes ont confirmé leur potentiel thérapeutique ainsi que le mécanisme par lequel elles exercent leurs activités. Les métabolites des plantes peuvent agir par différentes voies, telles que l'augmentation de la sécrétion d'insuline, l'absorption du glucose par diverses cellules et l'inhibition de la production et de l'absorption du glucose, ils peuvent agir indirectement en prévenant et en traitant l'oxydation et l'inflammation qui ont été récemment liées au

développement et à l'aggravation de l'état diabétique général (Sasi et al., 1975). L'une des approches importantes adoptées pour le traitement du diabète est l'inhibition de l'absorption du glucose. En inhibant les enzymes digestives responsables de l'hydrolyse des polysaccharides en petits fragments absorbables, on prévient l'hyperglycémie postprandiale. Un exemple de ce groupe d'inhibiteurs : les inhibiteurs de l'α-glucosidase et de l' α-amylase (Sasi et al., 1975 ; Alqahtani et al., 2019).

## IV. Conclusion

Les résultats de cette étude ne sont qu'une première étape dans la recherche des effets thérapeutiques des substances naturelles biologiquement actives. Cette étude révèle que l'extrait des feuilles et des racines de *W. frutescens* est actif contre les souches microbiologiques testées, la plante peut donc être utilisée dans les domaines liés au traitement des infections microbiennes, à la conservation des aliments et à la lutte biologique contre certaines maladies des plantes dans le domaine céréalier. L'utilisation des plantes dans le traitement de certaines maladies reste dangereuse sans validité scientifique. Les résultats de la présente étude n'ont montré aucun effet toxique sur les souris traitées avec *W. frutscens* jusqu'à la dose maximale (2000 mg/kg). Les résultats du pouvoir anti-inflammatoire *in vivo* montrent que la plante possède des propriétés pharmacologiques plus importantes soit par voie cutanée ou bien par voie orale contre les brûlures.

Les résultats antidiabétiques obtenus ont montré que les extraits de la plante étudiée contrôlent bien les niveaux de glucose dans le sang pendant une longue période. Par conséquent, nous pouvons confirmer que cette étude soutient l'utilisation de la plante par la population locale comme une alternative naturelle antidiabétique pour une utilisation à long terme.

Des recherches supplémentaires sur le mode d'action de l'extrait de la plante seront appréciées pour une meilleure compréhension. Ainsi qu'une caractérisation phytochimique et valorisation des effets pharmacologiques et environnementaux des composés terpéniques, notamment les huiles essentielles, identifiées au niveau de l'extrait des feuilles, s'avèrent nécessaires.

# Chapitre 4 : Caractérisation phytochimique et évaluation des activités biologiques et anticorrosive des huiles essentielles de *W. frutescens*

## I. Introduction

Les infections nosocomiales causées par certaines souches microbiennes restent une cause majeure de mortalité et de morbidité dans le monde entier (Jenkins et al., 2017). De nombreux pays dans le monde ont une grande incidence de maladies nosocomiales induites par des micro-organismes multirésistants (Maoutainine et al.,. 20174). Plusieurs médicaments synthétisés n'ont pas été efficaces contre les infections nosocomiales dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques (Chan et al., 2017). Il est donc normal que les médecins recherchent des médicaments naturels alternatifs efficaces pour lutter contre les microbes résistants aux antibiotiques nosocomiaux (Rossiter et al., 2017). Plusieurs études indiquent que les plantes pourraient être des sources prometteuses de médicaments efficaces contre divers micro-organismes (Siddiques et al., 2016).

Dans le domaine environnemental, particulièrement en agriculture, les pertes post-récolte dues aux insectes nuisibles pendant le stockage ont été enregistrées comme un problème croissant en Afrique puisque plus de 30% des produits alimentaires secs stockés sont perdus à cause des insectes nuisibles (Ilta, 1995). *Callosobruchus maculatus* (*C. maculatus*) fait partie des insectes ravageurs cosmopolites qui attaquent les cultures de légumineuses (Sathyaseelan et al., 2008). L'existence de cet insecte dans les stocks de légumineuses peut causer une grande perte en raison de sa multiplication rapide dans les entrepôts. Dans ce sens, il a été rapporté que *C. maculatus* peut affecter plus de 50% des stocks en quelques mois, causant également des dommages aux caractéristiques organoleptiques des produits (Gaswell et al., 1980 ; Sou et al., 1996). Dans une démarche écologique, l'utilisation des plantes médicinales à effet insecticide prend de plus en plus d'importance à travers le monde en raison de leur efficacité et leur faible impact sur l'environnement. Ces plantes sont exploitées sous plusieurs formes pour limiter les pertes post-récolte, soit sous forme de plante brute, soit à travers ses dérivés tels que les poudres, les huiles essentielles, les huiles végétales ou encore les composés purifiés.

Dans les secteurs industriels, La corrosion est considérée comme l'un des problèmes de la plupart de ces secteurs, et elle peut coûter plusieurs milliards de dollars chaque année en raison de la détérioration des matériaux (Hussin et Kassim, 2011). L'exposition des métaux à certains acides comme le HCl peut accélérer le processus de corrosion, car ces acides agissent comme des agents corrosifs. Ces agents corrosifs jouent un rôle important dans les processus pétrochimiques, l'industrie, le raffinage du pétrole brut, le nettoyage industriel et le détartrage à l'acide (Abiola et James, 2010). La plupart des composés synthétiques ou semi-synthétiques possèdent une bonne activité anticorrosive, mais certains produits chimiques appliqués pour l'inhibition de la corrosion peuvent être nocifs pour l'homme (Aourabi et al., 2020). Il est donc normal que l'intérêt pour les agents anticorrosifs naturels ait augmenté dans le monde entier. Dans ce sens, les HEWF peut être l'un des agents préférables qui trouvent une application dans le secteur industriel pour lutter contre la corrosion (Lahhit et al., 2011 ; Gualdrón et al., 2013).

En médecine traditionnelle, *Withania frutescens*.L (*W. frutescens*) est fréquemment utilisé par la population indigène pour combattre les infections bactériennes, la conjonctivite,

l'inflammation, la tuberculose, le stress, la bronchite, l'anxiété, les troubles neurologiques, les ulcères ainsi que les maladies du foie et de Parkinson (Bellakhedar, 1998). Des études publiées antérieurement ont rapporté certaines activités pharmacologiques de *W. frutescens*, notamment des activités anti-inflammatoires, analgésiques et cicatrisantes (Elmoussaoui et al., 2020). Des travaux antérieurs n'ont montré aucun effet toxique chez les animaux traités avec l'extrait de *W. frutescens*, et par conséquent, la plante étudiée a été considérée comme sûre chez les animaux traités dans des conditions de toxicité aiguë et subaiguë (Elmoussaoui et al., 2020). Le dépistage phytochimique préliminaire des extraits de *W. frutescens* a montré la présence de certaines classes de composés, notamment des tanins, des coumarines, des saponines, des mucilages et des huiles essentielles (Elmoussaoui et al., 2019).

Concernant les huiles essentielles de *W.frutescens*, à notre connaissance, aucune étude antérieure n'a examiné leurs activités pharmacologiques, et notamment leur activité anticorrosive et insecticide. Le présent travail vise donc à étudier la composition chimique, les activités antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, anticorrosives et insecticides des huiles essentielles de cette plante.

## II. Matériel et méthodes

### 1. Extraction des HEWF

Au total, deux cents grammes de la poudre des feuilles ont été placés dans un chauff-ballon à fond rond avec 750 ml d'eau distillée. Le mélange a été porté à ébullition pendant 2 heures, puis les HEWF obtenues ont été séparées de l'eau avant d'être stockées à 4º C dans l'obscurité jusqu'à leur utilisation ultérieure.

### 2. Préparation de l'hydrolat

L'extraction de l'hydrolat a été réalisée par extraction liquide-liquide. Brièvement, 200 ml récupérés de la solution obtenue par hydrodistillation ont été successivement extraits à nouveau trois fois avec 100 ml d'éther diéthylique à température ambiante pour obtenir l'extrait d'hydrolat. Ensuite, la couche organique a été évaporée, puis les restes ont été séchés à l'aide de Na2SO4 pour obtenir l'huile (0,03%) (Lemouchi et al., 2017).

### 3. Caractérisation chimique de l'huile essentielle par GC/MS

L'identification des différents composés chimiques contenus dans les huiles essentielles a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. L'huile de *W. frutescens* a été analysée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse capillaire Thermo Fischer directement couplé au système de spectromètre de masse (modèle GC ULTRA S/N 20062969 ; Polaris QS/N 210729), en utilisant deux colonnes : une colonne capillaire non polaire HP-5MS en silice fondue (60 m 0,32 mm, épaisseur du film 0,25 mm) et une colonne DB-HeawyWAX (30 m × 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm) en plus du GC-FID ( détecteur à ionisation de flamme). Les conditions de fonctionnement du GC-MS ont été maintenues comme suit : température initiale ; 40°C/2 min, vitesse 2 C/min avec une température finale 260 °C/10 min, température de l'injecteur ; 250 °C, gaz porteur ; hélium 1 ml/min. L'huile essentielle a été diluée dans de l'hexane avec un rapport de dilution de 10:100.

Le volume d'échantillon injecté était de 1 ml, technique d'injection fractionnée ; énergie d'ionisation 70 eV, mode d'ionisation ; température de la source d'ions 200 C, gamme de masse de balayage m/z 40-650 et température de la ligne d'interface 300 C. Les indices de rétention (RI) ont été déterminés par rapport à une série homologue de n-alcanes, et en faisant correspondre leurs spectres de masse enregistrés avec ceux stockés dans la base de données du spectromètre (NIST MS Library v. 2.0) (Pina-vaz et al., 2000 ; Adams, 2007 ; Babushok et al., 2011)

## 4. Activité antioxydante *in vitro* d'HEWF

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles a été évalué *in vitro* à l'aide de quatre tests : le DPPH, le pouvoir réducteur, la capacité antioxydante totale et la décoloration du ß-carotène.

### 4.1. Test de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

Le test DPPH a été réalisé selon la méthode décrite par Moatter et al., 2016. Brièvement, 100 µl d'HEWF diluée dans du méthanol ont été utilisés avec différentes concentrations. Chaque portion de test a été mélangée avec 750 µl de solution de DPPH (0,004%). Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 517 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$PI(\%)= (A0-A/A0)*100$$

Où PI est le pourcentage d'inhibition, A0 est l'absorbance DPPH sans l'échantillon (contrôle négatif) et A est l'absorbance DPPH avec l'échantillon.

### 4.2. Test du pouvoir antioxydant réducteur ferrique

Ce test a été réalisé selon la méthode rapportée par Tepe et al., 2013. Brièvement, 500 µl ont été récupérés dans une solution tampon phosphate (0,2 M pH = 6,6) et mélangés à 500 µl de ferricyanure de potassium [K3Fe(CN)6] (1%). Ensuite, le tout a été ajouté à 100 µl d'huile diluée dans du méthanol avant d'être incubé à 50 °C pendant 20 minutes au bain-marie. L'échantillon a été mélangé à nouveau avec 500 µl de solution aqueuse (10% TCA) comprenant 500 µl d'eau distillée et 100 µl de 0,1% (FeCl3) pour être prêt à être analysé. L'absorbance a été déterminée à 700 nm contre un blanc. Les résultats obtenus ont été exprimés en concentration effective. La concentration efficace médiane (EC-50) a été réalisée à partir du graphique.

### 4.3. Test de la capacité antioxydante totale

Vingt-cinq µl d'HEWF ont été mélangés avec 1 ml de solution réactive (acide sulfurique 0,6 M, phosphate de sodium 28 mM, et molybdate d'ammonium 4 mM). Ensuite, la solution obtenue a été incubée à 95 °C pendant 90 min. L'absorbance a été mesurée à 695 nm (Mašković et al., 2012). La capacité antioxydante totale a été exprimée en milligrammes d'équivalent acide ascorbique par gramme d'huile essentielle (mg EAA/g HE).

4.4. Test de la décoloration du bêta-carotène

Un millilitre de la solution de ß-carotène solubilisée dans le chloroforme (2 mg/10 ml) a été introduit dans un flacon contenant 10 µl d'acide linoléique et 100 mg de Tween 80. Le chloroforme a été évaporé à 45 °C pendant 5 minutes à l'aide d'un évaporateur rotatif à vide. Ensuite, 25 ml de peroxyde d'hydrogène ont été ajoutés au résidu avant d'ajouter de l'eau pour obtenir une émulsion. 2,5 ml du mélange obtenu ont été mélangés à 100 µl d'huile essentielle diluée dans du méthanol puis ont été incubés au bain-marie à 50°C pendant 2 heures avec le BHT (contrôle positif). Le pourcentage de l'activité antioxydante a été calculé selon l'équation suivante (Mašković et al., 2012) :

$$\mathbf{AA\% = (AE/ABHT) *100}$$

Où AA% est le pourcentage d'activité antioxydante, AE est l'absorbance de l'échantillon et ABHT est l'absorbance de l'échantillon avec le contrôle positif (BHT).

## 5. Pouvoir antibactérien

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été testée sur cinq souches : Bactéries à Gram-négatif incluant *E. coli* (ATB:57) B6N (CHU, Fez), *E. coli* (ATB:97) BGM (CHU, Fez), *K. pneumoniae* (LM, FMP, Fez), et *P. aeruginosa* (LM, FMP, Fez) ; Bactéries à Gram-positif incluant *S. aureus* (LM, FMP, Fez). Toutes les souches testées ont été isolées cliniquement à partir d'infections des poumons, des voies urinaires et du site chirurgical (complexe hospitalier universitaire, Fès-Maroc). Ces souches bactériennes ont été signalées comme étant multirésistantes (Mapara et al., 2015 ; Mulani et al., 2019).

La méthode de diffusion sur disque a été utilisée pour déterminer la zone d'inhibition. En bref, après une incubation de 30 minutes des plaques inoculées, les expériences ont été menées comme suit : des disques stériles (6 mm) imprégnés de 10 µl du produit à tester, d'ampicilline 1,67 mg/disque, de streptomycine 0,02 mg/disque ont été placés sur la surface de la gélose. Ensuite, les plaques ont été incubées à nouveau à 37°C (Elatki et al., 2019). A la fin de l'expérience, le pouvoir antimicrobien a été évalué en mesurant les zones d'inhibition de la croissance en mm.

Les souches bactériennes sélectionnées ont été cultivées dans des tubes contenant 9 ml de MHB (Mueller-Hinton broth) avant d'être incubées à 37°C pendant 18-24 heures. Une goutte de la culture a été ensemencée sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive avant d'être à nouveau incubée à 37°C pendant 18-24 heures. La suspension bactérienne (inoculum) a été préparée à partir des cultures pures comme suit : les colonies identiques des puits ont été isolées puis déversées dans 10 ml d'eau physiologique stérile avec 0,9 % de NaCl. La densité optique de la suspension bactérienne a été ajustée pour être comprise entre 0,08 et 0,1 nm, ce qui correspond à $10^7$ à $10^8$ UFC/ml selon McFarland. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par une méthode de microdilution (Dayal et al., 2000).

## 6. Pouvoir antifongique

L'activité antifongique de l'HEWF et de l'hydrolat sur *Candida albicans* (LBMF-Ca/16) et *Saccharomyces cerevisiae* (LBMF-Sc-16) a été réalisée par la méthode du contact direct. Différentes concentrations de l'échantillon testé ont été incorporées dans le milieu de culture gélosé. Les blastospores des cultures de souches (cultures de 5 jours) ont été récupérées dans des boîtes de Pétri avant de compter les souches blastées obtenues à l'aide de la cellule de Malassez. La densité optique (DO) de la suspension de spores fongiques a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 630 nm pour normaliser la suspension de spores à $10^7$ blastospores/ml. Le fluconazole a été utilisé comme témoins positifs à 5 mg/ml.

Différentes concentrations (v/v) de 1/100 ; 1/200 ; 1/400 ; 1/800 ; 1/1600 ; 1/3200 d'huiles ont été incorporées dans le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar). Ensuite, 10 µl d'inoculum ponctuel ont été déposés dans chaque milieu. Les boîtes de Pétri ont été scellées avec du parafilm avant d'être incubées à 27°C pendant 6 jours. La concentration minimale inhibitrice a été observée dans le milieu solide (Gulluce et al., 2007). Les boîtes de Pétri dont les concentrations ont montré une absence totale de croissance mycélienne ont été sélectionnées pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

## 7. Pouvoir insecticide des huiles essentielles de *W.frutescens*

### 7.1. Élevage des insectes

L'espèce *Collosorbruchus maculatus* utilisé pour les tests d'activité insecticide des huiles essentielles a été acclimaté à une température de 25 ± 1°C, une humidité relative 65 ± 5%, et une photopériode de 10h:14h (lumière/obscurité). Toutes les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions. Le pois chiche (*Cicer arietinum*) indigène des terres marocaines a été utilisé pour les tests.

### 7.2. Toxicité de l'huile essentielle contre *C. maculatus*

#### 7.2.1. Toxicité par contact

Dans le présent travail, 100 g de pois chiches ont été utilisés pour les tests. Pour ce faire, les grains ont été infestés par cinq paires d'insectes (mâle et femelle) âgés de 0 à 48 h dans des récipients en verre (1L) dûment fermés. Ensuite, l'huile essentielle a été ajoutée à l'échantillon à des concentrations allant de 1 µL/100 g à 20 µL/100 g avant d'être mis en sac pendant deux minutes. Des grains non traités confinés avec *C. maculatus* ont été utilisés comme contrôle. Après 48 h de traitement, la mortalité de *C. maculatus* a été évaluée. Les œufs déposés dans les grains ont été comptés à 12 jours de post-traitement, tandis que les insectes témoin ont été comptés régulièrement au 28 jours. Le taux de mortalité observé a été corrigé par la formule d'Abbott (1987) :

$$Pc = 100 \times \frac{P0 - Pt}{100 - Pt}$$

Où Pc est le pourcentage de mortalité corrigée, Po est la mortalité observée dans l'essai et Pt est la mortalité observée dans le contrôle.

Le pourcentage de diminution du nombre d'œufs et d'adultes émergés pour chaque concentration d'huile essentielle a été calculé à l'aide de la formule suivante (Abbott, 1987):

$$PR = \frac{NC - NT}{CN} \times 100$$

Où PR est le pourcentage de ponte ou de diminution des insectes émergés, NC est le nombre d'œufs ou d'insectes éclos dans le témoin et NT est le nombre d'œufs ou d'insectes éclos dans le traitement.

#### 7.2.2. Toxicité par inhalation

Dans des bocaux en verre d'un volume de 1 litre, de petites masses de coton ont été suspendues à l'aide d'un fil attaché à l'intérieur du couvercle. Des doses de 1, 5, 10 et 20µL d'huile essentielle ont été déposées dans le coton à l'aide d'une micropipette. Ensuite, dix *C. maculatus* (mâles et femelles) dont l'âge variait de 0 à 48h ont été placés dans des pots avec différentes concertations d'huile. Pour chaque dose, trois répétitions ont été effectuées. La comparaison a été faite avec un échantillon témoin (coton sans solutions d'essai). Le taux de mortalité observé a été calculé par la formule (Abbott, 1987) :

$$Pc = \frac{P0 - Pt}{100 - Pt} \times 100$$

Où Pc est le pourcentage de mortalité corrigé, Po est la mortalité observée dans l'essai et Pt est la mortalité observée dans le contrôle.

#### 7.2.3. Test de répulsion

L'effet répulsif de l'HEWF sur les adultes de *C. maculatus* a été évalué en utilisant la méthode des zones préférentielles sur papier filtre. Pour ce faire, on a utilisé des disques de 9 cm de diamètre préparés à partir de papier filtre. Les disques ont été immergés uniformément avec 0,5ml d'essentiel à différentes doses (1, 5, 10 et 20 µl/ml) correspondant à 0,016 ; 0,079 ; 0,157 et 0,315 µl/ disque. Des disques immergés avec un volume similaire d'acétone ont été utilisés comme contrôle. Ensuite, les boîtes de Pétri ont été fermées avec du Parafilm avant d'être incubées pendant 30 minutes. Le nombre de bruches présents sur la moitié du disque traité à l'huile essentielle a été compté par rapport au nombre sur la partie non traitée. Trois répétitions pour chaque expérience ont été effectuées dans les mêmes conditions environnementales de l'élevage des insectes. Le pourcentage de répulsion (PR) a été calculé selon la formule suivante (Zandi et al., 2011) :

$$PR = \frac{NC - NT}{NC + NT} \times 100$$

Où PR est le pourcentage de répulsion (%), NC est le nombre d'insectes dans la zone de contrôle et NT est le nombre d'insectes dans la zone de traitement.

## 8. Pouvoir anticorrosion des huiles essentielles

### 8.1. Matériau

Acier doux (MS) avec la composition chimique suivante : 0,3700% C, 0,1600% Cu, 0,2300% Si, 0,6800% Mn, 0,0770% Cr, 0,0160% S, 0,0090% Co, 0,0110% Ti, 0,0590% Ni, le reste étant du fer (Fe) a été utilisé comme substrat pour les tests d'activité anticorrosion.

Avant toutes les mesures, l'échantillon a été abrasé à l'aide de papiers émeri, puis rincé à l'eau avant d'être dégraissé à l'acétone, et enfin lavé à nouveau à l'eau distillée.

8.2. Milieu corrosif

L'électrolyte a été obtenu par dilution d'acide chlorhydrique (37%) (d=1,18). En raison de la solubilité relativement faible de l'huile essentielle dans un milieu aqueux ; En ce sens, l'HEWF a été préalablement dissoute dans 10 ml d'éthanol bi-distillé avant d'être ajoutée à 90 ml de HCl 1,0 M. Les concentrations utilisées dans ce travail vont de 1 g/L à 0,1 g/L.

8.3. Mesures électrochimiques

Les mesures électrochimiques ont été effectuées à l'aide de l'appareil BioLogic SP-150 contrôlé par le logiciel (Ec-Lab® V11.200). Toutes les expériences ont été réalisées dans la cellule conventionnelle à trois électrodes avec le MS décrit précédemment comme électrode de service, le platine et l'Ag/AgCl 3M KCl ont été utilisés comme électrodes de référence et contre-électrodes respectivement. Pour les mesures de polarisation potentiodynamique (PP), le potentiel a été balayé de -250 à +250 mV à une vitesse de balayage de 1 mV s-1 par rapport au potentiel balayé. Les mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) ont été effectuées après l'obtention d'un état d'équilibre dans une fréquence allant de 100,00 kHz à 100,00 mHz avec dix points par décennie et une amplitude de tension alternative de 10 mV crête à crête. Avant chaque mesure, l'électrode a été maintenue à Ecorr pendant 30 minutes à une température de 298 K et le test a été répété deux fois.

## III. Résultats et discussion

### 1. Composition phytochimique de l'huile essentielle

Le rendement de l'huile essentielle (HE) obtenue par hydrodistillation de *W. frutescens* était de 0,31%, avec 26 et 23 composés identifiés, pour la première fois, en utilisant la colonne HP-5MS et DB-HeawyWAX respectivement (Figure 34 et Tableau 15). L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a montré que les classes chimiques monoterpènes constituaient les principaux groupes chimiques dans les huiles essentielles de *W.frutescens*, avec 90,35±1,72% et 88,93±1,67% de composés identifiés par la colonne HP-5MS et DB-HeawyWAX respectivement. Pour les classes de sesquiterpènes, 3,52±0,82% et 3,96±0,51% ont été détectés par le HP-5MS et la colonne DB-HeawyWAX respectivement. Pour les autres composés, 3,18±74% et 4,22±0,36% ont été détectés par les deux colonnes respectivement.

Les huiles essentielles étaient principalement composées de camphre (24,26±0,31% et 25,41±0,22%), d'α-Thujone (18,64±0,07% et 17,45±0,31%), de Carvacrol (12,57±0,97% et 13,43±0,21%), de Thymol (9,53±0,8% et 9,24±0,83%) selon la détection par HP-5MS et DB-HeawyWAX, respectivement. De nombreux composés potentiellement bioactifs ayant des activités pharmacologiques ont été identifiés dans les HE caractérisées, notamment le thymol, le carvacrol, le linalol, le γ-terpinène et le p-cymène (Aazza et al., 2011 ; Djabou et al., 2014). Certains composés naturels rapportés dans les huiles étudiées, comme le camphre, possèdent des activités pharmacologiques variées, notamment analgésiques, antiseptiques,

antispasmodiques, anti-inflammatoires et anti-infectieuses (Zuccarini et al., 2009 ; Hamdi et al., 2013 ;Sherkhali et al., 2009).

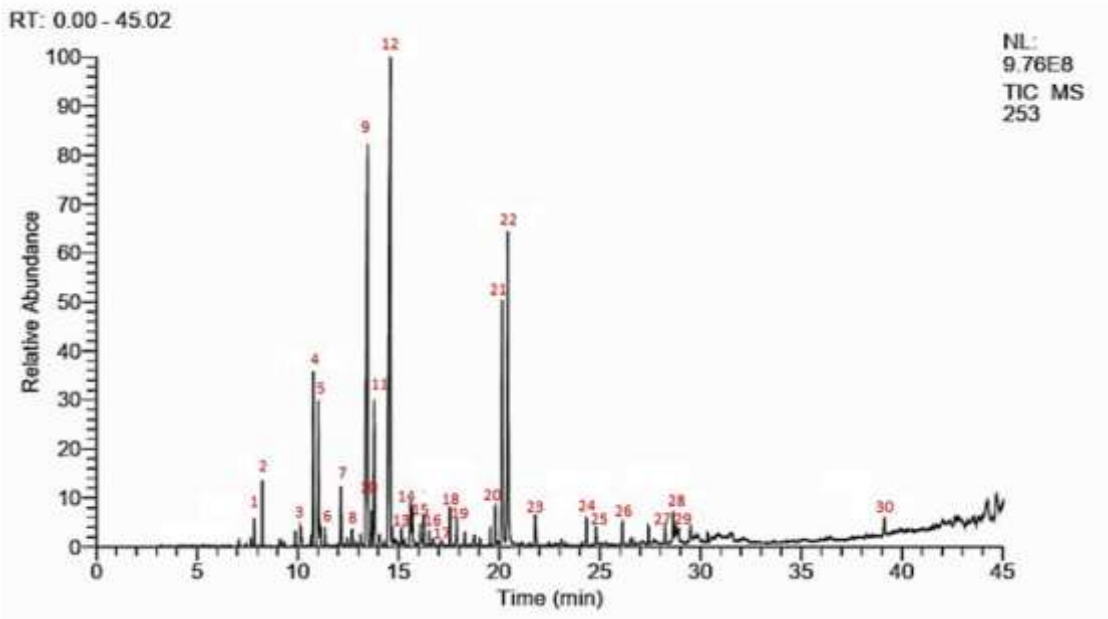



**Figure 34**: Profil chromatographique GC-MS de l'HE de *W. frutescens*.

**Tableau 15**: Composés phytochimiques contenus dans les huiles essentielles de *W.frutescens.*

| | | | | RI | | Colonne | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | HP-5MS | DB-H.WAX |
| P | RT | Compounds | Classe chimique | Obs | Lit | (%) | (%) |
| **1** | 7.84 | α-Pinene | Monoterpène (**MO**) | 937 | 939 | 1.03±0.01 | 0.93±0.01 |
| **2** | 8.23 | Camphene | MO | 946 | 946 | 1.07±0.01 | 0.94±0.02 |
| **3** | 10.13 | Yomogi alcohol | MO | 999 | 999 | 0.43±0.01 | 0.36±0.01 |
| **4** | 10.79 | o-Cymene | MO | 1020 | 1026 | 4.81±0.02 | 4.71±0.06 |
| **5** | 11.01 | 1,4-Cineole | MO | 1046 | 1031 | 4.11±0.01 | 3.94±0.01 |
| **6** | 11.10 | Limonene | MO | 1023 | 1029 | 0.75±0.01 | Nt |
| **7** | 12.16 | Terpinolene | MO | 1072 | 1088 | 1.42±0.01 | 1.34±0.01 |
| **8** | 12.69 | Fenchon | MO | 1087 | 1086 | 0.91±0.01 | Nt |
| **9** | 13.48 | α-Thujone | MO | 1105 | 1102 | 18.64±0.07 | 17.45±0.31 |
| **10** | 13.66 | Linalool | MO | 1105 | 1099 | 1.05±0.01 | 1.93±0.01 |
| **11** | 13.81 | β-Thujone | MO | 1198 | 1114 | 4.30±0.04 | 5.12±0.23 |
| **12** | 14.58 | Camphor | MO | 1143 | 1146 | 24.26±0.31 | 25.41±0.22 |
| **13** | 15.16 | Pinocarvone | MO | 1160 | 1164 | 0.95±0.01 | Nt |
| **14** | 15.60 | Borneol | MO | 1166 | 1169 | Nt | 1.16±0.11 |
| **15** | 15.68 | Bornyl acetate | Autre (**O**) | 1283 | 1288 | 1.28±0.01 | 1.18±0.06 |
| **16** | 16.08 | 4-terpineol | MO | 1177 | 1177 | 0.62±0.01 | Nt |
| **17** | 16.25 | α-Ionone | O | 1425 | 1430 | Nt | 0.88±0.01 |
| **18** | 17.56 | Octanol acetate | MO | 1209 | 1213 | 1.65±0.01 | 2.05±0.14 |
| **19** | 17.86 | Pulegone | MO | 1237 | 1237 | 1.27±0.18 | 0.92±0.10 |
| **20** | 19.79 | Bornyl formate | O | 1595 | 1588 | 1.24±0.01 | 1.44±0.13 |
| **21** | 20.17 | Thymol | MO | 1290 | 1290 | 9.53±0.08 | 9.24±0.83 |
| **22** | 20.45 | Carvacrol | MO | 1300 | 1299 | 12.57±0.97 | 13.43±0.21 |
| **23** | 21.81 | Nepetalactone | MO | 1369 | 1360 | 0.98±0.01 | Nt |
| **24** | 24.32 | β-Caryophyllene | Sesquiterpène (**ST**) | 1420 | 1419 | Nt | 0.82±0.01 |
| **25** | 24.83 | τ-Elemene | ST | 1484 | 1438 | 0.82±0.01 | 0.89±0.01 |
| **26** | 26.12 | Germacrene D | ST | 1708 | 1485 | 0.94±0.01 | Nt |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **27** | 28.26 | Germacrene B | ST | 1823 | 1561 | 0.64±0.01 | Nt |
| **28** | 28.66 | Spathulenol | ST | 1576 | 1578 | 1.12±0.01 | 1.63±0.08 |
| **29** | 28.76 | Caryophyllene oxide | ST | 1580 | 1583 | Nt | 0.62±0.01 |
| **30** | 39.11 | Hexadecanoic acid | O | 1968 | 1968 | 0.66±0.01 | 0.72±0.01 |
| **Classe chimique** | | | | | | | |
| | | | Monoterpène (MO) | | | 90.35±1.72 | 88.93±1.67 |
| | | | Sesquiterpène (ST) | | | 3.52±0.82 | 3.96±0.51 |
| | | | Autre (O) | | | 3.18±74 | 4.22±0.36 |
| | | | Total (%) | | | 97.05±1.07 | 97.11±1.35 |

**RI** : indices de rétention ; **RT** : temps de rétention en minutes ; **Obs** : indices de rétention déterminés par rapport à une série homologue de n-alcanes sur colonne HP-5MS et sur colonne DB-HeawyWAX; **Lit** : valeurs RI de la littérature ; Colonne: composition de l'huile essentielle détectée sur colonnes HP-5MS et DB-HeawyWAX ; **(%)**: teneur relative en pourcentage ; **Nt**: non détecté.

## 2. Activité antioxydante

Les valeurs IC50 (la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% des radicaux libres) de l'HE et de l'hydrolat étaient respectivement de 14,031±0,012 µg/ml et 232,081±3,047 µg/ml (figure 35a). La valeur IC50 du BHT utilisé comme contrôle positif était de 11,020±0,903 µg/ml. Les résultats obtenus ont révélé que la capacité antioxydante totale des HE et de l'hydrolat était de 0,091±0,007 et 0,131±0,004 mg AAE (équivalent acide ascorbique)/mg respectivement, Figure 35b.

Dans cette étude, le pouvoir antioxydant a également été évalué en utilisant la méthode FRAP. Comme le montre la figure 35c, les valeurs EC-50 de l'huile essentielle et de l'hydrolat étaient respectivement de 4,618±0,045 µg/ml et 8,997±0,147 µg/ml.

La dégradation des acides gras est l'une des principales causes d'altération des aliments et l'inhibition de l'oxydation des lipides est fréquemment assurée par l'intervention de conservateurs alimentaires naturels. Dans la présente recherche, l'oxydation des lipides a été évaluée en mesurant l'oxydation inhibitrice de l'acide linoléique en présence de β-carotène, utilisé comme marqueur. Les résultats obtenus ont montré que l'absorbance du β-carotène diminue progressivement en présence d'huiles, d'hydrolat et de BHT. De plus, la diminution de l'absorbance du contrôle négatif a été la plus importante suivie par l'hydrolat, l'huile essentielle et le BHT, Figure 35d.

La variation du taux de décoloration du β-carotène en fonction du temps peut indiquer que les huiles essentielles agissent contre l'oxydation de l'acide linoléique. Les résultats obtenus dans ce travail ont montré que le pourcentage d'inhibition des radicaux libres des HE et de l'hydrolat était respectivement de 74,141±1,040% et 40,850±0,083% (Figure 35). Cette activité est restée significativement inférieure à celle du BHT utilisé comme témoins positifs. Ces résultats obtenus ont été utilisés pour effectuer une comparaison avec ceux rapportés dans la littérature précédente, qui ont montré que les espèces appartenant aux genres Withania possèdent un pouvoir antioxydant de 57% et 36% pour les racines et les feuilles respectivement (Elmoussaoui et al., 2019).

Par conséquent, nous avons pu confirmer que l'HE possède un fort pouvoir antioxydant par rapport à l'hydrolat. Ainsi, nous pouvons suggérer que notre HE peut être très efficace contre les radicaux libres. Les huiles essentielles sont des mélanges complexes contenant plusieurs composés avec différents groupes fonctionnels, différentes polarités, et différents comportements chimiques. Cette complexité chimique peut conduire à des résultats différents selon le test utilisé. Il est donc approprié qu'une approche avec de multiples tests visant à évaluer le potentiel antioxydant de l'hydrolat et des huiles essentielles ait été menée pour valider les résultats obtenus.

De nombreuses études ont établi une forte relation entre la composition chimique des huiles essentielles et leur activité antioxydante. L'évaluation des interactions entre les agents antioxydants naturels et les autres composants alimentaires est une étape importante dans la discussion du pouvoir antioxydant total, en termes de bénéfices pour la santé. La grande diversité des produits chimiques de source naturelle, en plus de leurs interactions potentielles et de leur mode d'action rendent difficile l'évaluation de l'effet antioxydant en suivant une procédure simple (Hamdipo et al., 2013).

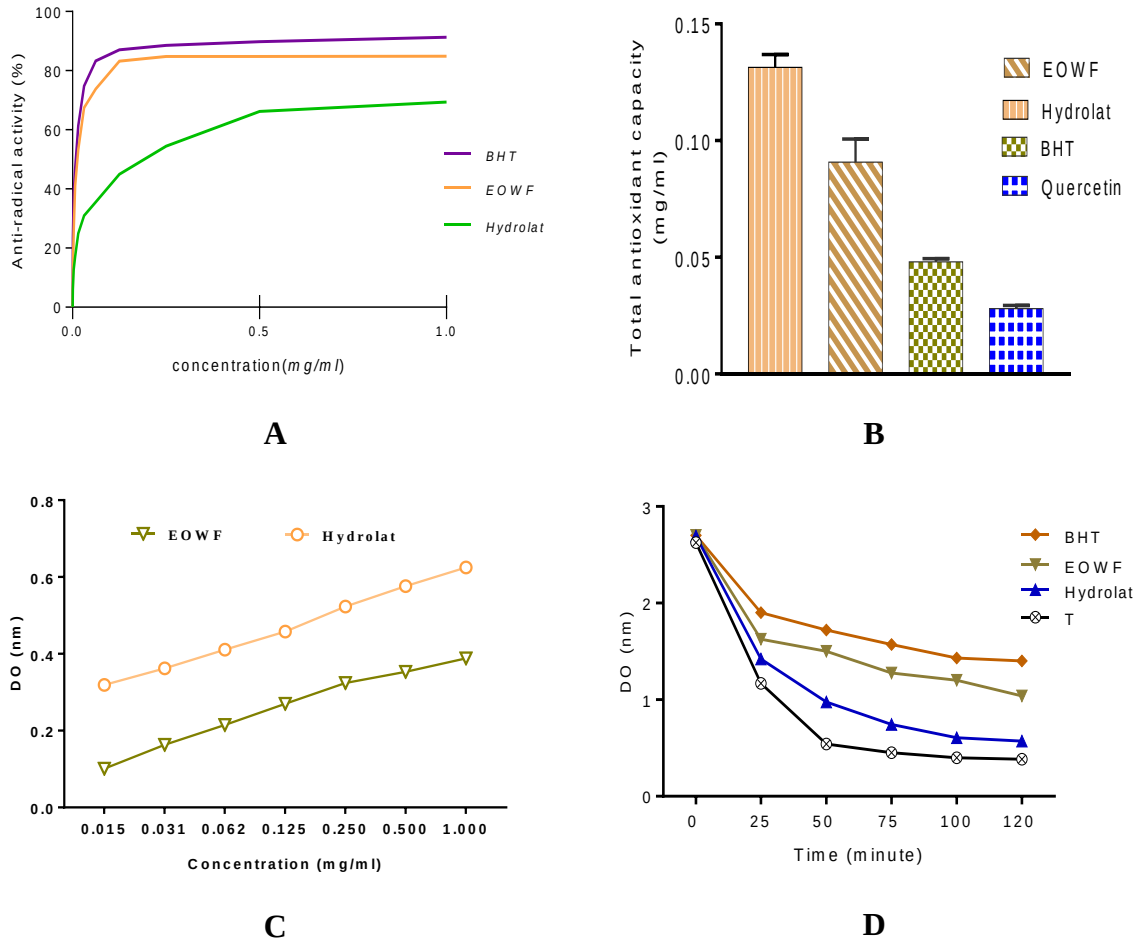



**Figure 35:** Pouvoir antioxydant de HEWF par la méthode de DPPH (A), la methode de phosphomolybdate (B), la methode de FRAP (C) et la méthode de beta-carotene (D).

Il a été rapporté que l'activité antioxydante des huiles essentielles est due à leur composition chimique et particulièrement aux composés ayant des fonctions hydroxyle

(Bouhdid et al., 2008). Par conséquent, les huiles essentielles qui sont plus riches en terpènes présentent un plus grand pouvoir antioxydant (Chun et al., 2005). Les ions métalliques sont nécessaires aux fonctions biochimiques et physiologiques cellulaires, cependant, parfois ces ions subissent des processus erronés pour provoquer une peroxydation lipidique, un stress oxydatif ou des lésions tissulaires en l'absence d'agents antioxydants (Fayad et al., 2009). Alors, les antioxydants naturelles peuvent exercer un large spectre de fonctions biologiques (anti-allergiques, anti-athérogènes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et antioxydantes), et l'identification et la quantification du contenu antioxydant peuvent être considérées comme une étude importante pour découvrir les propriétés biologiques des composés naturels.

### 3. Activité antibactérienne de l'huile essentielle

Ces résultats montrent que l'huile possède un puissant effet inhibiteur sur toutes les bactéries sélectionnées, qu'il s'agisse de souches Gram-négatives ou Gram-positives, avec différents diamètres de zone d'inhibition. *E. coli* et *S. aureus* étaient les bactéries les plus sensibles à l'HE avec des diamètres de zone d'inhibition de 27 mm et 26 mm respectivement. Les résultats obtenus ont également révélé que l'hydrolat était efficace sur *E. coli* 57, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, et *S. aureus* à l'exception de *E. coli* 97. Une méthode de microdilution a été utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice de l'échantillon testé (Tableau 16). Les résultats obtenus ont montré que la plus faible concentration inhibitrice de l'HE a été enregistrée pour *P. aeruginosa* avec une concentration de 1/640 µg/ml, suivie de *K. pneumoniae* avec 1/320 µg/ml (Tableau 17).

**Tableau 16**: Diamètre de la zone d'inhibition de l'HE, de l'hydrolat et des antibiotiques (mm)

| | ***E. coli 57*** | ***E. coli 97*** | ***K. pneumoniae*** | ***P. aeruginosa*** | ***S .aureus*** |
|---|---|---|---|---|---|
| **HEWF** | 24,32±0.20 | 27,50±0,11 | 19,71±0,10 | 16,11±0,21 | 26±0,41 |
| **Hydrolat** | 11,21±0.13 | - | 9,23±0,50 | 8±0,52 | - |
| **Streptomycin** | - | - | - | - | 9,61±0,20 |
| **Ampicillin** | - | - | - | - | - |

**Tableau 17**: Concentration minimale inhibitrice de l'hydrolat et de l'huile essentielle de *W. frutescens* (CMI en µg/ml).

| | ***E. coli 57*** | ***E. coli 97*** | ***K. pneumoniae*** | ***P. aeruginosa*** | ***S. aureus*** |
|---|---|---|---|---|---|
| **HEWF** | 0,006±0,001 | 0,050±0,004 | 0,003±0,001 | 0,001±0,0 | 0,012±0,003 |
| **Hydrolat** | 6,125±0,541 | - | 6,125±0,068 | 6,125±0,046 | 6,125±0,571 |
| **Streptomycin** | 0,250±0,027 | 0,500±0,002 | 0,003±0,001 | - | 0,062 |
| **Ampicillin** | - | - | - | - | - |

De plus, l'HE étudiée s'est révélé efficace contre les deux types de bactéries Gram-positives et Gram-négatives, contrairement à la streptomycine et à l'ampicilline qui étaient moins efficaces. Dans l'ensemble, le meilleur effet antibactérien a été démontré par l'HE

contre un large spectre de bactéries, y compris les bactéries Gram-négatives (*E. coli 57, E. coli 97, K. pneumonia, S. aureus*) et les bactéries Gram-positives (*P. aeruginosa*). Nos résultats ont montré que les souches bactériennes testées, qu'elles soient Gram-négatives ou Gram-positives, étaient complètement résistantes à l'ampicilline et partiellement à la streptomycine. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans des travaux antérieurs (Yu et al., 2020), qui ont montré que les microbes résistants aux médicaments les plus menaçants comprennent *S. aureus, K. pneumoniae, A. baumannii* et *E. coli*. Ces résultats ont montré que les huiles essentielles ont une activité presque similaire contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Par conséquent, nous avons pu confirmer que l'HE de *W. frutescens* peut être une arme prometteuse pour combattre les souches pathogènes nosocomiales et multirésistantes.

Les produits chimiques contenus dans l'huile peuvent agir en synergie plus qu'individuellement, car des travaux antérieurs ont montré que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles était supérieure à celle de leurs composés testés séparément (Cosentino et al., 1999 ; El Atki et al., 2019). Les propriétés antibactériennes des huiles essentielles observées dans ce travail peuvent être expliquées par le fait que l'huile a un caractère lipophile qui la rend facile à pénétrer dans la cellule bactérienne et conduit finalement à la mort des bactéries. Il a été rapporté que les hydrocarbures de l'huile essentielle se logent préférentiellement dans les membranes biologiques, ce qui perturbe la perméabilité de la membrane, et conduit finalement à la mort immédiate des bactéries (Delaquis et al., 2002; Lambert et al., 2001).

Les stratégies de traitement limitées contre les infections résistantes aux médicaments nécessitent de nouveaux antibiotiques plus efficaces. Cependant, le nombre d'antibiotiques approuvés pour un usage clinique depuis 2000 est limité et la plupart d'entre eux ne répondent qu'aux bactéries Gram-positives, et leurs mots de réponse contre les souches Gram-négatives se réduisent avec le temps, ce qui peut accentuer l'émergence d'une plus grande menace pour la santé humaine (Yu et al., 2020).

Pour avoir un effet antimicrobien, l'agent antimicrobien doit atteindre et interagir avec les sites microbiens cibles. Cependant, l'interaction entre le médicament et la cible est fréquemment interrompue par divers mécanismes chez les bactéries (multirésistance et résistance étendue aux médicaments), ce qui entraîne l'inefficacité des agents antimicrobiens et favorise finalement le développement des bactéries contre les agents testés (Yu et al., 2020).

La faible sensibilité des micro-organismes Gram négatif aux agents antibactériens peut s'expliquer par le fait qu'ils possèdent une membrane externe entourant la paroi cellulaire, ce qui limite la diffusion des composés hydrophobes à travers son revêtement de lipopolysaccharides. En raison de leur nature lipophile, les huiles essentielles peuvent facilement traverser les parois cellulaires et la membrane cytoplasmique en provoquant des troubles de la structure des polysaccharides, des acides gras, des phospholipides ainsi que de leur perméabilité (Bakkali et al., 2008).

## 4. Activité antifongique

Les infections à levures ont une fréquence élevée chez les patients hospitalisés dans le monde entier avec de nombreux facteurs de risque associés à un mauvais pronostic. Plusieurs études épidémiologiques ont été menées sur les infections à levures et ont montré que *C. albicans* est responsable de nombreuses maladies. Les souches de Candida ont été signalées comme la cause la plus fréquente d'infections fongiques invasives chez les patients hospitalisés, représentant 8 à 10% de toutes les infections nosocomiales (Gafter et al., 2008). Il a été signalé que les candidoses invasives sont fréquemment associées à des taux de mortalité bruts élevés, et le contrôle de ces infections peut être un grand défi puisque plusieurs options antifongiques peuvent ne plus être efficaces contre les souches résistantes. *S. cerevisiae* est impliqué dans la pathologie humaine causant la vaginite (Kett et al., 2008)

L'activité antifongique de l'HEWF et de l'hydrolat a été menée sur les levures *C. albicans* et *S. cerevisiae*. L'inhibition de la croissance fongique a été notée en présence de l'huile essentielle et de l'hydrolat. Les résultats obtenus ont montré qu'une forte inhibition de l'huile essentielle a été observée pour *C. albicans* et *S. cerevisiae* avec un diamètre de zone d'inhibition de 47±3,120 mm et 40±6,450 mm respectivement (Tableau 18). Le médicament utilisé comme référence était moins efficace contre les levures par rapport à l'huile essentielle avec un diamètre de zone d'inhibition de 21,200±4,200 mm contre *C. albicans* et 27,650±2,500 mm et *S. cerevisiae* respectivement (Tableau 18). Notre huile essentielle a eu une forte activité antifongique par rapport à toutes les normes utilisées, y compris le fluconazole et le sulfate de cuivre. La concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle était très faible comme le montre le tableau 18. Les résultats obtenus ont révélé que notre huile étudiée était plus efficace contre *C. albicans* et *S. cerevisiae* avec une concentration minimale inhibitrice de 10-4 mg/ml. L'hydrolat avait également une concentration minimale inhibitrice d'environ 12,5 mg/ml. L'extrait hydrolat a été modérément efficace par rapport aux autres résultats avec un diamètre de zone d'inhibition de 9±1,750 mm contre les deux levures testées *C. albicans* et *S. cerevisiae*. L'extrait hydrolat a également montré une meilleure activité en utilisant le test de concentration minimale inhibitrice sur *C. albicans* 0,400±0,020 mg/ml et *S. cerevisiae* 0,200±0,010 mg/ml. Les souches fongiques étudiées dans le présent travail appartiennent aux microbes résistants aux médicaments puisqu'elles ont montré des CMI élevées, qui existaient dans la gamme de 0,400±0,020 mg/ml pour le Fluconazole.

De nombreuses études ont rapporté des données intéressantes sur le mécanisme d'action des champignons pour la compréhension des mécanismes d'activité correspondants. Il s’est avéré que les huiles avec le thymol, le p-Cymène pénètrent dans les cellules en causant de graves dommages à la membrane (Green et al., 1990). L'activité fongicide résulte d'un dommage direct à la membrane des cellules plutôt que d'une altération métabolique conduisant à un dommage secondaire de la membrane cellulaire (Pina-vaz et al., 2000). Cette activité est en accord avec la nature chimique des monoterpènes, qui agissent très potentiellement comme un solvant de la membrane cellulaire. Dans des travaux plus récents, il a été déclaré que l'activité fongicide de l'huile avec le thymol et le p-cymène contre Candida spp. résulte d'un dommage direct à la membrane cytoplasmique (Pina-vaz et al., 2000).

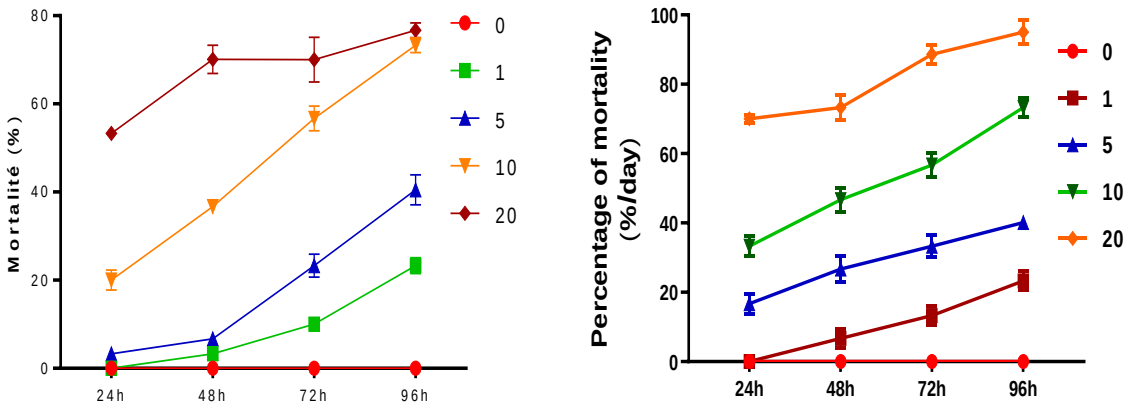
**Tableau 18**: Résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'hydrolat

| | Activité antifongique (mm) | | Concentration minimale inhibitrice (mg/ml) | |
|---|---|---|---|---|
| | *C. albicans* | *S. cerevisiae* | *C. albicans* | *S. cerevisiae* |
| HEWF | 47±3.120 | 40±6.450 | 0.0004±0.0 | 0.0004±0.0 |
| Hydrolat | 9±1.750 | 9±1.250 | 12.500±0.207 | 12.500±0.310 |
| Flu | 21.200±4.200 | 27.650±2.500 | 0.400±0.020 | 0.200±0.010 |

*Flu: fluconazole

## 5. Pouvoir insecticide de HEWF

Les résultats obtenus dans le présent travail ont révélé qu'à la plus faible concentration (1 µL/L) d'HEWF une mortalité de 23,13±1,07% et 24,41±1,21% chez les adultes de *C.maculatus* par inhalation et par contact respectivement après 96 h d'exposition (Figure 36). A la concentration la plus élevée (20 µL/L), la mortalité a atteint 95,1±3,5% par inhalation et 76,69±1,71% par contact respectivement, alors qu'aucune mortalité n'a été observée chez les espèces utilisées pour le contrôle. L'analyse statistique a montré que la valeur de la CL50 obtenue avec le test d'inhalation de 13,28±2,62 µL/L était inférieure à celle obtenue avec le test de contact 18,41±1,29 µL/L.




**A** **B**

**Figure 36**: Effets des huiles essentielles de *W. frutescens* sur la mortalité de *C. maculatus* adulte, (A) huile essentielle testée par inhalation; (B) Huile essentielle testée par contact.

La ponte des œufs chez *C. maculatus* a lieu dans les 24 heures suivant l'accouplement. Le nombre d'œufs pondus diminue significativement en présence des huiles essentielles testées et progressivement avec l'augmentation des doses, de sorte que le pourcentage de réduction de la ponte est de l'ordre de 81,26±2,01% à la dose de 20µl HEW. Les traitements à l'huile essentielle ont réduit significativement le taux de viabilité des œufs par rapport au lot témoin où il était maximal de l'ordre de 84,0±2,65% et un taux de réduction de la viabilité de ces œufs était de l'ordre de 71,42±3,41% enregistré à la dose de 20µl d'HEWF (Figure 36 et 37).

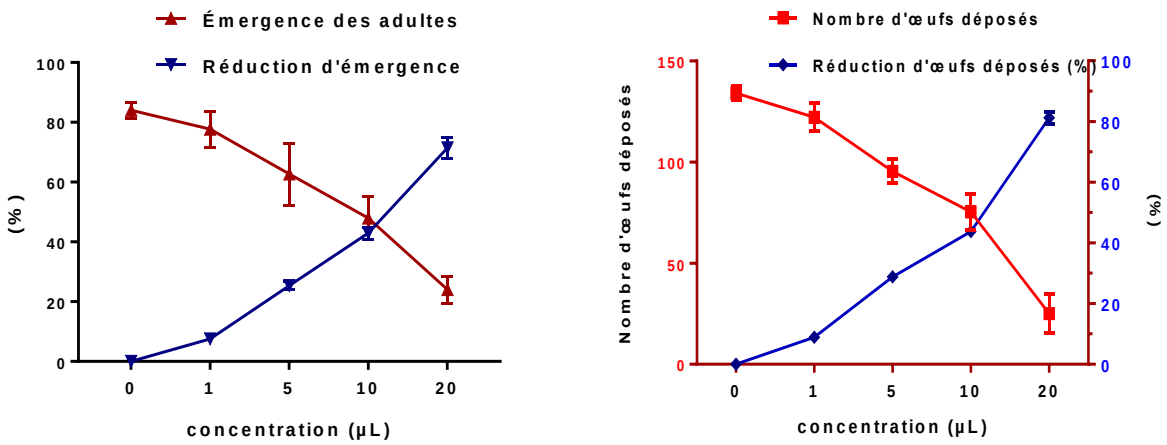



**Figure 37**: Effets des huiles essentielles de *Withania frutescens* sur sur l'émergence de *C. maculatus.* (A) Huile essentielle testée par inhalation ; (B) Huile essentielle testée par contact.

Concernant l'effet répulsif de l'HEWF sur *C. maculatus*. Les résultats ont montré que l'huile étudiée est très répulsive envers *C. maculatus* avec un taux de 95,12±3,42%. De plus, il a été noté que le pourcentage de répulsion augmentait avec la concentration, comme le montre la figure 37 et 38. Par conséquent, nous pouvons confirmer que l'HEWF pourrait être une source intéressante d'agents écologiques pour lutter contre *C. maculatus*. Le traitement par des produits chimiques synthétiques pour lutter contre les parasites a été considéré comme un problème croissant pour l'environnement. En conséquence, il est important d'utiliser des produits naturels pour lutter contre les insectes, notamment les huiles essentielles, qui pourraient être dans la lutte contre les insectes en raison de leur pouvoir insecticide contre les différents stades larvaires des nuisibles. En général, les huiles essentielles extraites de plantes naturelles sont considérées comme des insecticides respectueux de l'environnement et peuvent être utilisées comme composés bioactifs pour le développement de nouveaux agents naturels destinés à remplacer les agents synthétiques (Ikbal et al., 2004).

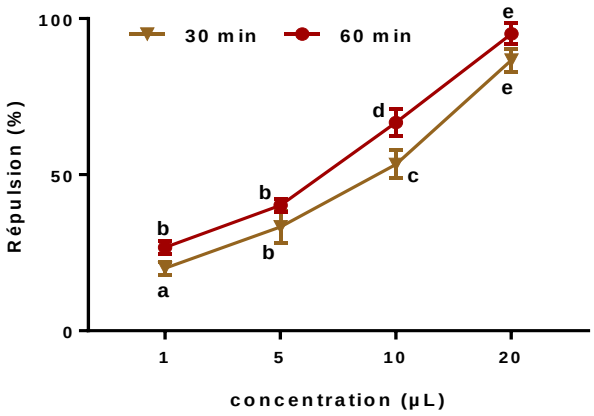



**Figure 38**: Activité répulsive de différentes concentrations d'huile essentielle de *Withania frutescens* contre *C. maculates*. Classe a (0,1≤ Répulsion ≤ 20%) ; Classe b (20,1≤ Répulsion ≤ 40%) ; Classe c (40,1≤ Répulsion ≤ 60% ; Classe d (60,1≤ Répulsion ≤ 80% ; Classe e (80,1≤ Répulsion ≤ 100%.

De nombreuses études ont démontré l'action des huiles essentielles sur la longévité des adultes de différentes espèces de ravageurs des grains stockés. En raison de leur grande volatilité, les huiles essentielles et leurs constituants, principalement les monoterpènes, exercent des effets insecticides et réduisent ou perturbent la croissance des insectes à différents stades de leur vie (frenot et al., 2001; Baudoin et al., 2001; Colas et al., 1962). Leur efficacité varie en fonction du profil et de la composition phytochimique des plantes et de la cible entomologique, par exemple le germe de haricot est plus sensible aux monoterpènes phénoliques (Butler et al., 1998).

En effet, les huiles essentielles, mélanges de monoterpènes, sont des agents neurotoxiques agissant sur différentes cibles selon leur nature chimique, ainsi le linalol provoque une réduction de l'amplitude et de la fréquence du potentiel d'action puis entraîne une réduction de la phase de post-hyperpolarisation qui suit la transmission de l'influx nerveux. Tandis que l'estragol induit plus spécifiquement une réduction de la phase de post-hyperpolarisation; l'action simultanée des deux composés provoque la paralysie puis la mort des insectes (Butler et al., 1998).

D'autre part, l'effet des huiles essentielles sur la reproduction résulte à la fois d'une inhibition de l'ovogenèse et en même temps d'une augmentation de la rétention des œufs dans les oviductes latéraux des femelles. En effet, des études ont montré que des modifications de l'environnement des sites de ponte peuvent conduire au blocage de l'ovogenèse et à la rétention des œufs dans les oviducts, ainsi les huiles essentielles, par leurs substances volatiles, pourraient masquer l'action des odeurs stimulantes émises par les graines (Sathya seelan et al., 2008; Caswell et al., 1980).

## 6. Activité anticorrosion de HEWF

### 6.1. Mesures PP

Les mesures PP sont une technique fondamentale utilisée pour collecter des informations relatives à un système électrochimique. Les perturbations de MS en milieu HCl 1.0 M, en absence et en présence de HEWF ont été réalisées après 30 minutes de stabilisation au potentiel anticorrosion appelé potentiel de circuit ouvert du système électrochimique à 298 K. Comme indiqué dans la Figure 39. Les paramètres électrochimiques liés à ce système tels que la densité de courant de corrosion (icorr), le potentiel de corrosion (Ecorr), ainsi que le coefficient cathodique de Tafel (βc) ont été répertoriés dans le tableau 19. Les icorr ont été déterminés à partir de l'extrapolation des lignes de Tafel cathodiques, qui présentent un réel comportement tafélien (McCafferty, 2005). L'efficacité d'inhibition (ηTafel) a été calculée en utilisant la formule suivante:

$$\eta_{Tafel} = (1 - \frac{i_{corr/inh}}{i_{corr}}) \times 100$$

Où icorr et icorr/inh représentent les valeurs de densité de courant de corrosion sans et avec HEWF respectivement.

Comme on peut le voir sur la figure 39, les réactions cathodiques et anodiques ont été inhibées par l'ajout de HEWF en solution acide. Les lignes de Tafel parallèles cathodiques (Figure 39) et les légers changements dans les pentes de Tafel cathodiques βc (Tableau 19) indiquent que la loi de Tafel a été vérifiée dans ce domaine (Rice-Evans et al., 1996). En ce sens, le mécanisme de décharge des protons H+ a été contrôlé par activation par l'ajout de Wf-HEWF en solution acide sans modification du mécanisme du processus. Néanmoins, dans le domaine anodique avec des potentiels supérieurs à -270 mVAg/AgCl, 3M KCl, le HEWF n'a pas modifié les caractéristiques courant vs potentiel par rapport au milieu non inhibé. Ce phénomène pourrait être attribué à la désorption des composés HEWF de la surface de l'électrode à un potentiel peut donc être défini comme le potentiel de désorption Ed, couramment rapporté dans la littérature (Beniken et al., 2018; Aourabi et al., 2021).

Le potentiel de corrosion Ecorr est décalé vers des valeurs plus anodiques comme le montre le tableau 19.En ce sens, si le déplacement de Ecorr(inh) est supérieur à 85 mV par rapport à Ecorr en inhibiteur libre, l'inhibiteur peut être considéré comme un type cathodique ou anodique (Bensouda et al..., 2019), et si le déplacement de Ecorr(inh) est inférieur à 85,00 mV, l'inhibiteur peut être considéré comme un type mixte (Soltaninejad et al., 2018; Guruprasad et al., 2019b). Dans cette étude, la plus grande valeur de déplacement de potentiel obtenue est de l'ordre de 74 mV indiquant que HEWF agit comme un inhibiteur de type mixte avec la domination du caractère anodique.

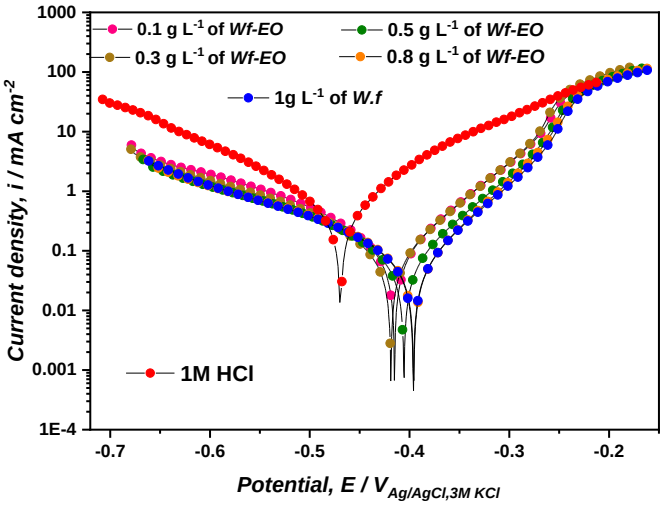



**Figure 39:** Courbes de polarisation de MS dans 1.0 M HCl à différentes concentrations de HEWF à 298 K

Le tableau 19 montre que les valeurs des densités de courant icorr diminuent considérablement avec l'augmentation des concentrations de HEWF, passant de 611.61 µA cm-2 dans 1.0 M HCl seul à 107.72 µA cm-2 à une concentration de 1.00 g L-1 de HEWF Cette diminution de la densité de courant permet à l'efficacité d'inhibition d'atteindre une valeur maximale de 82.39 %. On peut également noter qu'aucune amélioration de l'efficacité d'inhibition n'est observée malgré l'augmentation de la concentration de HEWF, c'est-à-dire qu'un plateau de ηTafe % a été enregistré à partir de 1 g L-1 de concentration de HEWF.

**Tableau 19**: Paramètres électrochimiques générés à partir des courbes de PP du MS immergé dans 1,0 M HCl à différentes concentrations de HEWF à 298 K.

| MS / electrolyte interface | $E_{corr}$ $mV_{Ag/AgCl,3M\ KCl}$ | $i_{corr}$ $\mu A\ cm^{-2}$ | $\lvert\beta_c\rvert$ $mV\ dec^{-1}$ | $\eta_{PP}$ % |
|---|---|---|---|---|
| **MS / 1.0 M HCl** | -469.79 | 611.61 | 131.1 | - |
| **MS / 0.1 g $L^{-1}$ of** HEWF | -414.92 | 199.54 | 186.5 | 67.37 |
| **MS / 0.3 g $L^{-1}$ of** HEWF | -418.99 | 176.2 | 192.8 | 71.22 |
| **MS / 0.5 g $L^{-1}$ of** HEWF | -405.64 | 132.4 | 200.3 | 78.42 |
| **MS / 0.8 g $L^{-1}$ of** HEWF | -395.61 | 115.40 | 197.9 | 81.13 |
| **MS / 1 g $L^{-1}$ of** HEWF | -396.12 | 107.72 | 191.0 | 82.39 |

## 6.2. **Mesures de l'impédance électrochimique**

Pour comprendre le mécanisme qui a eu lieu à l'interface électrode/solution, l'impédance électrochimique constitue une technique très puissante pour étudier les processus d'inhibition de la corrosion. Les diagrammes de Nyquist et de Bode de la MS immergée dans la solution corrosive 1.0 M HCl, sans et avec des concentrations de HEWF sont présentés dans la Figure 40.

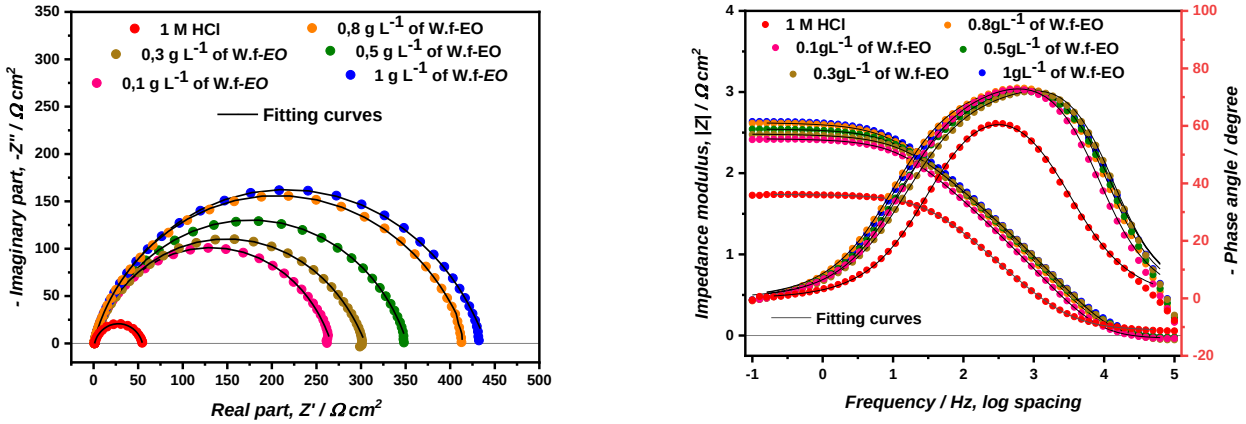



**Figure 40**: Diagrammes de Nyquist et de Bode d'acier doux (MS) dans 1.00 M HCl avec et sans concentrations de HEWF à 298 K.

Les diagrammes de Nyquist ne montrent à première vue qu'une seule boucle capacitive déprimée, ce qui montre que la corrosion du MS peut être suivie par le processus de transfert de charge. Ce phénomène de dispersion de la capacité à l'interface de l'électrode dépend fortement de l'état de la surface de l'électrode, c'est-à-dire de sa rugosité, de son degré de polycristallinité et aussi de l'adsorption d'un anion. La déviation du comportement capacitif idéal peut être représentée empiriquement par un élément à phase constante (CPE) ; une impédance complexe ayant une propriété spéciale avec un angle de phase indépendant de la fréquence, comme rapporté par Fricke (Fricke, 1932). L'impédance de l'élément CPE peut être exprimée en utilisant l'équation suivante:

$$Z_{CPE} = Q^{-1} (j\omega)^{-n}$$

Où Q est un paramètre lié à la capacité de l'électrode (F sn-1 cm-2), et n est l'exposant de phase constant souvent utilisé comme indicateur de la rugosité ou de l'hétérogénéité de la surface ($0 < n < 1$) associé à la déviation de la ligne capacitive droite de 90° par un angle α, si α peut être calculé par l'équation (5) et j2 = - 1 est un nombre y d'imaginaires tandis que ω est la fréquence angulaire:

$$\boldsymbol{\alpha = 90° (1 - n)}$$

Par conséquent, les Bode-plots sont recommandés pour l'affichage des données SIE en termes de fréquence. Les Bode-plots permettent de détecter les régions dominées par des éléments résistifs tels que la résistance de la solution Rs et la résistance de polarisation Rp dans lesquelles une pente de zéro a été remarquée, tandis que les régions dominées par un élément capacitif pur pour lesquelles une pente de (-1) a été remarquée dans le cas idéal. Cependant, la largeur de la gaussienne (φ-log f) obtenue en présence à différentes concentrations de HEWF est beaucoup plus grande que celle obtenue dans le HCl 1.0 M seul. Ce résultat stipule très probablement l'apparition d'une seconde constante de temps, bien que peu séparée de celle du transfert de charge en présence des différentes concentrations de HEWF. Ce second phénomène de relaxation ou de constante de temps est généralement attribué à la présence d'un processus supplémentaire évident à la surface du métal. Cette simple analyse qualitative confirme la formation d'une couche barrière.

Parmi les nombreux circuits équivalents qui ont été utilisés pour décrire la présente interface électrochimique afin d'extraire les paramètres nécessaires à la compréhension du système étudié, seul le circuit suivant à deux constantes de temps Rs+CPEdl/[Rct+CPEa/Ra], a été retenu tel que présenté sur la Figure 41. Rs est la résistance de la solution, Rct est la résistance de transfert de charge et la constante de temps (CPEdl) à haute fréquence se rapportant au processus de transfert de charge. Ra est la résistance de l'inhibiteur adsorbé tandis que CPEa représente la constante de temps de relaxation de la couche adsorbée à la surface du MS. Par conséquent, un excellent réajustement paramétrique des spectres d'impédance expérimentaux dans les plans de Nyquist et de Bode a été obtenu. De plus, les spectres expérimentaux et simulés étaient bien corrélés avec un coefficient $\chi'2/|Z|$, et donc, ils soutiennent la validation de ce modèle.

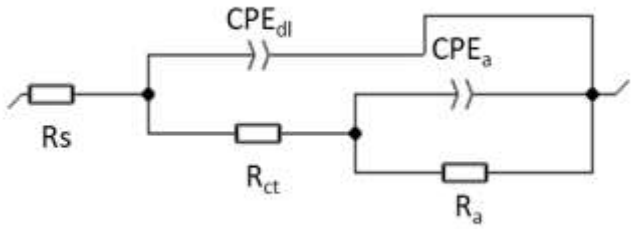



**Figure 41**: Modèle de circuit électrique equivalent

Les paramètres d'impédance enregistrés à partir de l'ajustement des diagrammes et η_"EIS" "\%" sont présentés dans le tableau 20. L'efficacité d'inhibition issue de la résistance de polarisation (PR) en présence des différentes concentrations de HEWF, est calculée selon l'équation (6):

$$\eta_{EIS}\% = \left(1 - \frac{R_p}{R_{p/inh}}\right) \times 100$$

Où Rp est la résistance de polarisation calculée par l'équation suivante (RP = Rct + Ra).

**Tableau 20**: Efficacité d'inhibition et paramètres EIS pour MS dans 1.0 M HCl à différentes concentrations de HEWF

| Interface électrode/électrolyte | $R_S$ | $Q_{dl}$ | $n_{dl}$ | $R_{ct}$ | $Q_a$ | $n_a$ | $R_a$ | $R_p$ | $\eta_{EIS}\%$ | $\chi^2/\|Z\|$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **MS / 1.0 M HCl** | 1.16 | 205.50 | 0.847 | 37.23 | 80.93 | 0.461 | 16.53 | 53.76 | -- | 0.015 |
| **MS / 0.1 g $L^{-1}$ de HE** | 0.94 | 31.46 | 0.963 | 28.35 | 118.70 | 0.667 | 239.60 | 267.95 | 79.93 | 0.037 |
| **MS / 0.3 g $L^{-1}$ de HE** | 0.89 | 22.50 | 0.959 | 39.90 | 107.50 | 0.675 | 267.40 | 307.30 | 82.50 | 0.040 |
| **MS / 0.5 g $L^{-1}$ de HE** | 0.96 | 27.71 | 0.943 | 48.73 | 100.10 | 0.678 | 304.90 | 353.63 | 84.79 | 0.043 |
| **MS / 0.8 g $L^{-1}$ de HE** | 0.93 | 29.27 | 0.947 | 49.81 | 92.69 | 0.677 | 370.90 | 420.71 | 87.22 | 0.049 |
| **MS / 1 g $L^{-1}$ de HE** | 0.96 | 27.99 | 0.936 | 56.88 | 83.35 | 0.674 | 382.90 | 439.78 | 87.77 | 0.037 |

*$R_s$, $R_{ct}$, $R_a$ et $R_p$ en Ω $cm^2$; $Q_{dl}$ et $Q_f$ en µF $s^{n-1}$ $cm^{-2}$*

Les données présentées dans le tableau 20 montrent clairement que dans la gamme de concentration, le PR augmente avec la concentration de HEWF, ainsi la meilleure efficacité d'inhibition atteinte était de 87,77%. Le paramètre de la composante CPEdl Qdl a diminué brusquement avec l'ajout de HEWF par rapport à la solution non inhibée par la formation présumée d'une couche protectrice adsorbée. L'amélioration de cette couche a été associée à une augmentation de nd par rapport à la solution vierge qui a été associée à une légère diminution de l'hétérogénéité de la surface (Aourabi et al., 2020). Il a été noté que la résistance de transfert de charge Rct augmentait avec la concentration croissante de HEWF et que la résistance totale Rp était plutôt dominée par Ra.

Selon le modèle de Bonnel et al. (Bonnel et al., 1983), on suppose que la résistance associée à la partie haute fréquence du spectre contient des contributions cathodiques et anodiques de la réaction de transfert de charge. Ceci confirme le caractère mixte obtenu par la mesure du PP. La résistance associée à la partie basse fréquence est considérée comme contenant la contribution explicite du transport de masse à travers les produits de corrosion poreux. Ce dernier résultat a été reflété par la plus petite valeur de na qui peut être attribuée comme une mesure de la distribution d'énergie puisque les molécules adsorbées étaient des porteurs de charge électroniques (Bonnel et al., 1983).

6.3. Isotherme d'adsorption

Au cours du processus d'adsorption de l'inhibiteur sur la surface du métal, il existe deux types d'adsorption: chimisorption ou physique, où le processus est contrôlé par la charge résiduelle sur la structure chimique et le métal de l'inhibiteur. L'ajout croissant d'un inhibiteur de corrosion entraîne une diminution progressive de la vitesse de corrosion et/ou un renforcement de l'inhibition de la corrosion. La relation entre la concentration de l'inhibiteur

et la vitesse de corrosion a été étudiée par plusieurs modèles d'isothermes. En ce sens, il a été rapporté que les isothermes d'adsorption couramment utilisés pour ajuster les données expérimentales sont les modèles de Freundlich, Temkin, Langmuir et le modèle cinétique-thermodynamique El-Awady. Les formes conventionnelles et linéarisées des isothermes sont représentées dans le tableau 21.

Dans le présent travail de recherche, les valeurs θ correspondant à différentes concentrations de HEWF sont facilement déterminées par la méthode EIS (θEIS), par le rapport η% /100. La figure 42 montre différents modèles d'isothermes d'adsorption tels que Langmuir, Freundlich, Temkin, El-Awady, ainsi que les paramètres d'adsorption déduits de ces isothermes.

**Tableau 21**: Formes linéarisées et conventionnelles des modèles d'isothermes d'adsorption les plus utilisés.

| Isotherm | Conventional form | Linearized form | Références |
|---|---|---|---|
| **Langmuir** | $\frac{\theta}{1-\theta} = K_{ads} C_{inh}$ | $\frac{C_{inh}}{\theta} = \frac{1}{K_{ads}} + C_{inh}$ | (Halambek et al., 2010) |
| **El-Awady** | $\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right)^{1/y} = K_{ads} C_{inh}$ | $log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = y log K_{ads} + y log C_{inh}$ | (Jiajun Fu et al., 2011) |
| **Temkin** | $exp(-2a\theta) = K_{ads} C_{inh}$ | $\theta = -\frac{1}{2a} ln K_{ads} - \frac{1}{2a} ln C_{inh}$ | (Andreani et al., 2016) |
| **Freundlich** | $\theta = K_{ads}(C_{inh})^n$ | $ln\,\theta = ln(K_{ads}) + n\,ln\,C_{inh}$ | (Khadom et al., 2010) |

Ces résultats montrent que tous les coefficients sont proches de l'unité avec le meilleur ajustement fourni par l'utilisation du modèle d'isotherme d'adsorption de Langmuir avec R2 = 0,9999, tandis que la pente de la formule correspondante s'écarte légèrement de l'unité. En conséquence, le modèle de Langmuir semble être plus approprié pour décrire le processus d'adsorption comme cela a été rapporté dans des travaux antérieurs (Durnie et al., 2001; Obot et al., 2009). Au contraire, la réciproque de 'y' obtenue à partir du modèle El-Awady est presque égale à 4 et peut donc suggérer que quatre molécules d'eau ont été remplacées par une molécule de HEWF dans le processus d'inhibition.

Sur la base de ce résultat, on peut conclure que le premier est en contradiction avec l'hypothèse sur laquelle repose l'isotherme de Langmuir, qui stipule qu'une molécule d'inhibiteur remplace une molécule d'eau. De plus, le processus d'adsorption des molécules de HEWF suit également l'isotherme de Temkin, ce qui indique la présence d'une interaction moléculaire dans la couche adsorbée. Cependant, cette hypothèse est pratiquement cohérente avec le modèle isotherme de Langmuir et elle est également confirmée par le signe négatif de l'interaction intermoléculaire dans la couche d'adsorption 'a' du modèle de Temkin (Oguzie, 2007). Il est donc approprié que le processus d'adsorption étudié dans le présent travail ne puisse pas être raisonnablement modélisé par le modèle isotherme de Freundlich, même si les valeurs R2 obtenues à partir des tracés correspondants étaient bonnes.

En résumé, la possibilité d'une adsorption idéale de type Langmuir est impensable du fait que l'hétérogénéité de la surface est mise en évidence par les mesures EIS où les exposants CPE sont loin de l'unité. De plus, une molécule d'eau serait probablement

remplacée par trois ou même quatre molécules d'huile, identiques ou non, comme en témoigne l'isotherme de El Away avec une possibilité de forte interaction entre elles en référence à l'isotherme de Temkin.

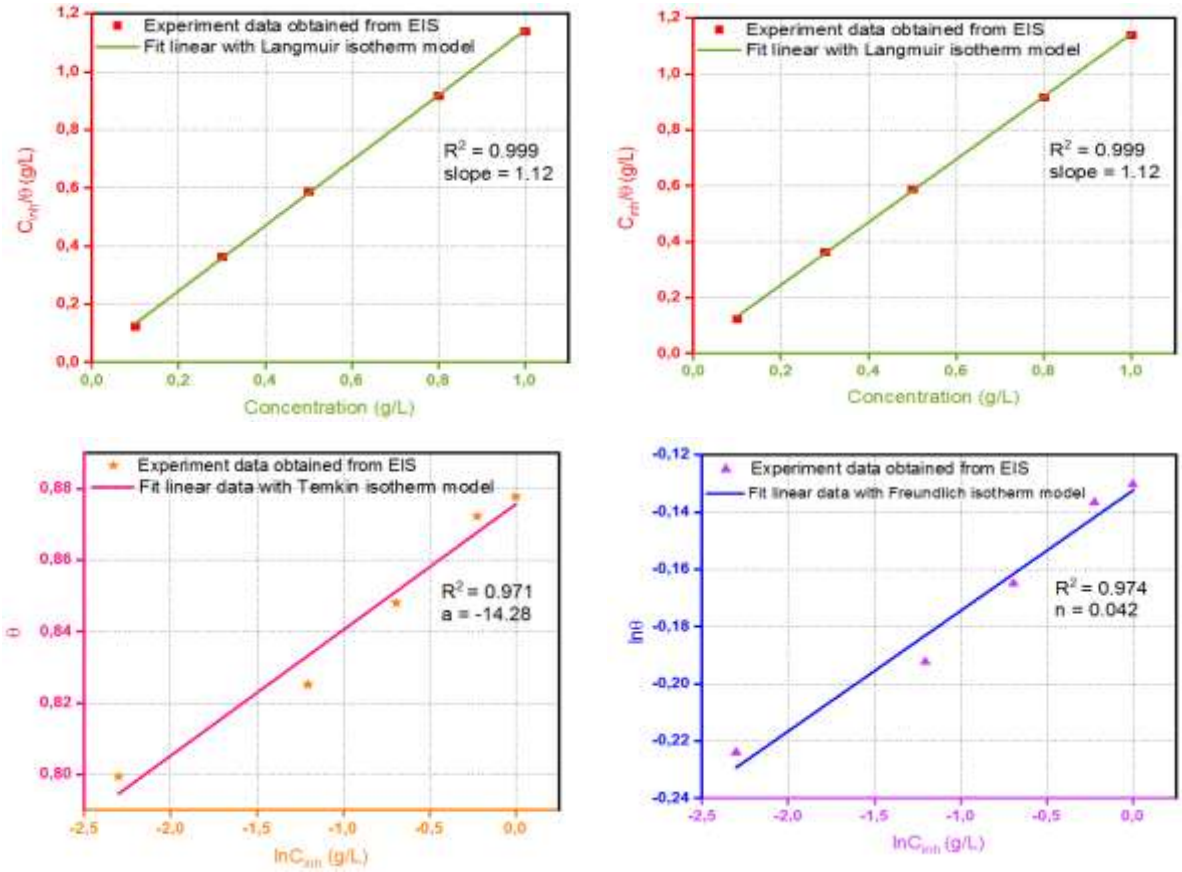



**Figure 42**: Tracés des modèles de l'isotherme d'adsorption de HEWF pour la surface de MS dans 1.0 M HCl à 298 K obtenus à partir des données EIS.

## IV. Conclusion

L'evalution du pouvoir antioxydant par quatre méthodes et antimicrobien contre des souches resistantes, a montré que l'hydrolat ne s'est pas montré plus actif envers les champignons et les bactéries testés en matière d'activité antioxydante, par contre notre huile a un pouvoir antioxydant et antimicrobien important et efficace. Alors, nous pouvons suggérer l'usage de l'huile essentielle de *W. frutescens* comme phytomédicament car elle fournit des agents potentiellement actifs pour combattre les dommages causés par les radicaux libres, les infections bactériennes et fongiques.

L'efficacité insecticide de notre huile essentielle étudiée contre *C. maculatus* du pois chiche est prometteuse. Et par conséquent, cette HE peut être utilisé comme un bio-pesticide naturel pour le contrôle des ravageurs. Les résultats obtenus ont révélé que les HE étudiées contrôlaient efficacement le cycle de vie des insects. Aussi, le pouvoir electrochimique de notre huile essentielle agit comme un bon inhibiteur de corrosion pour l'acier C dans une solution de HCl 1.0 M et son efficacité d'inhibition dépend de sa concentration.

# Chapitre 5 : Evaluation des potentialités nutritionnelles de la plante et application pharmaceutique du mucilage pour l'encapsulation des huiles essentielles et des antibiotiques

## I. Introduction

Le mucilage naturel est doté de grandes quantités de divers nutriments et a suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années en raison de ses activités biologiques, telles que ses propriétés antimicrobiennes, antialgales et de fibres solubles, et son excellent comportement lubrifiant (Nie et al., 2017 ; Liu et al., 2014 ; Hefny et al., 2018). Les gélules sont des systèmes d'administration insipides et inodores pour les médicaments en poudre et sont utilisées depuis la fin du 19e siècle (Zhang et al., 2017 ; Nagai et al., 2006). La capsule est définie comme une préparation solide faite en remplissant des médicaments ou des matériaux supplémentaires dans des capsules creuses dures ou élastiques, qui peuvent libérer leur contenu à des vitesses contrôlées dans des conditions spécifiques.

Le choix des matériaux et la méthodologie de capsulation dépendent de l'agent actif en question et de l'application visée (Shen et al., 2018). Un grand nombre de substances bioactives, telles que les polysaccharides, les polyphénols, les arômes et les parfums, sont largement utilisées dans la préparation des capsules en raison de l'évolution rapide de la préparation des capsules et de l'expansion de la production (Porter et al., 2017 ; Paini et al., 2015 ; Lei et al., 2018). Les polysaccharides naturels peuvent être utilisés comme système d'administration de médicaments en raison de leur biocompatibilité, de leur biodisponibilité accrue et de leur meilleure acceptabilité par les patients (Sujitha et al., 2012 ; Zhang et al., 2013).

Le but de ce travail était d'évaluer le potentiel du mucilage de *Withania frutescens* combiné à l'alginate comme matériau alternatif pour l'encapsulation de l'huile de la même plante par gélification ionique externe. Les capsules ont été caractérisées pour leur efficacité d'encapsulation, leur teneur en humidité, leurs propriétés micrométriques et thermiques, leur morphologie et leur stabilité oxydative. Et de comparer et d'analyser la stabilité des antibiotiques encapsulés par ce mucilage avec les formes brutes respectives d'antibiotiques couramment utilisés tels que la streptomycine, l'ampicilline et la kanamycine. Ainsi, nous rapportons ici l'isolement et l'élucidation de la structure du mucilage de *W.frutescens*. Leurs structures ont été élucidées par des analyses de RMN, incluant la spectroscopie COSY, HSQC, HMBC et des analyses de masse.

## II. Materiel et methodes

### 1. Valeur nutritionnelle de *W.frutescens*

Deux grammes de la poudre de *W. frutescens* ont été pesés dans des capsules en porcelaine puis placés dans des capsules dans un four à moufle réglé à 550 ± 15 °C pendant 5 heures jusqu'à l'obtention d'une couleur grise (cendre).

Aux cendres obtenues après incinération d'un gramme de la poudre pour la plante est ajoutée 1 ml d'acide chlorhydrique et 10ml d'eau distille. Après chauffage du mélange dans un bain marie bien bouillant jusqu' à dissolution des cendres, on complète à 100 ml. A partir de cette solution, nous avons effectué le dosage des éléments minéraux suivant : Ca, K, Mg, Na, P, Mn, Cu, Fe et Zn. L'analyse minéralogique a été réalisée par la Spectrométrie d'Émission Atomique de Plasma d'argon à Couplage Inductif (ICP-AES) (Hajaji et al., 2013).

Les acides aminés contenus dans la poudre des feuilles et des racines ont été digérés à l'aide de (6 M HCl) pendant 24 heures à 110 °C sous une atmosphère d'azote. La séparation des acides aminés a été réalisée avec une HPLC en phase inverse (Agilent1100, Agilent Technologies, USA) sur une colonne Zorbax 80 A C18 (4,6 mm × 180 mm, Agilent) à une température de 40°C avec une détection à 338 nm (Jarrett et al., 1986).

Le dosage des vitamines a été réalisé par HPLC en phase inverse. Un volume de 15 µL de l'échantillon a été injecté. La phase mobile a été préparée en mélangeant d'acétonitrile et d'eau (90 : 10). Le débit a été réglé à 2,0 mL/min et la température de la colonne à 40 °C. Les vitamines ont été détectées à 265-280 nm. L'extrait de la plante ont été pesés avec précision et transférés dans un flacon en verre de 100 ml et ont été dissous avec 10 ml d'eau purifiée (exactement mesurée) en agitant pendant 30 min. 100 ml de MeOH ont été ajoutés avec une pipette calibrée, la solution a été agitée pendant 60 min, puis filtrée avec un filtre seringue en PTFE de 0,22 µm et injectée dans un système HPLC.

## 2. Optimisation de l'extraction du mucilage

### 2.1. Extraction du mucilage de Wf

Les feuilles fraîches ont été prétraitées par rinçage à l'eau pendant 5 min. En bref, le mucilage de Wf a été extrait par cisaillement à grande vitesse avec de l'hydroxyde de sodium à 0,3 mol/L en fonction du rapport liquide-solide, de la température d'extraction, du temps d'extraction et de la vitesse de centrifugation. Le surnageant a été filtré, suivi d'une centrifugation à 8000 tr/min pendant 30 min. Ensuite, le filtrat a été concentré à 1/3 de volume primaire à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite, puis le mucilage a été obtenu par un four de séchage à 60 °C. Les effets des paramètres de traitement indépendants : la température d'extraction (°C), le rapport liquide-solide (g/l), le temps d'extraction (min) et la vitesse de centrifugation (rpm), sur les variables ont été étudiées. La variable dépendante était le rendement d'extraction du mucilage.

### 2.2. Caractérisation physico-chimique du mucilage

Les propriétés organoleptiques (aspect, couleur, odeur, rupture, texture) et les caractéristiques physico-chimiques du mucilage extrait par les deux méthodes ont été déterminées. Le pH du mucilage a été déterminé dans une solution aqueuse du mucilage (poids/volume de 1%). Le pH de la solution a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre (Thanatcha et al., 2011).

### 2.3. Mesure de l'indice de gonflement

Les caractéristiques de gonflement du mucilage ont été examinées dans l'eau distillée. L'indice de gonflement est le volume de l'eau distillé en ml occupé par 1 g de la substance. Dans 25 ml d'eau distillé, on ajoute 1g du mucilage. Le mélange est agité chaque 1h pendant 10 min, ensuite la solution est mise en repos pendant 24h à la température ambiante. Après repos, le volume occupé par le mucilage a été mesuré. Le procédé a été répété trois fois et la valeur moyenne a été calculée (Shubham et al., 2010).

2.4. Capacité de rétention d'eau

La capacité de rétention d'eau a été mesurée suivant la méthode modifiée de Thanatcha et al., 2011. 0,25 g de l'échantillon a été ajouté à 25 ml d'eau distillée, mélangé avec l'agitateur magnétique pendant 15 mn, et centrifugé à 10000 tours par 30 mn. Le surnageant obtenu a été enlevé, l'échantillon humide a été pesé par la suite pour déterminer la capacité de retenue d'eau, selon l'equation suivante :

$$\textbf{Capacité de rétention d'eau} = \frac{\textbf{poids de mucilage humide} - \textbf{poinds du muilage sec}}{\textbf{poids du mucilage humide}}$$

2.5. Absorption de l'huile

La poudre du mucilage a été employée pour déterminer l'absorption d'huile. Dans 10 ml d'huile raffinée, ajouter 0,5g de l'échantillon, mélanger en utilisant l'agitateur de Vortex pendant 1 min. Laisser le mélange en repos pendant 30 min à température ambiante, puis centrifuger à 10000 tours pendant 30 min. Le tube a été maintenu à l'envers pendant 1 mn. L'absorption de l'huile par le surnageant a été enlevé, enfin pesé le poids absorbé par huile témoin et a calculé l'absorption d'huile.

2.6. Capacité d'émulsion

Le mucilage de la poudre a été utilisé pour déterminer la capacité d'émulsion. Les échantillons ont été pesés avec précision (1 g), dissous dans 50 ml d'eau distillée, on l'ajoute avec 50 ml d'huile d'amande. On prépare ensuite l'émulsion en homogénéisant pendant 1 min, et centrifugé à 4100 tr pendant 5 min. finalement mesurée la hauteur de la couche émulsionnée comparée avec la hauteur totale et calculé la capacité d'émulsion par l'équation suivante (Thanatcha et al., 2011).

2.7. Mesure de la conductivité

La conductivité permet d'avoir la classe de tensioactif (anionique, cationique et non ionique). On prépare des solutions du tensioactif de différentes concentrations : 0.05, 0.3, 0.5, 1, 1.5 et 2 g/l en mesurant leurs conductivités à l'aide d'un conductimètre de type EC214 (Shubham et al., 2010).

2.8. Test de vieillissement accéléré par centrifugation

L'indice de crémage permet de vérifier la stabilité d'émulsion. Il est mesuré à l'aide de la centrifugeuse réglé à 3000-4000 tour/min avec différentes durées, et en vérifiant la séparation des phases et la sédimentation du mucilage (Thanatcha et al., 2011 ; Shubham et al., 2010).

## 3. Caractérisation chimique des mucilages

3.1. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince, ou chromatographie sur plaque (TLC), est réalisée principalement pour la séparation d'un mélange. C'est une technique d'analyse qualitative qui permet de fractionner les mucilages de *W. frutescens* pour avoir une idée de

leur composition chimique. L'échantillon (20 mg) est placé sur une plaque de verre fluorescent préparée et recouverte d'un gel de silice 64G (Fluka) sur une face. Les éluants testés sont essentiellement :

- Methanol : Acetate d'éthyle: Chloroforme: Eau distillée (35/35/30/0.1)
- Chloroform : Méthanol : Acetate d'éthyle : Eau distillée (20/50/30/0.2); (30/50/20/0.2)
- Acetate d'éthyle: Chloroforme : Méthanol : (80/23.5/20)
- Eau distillée : Méthanol (30/70), (20/80), (40/60)
- Acetate d'éthyle: Chloroforme : Méthanol : Eau distillée : (50/10/40/0.1) ; (20/50/30/3) ; (30/40/30/3)
- Acetate d'éthyle : Chloroforme : Acide formique : (40/50/10)
- Acetate d'éthyle: Chloroforme : Méthanol : Acide formique : (20/70/10/0.1).

3.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire

La filtration sur gel, ou chromatographie d'exclusion, repose sur la séparation de constituants en mélange en fonction de leur poids moléculaire et de leur structure spatiale (Hostettmann et al., 1997). Ce gel semi-rigide est soumis à une réaction d'hydroxypropylation pour donner le gel Sephadex LH-20. Il est constitué de billes de porosité variable. Il permet la réalisation de chromatographies d'exclusion diffusion et ainsi la séparation de molécules de masses moléculaires différentes en retenant à l'intérieur des billes les molécules dont la masse molaire est inférieure à la limite d'exclusion alors que les molécules de masse molaire supérieure traversent le gel et en sont ainsi exclues. Dans notre étude, nous avons utilité le Sephadex″R LH-20.

3.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique peut être considérée comme une CCM préparative réalisée en colonne, avec un vide permettant d'accélérer le débit d'élution. C'est une méthode alternative à la chromatographie flash pour le fractionnement des mucilages purifiés. C'est une étape qui précède toutes les autres étapes de séparation sophistiquées (Hostettmann et al., 1997). Dans notre étude nous avons utilisé le filtre en verre, qui est un entonnoir en verre contenant un disque de porosité fixe. La hauteur du filtre est variable et dépend de la masse des mucilages. La phase stationnaire est le gel de silice 60 en phase normale (Merck, 15-40 $\mu$m ou 63-200 $\mu$m) ou en phase inverse RP-18 (Silicycle, 75-200 $\mu$m). L'élution est réalisée comme suit : RP-18 : gradient MeOH-H2O (0-1, 1-1, 1-0) (v/v). Silice 60 normale : gradient CHCl3-MeOH-H2O (80-20-2 ; 70-30-5 ; 60-32-7) (v/v),

3.4. Détérmination structurale du mucilage

L'analyse infrarouge (IR) d'un échantillon révèle la présence de certains groupes fonctionnels caractéristiques. La spectrométrie infrarouge est une méthode d'analyse physique rapide basée sur l'excitation des molécules par le rayonnement infrarouge. L'absorption d'un rayonnement dont le nombre d'onde est compris entre 4000 et 400 cm-1 comme énergie vibratoire moléculaire modifie les états rotationnels et vibrationnels des molécules (Bertrand et Dufour, 1987). Le spectre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) des extraits de

mucilage purifiés est réalisé dans des pastilles de KBr (bromure de potassium). Une quantité de 0,5-1,0 mg d'échantillon est broyée avec 100 mg de KBr sec et comprimée à 10000 15000psi dans des pastilles de KBr (Wu et al., 2007). Tous les spectres infrarouges ont été enregistrés entre 4000 et 400cm.

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un Brüker Avance III 600. Après hydrolyse dans HCl (1%), 20 mg de mucilages W.f ont été solubilisés dans 500 µL de D2O et séchés. Cette étape a été répétée deux fois afin d'échanger les hydrogènes des groupes hydroxyle par du deutérium pour faciliter l'analyse par RMN. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

## 4. Docking moleculaire

La molécule a été préparé par l'outil LigPrep dans la version Maestro 11.5 du programme Schrödinger Software en utilisant le champ de force OPLS3. Un maximum de 32 stéréoisomères ont été produits pour chaque ligand après les états de théionisation à pH 7,0 ± 2,0.2-7-2.

Les configurations cristallines tridimensionnelles de l'acétylcholinestérase humaine, de la NAD(P)H oxydase, de la bêta-cétoacyl-[protéine porteuse d'acyle] synthase d'E. coli et de la nucléoside diphosphate kinase de Staphylococcus aureus ont été téléchargées à partir de la banque des protéines au format PDB à l'aide des identifiants PDB : 4EY7, 2CDU, 1FJ4 et 3Q8U respectivement. L'assistant de préparation de protéines de Schrödinger-Maestro v11.5 est utilisé pour générer et construire les structures. Les sélénométhionines ont été transformées en méthionines, toutes les eaux ont été éliminées et les atomes lourds ont reçu des hydrogènes. Des frais et des commandes de cautions ont également été attribués.

La RMSD maximale des atomes lourds (écart quadratique moyen) a été ajustée à 0,30 à l'aide du champ de force OPLS3. La grille réceptrice a été mise en place et l'espacement volumétrique effectué est de 20x20x20. Dans Glide de Schrödinger-Maestro v. 11.5, la liaison non-cis/trans amide a été pénalisée lors de docking du ligand flexible SP. La coupure de charge partielle a été fixée à 0,15 et le facteur d'échelle de van der Waals a été fixé à 0,80. Les postures économes en énergie ont servi de base à la notation finale, qui était représentée par le score Glide. Pour chaque ligand, l'emplacement le mieux ancré avec la valeur de score Glide la plus faible a été noté.

## 5. Encapsulation des huiles essentielles de *W. frutescens* dans le mucilage

### 5.1. Propriétés et performances du mucilage-alginate de *W.f* comme matrice d'encapsulation

#### 5.1.1. Préparation de l'encapsulation de l'huile de *W. frutescens* dans le mucilage

La somme totale de la masse de l'huile W.f, du mucilage-alginate et du Tween 80 (émulsifiant) a été maintenue à 40 g pour tous les essais de conception, quelle que soit la quantité de mucilage-alginate utilisée. Des dispersions d'alginate de sodium et mucilage (50:50 p/p) dans de l'eau distillée à des concentrations de 1%, 2% et 3% ont été préparées. Le

site de dispersion alginate-mucilage a été dégazé pendant 12 heures avant utilisation. Pour les émulsions, 10g d'alginate/mucilage de sodium, 1mL d'huile *W. frutescens* et du Tween 80 ont été mélangés pendant des minutes. Les émulsions ont été pompées à un débit de 10 ml/min vers un disque de distribution, et déposées dans 400 ml de chlorure de calcium. Le disque était équipé de huit buses coniques à filetage hélicoïdal en polyéthylène (diamètre interne de 1,4 mm). La solution de chlorure de calcium a été agitée à 350-400 tr/min à l'aide d'une barre magnétique cunéiforme de 80 mm de long. Après le temps de durcissement souhaité (10, 20 ou 30 min) à température ambiante, les capsules humides ont été lavées à l'eau déminéralisée pour éliminer l'excès de chlorure de calcium. Les capsules ont été stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

5.1.2. Efficacité de l'encapsulation avant le séchage

L'huile non encapsulée avant le séchage a été déterminée en mesurant le poids de l'huile libre restant à la surface de la solution gélifiante ainsi qu'à la surface des billes humides. Du papier filtre a été utilisé pour absorber l'huile de surface des billes humides, et celles-ci ont été séchées dans un four jusqu'à ce qu'un poids constant soit atteint.

La différence entre la quantité initiale d'huile utilisée (W1) et l'huile non encapsulée avant séchage (W2) donne la quantité d'huile encapsulée (W3) :

$$\mathbf{W3=W1-W2}$$

L'efficacité d'encapsulation avant séchage (EEBD) a été exprimée comme le pourcentage d'huile encapsulée par rapport à la quantité initiale d'huile utilisée :

$$\mathbf{EEBD\ (\%)=W3/W1\ *100}$$

5.1.3. Efficacité d'encapsulation après séchage

Les capsules ont été placées sur des plateaux de séchage et séchées dans un four à 60 °C jusqu'à un poids constant. L'huile non encapsulée, c'est-à-dire l'huile qui s'est échappée des billes en raison du séchage, a été déterminée en pesant la quantité d'huile libre restant sur le plateau de séchage ainsi que sur la surface des billes séchées.

La différence entre la quantité d'huile encapsulée avant séchage (W3) et la quantité d'huile non encapsulée après séchage (W4) donne la quantité d'huile encapsulée après séchage (W5) :

$$\mathbf{W5=W3-W4}$$

L'efficacité d'encapsulation après séchage (EEAD) a été exprimée comme le pourcentage d'huile encapsulée (W5) par rapport à la quantité d'huile encapsulée (W3) :

$$\mathbf{EEAD\ (\%)=W5/\ W3*100}$$

### 6. Encapsulation de nanoparticules de mucilage de *Withania frutescens* avec des antibiotiques : stabilité in vitro et évaluation fonctionnelle

6.1. Encapsulation d'antibiotiques dans une matrice du mucilage.

80 mg de mucilage ont été dissous dans 4 ml d'eau distillée à l'aide d'un agitateur magnétique pour une dissolution complète jusqu'à 6 heures dans un petit bécher et séparément 20 mg d'antibiotiques (ampicilline, kanamycine et streptomycine) ont été dissous dans 2 ml d'eau distillée. Ensuite, la solution d'antibiotique a été ajoutée goutte à goutte à l'aide d'une micropipette sous agitation continue pendant 16 heures pour encapsuler complètement les antibiotiques respectifs dans le mucilage. Ensuite, le mucilage chargé d'antibiotique a été lyophilisé pour éliminer complètement l'eau. Ensuite, des expériences ont été réalisées pour confirmer la charge d'antibiotiques.

6.2. Caractérisations physiques

Le caractère gonflant de l'hydrogel de Mucilage-antibiotiques a été déterminé dans une solution tampon de pH 7,4 à 37 °C. Le mucilage sec a été pesé avec précision (St) et immergé dans la solution tampon. Quelques heures plus tard, le mucilage gonflé a été pesé (Se) et l'excès d'eau a été éliminé avec le coton absorbant. Le degré de gonflement % du mucilage au temps t a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Degré de gonflement (\%)} = [(St-Se)/St] \times 100$$

Où St et Se sont les poids du mucilage au temps (t) et à l'état sec (t=0), respectivement.

6.3. Evaluation du pouvoir antimicrobienne de McAb

Les propriétés antibactériennes de McAb ont été appliquées contre des souches pathogènes et qui provoquent un danger sur la santé humain et qui sont caractérisées par leur résistances aux antibiotiques (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC-70371 et *Bacillus subtilis* ATCC-6333) (Akti et al., 2019).

### 7. Analyses statistiques

Les données ont été exprimées sous forme de Mean=SD et soumises à une analyse de la variance (ANOVA) et au test de Tukey ($p < 0,05$). Les analyses statistiques ont été realiées par un logiciel de GraphPed-prism version 7.0.

## III. Résultats et discussion

### 1. Valeur nutritionnelle de *W.frutescens*

Les résultats des analyses par ICP-AES réalisées à la cité d'innovation d'Université Sidi Mohamed ben Abdellah à Fès (USMBA-Fès) sont présentés dans le tableau 22. Ces résultats montrent des teneurs importantes de minéraux, notamment Fe, P, Ca et Mg, chez l'extrait foliaire (EFWF). Par contre chez l'extrait racinaire, elle est riche en P suivie par le Mg, K et Fe. Et aussi, il a remarqué une différence dans la teneur de la composition minéralogique entre les deux extraits. Les oligoéléments ou les éléments minéralogiques sont indispensables à la vie, et le corps humain ne peut pas produire par l'organisme. Et dans le corps humain, Elles présentent moins de 1 mg/kg de poids corporel (Skalli-Pariat, 2017). Et l'absence ou la

concentration insuffisante dans le corps humain peut provoquer des anomalies fonctionnelles ou structurales, car ils assurent des rôles essentiels dans la fonction catalytique (Cofacteurs d'enzymes), la structure des vitamines, l'expression des signaux hormonaux et la défense de l'organisme (Bordeneuve, 2019). La consommation des parties des plantes (feuilles, racines, fruits…) peut prévenir une carence, soit pour compenser un déficit, soit pour obtenir un effet thérapeutique (Burdin, 2014).

**Tableau 22**: Teneur de la composition minérale des deux extraits en mg/kg.

| | **Ca** | **P** | **K** | **Cu** | **Mg** | **Mn** | **Fe** | **Na** | **Zn** | **Si** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **EFWF** | 17767 | 20489 | 13473 | 41.27 | 43238 | 652.81 | 58469 | 7886 | 148.41 | 2458 |
| **ERWF** | 105,21 | 24792 | 13894 | 50.91 | 14177 | 456.05 | 6947 | 2713 | 323.73 | 1584 |

L'identification des acides aminés a été faite par chromatographie en phase liquide (HPLC), et les résultats montrent que la poudre des feuilles et des racinaires sont riche en acides aminés. 17 acides aminés ont été identifiées sur les racines et les feuilles avec une dominance de Ser et Gly dans les deux parties par une concentration d'ordre de 10,28 mg/g et 14,90 mg/g, et 5,69 mg/g et 3,35 mg/g respectivement (Fig 43).

L'acide aminé Serine participe à la biosynthèse de plusieurs biomolécules nécessaires à la prolifération cellulaire, notamment les acides aminés, les bases azotées, les phospholipides et les sphingolipides. Le Serine a également un rôle indispensable dans plusieurs processus cellulaires, comme le métabolisme des unités monocarbonées (C1) (SC kalhan et al., 2012), ou dans les mécanismes de signalisation, où il est l'un des trois acides aminés phosphorylés par les kinases. Ce qui est explique la dominance de cet acide aminé dans les feuilles et les racines de *W. frutescens*.

Chez la santé humain, la serine est essentiel au développement embryonnaire normal, en particulier pour la morphogenèse cérébrale (Tabatabaie et al., 2010 ; Yoshida et al., 2004). Cet acide aminé a également un rôle central dans le contrôle de la prolifération cellulaire, ayant été impliqué dans la progression du cancer (Locasale et al., 2011 ; Pollari et al., 2011 ; Bachelor et al., 2011). La serine est un activateur allostérique d'enzymes comme la pyruvate kinase M2, qui est surexprimée dans les cellules cancéreuses (Chaneton et al., 2013). Il induit également un remodelage métabolique dans les cellules cancéreuses en fonction de la protéine suppresseur de tumeur p53, ce qui a conduit les chercheurs à suggérer le rôle potentiel de la déplétion en Ser dans le traitement des tumeurs déficientes en p53 (Maddocks et al., 2013).

Puisque les acides aminés ont une importance nutritionnelle, il y a aussi les vitamines qui jouent un rôle dans la croissance et le développement des plantes (Figure 44). L'analyse phytochimique a révélé que les feuilles et les racines de *W. frutescens* sont riches en vitamines. 11 vitamines ont été révélées sur les feuilles et 10 vitamines sur les racines, avec une dominance de vitamine C (VC) par une concentration d'ordre de 14,09 mg/g et 23,69 mg/g, respectivement. D'autre part, il a été remarqué que la concentration des vitamines A et E sont de 1,90 mg/g et 1,20 mg/g (les feuilles), 3,05 mg/g et 2,48 mg/g (les racines),

respectivement. De nombreuses recherches ont révélé que les vitamines jouent un rôle dans la synthèse et l'utilisation des hormones (Blatt et al., 2001 ; Mustacich et al., 2007 ; Manor et Morlet, 2007).

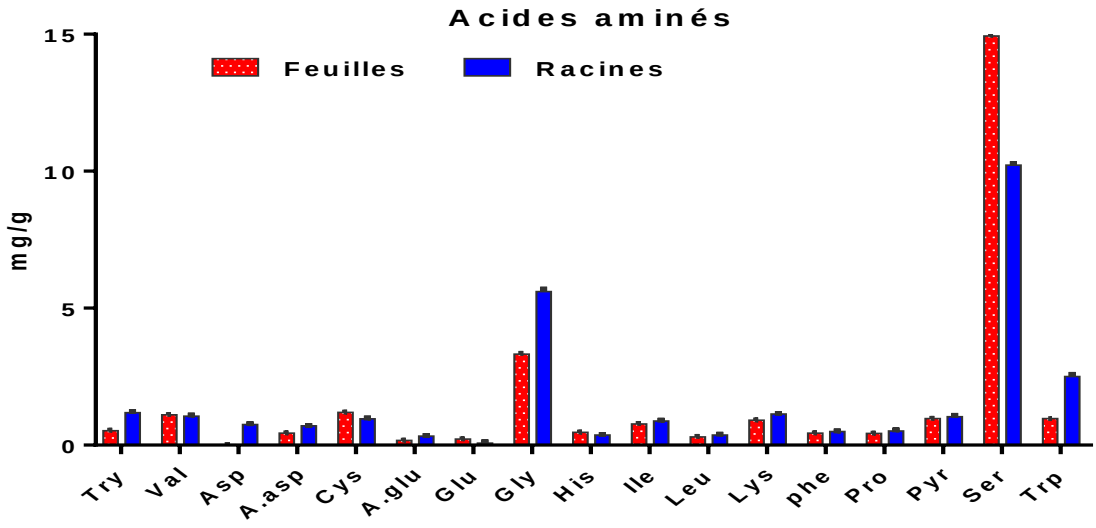



**Figure 43**: Concentration des acides aminés dans la poudre racinaires et foliaire

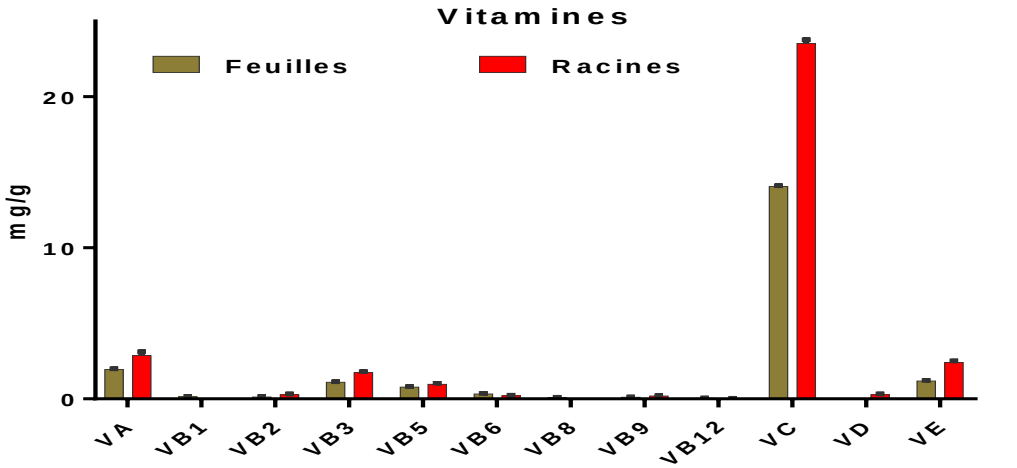



**Figure 44**: Concentration des vitamines dans la poudre des racines et des feuilles.

La vitamine A est un antioxydant biologique qui agit comme agent détoxifiant, immunopotentiateur et immunoactivateur (Ames et al., 1993). De même, la vitamine E (tocophérol) contribue au système de défense de l'organisme contre l'oxydation des lipoprotéines et peut aider à améliorer la motilité des spermatozoïdes (Askari et al., 1994). Les hommes fertiles en bonne santé avec des paramètres de sperme normaux contiennent des quantités adéquates de vitamines A et E (Aitken et al., 1987). L'activité antioxydante altérée chez les hommes présentant un dysfonctionnement du sperme peut être le reflet de faibles niveaux séminaux de vitamines A et E (Rajasekharan et al., 1995).

L'acide ascorbique (vitamine C) est une vitamine hydrosoluble et possède une puissante activité de piégeage des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le plasma séminal est très riche en acide ascorbique, avec une concentration signalée comme étant dix fois plus élevée que dans le sérum (Dawson et al., 1987), soulignant son importance pour la fertilité. Des études antérieures ont également signalé des niveaux réduits de vitamine C chez les hommes infertiles (Lewis et al., 1997). Le traitement avec *W.somnifera* et *W.coagulans* a amélioré les niveaux de vitamines A, C et E, indiquant la force de ces plantes médicinales à protéger contre l'infertilité due à la perte de vitamines (Ahmed et al., 2010).

## 2. Extraction, purification et caractérisation physico-chimique du mucilage

Le rendement en mucilage a augmenté lorsque le rapport liquide-solide a augmenté dans la plage de 60 à 100 g/l et la température d'extraction a augmenté de 80 à 100 °C. Les effets du temps d'extraction et du rapport liquide-solide sur le rendement en mucilage. Le rendement en mucilage a augmenté avec l'augmentation du temps d'extraction et l'augmentation du rapport liquide-solide, mais le rendement a ensuite diminué à mesure que ces deux variables augmentaient davantage. L'évaluation de l'effet de la vitesse de cisaillement et du rapport liquide-solide sur le rendement en mucilage. Un rendement maximal (environ 65,21 %) de mucilage a été obtenu lorsque le rapport liquide-solide a été fixé à environ 100 g/l et la vitesse de cisaillement à environ 3000 tr/min (Tableau 23 et figure. 45).

**Tableau 23**: Résultats de l'optimisation de l'extraction du mucilage de *W.frutescens*

| | **Etape 1** | | | **Etape 2** | | | **Etape 3** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Extraction aqueuse** | | | **Extraction par Ethanol** | | | **Purification** | |
| **Exp** | **T (°C)** | **Ratio ((g/L)** | **Extraction (min)** | **Ratio en % (V:V)** | **C (tr/min)** | **R (%)** | **Mucilage (10%) et TCA: 5% (V:V)** | **Rf (%)** |
| **1** | 70 | 40 | 15 | 60 | 2000 | 32,127 | 100 | 84,251 |
| **2** | 80 | 30 | 20 | 70 | 3000 | 25,14 | 100 | 83,441 |
| **3** | 80 | 50 | 20 | 50 | 2000 | 16,458 | 100 | 80,22 |
| **4** | 90 | 40 | 20 | 60 | 4000 | 42,814 | 100 | 84,109 |
| **5** | 100 | 40 | 30 | 60 | 8000 | 43,62 | 100 | 87,942 |
| **6** | 100 | 100 | 30 | 80 | 3000 | 65,219 | 100 | 92,147 |
| **7** | 80 | 40 | 20 | 60 | 8000 | 27,141 | 100 | 88,527 |
| **8** | 60 | 30 | 10 | 70 | 6000 | 22,014 | 100 | 89,528 |
| **9** | 60 | 40 | 15 | 60 | 8000 | 15,811 | 100 | 90,14 |
| **10** | 90 | 50 | 15 | 50 | 6000 | 37,846 | 100 | 90,201 |
| **11** | 100 | 60 | 20 | 80 | 4000 | 62,358 | 100 | 91,204 |
| **12** | 70 | 30 | 30 | 70 | 2000 | 36,518 | 100 | 90,428 |
| **13** | 100 | 40 | 60 | 90 | 3000 | 61,024 | 100 | 89,473 |
| **14** | 100 | 50 | 30 | 80 | 2000 | 64,047 | 100 | 91,386 |
| **15** | 70 | 50 | 30 | 50 | 6000 | 19,804 | 100 | 90,375 |

Exp : Expériences ; T : température (°C) ; R : rendement (%) ; C : centrifugation (tr/min)

Parmi les variables, le rapport liquide-solide était le facteur le plus important affectant le rendement d'extraction du mucilage, le facteur suivant le plus important était la vitesse de cisaillement, suivie du temps d'extraction et enfin de la température d'extraction. Les conditions optimales d'extraction pour le rendement maximal d'extraction du mucilage étaient les suivantes : Une température d'extraction de 92 °C, un rapport liquide-solide de 71 g/l, un temps d'extraction de 34 min, et une vitesse de cisaillement de 2500 tr/min. Des expériences de validation ont été réalisées dans ces conditions avec de légères modifications : une température d'extraction de 90 °C, un rapport liquide-solide de 70 g/l, un temps d'extraction de 30 min et une vitesse de cisaillement de 2500 tr/min. Dans ces conditions, le rendement réel de mucilage obtenu était de 71,48 %, ce qui correspondait fortement au rendement (73,44 %) prédit (Figure 46). Ces résultats ont indiqué que le modèle était précis et adéquat pour prédire les conditions d'extraction du mucilage.

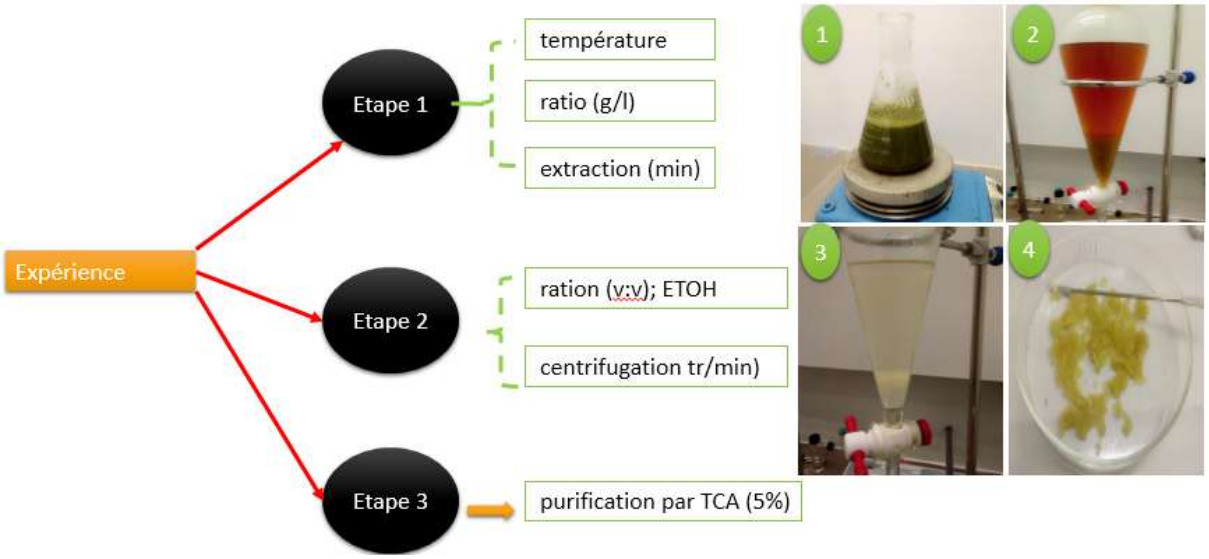



**Figure 45**: Etapes suivies pour l'extraction et la purification du mucilage de *W.frutescens*

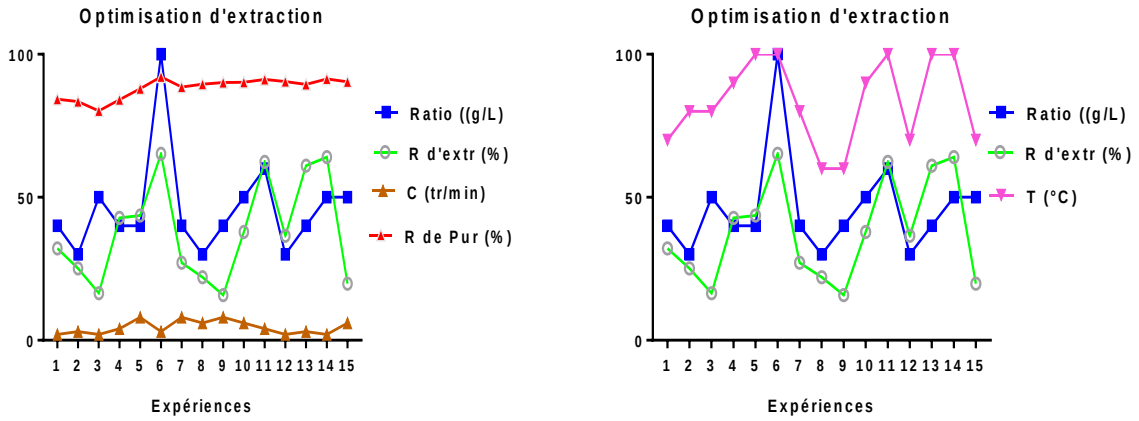



**Figure 46**: Variation du rendement d'extraction du mucilage de chaque experience

Les mucilages purifiés sont de couleur jaune avec une texture rugueuse irrégulière et une absence d'odeur. Le pH du mucilage est d'ordre de 6,81±0,06, et l'indice de gonflement a été d'ordre de 72,24±2,14%, ce gonflement a été considéré comme une bonne propriété pour

ce mucilage car il a été supérieur à 60% (Deve et al., 2014). La capacité de rétention d'eau et d'huiles par ce mucilage a été d'ordre de 9,64±1,02 g/g et 1,26±0,51 g/g, respectivement. La capacité d'émulsion est de l'ordre de 81,41±5,73%, cette valeur indique et montre une bonne capacité d'émulsion. Cette stabilité a été vérifiée par des tests de centrifugation où notre émulsion a été soumise à une série de vitesse de centrifugation de l'ordre de 3000tr/min, 4000tr/min pendant 10 min, 15 min et 30 min. Après cette opération, il a été remarqué l'absence de phénomène de sédimentation ou de crémage.

Des tests d'exposition à haute température, haute humidité et lumière intense ont été utilisés ici pour étudier la stabilité de la poudre et fournir des données de base pour l'emballage et le stockage de la capsule par le mucilage (Figure 47). Les résultats ont montré des altérations évidentes de l'apparence du mucilage à haute température (60 °C), forte humidité (95% ± 5%) et forte lumière, alors que le poids et la teneur en mucilage n'ont pas changé. Par exemple, le mucilage a fondu et coagulé à des températures élevées et s'est progressivement assombri sous une forte humidité et une forte exposition à la lumière. De manière constante, ces résultats ont indiqué que le mucilage doit être conservé à basse température, à faible humidité et à l'abri de la lumière.



Mucilage avant le sechage  Mucilage après le sechage  Test d'exposition

**Figure 47**: Test d'exposition du mucilage de *W. frutescens* à haute température

### 3. Isolement et caractérisation structurale des molécules du mucilage

Le mucilage obtenu (7,52 g) a été soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice en phase normale (15 :40 pm) éluée avec un gradient de CHCl3-MeOH-H2O (70:30:5; 60:32:7; 0:100:0). Après évaporation des solvants, deux fractions ont été obtenues : F1 (70:30:5;281,7 mg) et F2 (60:32:75; 71,2 mg).

La première fraction Fr1 (281,7 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne ouverte (CC) (Sephadex® *LH–20*, MeOH), et a conduit à neuf sous fractions, F11-F19. La fraction riche en mucilage F11 (64,3 mg) soumise à des chromatographies successives liquides à moyenne pression (MPLC) à l'aide du système A [gel de silice (15–40 µm), CHCl3-MeOH-H2O (80:20:2; 70:23:4; 70:30:5; 60:32:7; 0:100:0)], puis du système B [gel de silice RP-18, MeOH-H2O (40 à 100%)], a conduit à l'isolement des composés purs, MUC1 (48.61 mg). Ces étapes ont été gardées afin de répéter la manipulation et d'obtenir une quantité suffisante pour une évaluation pharmacologique (Figure 48).

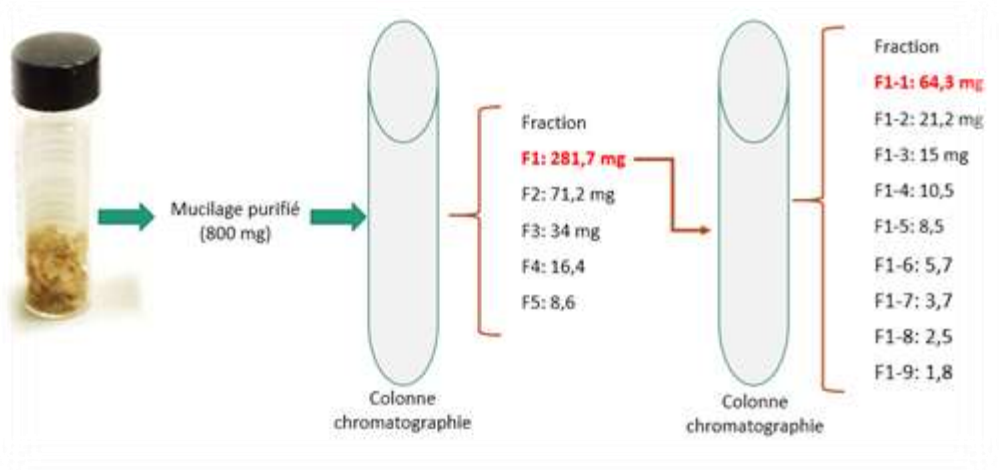



**Figure 48**: Les fractions du mucilage sur la colone chromatographique

L'empreinte de la spectrométrie infrarouge du mucilage concentré est visible sur l'image. Il semble que la vibration du groupe hydroxyle soit responsable de la présence d'une large bande d'absorption à 3400 $cm^{-1}$ dans les spectres infrarouges des extraits de polysaccharides hydrosolubles (OH). Il semble que les vibrations du groupe (C-H) se produisent à une longueur d'onde de 2925$cm^{-1}$. Les groupes carboxylates anioniques semblent être associés au pic à 1622 $cm^{-1}$ (-COO-), (Figure 49).

Les pics de vibration et de rotation de la fraction (C-OH) des oses et la vibration de la liaison osidique (C-O-C) se chevauchent dans la zone 1200-800, donnant à chaque extrait de polysaccharide ses propres bandes uniques (Wu et al., 2007).

Les groupes fonctionnels du mucilage pur ont été caractérisés par analyse infrarouge. Des similarités entre les spectres infrarouges observés et ceux d'autres recherches sur des extraits de polysaccharides et de mucilages ont été notées (Wu et al.,2007). Le chevauchement des pics de vibration et de rotation de la fraction (C-OH) des oses et la vibration du lien osidique donnent à chaque extrait de polysaccharide des bandes uniques dans la gamme 1200-800 (C-O-C). Les protéines n'ont pas été détectées car le test n'a pas montré de pics pour les liaisons amides (CO-NH).

La spectroscopie de RMN de 1H a révélé que la molécule purifiées a été riche en protons $^{1}H$ tel que 34 hydrogènes ont été identifiées sur cette molecule : NMR: δ 3.09-3.26 (5H, 3.15 (dd, *J* = 3.5, 2.7 Hz), 3.17 (dd, *J* = 3.5, 2.7 Hz), 3.19 (dd, *J* = 3.5, 2.7 Hz), 3.20 (dd, *J* = 3.5, 2.7 Hz), 3.20 (dd, *J* = 3.5, 2.7 Hz)), 3.49-3.74 (7H, 3.55 (dd, *J* = 3.4, 2.7 Hz), 3.58 (dd, *J* = 3.5, 2.7 Hz), 3.58 (dd, *J* = 3.4, 2.7 Hz), 3.63 (t, *J* = 3.5 Hz), 3.65 (t, *J* = 3.4 Hz), 3.69 (t, *J* = 3.5 Hz), 3.69 (t, *J* = 3.4 Hz)), 4.51-4.66 (5H, 4.56 (d, *J* = 2.7 Hz), 4.58 (d, *J* = 2.7 Hz), 4.58 (d, *J* = 2.7 Hz), 4.60 (d, *J* = 2.7 Hz), 4.60 (d, *J* = 2.7 Hz)), 4.68-4.80 (3H, 4.73 (d, *J* = 2.7 Hz), 4.75 (d, *J* = 2.7 Hz), 4.75 (d, *J* = 2.7 Hz)).

La spectroscopie RMN $^{13}C$ a révélé que le molecule est constituée par 20 carbone :NMR: δ 71.7-71.8 (2C, 71.7 (s), 71.7 (s)), 74.0-74.0 (3C, 74.0 (s), 74.0 (s), 74.0 (s)), 75.9-76.0 (4C, 75.9 (s), 75.9 (s), 75.9 (s), 75.9 (s)), 77.0-77.0 (3C, 77.0 (s), 77.0 (s), 77.0 (s)),

92.6-92.7 (5C, 92.7 (s), 92.7 (s), 92.7 (s), 92.7 (s), 92.7 (s)), 101.7-101.8 (3C, 101.7 (s), 101.7 (s), 101.7 (s)).

Le spectre de masse a révélé un seul pic à m/z 40,67 et un poids moléculaire d'ordre de 610 WM. L'analyse de RMN (1H et 13C) a été confirmée que la molécule a été constituée par 20 carbones ($C_{20}$) et 34 protons ($H_{34}$), et l'analyse d'Infra-rouge a confirmé l'absence d'atome d'Azote ($NH_2$ ou $NH_3$). Ces analyses ont permis de déterminer la formule moléculaire $C_{20}H_{34}O_{21}$.

L'analyse de RMN bidimensionnelle Homonucléaire (COSY : Corrélation SpectroscopY), ces spectres mettent en évidence le couplage scalaire entre protons géminaux $^{2}J_{H-H}$ et vicinaux $^{3}J_{H-H}$ d'un même système de spins, et permettent donc de retrouver l'enchaînement des protons voisins sur le squelette de la molécule. L'analyse de cette expérience permet de connaître les déplacements chimiques des protons et l'ordre de grandeur des constantes de couplage entre protons (Günther, 1996 ; Massiot et al., 1995). Et l'analyse de HSQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), cette expérience met en évidence les couplages directs $^{1}J_{C-H}$ entre carbones et protons liés. Elle permet, à partir du spectre proton, d'attribuer la majorité des carbones protonés (Massiot et al., 1995). HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence), cette expérience est très importante, car elle permet de détecter les couplages hétéronucléaires à longue distance $^{2}J_{C-H}$ et $^{3}J_{C-H}$ à travers un hétéroatome ou un carbone quaternaire. Grâce à cette expérience, il peut attribuer pratiquement la totalité des carbones de la molécule (Massiot et al., 1995).

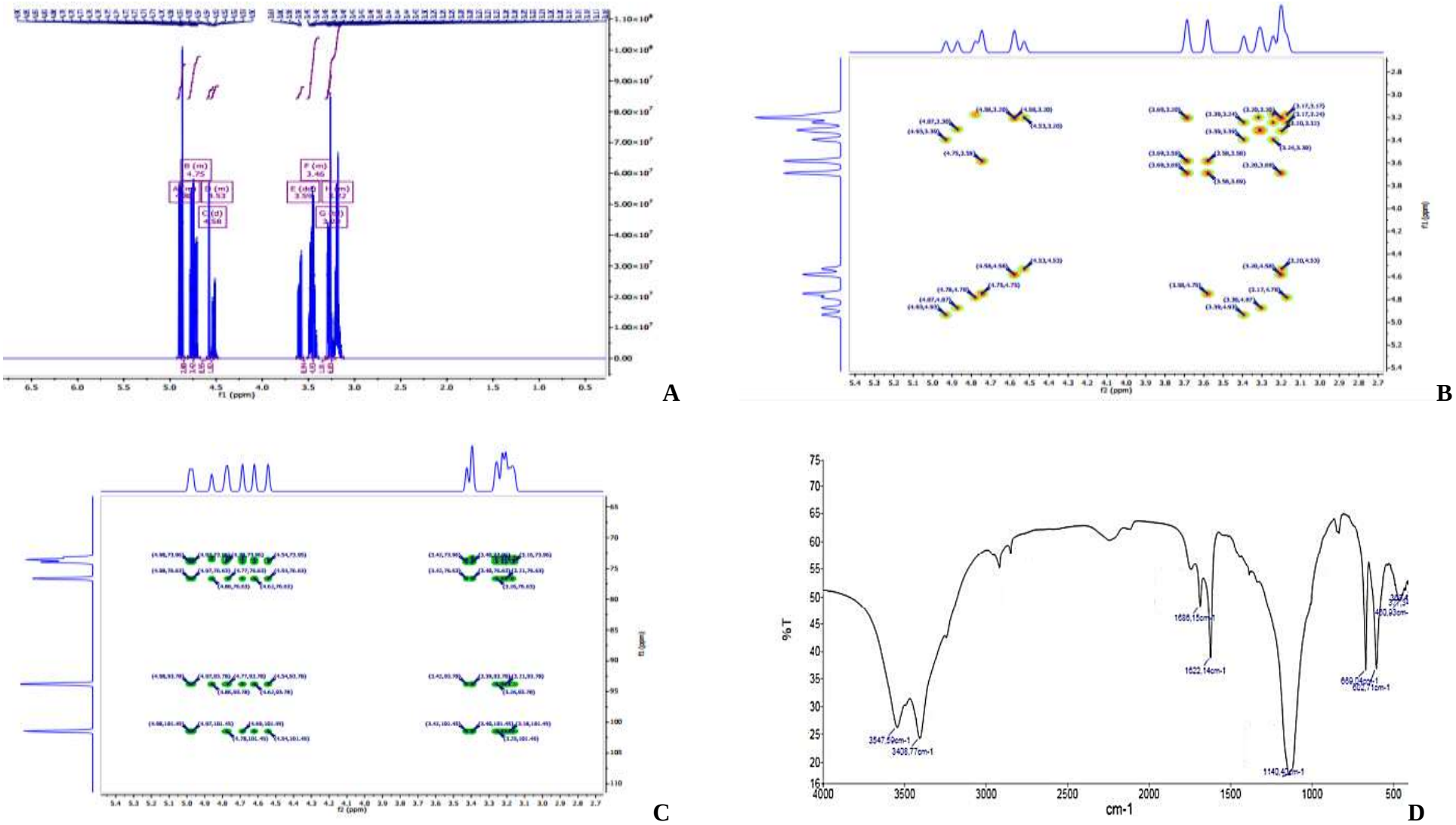



**Figure 49**: Analyse de la molécule purifiée par RMN (A), Cosy (B), HMBC (C) et infra-rouge (D).

## 4. Encapsulaltion des huiles essentielles dans une matrice du mucilage

L'effet de la concentration d'alginate et de mucilage, de la concentration de chlorure de calcium et du temps de réticulation sur l'efficacité d'encapsulation de l'huile est présenté dans le tableau 24. L'efficacité d'encapsulation a été déterminée immédiatement après le processus d'encapsulation (EEBD) et après le processus de séchage (EEAD). Dans la présente étude, la charge d'huile utilisée était de 34,72% du poids total du mucilage. L'efficacité d'encapsulation a été exprimée en pourcentage d'huile encapsulée par rapport à l'huile totale utilisée, allant de 69% à 86% (Tableau 24 et Figure 50).

Les résultats ont été influencés par la présence d'ions calcium dans la solution de réticulation. Ce type de comportement indique que la formation du film de gel se produit à partir de l'extérieur du noyau de la capsule. Tous ces résultats peuvent être facilement expliqués en prenant en compte la formation du gel, qui est supposée être contrôlée par la diffusion des deux composants impliqués. À cet égard, le fait que le cation métallique ait une taille inférieure à celle des molécules de polymère signifie que c'est principalement le cation qui diffuse entre les chaînes de polymère, se liant à des sites de liaison inoccupés sur les polymères. La réticulation du calcium a entraîné la formation d'un réseau de gel sans équivoque avec des spectres mécaniques caractéristiques d'une structure de gel permanente.

Dans la présente étude, une concentration plus élevée de chlorure de calcium a réduit l'EEBD. Selon Kamaruddin et al., (2014), lors de la formation des capsules à une concentration plus élevée de CaCl2, un gel rigide est rapidement généré, ce qui peut favoriser la libération du matériau encapsulé du noyau. En revanche, à faible concentration de CaCl2, des gels plus élastiques qui maintiennent le matériau à encapsuler dans le noyau sont générés.

Après 12 heures de séchage à 60 °C, l'efficacité d'encapsulation (EEAD) a été calculée à nouveau, afin de déterminer l'influence de la teneur en eau à la surface des capsules et retenue dans la matrice d'encapsulation. Le séchage par évaporation de l'eau entraîne un recul de la matrice d'hydrogel au cours du séchage. Dans ce cas, le recul a provoqué l'expulsion d'une partie de l'huile à la surface des billes. L'EEAD était compris entre 51 % et 79 % (Tableau 24). Il a été observé que les valeurs d'efficacité ont chuté pour certains traitements, cela peut être dû au fait que pendant le séchage, l'eau et l'huile à la surface des capsules ont été perdues. Ainsi, les capsules ayant une teneur en eau et une huile de surface plus élevées réduisent considérablement leur poids et leur efficacité d'encapsulation.

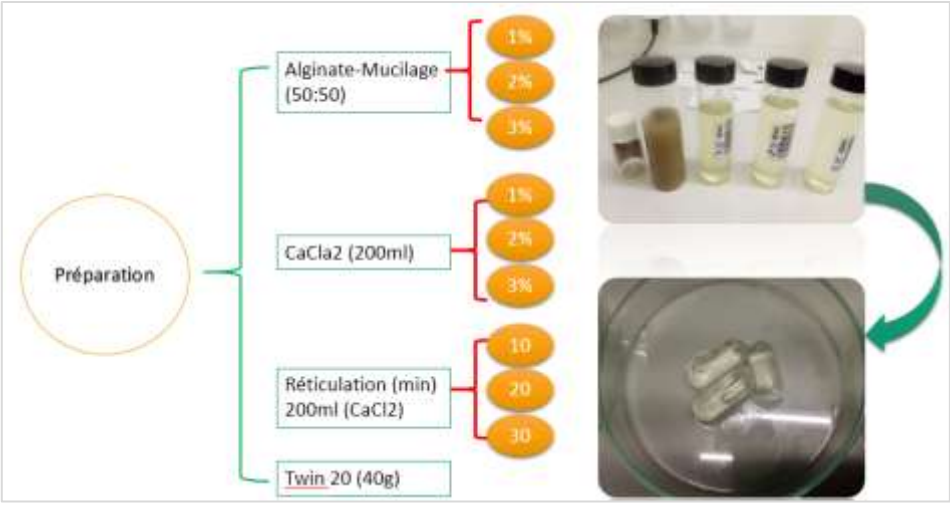



**Figure 50**: Préparation d'encapsulation dans un matrice du alginate-mucilage

Une explication de ce comportement est que l'EEAD dépend du degré de réticulation à la surface de la gouttelette d'émulsion extrudée. Il est possible qu'à des concentrations plus élevées d'alginate-mucilage et de CaCl2, une fois que la gouttelette d'émulsion est entrée dans le bain de CaCl2, il y ait eu une réticulation accrue entre l'alginate-mucilage et les ions calcium à la surface de la gouttelette, ce qui a entraîné la formation de barrières murales serrées d'hydrogel de Ca-alginate avec une teneur en eau interne plus faible. Selon Chan (2011), l'efficacité maximale d'encapsulation avant séchage pouvant être atteinte dans les billes de Ca-alginate était supérieure à 90 %, avec des concentrations d'alginate supérieures à 15 g/L et des charges d'huile allant jusqu'à 40 % en volume. L'abaissement de la concentration d'alginate en dessous de 15 g/L, ou l'augmentation de la charge d'huile supérieure à 40 % en volume, a diminué l'efficacité de l'encapsulation. Par exemple, le rendement élevé du procédé pourrait être un avantage pour l'encapsulation d'huiles coûteuses. De même, le procédé pourrait préserver les composés volatils ou facilement oxydés, car le processus d'encapsulation est réalisé à température ambiante sans utiliser d'air.

Le processus de séchage ultérieur peut alors être personnalisé pour éviter la perte ou la dégradation du produit. D'autres avantages du procédé incluent la possibilité de produire des capsules hautement concentrées pour la libération contrôlée d'huile, car le mucilage peut agir comme stabilisateur des émulsions huile-eau. Selon Munoz et al., (2012), le mucilage a montré un indice d'activité émulsifiante de 41,40±0,10 g/l et une grande capacité à stabiliser l'émulsion à 78,42±1,96 % en utilisant 40 % d'huile. L'extrême sensibilité des huiles à l'oxydation peut facilement conduire au développement de saveurs indésirables et entraîner des pertes significatives en termes de qualité, de stabilité, de valeur nutritionnelle et de biodisponibilité du produit, ainsi que d'acceptabilité globale (Wakil et al., 2010). Le fait que le mucilage de *Withania frutescens* ait la capacité de stabiliser une émulsion peut s'expliquer par sa capacité d'adsorption sur des interfaces solides ou liquides et peut stabiliser des émulsions huile dans l'eau sans aucune modification chimique ou enzymatique.

**Tableau 24**: Résultats d'efficacité d'encapsulation des huiles essentielles de *W. frutescens* dans la matrice alginate-mucilage

| EXP | Alginate-mucilage (%) | CaCl2 (%) | Reticulation (min) | Eau (%) | EEBD (%) | EEAD (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***1*** | 1 | 1 | 10 | 59,22 | 85,34 | 61,33 |
| ***2*** | 3 | 1 | 10 | 63,04 | 86,32 | 68,24 |
| ***3*** | 1 | 3 | 10 | 61,43 | 76,83 | 51,36 |
| ***4*** | 3 | 3 | 10 | 63,81 | 76,41 | 51,42 |
| ***5*** | 1 | 1 | 30 | 60,24 | 84,47 | 58,46 |
| ***6*** | 3 | 1 | 30 | 61,91 | 86,35 | 58,91 |
| ***7*** | 1 | 3 | 30 | 64,26 | 69,86 | 60,48 |
| ***8*** | 3 | 3 | 30 | 63,52 | 69,81 | 68,68 |
| ***9*** | 2 | 2 | 20 | 62,58 | 78,49 | 79,83 |

## 5. Stabilité in vitro et évaluation fonctionnelle d'encapsulation de nanoparticules de mucilage de *Withania frutescens* avec des antibiotiques

L'évaluation du pouvoir antibactérien sur milieu solide des mucilages purifiés, des antibiotiques brutes et des antibiotiques en capsulé dans les mucilages a été représentée dans la figure 51. Les résultats ont montré qu'il y a une inhibition de la croissance bactérienne des souches évaluées tel que le plus faible diamètre d'inhibition a été enregistré chez antibiotiques brutes dont 10 mm (Amp),11,5 mm (Str) et 10,6 mm (Kan) contre les mucilages purifiés et les antibiotiques encapsulé tel que 12,3 mm (Muc) 13,80 mm (Muc-Amp), 15,6 mm (Muc-Str) et 14 mm (Muc-Kan).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique libre a été évaluée puis comparée à celle de la forme encapsulée pour les deux souches bactériennes mentionnées précédemment. La valeur de la CMI de l'antibiotique encapsulé a diminué de manière significative par rapport à sa forme libre. Pour l'ampicilline encapsulée, la valeur de la CMI était de 34 µg/ml par rapport à 56 µg/ml dans le cas de l'ampicilline brute, les valeurs respectives pour la streptomycine sont de 17 et 24 µg/ml, dans le cas de la kanamycine les valeurs sont de 16 et 39 µg/ml dans *E. coli*, Figure 52.

Dans le cas de *S. aureus*, la valeur de la CMI de l'ampicilline encapsulée était de 37 µg/ml contre 46 µg/ml pour l'ampicilline libre, et pour la kanamycine, les valeurs étaient de 15 µg/ml et 29 µg/ml. Ainsi, dans tous les cas, les valeurs de CMI des antibiotiques encapsulés ont diminué par rapport aux antibiotiques libres. Les résultats suggèrent que les nanoparticules encapsulées dans des antibiotiques ont une efficacité antibactérienne accrue par rapport aux antibiotiques libres. L'utilisation des nanoparticules de mucilage pourrait diminuer la dose d'antibiotiques utilisée auparavant, ce qui réduirait la toxicité causée par l'utilisation effrénée des antibiotiques dans la société moderne.

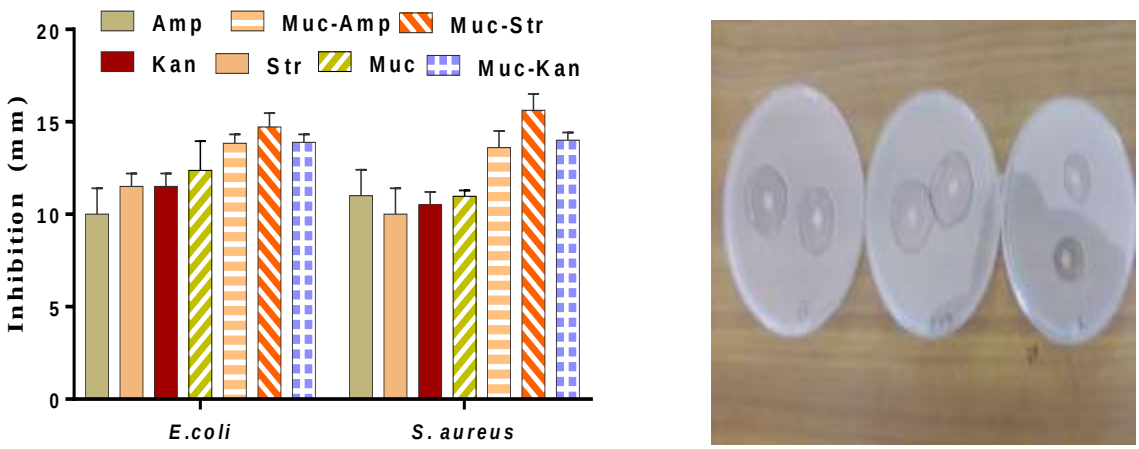



**Figure 51**: Pouvoir antibactérien du mucilage de *W. frutescens* par la méthode de disque sur milieu solide. Mu : mucilage ; Kan : kanamycine ; Str : stréptomycine ; Amp : ampiciline.

Nous avons ensuite examiné la stabilité des antibiotiques encapsulés dans les mucilages par rapport aux antibiotiques libres. Les antibiotiques et les nanoparticules de mucilage encapsulées dans des antibiotiques ont été incubés à une température de 25ºC-28°C pendant différents nombres de jours avant d'être testés. Il a été constaté que les nanoparticules de mucilage encapsulées dans des antibiotiques pouvaient conserver leur activité pendant une longue période de stockage, par rapport aux antibiotiques libres (Figure 53).

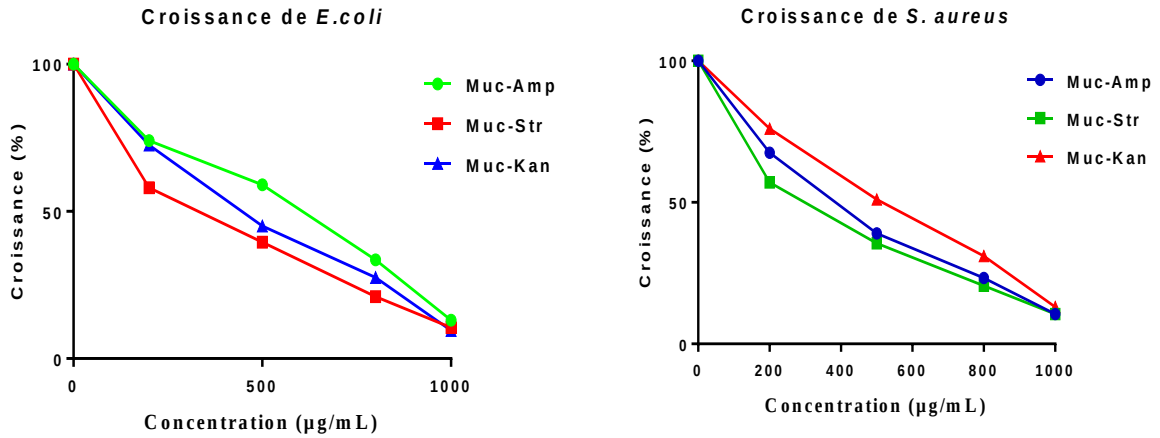



**Figure 52**: Croissance bactérienne en fonction de la concentration des nanoparticules.

D'autre part, le stress thermique des deux formes des trois antibiotiques utilisés pour l'activité antibactérienne a été mesuré par un test de diffusion sur l'agar. Toutes les formes encapsulées ont montré une plus grande stabilité à température élevée. Dans le cas d'*E.coli*, l'activité de la forme libre de la streptomycine diminue significativement à la température de 90 °C, et *S. aureus* montre également une tendance similaire. Généralement l'antibiotique encapsulé a montré la plus grande activité et stabilité à température élevée.

Dans les trois cas, les antibiotiques libres étaient moins actifs que les antibiotiques encapsulés dans du mucilage. Les expériences nous permettent de conclure que le mucilage

de gombo est stable même après de longues périodes de stockage et une exposition à des températures élevées. Les nanoparticules de mucilage de *W. frutescens* encapsulées dans des antibiotiques pourraient être utilisées pour augmenter la stabilité fonctionnelle des antibiotiques couramment utilisés.

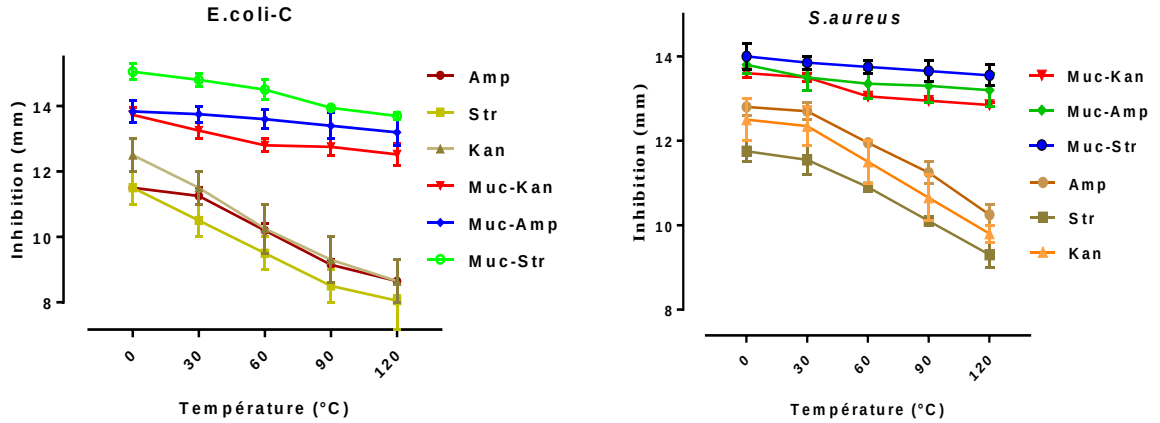



**Figure 53:** Effet de la température sur les nanoparticules et l'inhibition de la croissance bactérienne

Des nanoparticules encapsulées dans de l'ampicilline ont été utilisées pour traiter des souris infectées par des salmonelles et il a été observé que la quantité de médicament utilisée a été divisée par quarante par rapport à l'ampicilline libre (Nagpal et al., 2017). Divers rapports indiquent que l'utilisation abondante d'antibiotiques entraîne des effets toxiques (Geller et al., 1986). L'ampicilline, la kanamycine et la streptomycine sont largement utilisées dans diverses conditions pathogènes. L'utilisation effrénée de ces antibiotiques augmente les niveaux de toxicité chez les patients et conduit également à la synthèse de la multirésistance dans plusieurs souches pathogènes (Li et al., 2014). En outre, ces antibiotiques sont très sensibles à la dégradation à des températures élevées, aux rayons UV et à un stockage prolongé **(**Bhattacharya et al., 2012).

L'objectif principal est l'évaluation de l'efficacité bactéricide et de l'intégrité fonctionnelle d'antibiotiques courants encapsulés dans des mucilages sur des souches bactériennes pathogènes. Ces antibiotiques sont utilisés dans le monde entier dans plusieurs conditions pathogènes. Mais l'utilisation prédominante des antibiotiques provoque une toxicité systémique et induit également une résistance dans plusieurs souches pathogènes, ce qui fait déjà des ravages dans le monde moderne. En outre, ces antibiotiques sont susceptibles de subir une dégradation fonctionnelle lorsqu'ils sont exposés à des conditions défavorables. L'encapsulation de ces antibiotiques dans un nanomatériau peut être une solution à ce grave problème. La conjugaison des antibiotiques dans les nanoparticules implique l'utilisation de différents agents de fonctionnalisation qui pourraient avoir des effets indésirables sur la santé humaine. Nous avons conçu un système facile qui permet d'éviter l'utilisation de tels agents. Le conjugué résultant a une plus grande activité antibactérienne, ce qui suggère qu'une faible quantité d'antibiotiques est utilisée, ce qui réduit la toxicité résultant de l'utilisation abondante d'antibiotiques (Bhattacharya et al., 2012 ; Nagpal et al., 2017 **;** Geller et al., 1986).

## 6. Docking de la molécule purifiée

Le docking de la molécule dans les différents récpteurs a montré une forte activité antioxidante et antimicrobienne. Dans l'activité antioxidante la molécule a montré une liaison d'énergie de -10.129 et -6.771 Kcal/mol dans les sites actifs de l'acétylcholinestérase humaine et de la NAD(P)H oxydase réspectivement. Dans l'activité antimicrobienne la molécule a présenté une liaison d'énergie de -6,981 et -6.771 Kcal/mol et -6.738 (Tableau 25).

**Tableau 25**: Résultats du docking de la molécule dans l'acétylcholinestérase humaine, la NAD(P)H oxydase, la bêta-cétoacyl-[protéine porteuse d'acyle] synthase d' *E. coli* et les récepteurs nucléoside diphosphate kinase de *S. aureus.*

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Activité antioxidante** | l'acétylcholinestérase humaine PDB : 4EY7 | glide gscore (kcal/mol) | -10.129 |
| | | glide emodel (kcal/mol) | -104.681 |
| | | glide energy (kcal/mol) | -75.904 |
| | NADPH oxidase PDB : 2CDU | glide gscore (kcal/mol) | -6.771 |
| | | glide emodel (kcal/mol) | -93.174 |
| | | glide energy (kcal/mol) | -68.032 |
| **antimicrobial activity** | bêta-cétoacyl-[protéine porteuse d'acyle] synthase d'E. coli PDB : 1FJ4 | glide gscore (kcal/mol) | -6.981 |
| | | glide emodel (kcal/mol) | -49.489 |
| | | glide energy (kcal/mol) | -26.105 |
| | nucléoside diphosphate kinase de Staphylococcus aureus PDB : 3Q8U | glide gscore (kcal/mol) | -6.738 |
| | | glide emodel (kcal/mol) | -70.153 |
| | | glide energy (kcal/mol) | -53.213 |

Les figures 54 et 55 montrent le type et le nombre des liaisons établis entre la molécule et les sites actifs des différents récepteurs. La molécule a établi 6 liaisons hydrogène dans le site actif de l'acétylcholinestérase humaine (PDB : 4EY7) avec les résidus HIS 447, GLU 202, TYR 124, ARG 296, SER 293 et TYR 341, et 5 liaisons hydrogène dans le site actif de la NADPH oxidase (PDB : 2CDU) avec les résidus ILE 243, PHE 245, LYS 187, TYR 188 et PRO 298. Dans le site actif de bêta-cétoacyl-[protéine porteuse d'acyle] synthase d'*E. coli* (PDB : 1FJ4) la molécule a présenté la formation de 7 liaisons hydrogène avec les résidus GLY 205, MET 204, THR 302, PHE 390, THR 395 et ASP 265, a établi 5 liaisons hydrogène avec les résidus ARG 85, LYS 9, ASP 118, GLY 116 et ASP 60 dans le site actif de nucléoside diphosphate kinase de *Staphylococcus aureus* (PDB : 3Q8U).

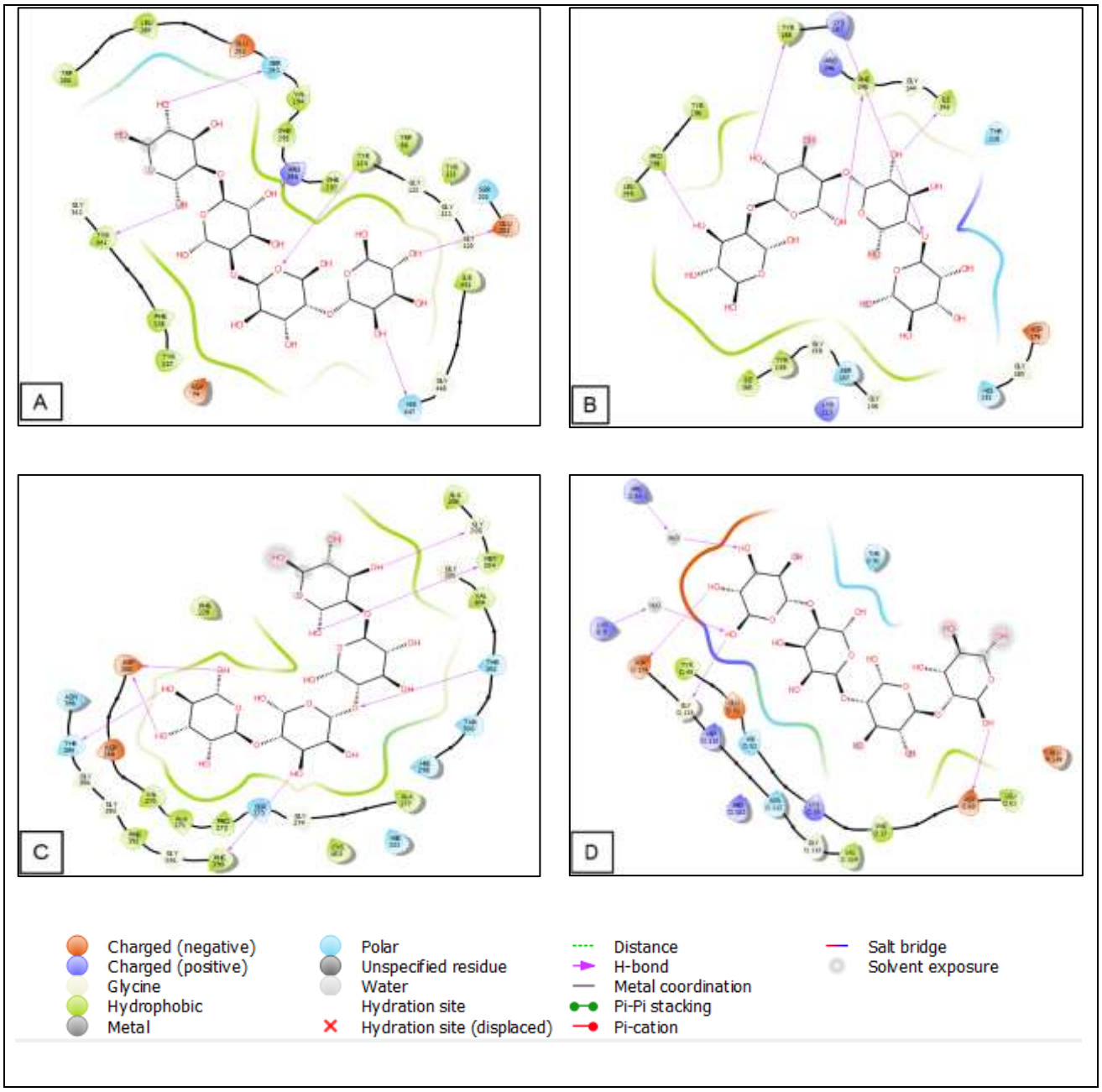



**Figure 54**: Visualisation 2D de l'interaction entre la molécule et les sites actifs. A : interactions avec le site actif 4EY7, B : interactions avec le site actif 2CDU, C : interactions avec le site actif de 1FJ4, D : interactions avec le site actif de 3Q8U.

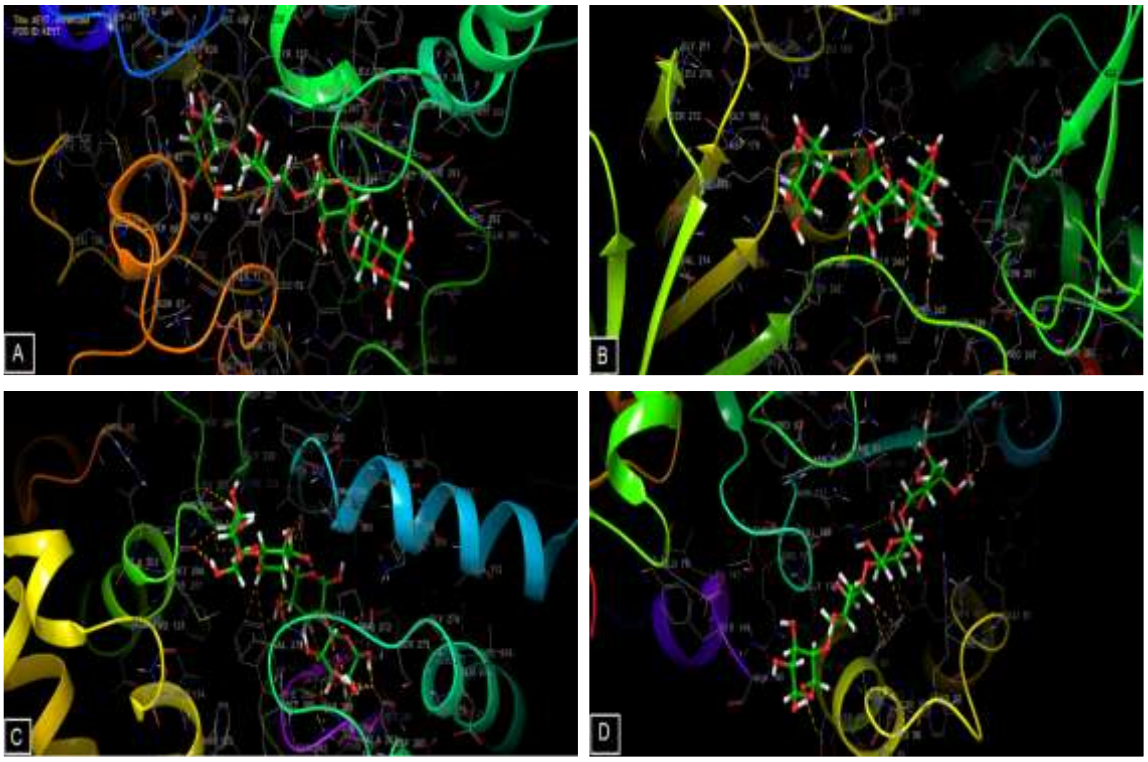



**Figure 55:** Visualisation 3D de l'interaction entre la molécule et les sites actifs. A : interactions avec le site actif 4EY7, B : interactions avec le site actif 2CDU, C : interactions avec le site actif de 1FJ4, D : interactions avec le site actif de 3Q8U.

## IV. Conclusion

Dans le présent travail, les conditions optimales d'extraction par une centrifugation à grande vitesse, une température d'extraction, un rapport liquide-solide et un temps d'extraction, avec un rendement réel de mucilage. La valorisation du mucilage de *W. frutescens* en créant des capsules avec de l'alginate s'est avérée conférer un bon effet thermoprotecteur au médicament encapsulé pendant le traitement à haute température. Nos résultats fournissent une référence pour le développement et l'utilisation du mucilage de *W. frutescens* dans les produits de santé, qui conviennent à la production d'échantillons en vrac.

L'étude actuelle met en évidence les performances *in vitro* des capsules de mucilage-alginate, et la même chose doit être étayée par *in vivo* essais et configuration à l'échelle pilote à l'aide de modèles alimentaires appropriés dans les recherches futures. Ce matériau de revêtement hybride a montré des caractéristiques prometteuses pour être utilisé non seulement comme véhicule d'administration de médicaments bioactifs, mais peut également être fusionné avec d'autres hydrocolloïdes ou polymères pour une application d'avant-garde dans les industries de l'emballage alimentaire et pharmaceutique.

# Conclusion générale et perspectives

Le changement climatique devrait avoir les effets les plus négatifs sur les écosystèmes des zones arides et semi arides, et les changements futurs devraient exacerber considérablement les problèmes environnementaux, structurels et socio-économiques actuels. Aussi, les pressions exercées sur les ressources naturelles dans ces zones menacent, en grande partie la diversité biologique et culturelle. C'est dans ce contexte, que nous avons étudié l'adaptation de *W. frutescens*, une espèce endémique du Maroc au stress environnemental, en caractérisant son milieu naturel, sa morphologie, son histologie et sa phytochimie, et sous différentes conditions microclimatiques. Cette adaptation pourrait-elle différer en fonction des interactions de la plante avec la variation des facteurs abiotiques et biotiques et comment s'exprime cette variabilité? La valeur culturelle de l'espèce relative à ses applications en pharmacopée traditionnelle a été relevée. L'ensemble des résultats nous ont conduits à évaluer les activités biologiques de différents extraits de l'espèce, suivies par la caractérisation de ses potentialités nutritionnelle et pharmaceutique pour une application du mucilage.

La caractérisation écologique a permis de monter l'aridification du climat, au niveau des 4 stations, et des variations quantitatives et qualitatives des profils phytochimiques. L'examen par GC-MS, après sylilation, a montré la richesse des feuilles en composés phénoliques dont 59 molécules identifiées pour la première au niveau de cette plante.

Toutes les variations élucidées montrent que *W. frutescens* aurait développé différentes stratégies d'adaptation au niveau de sa forme, ses organes, ses tissus et sa composition phytochimique, afin de persister dans des conditions écologiques difficiles. Mais d'autres investigations sont nécessaires, à l'échelle du Maroc pour appuyer davantage ces corrélations.

Les résultats de l'étude de la multiplication sont encourageants, mais nécessitent toutefois d'autres investigations pour sauver cette espèce de l'extinction dans la zone d'étude. Il s'avère également nécessaire d'évaluer le statut de conservation de cette espèce en fonction des critères de l'union internationale de conservation de la nature. Toutes les données relevées sur le terrain vont dans le sens que l'espèce est très menacée dans son milieu naturel, principalement à cause du surpâturage, de la dégradation anthropique et de l'extension de l'agriculture.

La population autochtone a déclaré que cette plante est rare dans le milieu naturel, et que ses parties sont traditionnellement utilisées contre certaines infections. Ce qui confirme l'état critique de l'espèce par la surexploitation et l'absence de sa régénération naturelle. Il est primordial de sensibiliser les gestionnaires et la population locale de l'urgence de la préservation de cette espèce à valeurs multiples.

L'étude phytochimique a permis de mettre en lumière la richesse des extraits des racines et des feuilles en composés phénoliques importantes, nous avons identifié pour la première fois 59 composés chez *W. frutescens*. Nous avons examiné leurs activités biologiques (*in vitro* et *in vivo*). Les résultats de l'étude *in vitro* ne sont qu'une première étape dans la recherche des effets thérapeutiques des substances naturelles biologiquement actives. Par son pouvoir antioxydant et antimicrobien, *W. frutescens* peut être utilisée dans la conservation des aliments et dans la lutte biologique, entre autres usages potentiels de cette espèce.

De plus, l'étude de la toxicité des extraits de cette plante a confirmé leur innocuité pour traiter certaines infections. Etant donné que la forte dose (2000 mg/kg), ne montre aucun changement au niveau des paramètres biochimiques du sérum et la structure histologique des organes des animaux. Le pouvoir anti-inflammatoire évalué par voie cutanée et par voie orale,

a montré l'efficacité des extraits à la dose de 450 mg/kg. Cette dose a également montré une activité analgésique, cicatrisante et antidiabétique.

L'identification des composés terpéniques dans l'extrait des feuilles, nous a permis de valoriser les huiles essentielles de *W. frutescens*. Par la méthode de l'hydrodistilation, nous avons extrait ces composés terpéniques avec un rendement de l'ordre de 0,3%, et l'analyse de GC-MS a révélé 30 molécules avec une dominance de la classe des monoterpènes suivis par la classe des sesquiterpènes. Egalement, nous avons évalué la potentialité antioxydante de ces composés par quatre méthodes et son pouvoir antimicrobien sur des souches résistantes. Dans cette partie, nous avons aussi évalué les activités biologiques de l'hydrolat. Les résultats trouvés ont montré que l'hydrolat a une activité antioxydante, antibactérienne et antifongique limitée par rapport à celle des huiles essentielles.

Ces effets des huiles essentielles extraites au niveau des feuilles de notre plante, nous encouragent à entreprendre, à l'avenir, une étude de toxicité afin d'étudier l'utilisation cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire…de ces huiles. Il est aussi envisagé de mener d'autres activités de ces huiles dont l'activité anticancéreuse.

*W. frutescens* pourrait être utilisée dans la lutte des insectes (*C. maculatus*) du poids chiche, les résultats de l'activité insecticide des huiles essentielles de notre plante, ont montré une efficacité inhibitrice sur le cycle de vie de l'insecte et ces composés terpéniques peuvent être utilisés comme un bio-pesticide naturel pour le contrôle des ravageurs. Ces résultats nous encouragent à évaluer l'effet insecticide de la poudre et de l'extrait. Aussi, le pouvoir électrochimique de notre huile agit comme un bon inhibiteur de corrosion pour l'acier dans une solution de HCl 1.0 M et son efficacité d'inhibition dépend de sa concentration.

L'étude de la valeur nutritionnelle de *W. frutescens* a révélé la richesse de la poudre de cette espèce en éléments minéraux, en acides aminés et en vitamines. L'innocuité de ces extraits nous oriente vers leurs usages comme compléments alimentaires.

Le mucilage est une bonne matrice de l'encapsulation des nanoparticules (Huiles et antibiotiques). A cet effet, nous avons purifié et caractérisé les mucilages de notre plante, après l'étude et des conditions optimales d'extraction de ce polymère. De plus, la colonne chromatographique utilisée a permis de la purification de certaines fractions et l'élucidation de leur structure par des analyses chimiques (RMN, COSY…). Ce qui a permis de déterminer, pour la première fois, une molécule du mucilage sur cette plante.

La valorisation du mucilage de *W. frutescens* en créant des capsules avec de l'alginate s'est avérée conférer un bon effet thermoprotecteur au médicament encapsulé pendant le traitement à haute température. L'étude actuelle met en évidence uniquement les performances *in vitro* des capsules de mucilage-alginate, et la même chose doit être étayée par des essais *in vivo* et la configuration à l'échelle pilote à l'aide de modèles alimentaires appropriés dans les recherches futures. Il peut également être fusionné avec d'autres hydrocolloïdes ou polymères pour une application d'avant-garde dans les industries des compléments alimentaires et pharmaceutique.

# Références bibliographiques

Abatzoglou, J. T., Dobrowski, S. Z., Parks, S. A., and Hegewisch, K. C. (2018). TerraClimate, a high-resolution global dataset of monthly climate and climatic water balance from 1958-2015. Scientific Data 5, 1–12. doi:10.1038/sdata.2017.191.

Abbott W S, A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925 - PubMed, J. Écon. Entomol. 3 (1987) 302–3.

Abdelaziz N.F., H. Salem, E. Sammour. (2014). Insecticidal effect of certain ecofriendly compounds on some scale insects and mealybugs and their side effects on antioxidant enzymes of mango nurslings. Arch. Phytopathol. Plant Prot, 47 (1), 1-14.

Abdelaziz, G. (1980). Hypothèses et réflexions sur la dégradation des écosystèmes forestiers dans la région de Tlemcen (Algérie). Revues Forêt méditerranéenne 2, 131–146.

Abiola, O. K., and James, A. O. (2010). The effects of Aloe vera extract on corrosion and kinetics of corrosion process of zinc in HCl solution. Corros. Sci. 52, 661–664. doi:10.1016/j.corsci.2009.10.026.

Adams, Robert.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatograpy/Mass Spectrometry, 4th Edition.; Allured Publishing Corporation, 2007; ISBN 978-1-932()33-11-4.

Adoo D.J.Me, Bente P.F., Gross M.L., Mc Lafferty F.W. (1974). Org. Mass. Spectrom. 9, pp. 525.

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., and Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. Plant Science 196, 67–76. doi:10.1016/j.plantsci.

Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., and Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. Plant Physiology and Biochemistry 72, 35–45. doi:10.1016/j.plaphy.2013.03.014.

Ahmad MK, AA Mahdi, KK Shukla, (2010). Withania somnifera improves semen quality by regulating reproductive hormone levels and oxidative stress in seminal plasma of infertile males. Fertil Steril, 94 (2010), pp. 989-996

Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by spermatozoa. J Reprod Fertil 1987;81:459–69.

Akdim Brahim, Abdelghani Gartet, Mohamed Laaouane and Mhamed Amyay. (2013). Flood risk and mitigation strategies in the southeastern suburbs of Fez City (Morocco). Estudios Geográficos, 275, 379-408.

Alfonso D, Bernardinelli G, Kapetanidis I (1993). Withanolides from Lochroma coccineum. Phytochemistry 34:517-521.

Alqahtani, A.S.; Hidayathulla, S.; Rehman, M.T.; ElGamal, A.A.; Al-Massarani, S.; Razmovski-Naumovski, V.; Alqahtani, M.S.; El Dib, R.A.; AlAjmi, M.F. Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Enzyme Inhibition and Antioxidant Potential of 3-Oxolupenal and Katononic Acid Isolated from Nuxia oppositifolia. Biomolecules 2019, 10, 61

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:7915–22.

Amigues J. P. et al. (2006). Sécheresse et agriculture. Réduire la vulnérabilité de l'agriculture à un risque accru de manque d'eau. Expertise scientifique collective. (INRA).

Andreani, S., Znini, M., Paolini, J., Majidi, L., Hammouti, B., Costa, J., et al. (2016). Study of corrosion inhibition for mild steel in hydrochloric acid solution by Limbarda crithmoides (L.) essential oil of Corsica. J. Mater. Environ. Sci. 7, 187–195.

Aouadi G., S. Haouel, A. Soltani, M. Ben Abada, E. Boushih, S. Elkahoui, F. Taibi, J. Mediouni Ben Jemâa, S. Bennadja. (2020). Screening for insecticidal efficacy of two Algerian essential oils with special concern to their impact on biological parameters of Ephestia kuehniella (Zeller)(Lepidoptera: Pyralidae). J. Plant. Dis. Prot., 127, 471-482

Aourabi, S., Driouch, M., Kadiri, M., Achnine, N., Sfaira, M., and Mahjoubi, F. (2021). Synergetic Effect between Phenolic Extracts of Ammi visnaga and Zea mays Formulation on the Corrosion of Mild Steel in 1 M HCl Solution. J. Chem. 2021. doi:10.1155/2021/5589175.

Aourabi, S., Driouch, M., Kadiri, M., Mahjoubi, F., Sfaira, M., Hammouti, B., et al. (2020). Valorization of Zea mays hairs waste extracts for antioxidant and anticorrosive activity of mild steel in 1 M HCl environment. Arab. J. Chem. 13, 7183–7198. doi:10.1016/j.arabjc.2020.08.001.

Aphale, A.A.; Chhibba, A.D.; Kumbhakarna, N.R.; Mateenuddin, M.; Dahat, S.H. (1998). Subacute toxicity study of the combination of ginseng (Panax ginseng) and Ashwagandha (Withania somnifera) in rats: A safety assessment. Indian J. Physiol. Pharmacol. 1998, 42, 299–302.

Archana, R., and Namasivayam, A. (1998). Antistressor effect of Withania somnifera. J. Ethnopharmacol. 64, 91–93.

Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. Effect of natural antioxidant tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. Arch Androl 1994;33:11–5.

Atkins, K. E., and Travis, J. M. J. (2010a). Local adaptation and the evolution of species' ranges under climate change. Journal of Theoretical Biology 266, 449–457.

Atkins, K. E., and Travis, J. M. J. (2010b). Local adaptation and the evolution of species' ranges under climate change. Journal of Theoretical Biology 266, 449–457.

Atta-ur-Rahman A, Abbas S, Dur-e-Shawar NA, Jamal AS, Choudhary MI (1993). New withanolides from Withania spp. 56, 1000-1006. J. Nat. Prod. 56:1000-1006.

Atta-ur-Rahman A, Choudhary MI, Qureshi S, Gul W, Yousaf M (1998). Two new ergostane-type steroidal lactones from Withania coagulans. J. Nat. Prod. 61:812-814.

Atta-ur-Rahman A, Dur-e-Shahwar NA, Choudhary MI (2003). Withanolides from Withania coagulans. Phytochemistry 63:387-390.

Atta-ur-Rahman A, Shabbir M, Yousaf M, Qureshi S, Dur-e-Shahwar NA, Naz A, Choudhary MI (1999). Three withanolides from Withania coagulans. Phytochemistry 52:1361-1364.

Augustin, M. A. & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. Chemical Society Reviews, 38, 902–912.

Aunchalee NANSATHIT Sukanya APIPATTARAKUL Chanokporn PHAOSIRI Paweena PONGDONTRI Saksit CHANTHAI, and RUANGVIRIYACHAI, C. (2009). Synthesis, Isolation of Phenazine Derivatives and Their Antimicrobial Activities. Walailak J Sci Tech 2009; 6, 79–91.

Babin, V.N., Belousov, Y.A., Borisov, V.I., Gumenyuk, V. V., Nekrasov, Y.S., Ostrovskaya, L.A., Sviridova, I.K., Sergeeva, N.S., Simenel, A.A., and Snegur, L. V. (2014). Ferrocenes as potential anticancer drugs. Facts and hypotheses. Russ. Chem. Bull. 63, 2405–2422.

Bachelor, M.A. et al. (2011) L-3-Phosphoserine phosphatase (PSPH) regulates cutaneous squamous cell carcinoma proliferation independent of L-serine biosynthesis. J. Dermatol. Sci. 63, 164–172

Badreddine B.S., E. Olfa, D. Samir, C. Hnia, B.J.M. Lahbib. (2015). Chemical composition of Rosmarinus and Lavandula essential oils and their insecticidal effects on Orgyia trigotephras (Lepidoptera, Lymantriidae) Asian Pac. J. Trop. Med., 8 (2), 98-103

Bagnouls, F., and H. Gaussen (1957). Les Climats Biologiques et Leur Classification. Annales de Géographie 66, 193–220.

Bahramsoltani, Roodabeh, Mohammad Hosein Farzaei, Roja Rahimi. 2014. Medicinal Plants and Their Natural Components as Future Drugs for the Treatment of Burn Wounds: An Integrative Review. Archives of Dermatological Research. 306 (7): 601–17.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck, D and al (2008) Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology 46 : 446–475.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological Effects of Essential Oils - A Review. Food and Chemical Toxicology 2008, 46, 446–475, doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.

Barbero, M., Loisel, R. and Quezel, P. (1990) Les apports de la phytoécologie dans l'interprétation des changements et perturbation induite par l'homme sur les écosystèmes forestiers méditerranéens. Forêt Méditerranéenne XII, 3, 194-216.

Baudoin, Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales, Undefined. (2001).

Bellakhdar J. (1987). Plantes médicinales, plantes toxiques et substances d'origine végétale utilisées dans les soins. La grande encyclopédie du Maroc. Ed 1, Volume n°4, pp. 207- 211

Bellakhdar jamal (1998) the traditional moroccan pharmacopee, ancient arab medicine and popular knowledge, ibis press. Paris

Bellakhdar Jamal (1998). The Traditional Moroccan Pharmacopee, Ancient Arab Medicine and Popular Knowledge (Paris).

Benabadji, N., and Bouazza, M. (2000). Contribution à une étude bioclimatique de la steppe à Artemisia herba-alba Asso. dans l'Oranie (Algérie occidentale). Science et changements planétaires / Sécheresse 11, 117–23.

Benabid, A., 2000. Flore et écosystèmes du Maroc : évaluation et préservation de la biodiversité. Éd. Ibis Presses, Paris

Benamar, S. (2005). Contribution à la réhabilitation au Maroc de l'espèce forestière Alnus Glutinosa par son étude éco physiologique et la caractérisation moléculaire de son microsymbiote diazotophe Frankia. Thèse, Université Moulay ismail, Faculté des sciences, Meknès

Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, et al . (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Anim Feed Sci Technol 145:209–28

Beniken, M., Driouch, M., Sfaira, M., Hammouti, B., Ebn Touhami, M., and Mohsin, M. A. (2018). Anticorrosion Activity of a Polyacrylamide with High Molecular Weight on C-Steel in Acidic Media: Part 1. J. Bio- Tribo-Corros. 4, 38. doi:10.1007/s40735-018-0155-y.

Beniston M. 1984. Ecosystèmes méditerranéen (Climat et flore). Diffusion Lavoisier, Tec et Doc. 154.

Ben-Khalifa N, I. Chaieb, A. Laarif, R. Haouala. (2018). Insecticidal activity of six Apiaceae essential oils against Spodoptera littoralis Biosduval (Lepidoptera: Noctuidae). J. New Sci., 55, 3603-3609

Bennett, M., Gallagher, M., Fagg, J., Bestwick, C., Paul, T., Beale, M., et al. (1996). The hypersensitive reaction, membrane damage and accumulation of autofluorescent phenolics in lettuce cells challenged by Bremia lactucae. The Plant Journal 9, 851–865. doi:10.1046/j.1365-313X.1996.9060851.x.

Bensouda, Z., El Assiri, E. H., Sfaira, M., Ebn Touhami, M., Farah, A., and Hammouti, B. (2019). Extraction, Characterization and Anticorrosion Potential of an Essential Oil from Orange Zest as Eco-friendly Inhibitor for Mild Steel in Acidic Solution. J. Bio- Tribo-Corros. 5, 1–20. doi:10.1007/s40735-019-0276-y.

Berraho, A., Birouk, A., Menioui, M. (2006). Biodiversité et équilibres écologiques 184p

Bhandari MM (1995). Flora of the Indian desert. MPS Repros Jodhpur, India.

Bhattacharya D, Saha B, Mukherjee A, Santra C R and Karmakar P. (2012). Nanoscience and Nanotechnology 2, 14–21

Bhattacharya sk, muruganandam a v. (2003) adaptogenic activity of withania somnifera: an experimental study using a rat model of chronic stress. Pharmacol biochem behav 75:547–555.

Bhattacharya, S.K., and Muruganandam, A. V. (2003). Adaptogenic activity of Withania somnifera: An experimental study using a rat model of chronic stress. Pharmacol. Biochem. Behav. 75, 547–555.

Bibitha, B., Jisha, V. K., Salitha, C. V., Mohan, S., and Valsa, A. K. (2002). Antibacterial activity of different plant extracts. Indian Journal of Microbiology, 42: 361-363.

Biot, C., Nosten, F., Fraisse, L., Ter-Minassian, D., Khalife, J., and Dive, D. (2011). The antimalarial ferroquine: from bench to clinic. Parasite 18, 207–214.

Blanco-Metzler, A.; Tovar, J.; Fernández-Piedra, M. Caracterización nutricional de los carbohidratos y composición centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos, cultivados en Costa Rica. Arch. Latinoam. Nutr. 2004, 54, 322–327.

Bonnel, A., Dabosi, F., Deslouis, C., Duprat, M., Keddam, M., and Tribollet, B. (1983). Corrosion Study of a Carbon Steel in Neutral Chloride Solutions by Impedance Techniques. J. Electrochem. Soc. 130, 753–761. doi:10.1149/1.2119798.

Bose Anindya, Sumanta Mondal, Jayanta Kumar Gupta, Tirtha Ghosh, Gouri Kumar Dash, Sudam Si. 2007. Analgesic, Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of the Ethanolic Extract and Its Fractions of Cleome Rutidosperma. Fitoterapia. 78 (7–8): 515–20.

Bosly A.H. (2013). Evaluation of insecticidal activities of Mentha piperita and Lavandula angustifolia essential oils against house fly, Musca domestica L. (Diptera: Muscidae). J. Entomol. Nematol., 5 (4), 50-54

Bouhdid, S.; Skali, S.N.; Idaomar, M.; Zhiri, A.; Baudoux, D.; Amensour, M.; Abrini, J. Antibacterial and Antioxidant Activities of Origanum Compactum Essential Oil. African Journal of Biotechnology 2008, 7, 1563–1570, doi:10.5897/AJB08.140.

Bourhia, M., Elmahdaoui, H., Moussa, S. I., Ullah, R., and Bari, A. (2020). Potential Natural Dyes Food from the Powder of Prickly Pear Fruit Peels (Opuntia spp.) Growing in the Mediterranean Basin under Climate Stress. BioMed Research International 2020. doi:10.1155/2020/7579430.

Bourhia, M.; Bari, A.; Ali, S.S.; Benbacer, L. Phytochemistry and Toxicological Assessment of Bryonia Dioica Roots Used in North-African Alternative Medicine. Open Chemistry 2019, 17, 1403–1411.

Brodribb T. J. et McAdam S. A. M. (2011). Passive Origins of Stomatal Control in Vascular Plants. Science, 331: 582-585, doi:10.1126/science.1197985

Budhiraja RD, Sudhir S (1987). Review of biological activity of withanolides. J. Sci. Ind. Res. 46:488-491.

Budhiraja RD, Sudhir S, Garg KN (1983). Cardiovascular effects of a withanolide from Withania coagulans, Dunal fruits. Indian J. Physiol. Pharmacol. 27:129-134.

Bussotti, F., Gravano, E., Grossoni, P., and Tani, C. (1998). Occurrence of tannins in leaves of beech trees (Fagus sylvatica) along an ecological gradient, detected by histochemical and ultrastructural analyses. New Phytologist 138, 469–479. doi:10.1046/j.1469-8137.1998.00121.x.

Butchart, S.H.M., Resit Akçakaya, H., Chanson, J., Baillie, J.E.M., Collen, B., Quader, S., Turner, W.R., Amin, R., Stuart, S.N., Hilton-Taylor, C. (2007). Improvements to the Red List Index. PLoS ONE 2, e140.

Butchart, S.H.M., Stattersfield, A.J., Bennun, L.A., Shutes, S.M., Akçakaya, H.R., Baillie, J.E.M., Stuart, S.N., Hilton-Taylor, C., Mace, G.M. (2004). Measuring Global Trends in the Status of Biodiversity: Red List Indices for Birds. PLoS Biol. 2, e383

Butler M.J., A.W. Day, Fungal melanins: A review, Can. J. Microbiol. 44 (1998) 1115–1136. doi:10.1139/W98-119.

C.G. Park, M. Jang, K.A. Yoon, J. Kim. (2016). Insecticidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Lamiaceae plant essential oils and their major components against Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae). Ind. Crops Prod., 89, 507-513

Cahagnier B., Richard-Molard D., (2000), Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158.

Cai Elijah Zhengyang, Chuan Han Ang, Ashvin Raju, Kong Bing Tan, Eileen Chor Hoong Hing, Yihua Loo, Yong Chiat Wong. (2014). Creation of Consistent Burn Wounds: A Rat Model. Archives of Plastic Surgery. 41 (4): 317.

Calatayud, P.-A., Garrec, J.-P., and Nicole, M. (2013). "Adaptation des plantes aux stress environnementaux," in Interactions insectes-plantes, ed. M.-P. F. (ed Sauvion N, Calatayud PA, Thiéry D (Marseille: Institut de recherche pour le développement), 229–245.

Campolo O, G. Giunti, A. Russo, V. Palmeri, L. Zappalà. (2018). Essential oils in stored product insect pest control. J. Food Qual., 2018

Canadell, J., Noble, I., (2001). Challenges of a changing Earth. Trends in Ecology & Evolution. 16(12), 664-666.

Carvalho, E.N. de; Carvalho, N.A.S. de; Ferreira, L.M. Experimental Model of Induction of Diabetes Mellitus in Rats. Acta Cirurgica Brasileira 2003, 18, 60–64.

Caswell G.H., A review of the work done in the entomology section of the Institute for Agricultural Research on the pests of stored grain, Samaru Misc. Pap. 99 (1980) 12.

CBD, 2003. Convention sur la diversité biologique. UNEP/CBD/COP/7/4, Montréal. 169 p.

CBD, 2010. Convention on Biological Diversity. Global biodiversity Outlook 3. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal.

CDB - Rio, 1992. Convention sur la diversité biologique. Sommet de la Terre de Rio

CDB – Rio. (1992). Convention sur la diversité biologique. Sommet de la Terre de Rio

Centre d'échange d'information sur la biodiversité du Maroc. (2009). Les valeurs culturelles. URL https://ma.chm-cbd.net/biodiversity/val_cult (accessed 8.5.21)

Champagne, C. P. & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. Current Opinion in Biotechnology, 18, 184–190.

Chan, E. S. (2011). Preparation of Ca-alginate beads contain-ing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. Carbohydrate Polymers, 84, 1267–1275.

Chaneton, B. et al. (2013) Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. Nature 491, 458–462

Chaves, M. M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J. M., Santos, T., Regalado, A. P., et al. (2010). Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. Annals of botany 105, 661–676. doi:10.1093/aob/mcq030.

Chebaibi, M., Bousta, D., Chbani, L., Ez zoubi, Y., Touiti, N., and Achour, S. (2019). Acute toxicity of plants mixture used in traditional treatment of edema and colic renal in Morocco. Sci. African 6, e00152.

Chelli-Chaabouni, A. (2014). "Mechanisms and adaptation of plants to environmental stress: a case of woody species," in Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment (Springer), 1–24.

Chen F, Dahal P, Bradford KJ. 2001. Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. Plant Physiology 127: 928–936

Chen Han-Qing, Zheng-Yu Jin, Xi-Jin Wang, Xue-Ming Xu, Li Deng, Jian-Wei Zhao. 2008. Luteolin Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Injury through Inhibition of Microglial Activation. Neuroscience Letters. 448 (2): 175–79.

Choudhary MI, Dur-e-Shahwar NA, Parveen Z, Jabbar A, Ali I, Atta-urRahman A (1995). Antifungal steroidal lactones from Withania coagulance. Phytochemistry 40:1243-1246.

Christensen, T. R., Johansson, T., Olsrud, M., Ström, L., Lindroth, A., Mastepanov, M., et al. (2007). A catchment-scale carbon and greenhouse gas budget of a subarctic landscape. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 365, 1643–1656. doi:10.1098/rsta.2007.2035.

Chun, S.S.; Vattem, D.A.; Lin, Y.T.; Shetty, K. Phenolic Antioxidants from Clonal Oregano (Origanum Vulgare) with Antimicrobial Activity against Helicobacter Pylori. Process Biochemistry 2005, 40, 809–816, doi:10.1016/j.procbio.2004.02.018.

Colas, Traité d'Entomologie appliquée a l'Agriculture, publié sous la direction de A.S. Balachowsky, Professeur au Muséum national d'Histoire naturelle, Chef de Service à l'Institut Pasteur, Persée - Portail des revues scientifiques en SHS, 1962.

Collin, P. (2001). L'adaptation au milieu chez les plantes vasculaires Plant adaptations to environmental conditions. Annee Biologique 40, 21–42. doi:10.1016/s0003-5017(01)72083-1.

Combe, M. (1963). Etude hydrogéologique de la région de Lalla Mimouna. Kenitra: National Office for Irrigation.

Come, D. (1971). Les Obstacles à la Germination. Publ. Société Linn. Lyon 40, 108–108

Contreras-Zentella, M.L.; Hernández-Muñoz, R. Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress? Oxidative Medicine and Cellular Longevity **2016**, 2016, 1–12, doi:10.1155/2016/3529149.

Contreras-Zentella, M.L.; Hernández-Muñoz, R. Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress? Oxidative Med. Cell. Longev. 2016, 2016, 1–12.

Cordell GA (2011). Phytochemistry and traditional medicine – A revolution in process. Phytochem. Lett., 4: 391-398.

Cosentino, S.; Tuberoso, C.I.G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F. In-Vitro Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Sardinian Thymus Essential Oils. Letters in Applied Microbiology 1999, 29, 130–135, doi:10.1046/j.1472-765X.1999.00605.x.

Cosgrove DJ. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 391–417.

Cosgrove DJ. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. Nature 407: 321–326.

Cox SD, Mann CM, Markham JL. (2001). Interactions between components of the essential oil of Melaleuca alternifolia. J Appl Microbiol 91:492–9.

Daget, Ph. (1980) On life forms as adaptive strategy. (Case therophytes). In: Barbault, R., Blandin, P. and Meyer, J.A., Eds., Searches of Theoretical Ecology, Adaptive Strategies, Maloines, Paris, 89-114.

Daget, Ph. (1980) Un élément actuel de la caractérisation du monde méditerranéen: Le climat-nat. Monsp: H-S: 101-126.

Dahmani M. (1997). Le chêne vert en Algérie. Syntaxonomie, phyto-écologie et dynamique des peuplements. Thèse Doct. Es. Sci. Univ. Houari Boumediène. Alger. 383p.

Danin, A. and Orshan, G. (1990) The distribution of Raunkiaer life forms in Israël in relation to the environment. Journal of Vegetation Science, 1, 41-48.

dasilva EAA, Toorop EP, van Aelst AC, Hilhorst HWM. (2004). Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (Coffea arabica cv. Rubi) seed germination. Planta 220: 251–261.

dasilva JAT. (2018). "Smoke tree (Cotinus coggygria Scop.) propagation and biotechnology". South African Journal of Botany 114 (2018): 232-240.

Dawson EB, Harris WA, Mc Rankin WE, Charpentier LA, McGainty WJ. Effect of ascorbic acid on male fertility. Ann N Y Acad Sci 1987;498:312–23.

Dayal B, P.R. Screening of Some Indian Essential Oils for Their Antifungal Properties. Flavour Industry 1971, 2, 484–485.

De Broe, M.E., Gharbi, M.B., and Elseviers, M. (2016). Maremar, prevalence of chronic kidney disease, how to avoid over-diagnosis and under-diagnosis. Nephrol. Ther. 12, S57–S63.

De Carvalho, E.N.; de Carvalho, N.A.S.; Ferreira, L.M. (2003). Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. Acta Cir. Bras.2003, 18, 60–64

De Micco, V., and Aronne, G. (2012). "Morpho-anatomical traits for plant adaptation to drought," in Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 37–61. doi:10.1007/978-3-642-32653-0_2.

De Sadeleer, N. (2008). Mise en oeuvre de la Convention de Berne au Maroc Sauvegarde de la nature, (Convention No. 153). Conseil de l'Europe. 47p

De Souza M.T., M.T. de Souza, D. Bernardi, D.J. de Melo, P.H.G. Zarbin, M.A.C. Zawadneak. (2021). Insecticidal and oviposition deterrent effects of essential oils of Baccharis spp. and histological assessment against Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae). Sci. Rep., 11 (1), 1-15

Debrach, J. (1953). Notes sur les climats du maroc occidental. Maroc medicinal 32, 1122–1134.

Delaquis P.J, Stanich K, Girard M (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology 74 :101– 109.

Delaquis, P.J.; Stanich, K.; Girard, B.; Mazza, G. Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils. International journal of food microbiology 2002, 74, 101–9.

DERNEGI, D. (2010). Hotspot de la biodiversité du bassin méditerranéen. Bird Life International ; 2010.

Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. Drying Technology, 23, 1361–1394

Deve, AS ; Kumaresan, K.; Rapheal, VS Optimisation du processus d'extraction des polyphénols de Citrus sinensis indien - en tant que nouveaux agents antiglycatifs dans la gestion du diabète sucré. J. Diabetes Metab. Désordre. 2014, 13, 11.

Dhuley, J.N. (1997). Effect of some Indian herbs on macrophage functions in ochratoxin A treated mice. J. Ethnopharmacol. 58, 15–20.

Dhuley, J.N. (1998). Therapeutic efficacy of Ashwagandha against experimental aspergillosis in mice. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 20, 191–198.

Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G., and Tattini, M. (2014). Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. Environmental and Experimental Botany 103, 107–116. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.09.012.

Diallo, M. D., Ngamb, T., Tine, A. K., Guisse, M., Ndiaye, O., Saleh, M. M., et al. (2015). Caractérisation agropédologique des sols de mboltime dans la zone des niayes (Sénégal). Agronomie Africaine 27, 57–67.

Diamond J. M. (2005). Collapse: How societies choose to fail of succeed: London, Viking Press.

Diffenbaugh, N. S., Pal, J. S., Trapp, R. J., and Giorgi, F. (2005). Fine-scale processes regulate the response of extreme events to global climate change. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 15774–15778. doi:10.1073/pnas.0506042102.

Digilio M.C., E. Mancini, E. Voto, V. De Feo. (2008). Insecticide activity of Mediterranean essential oils. J. Plant Interact., 3 (1), 17-23.

Direction Générale des Collectivités Locales, 2015. Monographie de la région de Fès Meknès Ministère de l'Intérieur. Maroc.

Djabou, N.; Dib, M.E.A.; Tabti, B.; Costa, J.; Muselli, A. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Hydrosol Extracts Obtained by Liquid–Liquid Extraction (LLE) of Daucus Muricatus L. Journal of Essential Oil Research 2014, 26, 393–399.

Djemai Z.S., (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de Zizyphus lotus L. Université El Hadj Lakhdar – Batna.

Dobignard, A., Chatelain, C. (2013). Index synonymique de la flore d'Afrique du nord, Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord. Ed. Des Conservatoire et Jardin Botaniques, Genève

Doughari, J. H., El-mahmood, A. M. and Tyoyina, I. (2008). Antimicrobial activity of leaf extracts of Senna obtusifolia (L). African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2 (1): 007-013.

Duarte G.K.G.F, A.C.S. Menezes, P.L.F. Naves, O.C. Bueno, R.G. Santos, W.Md Silva Junior. (2019). Toxicity of Esenbeckia pumila Pohl (Rutaceae) on Artemia salina and Atta sexdens rubropilosa Rev. Caatinga, 32, 101-112

Durnie, W. H., Kinsella, B. J., De Marco, R., and Jefferson, A. (2001). A study of the adsorption properties of commercial carbon dioxide corrosion inhibitor formulations. J. Appl. Electrochem. 31, 1221–1226. doi:10.1023/A:1012716911305.

Eddaha T. (1990). Contribution à l'étude du bouturage du pistachier (Pistaciavera L.). Mémoire pour l'obtention du certificat des études approfondies. Univ. Moulay Ismail Meknes.p61. 8

El abidine. (2001). Multiplication végétative du myrte. Annales recherches forestières, Maroc, T(34), pp 2-8.

El Atki, Y.; Aouam, I.; El Kamari, F.; Taroq, A.; Lyoussi, B.; Oumokhtar, B.; Abdellaoui, A. Phytochemistry, Antioxidant and Antibacterial Activities of Two Moroccan Teucrium Polium L. Subspecies: Preventive Approach against Nosocomial Infections. Arabian Journal of Chemistry 2019, doi:10.1016/j.arabjc.2019.04.001.

El Hilaly, J., Israili, Z.H., and Lyoussi, B. (2004). Acute and chronic toxicological studies of Ajuga iva in experimental animals. J. Ethnopharmacol. 91, 43–50.

El Moussaoui, A., Jawhari, F. Z., Almehdi, A. M., Elmsellem, H., Fikri Benbrahim, K., Bousta, D., et al. (2019). Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of Withania frutescens.L. Bioorganic Chemistry 93. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103337.

EL Moussaoui, A., Jawhari, F., EL Ouahdani, K., Es-Safi, I., Bousta, D., and Bari, A. (2019). Valorization of the Pharmacological Potential of Phytochemical Compounds Contained in the Crude Extract of the Root of a Plant of Withania frutescens L . Phytothérapie.

El Moussaoui, A., Jawhari, F.Z., Almehdi, A.M., Elmsellem, H., Fikri Benbrahim, K., Bousta, D., and Bari, A. (2019a). Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of Withania frutescens.L. Bioorg. Chem. 93.

El Moussaoui, A., Jawhari, F.Z., Almehdi, A.M., Elmsellem, H., Fikri Benbrahim, K., Bousta, D., and Bari, A. (2019b). Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of Withania frutescens.L. Bioorg. Chem. 93.

Emberger L. 1960. Traité de botanique systematique : Les végétaux vasculaires.II. Masson et cte.Ed, Paris. 441-862.

Emberger, L. (1930). Sur une formule climatique applicable en géographie botanique. C. R. Acad Sci 191, 389–390.

Enan E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol, 130 (3), 325-337

Etame loe g, yinyang j, ebongue co, et al (2017) étude de la toxicité aigue et subaigüe de l'extrait au vin des graines de carica papaya linn. J appl biosci 120:12077–12085

F.Z. El Alalaoui Faris, J. El Oualidi, M. Fennane, Mohamed Ibn Tattou, Joël Mathez, S. Ouchbani, et al. (1999). Flore Pratique du Maroc; manuel de détermination des plantes vasculaires: Volume 1. , eds. M. Fennane, M. Tattou, J. Mathez, A. Ouyahya, and J. Oualidi Rabat: Institut Scientifique, Université Mohammed V - Agdal.

Farhat Asma. (2010). Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application. Thèse de Doctorat de L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse et l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès.

Fayed, S.A. Antioxidant and Anticancer Activities of Citrus Reticulate ( Petitgrain Mandarin ) and Pelargonium Graveolens ( Geranium ) Essential Oils. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 2009, 5, 740–747.

Fennane M., (1987). L'endémisme végétal au Maroc. La grande encyclopédie du Maroc. Ed.1, Volume n°4, pp.13

Fennane M., Ibn Tattou M. (1999). Observations sur la flore vasculaire endémique, rare ou menacée du Maroc. Flora Mediterranea. 9, pp. 113-124

Fennane, M. (2016). Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 1. Pteridophyta. Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND. 1

Fennane, M. (2017a). Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 2. Gymnospermae, Dicotyledonae (Acanthaceae - Aristolochiaceae). Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND. 2.

Fennane, M. (2017b). Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 3. Asteraceae version 1. Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND. 3, 1_48.

Fennane, M. (2017c). Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 4. Basellaceae - Buxaceae. Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND. 4, 29.

Fennane, M. (2018a). Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 5. Cactaceae - Euphorbiaceae. Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND. 5.

Fennane, M. (2018b). Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 6. Fabaceae. Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND. 6.

Fennane, M. (2018c). Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 7. Fagaceae - Lythraceae. Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND. 7, 46.

Fennane, M. (2018d). Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 8. Malvaceae - Plumbaginaceae. Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND. 8.

Fennane, M. (2018[e]). Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 9. Polygalaceae - Zygophyllaceae. Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND. 9.

Fennane, M., (2018f). Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 10. Monocotyledonae. Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND. 10.

Fennane, M., 2004. Proposition de zone importantes pour les plantes au Maroc (ZIP Maroc). Rabat

Fennane, M., Ibn Tattou, M. (1999). Observations sur la flore vasculaire endémique, rare ou menacée du Maroc. Flora Mediterr. 9, 113–124

Fennane, M., Rejdali, M. (2018). Moroccan vascular plant Red Data Book: A basic tool for plant conservation. Flora Mediterr. 28. https://doi.org/10.7320/FlMedit28.339.

Floret, C., Galan, M.J., Lefloch, E., Orshan, G. and Romane F. (1990) Growth forms and phenomorphology traits along an environnemental gradient: Tools for studing vegetation. Journal of Vegetation Science, 1, 71-80.

Font Quer P. 1990. Plantas medicinales. El Dioscorides renovado. Barcelona. Labor. In Montes 2004.

Fontanazza G., Rugini E. (1981). Radicazionedelle cultivar di olivio con ilmetodo del "cassoneriscaldato" III contributo. Frutticoltura XLIII (2), 39-44.

Fortson, W.C.; Tedesco, F.J.; Starnes, E.C.; Shaw, C.T. Marked elevation of serum transaminase activity associated with extrahepatic biliary tract disease. J. Clin. Gastroenterol. 1985, 7, 502–505, doi:10.1097/00004836-198512000-00012.

Frénot, E. Vierling, Biochimie des aliments : diététique du sujet bien portant, DOIN, CRDP d'Aquita…, Doin, 2001.

Fricke, H. (1932). XXXIII. The theory of electrolytic polarization . Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci. 14, 310–318. doi:10.1080/14786443209462064.

Füssel H. (2007). Vulnerability: a generally applicable conceptual framework for climate change research. Global Environmental Change, 17 (2007), pp. 155-167.

Gafter-Gvili, A.; Vidal, L.; Goldberg, E.; Leibovici, L.; Paul, M. Treatment of Invasive Candidal Infections: Systematic Review and Meta-Analysis. In Proceedings of the Mayo Clinic Proceedings; Elsevier, 2008; Vol. 83, pp. 1011–1021.

García M., O.J. Donadel, C.E. Ardanaz, C.E. Tonn, M.E. Sosa. (2005). Toxic and repellent effects of Baccharis salicifolia essential oil on Tribolium castaneum. Pest Manag. Sci. Form. Pesticide Science, 61 (6), 612-618

GaskinS, H. G., ALMEYDA, N. (1974). Propagating trials with some tropical species. Florida State Horticultural Society. 3p.

Gaskins, H. G., almeyda, N., 1974. Propagating trials with some tropical species. Florida State Horticultural Society. 3p.

Gautam, M., Diwanay, S.S., Gairola, S., Shinde, Y.S., Jadhav, S.S., and Patwardhan, B.K. (2004). Immune response modulation to DPT vaccine by aqueous extract of Withania somnifera in experimental system. Int. Immunopharmacol. 4, 841–849.

Geller R J, Chevalier R L and Spyker D A. (1986). Journal of Toxicology: Clinical Toxicology 24 : 175.

Ghedadba, N., Hambaba, L., Hachemi, M., Bensaad, M.S. (2021). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities ofMethanolic Extract of Marrubiumdeserti de Noé Leaves. PSM Biol.Res., 6(3): 56-65.

Ghedira K., (2005). Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytotherapie, 3, pp. 162-169.

Ghoush, M. A., Samhouri, M., Al-Holy, M., & Herald, T. (2008). Formulation and fuzzy modeling of emulsion stability and viscosity of a gum–protein emulsifier in a model mayonnaise system. Journal of Food Engineering, 84, 348–357

Glotter E (1991). Withanolides and related ergostane-type steroids. Nat. Prod. Rep. 8:415-440.

Gnanamani, A.; Sudha, M.; Deepa, G.; Sudha, M.; Deivanai, K.; Sadulla, S. Haematological and biochemical effects of polyphenolics in animal models. Chemosphere 2008, 72, 1321–1326, doi:10.1016/j.chemosphere.2008.04.028.

Goddard cj, warnes tw (1992) raised liver enzymes in asymptomatic patients: investigation and outcome. Dig. Dis. 10:218–226.

Gong X, Bassel GW, Wang A, Greenwood JS, Bewley JD. 2005. The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo-b-mannanase activity. Annals of Botany 96: 1–9

Gopinath D, M Rafiuddin Ahmed, K Gomathi, K Chitra, P K Sehgal, R Jayakumar. (2004). Dermal Wound Healing Processes with Curcumin Incorporated Collagen Films. Biomaterials. 25 (10): 1911–17.

Grayer R.J., Chase M.W., and Simmonds M.S.J. (1999) A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's''Chemotaxonomie der Pflanzen''. Biochemical Systematics and Ecology 27(4), 369-393.

Green, L.J.; Marder, P.; Mann, L.L.; Chio, L.-C.; Current, W.L. LY303366 Exhibits Rapid and Potent Fungicidal Activity in Flow Cytometric Assays of Yeast Viability. Antimicrobial agents and chemotherapy 1999, 43, 830–835.

Gualdrón, A. F., Becerra, E. N., and Peña, D. Y. (2013). Inhibitory effect of Eucalyptus and Lippia Alba essential oils on the corrosion of mild steel in hydrochloric acid. J Mater Env. Sci 4, 143–158.

Gulluce, M.; Sahin, F.; Sokmen, M.; Ozer, H.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Polissiou, M.; Adiguzel, A.; Ozkan, H. Antimicrobial and Antioxidant Properties of the Essential Oils and Methanol Extract from Mentha Longifolia L. Ssp. Longifolia. Food Chemistry 2007, 103, 1449–1456, doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.061.

Gunnaiah, R., Kushalappa, A. C., Duggavathi, R., Fox, S., and Somers, D. J. (2012). Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat QTL (Fhb1) Contributes to Resistance against Fusarium graminearum. PLoS ONE 7, e40695. doi:10.1371/journal.pone.0040695.

Günther, H. (1996). La spectoscopie de RMN: Principes de bases, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétiques nucléaires du carbone 13 en chimie. Elsevier Masson (Eds.).

Gupta AP, Verma RK, Misra HO, Gupta MM (1996). Quantitative determination of withaferin A in different plant parts of Withania somnifera by TLC densitometry. J. Med. Aromat. Plant Sci. 18:788- 790

Gupta GL, Rana AC (2007). Withania somnifera (Ashwagandha): A review. Phcog Rev. 1:129-136.

Gupta, S.K., Dua, A., and Vohra, B.P.S. (2003). Withania somnifera (Ashwagandha) attenuates antioxidant defense in aged spinal cord and inhibits copper induced lipid peroxidation and protein oxidative modifications. Drug Metabol. Drug Interact. 19, 211–222.

Guruprasad, A. M., Sachin, H. P., Swetha, G. A., and Prasanna, B. M. (2019a). Adsorption and inhibitive properties of seroquel drug for the corrosion of zinc in 0.1 M hydrochloric acid solution. Int. J. Ind. Chem. 10, 17–30.

Guruprasad, A. M., Sachin, H. P., Swetha, G. A., and Prasanna, B. M. (2019b). Adsorption and inhibitive properties of seroquel drug for the corrosion of zinc in 0.1 M hydrochloric acid solution. Int. J. Ind. Chem. 10, 17–30. doi:10.1007/s40090-018-0168-x.

Haissig B.E. (1974). Influences of auxines and auxin synergists and adventitious root primordium initiation and development New Zeland. J. Of Forestry Sci., 4 (2) 311-323.

Hajlaoui ., H., Denden ., M., Bouslama ., M. (2007). Etude de la variabilité intraspécifique de tolérance au stress salin du pois chiche (Cicer arietinum L.) au stade germination. Tropicultura 25, 168–173

Halambek, J., Berković, K., and Vorkapić-Furač, J. (2010). The influence of Lavandula angustifolia L. oil on corrosion of Al-3Mg alloy. Corros. Sci. 52, 3978–3983.

Halimi, A. (1980). L'Atlas Blideten : climats & ettages vegéttaux. Alger: Office des publications universitaires.

Hamdi Pacha Y, Belkhiri A, Benazzouz M, Benhamza L, Bensegueni L. 2002. Evaluation de l'activité Cicatrisante Suite à Des Brûlures Expérimentales de Quelques Plantes Algériennes. Revue Méd Pharm Afri. 16 : 1-7.

Hamidpo, R.; Hamidar, S.; Hamidpour, M.; Shahlari, M. Camphor (Cinnamomum Camphora), a Traditional Remedy with the History of Treating Several Diseases. Int. J. Case Rep. Images 2013, 4, 86–89.

Hammer, K.A., Carson, C.F., and Rileya, T. V. (2012). Effects of Melaleuca alternifolia (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 909–915.

Harper, J. G., Steininger, k. M., Tucker, j. C., Juhn, d., & Hawkins, f. (2007). Fifty years of deforestation and forest fragmentation in Madagascar. Environmental conservation, 9p.

Hartmann H.T. (1952). Leafy sevillano olive cuttings. Calif. Agri. 5: 6-16. 14- Hartmann H.T., Kester D.E., et Davies F.T., 1990. Plant propagation principles and practices, 5th Ed. Prentice-Hall, New Jersy : 547.

Hartmann H.T., Kester D.E., et Davies F.T. (1990). Plant propagation principles and practices, 5th Ed. Prentice-Hall, New Jersy : 547

Hassiba. Stambouli-meziane & Mohammed. Bouazza. (2013). Floristic characterization of the steppe of the area of tlemcen\n(western Algeria). International Journal of Environment, Ecology, Family and Urban Studies (IJEEFUS) 3, 7–20.

Hatting, M.; Tavares, C.D.J.; Sharabi, K.; Rines, A.K.; Puigserver, P. Insulin regulation of gluconeogenesis: Insulin regulation of gluconeogenesis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2018, 1411, 21–35.

Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification. (2015). Stratégie de développement des plantes aromatiques et médicinales spontanées. Maroc.

Hefny, AF; Ayad, Arizona ; Matev, N.; Bashir, MO Obstruction intestinale causée par un médicament laxatif (Psyllium) : à propos d'un cas et revue de la littérature. Int. J. Surg. Rapport de cas 2018, 52, 59–62.

Helander, I.M.; Alakomi, H.L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.J.; Gorris, L.G.M.; Von Wright, A. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1998, 46, 3590–3595, doi:10.1021/jf980154m.

Hemalatha S, Kumar R, Kumar M (2008). Withania coagulans Dunal: A review. Phcog Rev. 2:351-358.

Hemalatha S, Wahi AK, Singh PN, Chansouria JPN (2006). Hypolipidemic activity of aqueous extract of Withania coagulans Dunal in albino rats. Phytother. Res. 20:614-617.

Hepper FN (1991). Old World Withania (Solanaceae): a taxonomic review and key to the species. In: Hawkes JG, Lester RN, Estrada N (eds), Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution. RBG Kew, Richmond, Surrey. .211-227.

Hernández-Pérez Margarita, Rosa M Rabanal. ( 2002). Evaluation of the Antinflammatory and Analgesic Activity of Sideritis Canariensis Var. Pannosa in Mice. Journal of Ethnopharmacology. 81 (1): 43–47.

Hesse M., (2002) Alkaloids: Nature's Curse or Blessing?, Wiley-VCH, Zurich, pp. 67-77.

Higgins J. K., MacLean H. J., Buckley L. B. et Kingsolver J. G. (2014). Geographic differences and microevolutionary changes in thermal sensitivity of butterfly larvae in response to climate. Functional Ecology, 28 (4): 982-989.

Homès, J. L. A. (1960). ÉTUDE HISTOLOGIQUE DE LA GREFFE DE GOSSYPIUM HIRSUTUM L. Royal Botanical Society of Begium 92, 11–32.

Horwitz, W. Official Methods of Analysis of AOAC International. Volume I, Agricultural Chemicals, Contaminants, Drugs; Horwitz, W., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 1997.

Hoşnuter Mübin, Ahmet Gürel, Orhan Babucçu, Ferah Armutcu, Eksal Kargi, Ahmet Işikdemir. (2004). The Effect of CAPE on Lipid Peroxidation and Nitric Oxide Levels in the Plasma of Rats Following Thermal Injury.Burns. 30 (2): 121–25. https://doi.org/10.1016/j.burns.2003.09.022.

Houghton P.J., Y. Ren, M.-J. Howes. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. Nat. Prod. Rep., 23 (2), 181-199

Husen, a. Mohinder, P. (2006). Variation in Shoot Anatomy and Rooting Behavior of Stem Cuttilgs in Relation to Age of Donor Plants in Teak (Tectona grandis Linn. f.). New Forests, Vol. 31, No. 1, pp. 57-73.

Hussin, M. H., and Kassim, M. J. (2011). The corrosion inhibition and adsorption behavior of Uncaria gambir extract on mild steel in 1 M HCl. Mater. Chem. Phys. 125, 461–468. doi:10.1016/j.matchemphys.2010.10.032.

IITA, Plant Health Management Division, 1995.

Ikbal C., R. Pavela, Essential oils as active ingredients of botanical insecticides against aphids, J. Pest Sci. (2004). 92 (2019) 971–986.

Institut Royal des Etudes Stratégiques. (2017). Rapport strategique 2017 panorama du maroc dans le monde les enjeux planetaires de la biosphere. Institut Royal des Etudes Stratégiques

Isman M. (2002). Insect antifeedants. Pestic. 13 (4), 152-157

Jankowska M. J. Rogalska, J. Wyszkowska, M. Stankiewicz. (2018). Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—a review. Molecules, 23 (1). 34

Janpeter Schilling, Korbinian P. Freiercd, Elke Hertig, Jürgen Scheffran. (2012). Climate change, vulnerability and adaptation in North Africa with focus on Morocco. Agriculture, Ecosystems & Environment, 156, 12-26.

Jarrett, H.W.; Cooksy, K.D.; Ellis, B.; Anderson, J.M. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversedphase chromatography on octylsilica columns. Anal. Biochem. 1986, 153, 189–198

Jayaprakasam, B., and Nair, M.G. (2003). Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory withanolides from Withania somnifera leaves. Tetrahedron 59, 841–849.

Jean-Michel Gobat, Michel Aragno, and Willy Matthey (2010). Le sol vivant. Bases de pédologie. Biologie des sols. Troisième édition. ed. Lausanne, Presses, Polytechniques et Universitaires Romandes, 15 octobre 2013, 848 p.

Jemâa J.M.B. (2014). Essential oil as a source of bioactive constituents for the control of insect pests of economic importance in Tunisia Med Aromatic Plants. 3, 1-7

Jiajun Fu, unyi Pan, Zhuo Liu, Suning Li, and Ying Wang (2011). Corrosion Inhibition of Mild Steel by Benzopyranone Derivative in 1.0 M HCl Solutions. Int J Electrochem Sci 6, 2072–2089.

Johri S, Jamwal U, Rasool S, Kumar A, Verma V, Qazi GN (2005). Purification and characterization of peroxidases from Withania somnifera (AGB 002) and their ability to oxidize IAA. Plant Sci. 169:1014-1021.

Jourdain, L., Leser, M. E., Schmitt, C., Michel, M., & Dickinson, E. (2008). Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: relationship to complexation in solution. Food Hydrocolloids, 22, 647–659.

Junhirun P, W. Pluempanupat, T. Yooboon, T. Ruttanaphan, O. Koul, V. Bullangpoti. (2018). The study of isolated alkane compounds and crude extracts from Sphagneticola trilobata (Asterales: Asteraceae) as a candidate botanical insecticide for lepidopteran larvae. J. Econ. Entomol, 111 (6), 2699-2705.

Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 4, 1–19

Kalhan, S.C. and Hanson, R.W. (2012) Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino Acid. J. Biol. Chem. 287, 19786–19791

Kamaruddin, M. A., Yuso, M. S., & Aziz, H. A. (2014). Preparation and characterization of alginate beads by drop weight. International Journal of Technology, 5(2), 121–132.

Kapoor LD (2001). Handbook of Ayurvedic medicinal plants. CRC Press.

Karalija E. (2017). "Media composition affects seed dormancy, apical dominance and phenolic profile of Knautia sarajevensis (Dipsacaceae), Bosnian endemic". Acta Botanica Croatica (2017)

Kearns C.A., Inonge D.W. (1993). Techniques for pollination Biologists. University Press of Colorado. Colorado.

Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.M. (1998). Endangered mutualisms: The Conservation of Plant-Pollinator Interactions. Annu. Rev. Ecol. Syst. 29, 83–112.

Keith, D.A., Ferrer-Paris, J.R., Nicholson, E., Kingsford, R.T. (2020). IUCN Global Ecosystem Typology 2.0: descriptive profiles for biomes and ecosystem functional groups. IUCN, International Union for Conservation of Nature.

Khadom, A. A., Yaro, A. S., and Kadhum, A. A. H. (2010). Adsorption mechanism of benzotriazole for corrosion inhibition of copper-nickel alloy in hydrochloric acid. J. Chil. Chem. Soc. 55, 150–152. doi:10.4067/S0717-97072010000100035.

Kolai N, Saiah F, Boudia A (2012) Effet inhibiteur in vitro de l'huile essentielle d'Artimesia herba alba sur deux souches de Fusarium oxysporum f. sp.radicis-lycopersici. Algerian journal of arid environment 2 : 71- 76.

Kulkarni SK, Dhir A (2008). Withania somnifera: An Indian ginseng. Prog Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry 32:1093-1105.

Lachkar M. (2009). Médecine Traditionnelle : Quel rôle dans un nouveau modèle alternatif de santé ? Cas du Maroc. Journal Mediapart

Lahhit, N., Bouyanzer, A., Desjobert, J. M., Hammouti, B., Salghi, R., Costa, J., et al. (2011). Fennel (Foeniculum Vulgare) essential oil as green corrosion inhibitor of carbon steel in hydrochloric acid solution. Port. Electrochimica Acta 29, 127–138. doi:10.4152/pea.201102127.

Laila El Bouzidi, Valérie Mahiou-Leddet, Sok-Siya Bun, Mustapha Larhsini, Abdelaziz Abbad, Mohammed Markouk, Mabrouki Fathi, Michèle Boudon, Evelyne Ollivier &Khalid Bekkouche (2013) Cytotoxic withanolides from the leaves of Moroccan *Withania frutescens*, Pharmaceutical Biology, 51:8, 1040-1046.

Laila El Bouzidi, Widad Ben Bakrim, Valerie Mahiou-Leddet, Nadine D Azas, Mustapha Larhsini, et al.. (2017). In vitro antiplasmodial activity of Withania frutescens -Solanaceae. European Journal of Integrative Medicine. 2017, 14, 28 - 31

Lambert R.J.W., P.N. Skandamis2, P.J.C. and G.-J.E.N. A Study of the Minimum Inhibitory Concentration and Mode of Action of Oregano Essential Oil, Thymol and Carvacrol. Journal of AppliedMicrobiology 2001, 453–462, doi:10.2523/92513-ms.

Leadley P., Proenca V., Fernandez-Manjarres J., Pereira H. M., Alkemade R., Biggs R., Bruley E., Cheung W., Cooper D., Figueiredo J., Gilman E., Guenette S., Hurtt G., Mbow C., Oberdorff T., Revenga C., Scharlemann J. P. W., Scholes R., Smith M. S., Sumaila U. R. et Walpole M. (2014). Interacting Regional-Scale Regime Shifts for Biodiversity and Ecosystem Services. Bioscience, 64 (8): 665-679.

Lee A., G. Schade, R. Holzinger, A. Goldstein. A comparison of new measurements of total monoterpene flux with improved measurements of speciated monoterpene flux. Atmos. Chem. Phys., 5 (2), 505- 513

Lee B. P.C. Annis, S.-E. Lee. (2004). Fumigant toxicity of Eucalyptus blakelyi and Melaleuca fulgens essential oils and 1, 8-cineole against different development stages of the rice weevil Sitophilus oryzae. Phytoparasitica, 32 (5), 498-506

Lee B.-H., P.C. Annis, W.-S. Choi. (2004). Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1, 8-cineole against 3 major stored-grain insects. J. Stored Prod. Res., 40 (5), 553-564

Lei, H.; Hu, J.; Deng, W. Préparation et application de capsules d'arômes et de parfums. Polym. Chim. 2018 , 9 , 4926–4946.

Lemouchi, R.; Selles, C.; Dib, M.E.A.; Benmansour, N.; Allal, A.; Tabti, B.; Ouali, K. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil and Hydrosol Extract Obtained by Hydrodistillation (HY) and Liquid–Liquid Extraction (LLE) of Psoralea bituminosa. J. Herbs, Spices Med. Plants 2017, 23, 299–307.

Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertil Steril 1997;67:142–7

Li X, Robinson S M, Gupta A, Saha K, Jiang Z, Moyano D F, Sahar A, Riley M A and Rotello V M . (2014). ACS Nano 8 ; 10682–6

Li, X., Baskin, J.M., Baskin, C.C. (1999). Anatomy of two mechanisms of breaking physical dormancy by experimental treatments in seeds of two North American Rhus species (Anacardiaceae). Am. J. Bot. 86, 1505–1511.

Lima J.K. , E.L. Albuquerque, A.C.C. Santos, A.P. Oliveira, A.P.A. Araújo, A.F. Blank, M. de Fátima Arrigoni-Blank, P.B. Alves, Dd.A. Santos, L. Bacci. (2013). Biotoxicity of some plant essential oils against the termite Nasutitermes corniger (Isoptera: Termitidae). Ind. Crops and Prod, 47, 246-251

Liu, P.; Liu, Y.; Yang, Y.; Chen, Z.; Li, J.; Luo, J. Mécanisme de la superlubricité liquide biologique du mucilage de Brasenia schreberi . Langmuir 2014 , 30 , 3811–3816.

Locasale, J.W. et al. (2011) Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. Nat. Genet. 43, 869–874

Loi n° 10-95 sur l'eau promulguée par le Dahir n° 1-95-154 du 18 rabii I 1416, (1995). Maroc.

Loi n° 22-07 relative aux aires protégées promulguée par le dahir n° 1-10-123 du 3 chaabane 1431, (2010). Maroc.

Loi n°12-03 relative aux études d'impact sur l'environnement promulguée par le dahir n°1-03-60 du 10 rabii I 1424, (2003).Maroc

Loisel, R. and Gomila, H. (1993) Traduction des effets du débroussaillement sur les écosystèmes forestiers et pré forestiers par un indice de perturbation. Annales de la Société des Sciences Naturelles et d'Archéologie de Toulon et du Var, 123-132.

Louis S., (2004) Diversité structural et d'activité biologique des albumines entomotoxiques de type 1b des grains de légumineuses, Thèse de doctorat. L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

Ludwig, D.S.; Ebbeling, C.B. The Carbohydrate-Insulin Model of Obesity: Beyond "Calories In, Calories Out". JAMA Intern. Med. 2018, 178, 1098.

Luu-Dam N.A., N. Tabanca, A.S. Estep, D.H. Nguyen, P.E. Kendra. (2016). Insecticidal and attractant activities of magnolia citrata leaf essential oil against two major pests from diptera: Aedes aegypti (Culicidae) and Ceratitis capitata (Tephritidae). Molecules, 26 (8), 2311

Maddocks, O.D. et al. (2013) Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. Nature 493, 542–546

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. International Journal of Food Science and Technology, 41, 1–21.

Malhi, Y., Gardner, T. A., Goldsmith, G. R., Silman, M. R., and Zelazowski, P. (2014). Tropical forests in the Anthropocene. Annual Review of Environment and Resources 39.

Malik, F., Singh, J., Khajuria, A., Suri, K.A., Satti, N.K., Singh, S., Kaul, M.K., Kumar, A., Bhatia, A., and Qazi, G.N. (2007). A standardized root extract of Withania somnifera and its major constituent withanolide-A elicit humoral and cell-mediated immune responses by up regulation of Th1-dominant polarization in BALB/c mice. Life Sci. 80, 1525–1538.

Mapara, N., Sharma, M., Shriram, V., Bharadwaj, R., Mohite, K.C., and Kumar, V. (2015). Antimicrobial potentials of Helicteres isora silver nanoparticles against extensively drug-resistant (XDR) clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 10655–10667.

Mariod A, Ramlah M, Maznah I, & Norsharina I. (2010). Antioxydant activities of phenolic rich fraction (PRFs) obtained from black mahlab Monechma ciliatum and white mahlab Prunus mahaleb seedcakes 118 : 120 – 127.

Martinez lirola M.J. Gonzales-Tejero M.R et Molero-Mesa J. 1997. Etnobotanical ressources in the provence of almeria, Spain : ampos de Nijar. Conomic Botany, 50 (1) : 40-56.

Mašković P. Z, Manojlović N.T, Mandić A.I, Mišan A.Č, Milovanović I.Lj, Radojković M.M, Cvijović M.S, S.S.. (2012). Phytochemical screening and biological activity of extracts of plant species Halacsya sendtneri (Boiss.). Dörfl. Hem. Ind 66, 43–51.

Massiot, G. et Lavaud, C. (1995). Structural elucidation of saponins, Atta-UrRahman (Eds.), Structure and chemistry (Part 3): Studies in natural products chemistry, Elsevier: Amsterdam ; 187–224.

Maurya R, Akanksha J (2010). Chemistry and pharmacology of Withania coagulans: an Ayurvedic remedy. J. Pharm. Pharmacol. 62:153-160.

McCafferty, E. (2005). Validation of corrosion rates measured by the Tafel extrapolation method. Corros. Sci. 47, 3202–3215. doi:10.1016/j.corsci.2005.05.046.

McClements, D. J. (2005a). Emulsion ingredients. In, Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, 2nd Edition. F. M. Clydesdale (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. pp 95–174

McLusky, S. R., Bennett, M. H., Beale, M. H., Lewis, M. J., Gaskin, P., and Mansfield, J. W. (1999). Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by Botrytis allii are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. Plant Journal 17, 523–534. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00403.x.

MEA (Millennium ecosystem assessment). (2005). Ecosystems and human well-being: synthesis.(Vol. 5). Washington, DC: Island press.

Mediouni Ben Jemâa J, N. Tersim, K.T. Toudert, M.L. Khouja. (2012). Insecticidal activities of essential oils from leaves of Laurus nobilis L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition J. Stored Prod. Res. 48, 97-104

Merioua, S.M. (2007) Aménagement et approche cartographique des peuplements végétaux dans la région de Béni Saf (Nord de Tlemcen_Oranie) Thèse de magistère. Department of Forest, University of Tlemcen, Tlemcen, 184

Ministère de l'Aménagement du Territoire, de l'Eau et de l'Environnement. (2014). Cinquième rapport national sur la mise en oeuvre de la Convention sur la Diversité Biologique (No. 5). Royaume du Maroc Ministère de l'Aménagement du Territoire, de l'Eau et de l'Environnement Secrétariat d'Etat chargé de l'Environnement, Maroc

Mirjalili MH, Moyano E, Bonfill M, Cusido RM, Palazon J (2009b). Steroidal lactones from Withania somnifera, an ancient plant for novel medicine. Molecules 14:2373-2393.

Mishra L. C., B. B. Singh, and S. Dagenais. 2000. Scientific Basis for the Therapeutic Use of Withania Somnifera (Ashwagandha): A Review. Alternative Medicine Review. 5 (4): 334–46.

Montes F.T. 2004. Nombres y usos traditionales de las plantas silvestres en almeria (estudio linguistico y etnografico). Insitituto de estudios Almerienses, Ed. p-352.

Morrison, J.L. (1995). Meffe, G. K., C. R. Carroll, and contributors. 1994. Principles of Conservation Biology. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 600 pp. ISBN 0-87893-519- 3. Price (hardbound). J. Mammal. 76, 972–974.

Mossa A.-T.H. (2016). Green pesticides: essential oils as biopesticides in insect-pest management. J. Environ. Sci. Technol, 9 (5), 354

Moussaoui, A. EL, Bourhia, M., Jawhari, F. Z., Es-safi, I., Ali, S. S., Bari, A., et al. (2020). Withania frutescens. L Extract: Phytochemical Characterization and Acute and Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Studies in Mice . BioMed Research International 2020, 1–7. doi:10.1155/2020/1976298.

Mukinda, J.T.; Eagles, P.F.K. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of Polygala fruticosa in female mice and rats. J. Ethnopharmacol. 2010, 128, 236–240, doi:10.1016/j.jep.2010.01.022.

Mulani, M.S., Kamble, E.E., Kumkar, S.N., Tawre, M.S., and Pardesi, K.R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. Front. Microbiol. 10, 539.

Muniz M.N., (2006). Synthèse d'alcaloides biologiquement actifs : la(+)- anatoxine-a et la (±)-camptothécine, Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier Grenoble I.

Munoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. Journal of Food Engineering, 108, 216–224.

Musundire, R., Chabi-Olaye, A., and Krüger, K. (2012). Host plant effects on morphometric characteristics of Liriomyza huidobrensis, L. sativae and L. trifolii (Diptera: Agromyzidae). Journal of Applied Entomology 136, 97–108.

Myers, N., (1988). Threatened biotas: "Hot spots" in tropical forests. The Environmentalist 8, 187–208.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J., (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403, 853–858.

Myers, R.A., Worm, B., (2003). Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. Nature.423, 280–283. https://doi.org/10.1038/nature01610.

Nagai, T.; Suzuki, N.; Nagashima, T. Activité antioxydante des extraits aqueux de l'igname ( Dioscorea opposita Thunb.) Tuber mucilage tororo. EUR. J. Lipid Sei. Technol. 2006 , 108 , 526–531.

Nagpal M, Aggarwal G, Jain U and Madan J. (2017). Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 10 174–9

Ndiaye, O., Diallo, A., Matty, F., Thiaw, A., Fall, R., and Guisse, A. (2012). Caractérisation des sols de la zone des Niayes de Pikine et de Saint Louis (Sénégal). International Journal of Biological and Chemical Sciences 6, 519–528. doi:10.4314/ijbcs.v6i1.46.

Neeraj G, A. Kumar, S. Ram, V. Kumar. (2017). Evaluation of nematicidal activity of ethanolic extracts of medicinal plants to Meloidogyne incognita (Kofoid and White) Chitwood under lab conditions. Int. J. of Pure Appl. Biosci, 5, 827-831

Negi MS, Sabharwal V, Wilson N, Lakshmikumaran MS (2006). Comparative analysis of the efficiency of SAMPL and AFLP in assessing genetic relationships among Withania somnifera genotypes. Curr Sci. 91:464-471.

Neogi P, Kawai M, Butsugan Y, Mori Y, Suzuki M (1988). Withacoagin, a new withanolide from Withania coagulans roots. Bull. Chem. Soc. Jpn. 61:4479-4481.

Niang-Diop, F., Sambou, B., Lykke, A. (2011). Contraintes de régénération naturelle de Prosopis africana : facteurs affectant la germination des graines. Int. J. Biol. Chem.Sci. 4.

Nie, Y.; Lin, Q.; Luo, F. Effets des polysaccharides non amylacés sur les maladies inflammatoires de l'intestin. Int. J. Mol. Sci. 2017 , 18 , 1372.

Nikie, E., (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. Free Radic. Biol. Med. 49, 503-515

Nivot, N. (2005). Essais de germination et de bouturage de six espèces indigenes sciaphytes du Canada. Thèse. Université Laval. Canada.

Nordine Aicha. (2013). Développement de la culture in vitro et caractérisation biochimique et moléculaire pour la sélection des génotypes de haute valeur ajoutée de quelques espèces endémiques du thym du Maroc. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences Dhar El Mahraz. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.

Nowak J. Shulaev V. (2003). Priming for transplant stress resistance in in vitro propagation. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 39 (2): 107-124.

Nur-e-Alam M, Yousaf M, Qureshi S, Baig I, Nasim S (2003). A novel dimeric podophyllotoxin-type lignan and a new withanolide from Withania coagulans. Helv. Chim. Acta 86:607-614.

Obot, I. B., Obi-Egbedi, N. O., and Umoren, S. A. (2009). Adsorption characteristics and corrosion inhibitive properties of clotrimazole for aluminium corrosion in hydrochloric acid. Int. J. Electrochem. Sci. 4, 863–877.

Ogendo J., M. Kostyukovsky, U. Ravid, J. Matasyoh, , S. Kariuki, E. Shaaya. (2008). Bioactivity of Ocimum gratissimum L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. J. Stored Prod. Res., 44 (4), 328-334

Oguzie, E. E. (2007). Corrosion inhibition of aluminium in acidic and alkaline media by Sansevieria trifasciata extract. Corros. Sci. 49, 1527–1539.

Olfert E.D., Cross B.M., and McWilliam A.A. (2011). CCPA, Le Conseil Canadien de Protection Des Animaux (1993) Manuel Sur Le Soin et l'utilisation Des Animaux d'expérimentation.

Oliver MJ., Wood AJ., O'Mahomy P. (2001). "To dryness and beyond" - preparation for the dried state and rehydration in vegetative dessication-tolerant plants, Plant Growth Reg. 24 (2001) 193-20l.

Olmstead, R. G., J. A. Sweere, R. E. Spangler, L. Bohs, and J. D. Palmer. 1999. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. Pp. 111-137. En: Solanaceae IV: advances in biology and utilization, M. Nee, D. E. Symon, R. N. Lester, and J. P. Jessop (eds.). The Royal Botanic Gardens, Kew Artículo en inglés.

Olmstead, R.G. and Bohs, L. 2007. A Summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982-2006. Acta Hort. (ISHS) 745:255-268

Ozenda P. (2000). Les végétaux dans la biosphère, Paris: Éditions Doin, 2000. Raynal-Roques A. (1998). La botanique redécouverte, Paris: Belin, 1998. Lemée G. (1998). Précis de biogéographie, Paris: Masson, 1998.

Ozturk M, Aydogmus-Ozturk F, Emin Duru M .(2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (Rheum ribes): An edible medicinal plant. Food Chemistry 103:623–630.

Paini, M.; Aliakbarian, B.; Casazza, AA; Perego, P.; Ruggiero, C.; Pastorino, L. Microcapsules multicouches de chitosane/dextrane pour la co-administration de polyphénols. Mater. Sci. Ing. C Mater. Biol. Appl. 2015 , 46 , 374–380.

Palani s, raja s, praveen kumar r, et al (2009) therapeutic efficacy of pimpinella tirupatiensis (apiaceae) on acetaminophen induced nephrotoxicity and oxidative stress in male albino rats.

Int j pharmtech res 1:925–934
PALANISAMY, K., KUMAR, P. (1998). Effect of position, size of cuttings and environmental factors on adventitious rooting in nemm (Azadirachta indica A. Juss). Tropical Forest Research Institute.
Panwar D. (2018). “An improvised shoot amplification and ex vitro rooting method for offsite propagation of Tinospora cordifolia (Willd.) Miers: a multi-valued medicinal climber”. Indian Journal Plant Physiology (2018): 1-10.
Patil P. (2016). A revised protocol for in vitro propagation of Carica papaya using lateral buds from field-grown trees. Journal of Horticultural Sciences 2, (2): 99-103.
Pegg, R. B. & Shahidi, F. (2007). Encapsulation, stabilization, and controlled release of food ingredients and bioactives. In, Handbook of Food Preservation. 2nd Edition. M. S. Rahman (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. pp 509–568.
Penchev P. (2010). Thèse de Doctorat de l’université de Toulouse. Étude des procédés d’extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basse et haute pressions.
Peronny S., (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta), Thèse de doctorat. Muséum National d’Histoire Naturelle.
Petruzzelli L, Mu¨ller K, Hermann K, Leubner-Metzger G. 2003. Distinct expression patterns of b-1,3-glucanases and chitinases during the germination of solanaceaous seeds. Seed Science Research 13: 139–153
Pina-Vaz, C.; Gonçalves Rodrigues, A.; Sansonetty, F.; Martinez-De-Oliveira, J.; Fonseca, A.F.; M\aardh, P.-A. Antifungal Activity of Local Anesthetics against Candida Species. Infectious diseases in obstetrics and gynecology 2000, 8, 124–137.
Pina-Vaz, C.; Sansonetty, F.;Martinez-De-Oliveira, J.; Fonseca, A.F.; M\aardh, P.-A. Antifungal Activity of Ibuprofen Alone and in Combination with Fluconazole against Candida Species. Journal of medical microbiology 2000, 49, 831–840.
Pollari, S. et al. (2011) Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. Breast Cancer Res. Treat. 125, 421–430
Polunin, N. (1967). Éléments de géographie botanique. Gauthier-V. Paris.
Porter, DA; Martens, EC Un sous-ensemble de capsules de polysaccharides dans le symbiote humain Bacteroides thetaiotaomicron favorise une meilleure forme physique compétitive dans l'intestin de la souris. Microbe hôte cellulaire 2017, 22, 494–506.
Prabu, P.C.; Panchapakesan, S.; Raj, C.D. (2013). Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the hydroalcoholic extract of Withania somnifera roots in wistar rats. Phytother. Res. 2013, 27, 1169–1178, doi:10.1002/ptr.4854.
Prakash, J., Gupta, S.K., and Dinda, A.K. (2002). Withania somnifera root extract prevents DMBA-induced squamous cell carcinoma of skin in Swiss albino mice. Nutr. Cancer 42, 91–97.
Prasad R. and Kapoor K (2004) Multidrug resistance in yeast Candida. International Review of Cytology 242 : 215–248.
Priestley C.M., E.M. Williamson, K.A. Wafford, D.B. Sattelle0 (2003). Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from Drosophila melanogaster. Br. J. Pharmacol., 140 (8), 1363-1372
Projet de loi-cadre n° 99-12, 2014. Portant charte nationale de l’environnement et du développement durable. Maroc.
Pullaiah T, Bahadur B Krishnamurthy K V (2015) Plant biodiversity.In Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement, Eds. B. Bahadur et al., Springer India, Chp 6: 177-193. DOl: 10.1007/978-81-322-2286-6_6.
Quezel P (1999). Biodiversité végétale des forêts méditerranéennes : son évolution éventuelle d’ici trente ans. Forets mediterranéennes 1, 3–8.
Quezel, P., Barbero, M., Benabid, A. and Rivas-Martinez, S. (1992) Contribution à l’étude des groupements forestiers et pré-forestiers du Maroc Oriental. Studia Botanica, 10/57-90, Salamanca.

Rachid A., (2013). Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (Ficus carica) et de coloquinte (Citrullus colocynthis) chez le rat Wistar, Thèse de doctorat. Université abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Räisänen J, U. Hansson, A. Ullerstig. (2004). European climate in the late twenty-first century: regional simulations with two driving global models and two forcing scenarios. Climate Dynamics, 22 (2004), 13-31.

Rajasekharan M, Hallstrom WJG, Naz RK, Sikka SC. Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia. Fertil Steril 1995;64:166–71.

Ramadan, A., Soliman, G., Mahmoud, S.S., Nofal, S.M., and Abdel-Rahman, R.F. (2012). Evaluation of the safety and antioxidant activities of Crocus sativus and Propolis ethanolic extracts. J. Saudi Chem. Soc. 16, 13–21.

RAMBELOARISOA G. E., 2004. La production des plants en pépinière. Manuel Forestier No. 10, 42p.

Rankou, H., Culham, A., Sghir Taleb, M., Ouhammou, A., Martin, G., Jury, S.L., (2015). Conservation assessments and Red Listing of the endemic Moroccan flora (monocotyledons): Red Listing of the Moroccan Flora. Bot. J. Linn. Soc. 177, 504–575. https://doi.org/10.1111/boj.12258

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K. (2006). Manipulation des semences, Bioversity International. ed. Rome, Italie.

Rapport PDAIRE. (2011). Etude d'actualisation du plan directeur d'aménagement intégré des ressources en eau du bassin hydraulique de Sebou.

Raunkiaer, C. (1934) The life forms of plants and statistical plant. Geography Claredon Press, Oxford.

Raza, M.; Al-Shabanah, O.A.; El-Hadiyah, T.M.; Al-Majed, A.A. (2002). Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. Sci. Pharm. 2002, 70, 135–145.

Reanmongkol Wantana, Tassanee Noppapan. (2009). Antinociceptive, Antipyretic, and Anti-Inflammatory Activities of Putranjiva Roxburghii Wall . Leaf Extract in Experimental Animals. J Nat Med. 63: 290–96.

Reed, M.D.; Mattison, D.R. Treating the Placenta. (2013). In Clinical Pharmacology During Pregnancy; pp. 73–87 ISBN 978-0-12-386007-1.

Reig-Armiñana, J., Calatayud, V., Cerveró, J., García-Breijo, F. J., Ibars, A., and Sanz, M. J. (2004). Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (Pistacia lentiscus L.). Environmental Pollution 132, 321–331.

Remmal A, Tantaoui-el araki a, Bouchikhi T,. (1993) Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oil in Agar medium. J Essenti Oils Res 5: 179–84.

Restauration des paysages forestiers (RPF). (2002). Exemples concrets dans 3 écorégions. Brochure WWF. 20p.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 20, 933–956. doi:10.1016/0891-5849(95)02227-9.

Rodríguez, J.P., Rodríguez-Clark, K.M., Baillie, J.E.M., Ash, N., Benson, J., Boucher, T., Brown, C., Burgess, N.D., Jennings, M., Keith, D.A., Nicholson, E., Revenga, C., Reyers, B., Rouget, M., Smith, T., Spalding, M., Walpole, M., Zager, I., Zamin, T. (2011). Elaboration des Critères de l'UICN pour la Liste Rouge des Ecosystèmes Menacés. Conserv. Biol. 25, 11

Rodriguez-Bernaldo A, Frecha P, Vidal, & Lope, H J (2010) Antioxydant compounds in edible brown seweeds. European Food Research & Technology., 231: 495–498.

Rojas, J. J., Ochoa, V. J., Ocampo, S. A. and Munoz, J. F. (2006). Screening of antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. Biomedical Central Complementary and Alternative Medicine, 6: (2)

Ros R., Muñoz-Bertomeu J., S. Krueger. (2014), Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. Trends Plant Sci., 19 (9), 564-569

Rousselet M.C, Vignaud J.M, Hofman P, Chatelet F.P. 2005. Inflammation and inflammatory pathology. French Association of Teachers and Researchers in Anatomy Pathology. 2005; 1-57. French

Roux, C., and Biot, C. (2012). Ferrocene-based antimalarials. Future Med. Chem. 4, 783–797.

S.H. Hamdi, M. Hedjal Chebheb, A. Kellouche, M.L. Khouja, A. Boudabous, J.M.B. Jemâa. (2015). Management of three pests' population strains from Tunisia and Algeria using Eucalyptus essential oils. Ind. Crops Prod. 74, 551-556

Sahotra Sarkar. (2021). Origin of the Term Biodiversity. BioScience. 71 (9):893.

SAIMA, S., DASTI, A. A., HUSSAIN, F., WAZIR, S. M., and MALIk, S. A. (2009). Achakzai, A.K.K., Achakzai, P., Masood, A., Kayani, S.A., Tareen, R.B. Pakistan Journal of Botany 41, 2129–2135.

Salhi N, Goumni Z, Salhi A, Mehani M, Terzi V (2015) Evaluation de l'activité antifongique in vitro des huiles essentielles de Laurus Nobilis.L sur la croissance mycélienne de Fusarium Sporotrichoide. Revue ElWahat pour les Recherches et les Etudes 8 : 34 – 44.

Saltré F., Duputié A., Gaucherel C., Chuine I. (2015). How climate, migration ability and habitat fragmentation affect the projected future distribution of European beech. Global Change Biology, 21: 897-910.

Sandra Lavorel, Jean-Dominique Lebreton et Yvon Le Maho. (2017). Les mécanismes d'adaptation de la biodiversité aux changements climatiques et leurs limites. Académie des sciences. Institut de France.

Sanogo, R., Maiga, A., Diallo, D. (2006). Activités analgésique et anti-inflammatoire des extraits de maytenus senegalensis, stereospermum kuntrianum et tricrilia emetica utilisées dans le traitement traditionnel des dysmenorrhees au Mali. Pharm. Méd. Trad. Afr., 14: 123- 136.

Saraiva W.V.A., Nd.S. Dias-Pini, R. Innecco, G.J. Zocolo, T. Helena Soares Rodrigues, A.S. Rêgo, E.Ad Amaral, J.Wd.S. Melo, G.Pd.S. Maciel. (2021). Toxic effects of an essential oils mixture on Aleurodicus cocois (Hemiptera: Aleyrodidae) and Chrysoperla externa (Neuroptera: Chrysopidae). Biocontrol Sci. Technol., 31 (5), 526-540

Sasi, P.K.; Kaleysa Raj, R. Effect of piperazine on the level of phospholipids and on the activities of certain enzymes of phospholipid metabolism in human Ascaris lumbricoides. Experientia 1975, 31, 1261–1262

Sathyaseelan V., V. Baskaran, S. Mohan, Efficacy of some indigenous pesticidal plants against pulse beetle, Callosobruchus chinensis (L.) on green gram, J. Entomol. 5 (2008) 128–132. doi:10.3923/JE.2008.128.132.

Scheldeman, X., Zonneveld, M. van. (2010). Training manual on spatial analysis of plant diversity and distribution. Bioversity International, Rome

Seconde communication nationale à la convention cadre des nations unies sur les changements climatiques. (2010). Maroc

Sharma, A., Deo, A.D., Tandel Riteshkumar, S., Chanu, T.I., and Das, A. (2010). Effect of Withania somnifera (L. Dunal) root as a feed additive on immunological parameters and disease resistance to Aeromonas hydrophila in Labeo rohita (Hamilton) fingerlings. Fish Shellfish Immunol. 29, 508–512.

Shen, H.; Li, F.; Wang, D.; Yang, Z.; Yao, C.; Oui, Y. ; Wang, X. Capsules de gel BSA de chitosan-alginate pour la chimiothérapie locale contre le cancer du sein résistant aux médicaments. Drogues Dés. Dév. Là. 2018

Sherkheli, M.A.; Benecke, H.; Doerner, J.F, A.K.; Gisselmann, G.; Hatt, H. Monoterpenoids Induce Agonist-Specific Desensitization of Transient Receptor Potential Vanilloid-3 (TRPV3) Ion Channels. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences 2009, 12, 116–128.

Shubham verma, Nitin kumar et Pramod sharma. (2010). Extraction et evaluation de graecum Linn de foenum de trgonella et mucilage de graine d'usitatissimum de Linn.

Siddique M.A, M. Sagheer, S.T. Sahi. (2022). Comparative toxic effects of Eucalyptus globulus L.(Myrtales: Myrtaceae) and its green synthesized zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) against Rhyzopertha dominica (F.)(Coleoptera: Bostrichidae). Int. J. Trop. Insect Sci., 42 (2), 1697-1706

Siddique, S.; Parveen, Z.; Firdaus-e-Bareen, X.; Mazhar, S. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Leaves of Three Melaleuca Species of Pakistani Flora. Arabian Journal of Chemistry 2016, doi:10.1016/j.arabjc.2017.01.018.

Sireeratawong, S.; Lertprasertsuke, N.; Srisawat, U.; Thuppia, A.; Ngamjariyawat, A.; Suwanlikhid, N.; Jaijoy, K. (2008). Acute and subchronic toxicity study of the water extract from Tiliacora triandra (Colebr.) Diels in rats. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2008, 30, 611–619.

Soltaninejad, F., and Shahidi, M. (2018). Investigating the effect of penicillin G as environment-friendly corrosion inhibitor for mild steel in H3PO4 solution. Prog. Color Color. Coat. 11, 137–147.

Somersalo S., MtikeHi P., Rajala A., Nevo E., Peltonen-Saino P. (2003). Morphophysiological traits characterizing environmental adaptation of Avena barbata, Euphytica 99 (2003) 213-220.

Sou O. A. P., S., A. Sanon, J.P. Monge, J. Huignard, B. Tran, P.F. Crdland, Influence of temperature and humidity on population of Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid Dinarmus basalis (Pteromalidae) in two climatic zones of Burkina Faso, Bull. Entomol. Res. 86 (1996) 695–702.

Soule, M.E., Estes, J.A., Berger, J., Del Rio, C.M. (2003). Ecological Effectiveness: Conservation Goals for Interactive Species. Conserv. Biol. 17, 1238–1250.

Spira, T.P. (2001). Plant-pollinator interactions : A threatened mutualism with implications for the ecology and management of rare plants. Natural Areas Journal, 21(1), 78-88

Subaraju GV (2006). Ashwagandhanolide, a bioactive dimeric thiowithanolide isolated from the roots of Withania somnifera. J. Nat. Prod. 69:1790-1792.

Subramanian SS, Sethi E (1971). 5, 20 [alpha](R)-dihydroxy-6 [alpha], 7 [alpha]-epoxy-1-oxo-(5 [alpha]) witha-2, 24-dienolide, a new steroidal lactone from Withania coagulans. Phytochemistry 10:685-688.

Subramanian SS, Sethi PD (1969). Withaferin-A from the roots of Withania coagulans. Curr. Sci. 38:267-268.

Sujitha B, Krishnamoorthy B and Muthukumaran M. (2012). International Journal of Pharmacy and Technology **4** ; 2347–62.

Tabatabaie, L. et al. (2010) L-serine synthesis in the central nervous system: a review on serine deficiency disorders. Mol. Genet. Metab. 99, 256–262.

Tardieu F. (2012). Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. J. Exp. Bot., 63: 25-31.

Tattini, M., Gravano, E., Pinelli, P., Mulinacci, N., and Romani, A. (2000). Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of Phillyrea latifolia exposed to excess solar radiation. New Phytologist 148, 69–77. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00743.x.

Taylor, S. A., and Larson, E. L. (2019). Insights from genomes into the evolutionary importance and prevalence of hybridization in nature. Nature ecology & evolution 3, 170–177.

Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, & Polissiou M (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae). Food Chemistry 90 : 333–340.

Thanatcha R, Prane A. (2011). Extraction et caractérisation of mucilage in ziziphus mauritiana Lam. Inter Food Res J, 2011.

Titouhi F., M. Amri, C. Messaoud, S. Haouel, S. Youssfi, A. Cherif, J.M.B. Jemâa. (2017). Protective effects of three Artemisia essential oils against Callosobruchus maculatus and Bruchus rufimanus (Coleoptera: Chrysomelidae) and the extended side-effects on their natural enemies J. Stored Prod. Res, 72, 11-20

Tomlison H. S. et Fleming M. G., 1963, Etudes cinétiques de flottation.Soc. Ind. Min., 6ème Cong.Int. de la Prép. des Minerais.

Tong X, Zhang H, Timmermann BN (2011). Chlorinated withanolides from Withania somnifera. Phytochem. Lett. 4(4):411-414.

Toorop PE, Van Aelst AC, Hilhorst HWM. 2000. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (Lycopersicon esculentum) seed germination is under control of ABA. Journal of Experimental Botany 51: 1371–1379

Torres De Pinedo A, Pen alver P, & Morales J (2007) Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. Food Chem 103 : 55–61.

Tousignant, D. (1995). Relation entre la teneur en eau des boutures d'épinette noire et leur enracinement en bouturathèque. Québec, Ministère des Ressources Naturelles, Direction de la recherche forestière, Note de recherche forestière, No. 66, 7p.

Traoré M.C. (2006). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysmenorrhee au Mali. Thèse de Doctorat. Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto –Stomatologie. Université de Bamako

Tursunova RN, Maslennikova VA, Abubakirov NK (1977). Withanolides in the vegetable kingdom. Chem. Nat. Comp. 13:131-138.

Uddin Q, Samiulla L, Singh VK, Jamil SS (2012). Phytochemical and pharmacological profile of Withania somnifera Dunal: a review. J. Appl. Pharm. Sci. 2:170-175.

Urban, M. C., Bocedi, G., Hendry, A. P., Mihoub, J. B., Pe'er, G., and Singer, A. others. 2016. Improving the forecast for biodiversity under climate change. Science 353, 1113–1122.

V.L. Gonçalves, M. Laranjeira, V.T. Fávere, R.C. Pedrosa. (2005). Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. Polímeros, 15 (1), 6-12

Vaidya, V.S.; Ferguson, M.A.; Bonventre, J.V. Biomarkers of Acute Kidney Injury. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2008, 48, 463–493.

Valcarcel F., A.S. Olmeda, M.G. Gonzalez, M.F. Andrés, J. Navarro-Rocha, A. González-Coloma. (2021). Acaricidal and insect antifeedant effects of essential oils from selected aromatic plants and their main components. Front. Agron., 3, 22

Valladares, F., Zaragoza-Castells, J., Sa´nchez, D., Sa´nchez-Go´mez, S., Go´mez, G., Matesanz, S., et al. (2008). Is Shade Beneficial for Mediterranean Shrubs Experiencing Periods of Extreme Drought and Late-winter Frosts? Annal of botany 102, 923–933. doi:10.1093/aob/mcn182.

Vanderlinde Frederico Argollo, Higor Frutuoso Landim, Elson Alves Costa, Pablinny Moreira Galdino, Gineide Conceição dos Anjos, David do Carmo Malvar, Wellington da Silva Côrtes, Fábio Fagundes da Rocha. 2009. Evaluation of the Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of the Acetone Extract from Anacardium Occidentale L. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 45 (3): 437–42.

Velde VV, Lavie D, Budhiraja RD, Sudhir S, Garg KN (1983). Potential biogenetic precursors of withanolides from Withania coagulans. Phytochemistry 22:2253-2257

Verhelst, D.; Monge, M.; Meynard, J.-L.; Fouqueray, B.; Mougenot, B.; Girard, P.-M.; Ronco, P.; Rossert, J. Fanconi syndrome and renal failure induced by tenofovir: A first case report. Am. J. Kidney Dis. 2002, 40, 1331–1333, doi:10.1053/ajkd.2002.36924.

Volak J., Stodola J., (1983) Plantes médicinales, GRUND, Lyon, pp. 29-31

Wadood, A., Gufran, M., Jamal, B., Naeem, M., Khan, A., Ghaffar, R. and Asnad. D. (2013). Phytochemical analysis of medicinal plants occurring in local area of Mardan. Biochemistry and Analytical Biochemistry, 2:14-44.

Waele, J. De., Gregorio, F. Di., El Wartiti, M., Fadli, D., Follesa, R., Marini, A. andMelis, M. T. (2004): "Geo-environmental risk in the upper valley of the Oued Se-bou (Fez, Central Morocco): a preliminary approach". Journal of African EarthSciences, 39, pp. 491-500.

Wakil, A., Mackenzie, G., Diego-Taboada, A., Bell, J. G., & Atkin, S. L. (2010). Enhanced bioavailability of eicosapentaenoic acid from fish oil after encapsulation within plant spore exines as microcapsules. Lipid, 45, 645–649.

Walpole, M., Almond, R.E.A., Besancon, C., Butchart, S.H.M., Campbell-Lendrum, D., Carr, G.M., Collen, B., Collette, L., Davidson, N.C., Dulloo, E., Fazel, A.M., Galloway, J.N., Gill, M., Goverse, T., Hockings, M., Leaman, D.J., Morgan, D.H.W., Revenga, C., Rickwood, C.J., Schutyser, F., Simons, S., Stattersfield, A.J., Tyrrell, T.D., Vie, J.-C., Zimsky, M. (2009). Tracking Progress Toward the 2010 Biodiversity Target and Beyond. Science 325, 1503-1504

Willan R.L. (1992). Guide de manipulation des semences forestieres dans le cas particulier des regions tropicales. Food & Agriculture Org. 444 p.

Winter C. A., E. A. Risley, G. W. Nuss. (1962). "Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. Experimental Biology and Medicine. 111 (3): 544–47. https://doi.org/10.3181/00379727-111-27849.

Wollenweber, B., Porter, J. R., and Lübberstedt, T. (2005). Need for multidisciplinary research towards a second green revolution. Current Opinion in Plant Biology 8, 337–341. doi:10.1016/j.pbi.2005.03.001.

Wu, Y. J., Hong, C. Y., Lin, S. J., Wu, P., and Shiao, M. S. (1998). Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of Salvia miltiorrhiza. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 18(3):481–486.

Xu Y-m, Gao S, Bunting DP, Gunatilaka AAL (2011). Unusual withanolides from aeroponically grown Withania somnifera. Phytochemistry 72:518-522.

Yahaya, A., Ali, M. and Idu, A. (2017). Antibacterial activity and phytochemical screening of Carica papaya on some enteric bacterial isolates of public health importance. Greener Journal of Biological Sciences, 7(1):001-007.

Yoshida, K. et al. (2004) Targeted disruption of the mouse 3- phosphoglycerate dehydrogenase gene causes severe neurodevelopmental defects and results in embryonic lethality. J. Biol. Chem. 279, 3573–3577

Yu, Z.; Tang, J.; Khare, T.; Kumar, V. The Alarming Antimicrobial Resistance in ESKAPEE Pathogens: Can Essential Oils Come to the Rescue? Fitoterapia 2020, 140, 104433, doi:10.1016/j.fitote.2019.104433.

Zandi-Sohani N., M. Hojjati, Á.A. Carbonell-Barrachina, Insecticidal and Repellent Activities of the Essential Oil of Callistemon citrinus (Myrtaceae) Against Callosobruchus maculatus (F.) (Coleoptera: Bruchidae).

Zarrad K, A.B. Hamouda, I. Chaieb, J.M.-B. Jemâa. (2015). Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian Citrus aurantium L. essential oils. Ind. Crops Prod., 76, 121-127

ZEKKOUR, M., and Mohamed (2008). Les risques de la phytothérapie, Monographies des plantes toxiques les plus usuelles au Maroc.

Zhang Y, Chan F H and Leong W K . (2013). Advance Drug Delivery Review **65 ;** 104–20.

Zhang, Y.; Zhao, Q. ; Wang, H.; Jiang, X.; Cha, R. Préparation de capsules de cellulose nanocristalline verte et sans gélatine. Glucides. Polym. 2017 , 164 , 358–363.

Zhao J, Nakamura N, Hattori M, Kuboyama T, Tohda C, Komatsu K (2002). Withanolide derivatives from the roots of Withania somnifera and their neurite outgrowth activities. Chem. Pharm. Bull. 50:760- 765.

Zuccarini, P. Camphor: Risks and Benefits of a Widely Used Natural Product. Journal of Applied Sciences and Environmental Management 2009, 13.

# Annexe

## Profil de l'informateur :

**Sexe** : ☐ Masculin ☐ Féminin

**Age** : ☐ $A_1$ <20 ☐ $A_2$ (20-30) ☐ $A_3$ (30-40) ☐ $A_4$ (40-50) ☐ $A_5$ (50-60) ☐ $A_6$ >60

**Situation familiale** : ☐ Célibataire ☐ Marié

**Niveau d'étude** : ☐ non scolarisé ☐ Primaire ☐ Secondaire ☐ Niveau Universitaire

**Localité** : ☐ Douar ☐ Village ☐ Ville ☐ Nomade

## Pour les herboristes :

Est 'elle reconnue : ☐ Oui ☐ Non

Est 'elle commercialisée ? ☐ Oui ☐ Non

Le prix / kg ou g : .....

Type de collecteur : ☐ Nomade ☐ Berger ☐ Soi-même ☐ Agriculteur ☐ Sédentaire

## Matériel végétal :

**Est-elle Reconnue** : ☐ Oui ☐ Non

**Nom vernaculaire :** .....

**Est-elle utilisée** : ☐ Oui ☐ Non

**Abondance de l'espèce :** ☐ très abondant ☐ rare ☐ très rare

**Type de plante** : ☐ Sauvage ☐ Cultivée ☐ Adventice

## Utilisation de la plante :

**Usage de la plante** : ☐ Thérapeutique ☐ comestible ☐ Cosmétique

Autres .... .....

**Utilisez- vous la plante ?** ☐ Seule ☐ Association possible (de plantes) Utilise : …

.....

**utilisez- vous la plante avec des doses précises ?** : ☐ Oui ☐ Non

**Parties utilisées**: ☐ Fleurs ☐ Fruits ☐ Graine ☐ Ecorce ☐ racine ☐ Tige ☐ Feuilles ☐ Plante entière

**Moment de la récolte** (saison) : ☐ Hiver ☐ Automne ☐ Printemps ☐ Eté

**Forme d'emploi :** ☐ Poudre ☐ Huiles essentielles ☐ Tisane ☐ Extrait (teinture, solution, gélule) ☐ Huiles grasses

**Mode de préparation :** ☐Infusion ☐Décoction ☐ Cru ☐ Cuit ☐ Cataplasme

Autres ……..……

**Dose utilisée** : ☐ Pincée ☐ Poignée ☐ Cuillerée

Autres ……..……

**Mode d'administration** : ☐ Massage ☐ Rinçage ☐ Oral

Autres ……..……

**Durée d'utilisation** (durée de traitement) : ☐ Un jour ☐Une semaine ☐Un mois ☐Guérison

**Méthode de conservation** : ☐ A l' abri de la lumière ☐ Exposé à la lumière

Autres ……..……

**Posologie : nombre de prise par jour** :

Pour les enfants : ☐ 1fois/jour ☐ 2fois/jour ☐ 3fois/jour ☐ Autres : ……..

Pour les personnes âgées : ☐1fois/jour ☐ 2fois/jour ☐3fois/jour ☐Autres : ……..

Pour les Adultes : ☐1fois/jour ☐2fois/jour ☐ 3fois/jour ☐ Autres :……..

**Type de maladie soignée :**

☐Affections dermatologiques ☐ Affections respiratoires ☐Affections cardio-vasculaires

☐Affections génito-urinaires ☐ Affections osteo-articulaires ☐ Affections métaboliques.

☐ Affections du tube digestif ☐ Affections neurologiques

Autres : ……..……

**Diagnostic par :** ☐soi-même ☐ Le médecin ☐ L'herboriste

Autres : ……..……

**Résultats :** ☐Guérison ☐ Amélioration ☐ Inefficace

**Effets secondaires:**

……..……
……..……
……..……

**Cette plante peut-elle avoir des effets néfastes sur la santé :** ☐ Oui ☐ Non

**Si oui quels sont ces effets ?** ☐ L'allergie ☐La nausée ☐Le vomissement ☐ Les ulcères
Autres (à préciser) : ……..……