



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2024

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté et soutenu par :

SEGGOU Nadjjet **SLIMANI Lina Abir**

Le : mardi 25 juin 2024

Synthèse : Etude bibliographique de l'activité antioxydante et immunomodulatrice de *withania somnifera* L. Dunal

Jury :

M.	DERRADJI Yacine	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	BELIEBCIR Leila	MAA	Université de Biskra	Présidente
Mme.	BOUATROUS Yasmina	Pr	Université de Biskra	Examinatrice

Année universitaire :2023/2024

Remerciements

Au-dessus de tout, nous tenons à remercier ALLAH le tout Puissant, le tout Miséricordieux, de nous avoir permis d'atteindre ce niveau d'étude et pour nous avoir donné la santé, la force, le courage et la volonté d'achever notre humble recherche.

Nous remercions notre encadreur Dr. DERRADJI Yacine, pour son aide, sa disponibilité, le temps qu'il nous a consacré, ses encouragements et ses conseils judicieux et sa supervision éclairée dans ce travail.

Des remerciements également aux membres du Jury, président et examinateur, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre modique étude et pour avoir accepté d'examiner, d'évaluer et d'enrichir par leurs propositions, cette recherche.

Nous exprimons notre gratitude à tous les enseignants qui nous ont accompagnés tout au long de notre cursus universitaire. Nous avons eu l'honneur d'être parmi vos étudiants et de bénéficier de votre riche enseignement.

On remercie également tous nos amis et collègues de la promotion de biochimique appliquée la promo de 2023/2024.

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de la présente étude.

Dédicaces

Louange à الله, et merci à lui, d'avoir été mon guide pendant toutes ces années.

Ce mémoire représente l'aboutissement du soutien et l'encouragement que mes parents «**Slimani Mustapha**» et «**Amara Souad**» m'ont prodigué tout au long de ma scolarité. Cru en moi et m'avoir aidé à arriver là où j'en suis ;

Merci pout tout.

Je n'oublierai jamais de remercier ma chère grand-mère

A mes frères : **Dhae** et **serine**.

A mes sœurs et meilleure amies : **Messaouda** et **Asma**.

«A mes chers membres de la famille : **Imane, Ritaj, Adam, Oumar, Ayoub, Marwa** » pour leur présence et leurs moments heureux.

SLIMANI Lina Abir

Dédicaces

Avec la grâce et l'aide de Dieu, nous avons achevé ce travail que je dédie à:

A mes chers parents « **Fatima zohra Mounib** » et « **Mouhamed El hadi** » avant tout vous êtes un symbole d'espoir et de dévotion qui n'a pas de limites.

Les plus chères personnes dans le monde, qui ont toujours fait leur maximum, en sacrifiant leur temps, qui n'ont jamais cessé de m'encourager, de me soutenir.

C'est grâce à vous et pour vous que j'ai fait ce travaille.

Vous êtes notre soutien et notre trésor dans ce monde, nous demandons à Dieu de vous protéger et de prolonger votre vie.

Nous n'oublierons pas votre confiance et vos sacrifices, et nous espérons que vous serez fiers de nous.

À mon seul cher frère **Hakime**

À mes chères sœurs **khaoula, Selma** et **Amina**

À mes belles **Loudjine mounib** et **Moufida laaouade**

À ma chère tante **Yassmina** et **Saliha mounib**

À mes chères copines

Merci a tous pour vous soutien tout au long de mon parcours universitaire, Merci d'être dans ma vie.

À tous ceux qui me sont chères A tous ceux qui m'aiment A tous ceux que j'aime.

Seggou Nadjjet

Sommaire

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction.....	1
Première partie	
synthèse bibliographique	
Chapitre 1.....	2
Généralités sur l’Ashwagandha.....	2
1.1. Définition	2
1.4. Classification taxonomique	3
1.5. Utilisation traditionnelle	4
1.6. Composition chimique	4
1.6.1 Composé phénolique	5
1.6.2. Flavonoïdes	5
1.6.3. Alcaloïdes	5
1.6.4. Saponines	6
1.6.5. Withanolides	6
Chapitre 2.....	8
Certaines pathologies à traité avec l’Ashwagandha	8
2.1. Stress oxydant.....	8
2.1.1. Définition des radicaux libres	8
2.1.2. Système antioxydant.....	9
2.2. Les maladies inflammatoires.....	10
2.2.1. Cellules et médiateurs de l’inflammation.....	11
2.2.2. Types d’inflammation	11
2.2.2.1. Inflammation aiguë	11
2.2.2.2. Inflammation chronique	12
Deuxième partie	13
Synthèse sur les travaux scientifiques choisis.....	13

Chapitre 3.....	14
La méthodologie suivie dans les travaux choisis	14
3.1. Matériel biologique.....	13
.3.1.1 Échantillonnages de la plante	13
3.1.2. Animaux utilisés	13
3.1.3. Cellules utilisées	13
3.2. Méthodes	14
3.2.1. Obtention des extraits	14
3.2.2. Evaluation de l'activité antioxydants.....	14
3.2.2.1. Test de piégeage du DPPH.....	14
3.2.2.2. Inhibition de l'oxydation des protéines.....	15
3.2.2.3. Inhibition de la dégradation de l'ADN	15
3.2.2.4. Inhibition de la xanthine oxydase	16
3.2.2.5. Effet sur l'équilibre oxydatif.....	16
a. Induction du stress oxydant.....	16
b. Dosage des paramètres du stress antioxydant	17
3.2.3. Etudes de l'activité immunomodulatrice	19
3.2.3.1. Effet stimulant du système immunitaire	19
a. Effet sur les paramètres hématologique	19
b. Effet sur la viabilité et l'activité des macrophages	19
c. Effet sur la réponse à l'introduction d'un Ag.....	21
3.2.3.2. Effet sur l'inflammation aigue	21
3.2.3.3. Effet sur l'inflammation chronique	21
3.2.3.4. Effet sur la dénaturation des protéines	22
3.2.3.5. Effet sur les enzymes impliquées dans l'inflammation.....	22
Chapitre 4.....	23
Les résultats et discussion des travaux choisis.....	23
4.1. Activité Anti-oxydante.....	23
4.2. Activité immunomodulatrice.....	27
Conclusion et Perspectives	32
Référence bibliographique	34
Résumés.....	41

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux composés chimiques de <i>Withania somnifera</i> et leurs propriétés	7
Tableau 2: Différentes formes des radicaux libres.....	8
Tableau 3: Principaux systèmes antioxydants endogènes.	10

Liste des figures

Figure 1: Différents parties de la plante <i>Withania somnifera</i>	3
Figure 2: Structure de base des withanolides.	6
Figure 3: Réaction du radical libre DPPH· avec un antioxydant.....	15

Liste des abréviations

AAPH : Alpha-tocophérol acétate peroxyde

ABTS : 2,2'-Azinobis-(acide 3-éthylbenzthiazolin-6-sulfonique)

ACF : Adjuvant complet de Freund

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALI : Lésions pulmonaires aiguës

AOXH : Antioxydant naturel

BSA : Albumine de Sérum Bovin

CAT : Catalase

CDNB : 1-chloro-2, 4-dinitrobenzène

COX-1 : Cyclooxygénases-1

COX-2 : Cyclooxygénases-2

CO₂ :Dioxyde de carbone

DW : Poids sec

DPPH :2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

DMEM : Milieu de Eagle modifié par Dulbecco

DTNB : Acide 5,50-dithiobis-2-nitrobenzoïque

EE : Extrait éthanolique

EW : Extrait aqueux

ERN : Espèces réactives nitrogénées

ERO : Espèces réactives oxygénées

FRAP : Capacité réductrice ferrique du plasma

FBS : Sérum de veau fœtal
GAE : Équivalent Acide Gallique
GB : Globule blanc
Gr : Globule rouge
GR : Glutathion réductase
GRM : Globule rouge de mouton
GPx : Glutathion peroxydase
GSH : Glutathion
GST : Glutathion-S-transférase
GSSG : Glutathion oxydé
G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50%
IgG-1 : Immunoglobuline G1
IgG-2 : Immunoglobuline G2
IL-1 : Interleukine1
IL-1 β : Interleukine1 β
IL-2 : Interleukine2
IL-4 : Interleukine4
IL-6 : Interleukine 6
IL-10 : Interleukine10
INF- γ : Interféron- γ
iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible
LPS : Lipopolysaccharide
LPO : Peroxydation lipidique

5-LOX : Lipoxygénase

MMP-8 : Métalloprotéase

MDA : Malone-dialdéhyde

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

MTT : sel de tétrazolium

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NBT : Nitroblue tétrazolium

NF- κ B : Facteur de transcription κ B

NPZnO : Nanoparticules de l'oxyde de zinc

NO : Oxyde nitrique

NOS : Oxyde nitrique synthases

O₂⁻ : Anion superoxyde

PAF : Facteur d'activation plaquettaire

RPMI : Institut commémoratif du park Roswell

PBS: Phosphate Buffered Saline

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

SOD : Superoxyde dismutase

TBA : Thiobarbiturique

TGF- β : Facteur de croissance transformante- β

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale- α

Th1 : Lymphocytes T auxiliaire 1

Th2 : Lymphocytes T auxiliaire 2

XO : Xanthine oxydase

Introduction

Introduction

L'histoire de la phytothérapie est ancienne. Par intuition et par expérimentation, l'homme a sélectionné les plantes alimentaires pour se nourrir, les plantes médicinales pour se soigner et les plantes toxiques pour s'en servir comme poisons de flèche à la chasse ou à la guerre. Ces choix ont évolué de manière empirique au fil des expériences qui se sont succédées pendant des siècles (Lehmann, 2013) est différemment en fonction des zones géographiques (Boissière, 2018).

Withania somnifera, communément appelée « Ashwagandha » ou « ginseng indien » est une plante thérapeutique essentielle des régions du sous-continent indien. Elle est utilisée depuis plus de 3000 ans en médecine ayurvédique. Son nom signifie en hindi « odeur de cheval », en référence à la puissance de l'animal et aux propriétés revitalisantes et fortifiantes de la plante (Mandlik et Namdeo, 2021).

Plusieurs études ont prouvé la richesse de cette plante en constituants chimiques (polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, withanolides,...etc.) qui avaient présenté plusieurs propriétés pharmacologiques comme l'antioxydants, aphrodisiaques, antimicrobiennes, adaptogènes, diurétiques, antihelminthiques, immunomodulateurs, anti-inflammatoires, antidiabétiques, hépato-protecteurs, antistress ... (John, 2014).

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits de *W. somnifera*, à partir d'une synthèse des articles qui ont étudié le sujet de manière expérimentale. Pour réaliser cet objectif, notre manuscrit est divisé en deux parties :

- Dans la première partie nous apportons des généralités sur *Withania somnifera* L., sa composition chimique et les maladies dont nous espérons qu'elle sera bénéfique.
- La deuxième partie est une synthèse des études expérimentales choisies où on discute les méthodes utilisées et les résultats obtenus.
- Enfin, on présente une conclusion générale sur les résultats importants de ces études, ainsi que les perspectives.

Première partie
synthèse bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur l'Ashwagandha

Chapitre 1 : Généralités sur l'Ashwagandha

1.1. Définition

Withania somnifera est une plante très importante de la famille des *Solanacées* utilisée dans un certain nombre de systèmes médicaux orthodoxes comme l'Ayurveda, le Siddha et l'Unani comme plante médicinale. En lui attribue plusieurs noms avec des significations distinctes telles que « *ginseng indien* » en anglais, car il est utilisé en médecine ayurvédique d'une manière similaire au ginseng chinois (*Panax ginseng*) en médecine traditionnelle chinoise ; « Ashwagandha » (« *ashwa* » signifie cheval et « *gandha* » signifie odeur), car les racines possèdent une odeur caractéristique de « cheval mouillé » ou « *Asgandh* » en hindi et « *Asgand* » en ourdou. Le nom de l'espèce a été attribué à « *somnifera* », ce qui signifie inducteur de sommeil en latin, en raison de ses prodigieuses caractéristiques anti-stress (Bharti *et al.*, 2016 ; Kumar *et al.*, 2019 ; Paul *et al.*, 2021).

1.2. Description botanique

W. somnifera est un arbuste à feuilles persistantes, droit et ramifié, mesurant 150 cm de haut.

- Les feuilles ont une forme ovale, glabre et leur longueur est d'environ 10 cm.
- Fleurs verdâtres ou jaunes brillantes, plus petites d'environ 1 cm de long. Il y a jusqu'à 5 fleurs disposées en cymes axillaires et ornées.
- Les fruits sont des baies rondes d'environ 6 mm de diamètre. À maturité, les baies deviennent d'un rouge orangé et restent fidèles au calice gonflé et membraneux.
- Les graines sont jaunes, réniformes et mesurent environ 2,5 mm de diamètre.
- Les racines, lorsqu'elles sont sèches, sont charnues et cylindriques. Leur rétrécissement s'accompagne de la présence de racines secondaires droites, non ramifiées, de 10 à 17,5 cm de long et de 6 à 12 mm de diamètre dans les racines principales. La racine est d'un blanc brunâtre à la surface externe et crémeuse à l'intérieur. Les racines produisent de courtes et inégales cassures, à forte odeur et à goût amer. Lorsqu'elles sont jeunes, les racines ont un épiderme unique et un cortex parenchymateux de 4 à 5 couches de cellules (Mukherjee *et al.*, 2020).

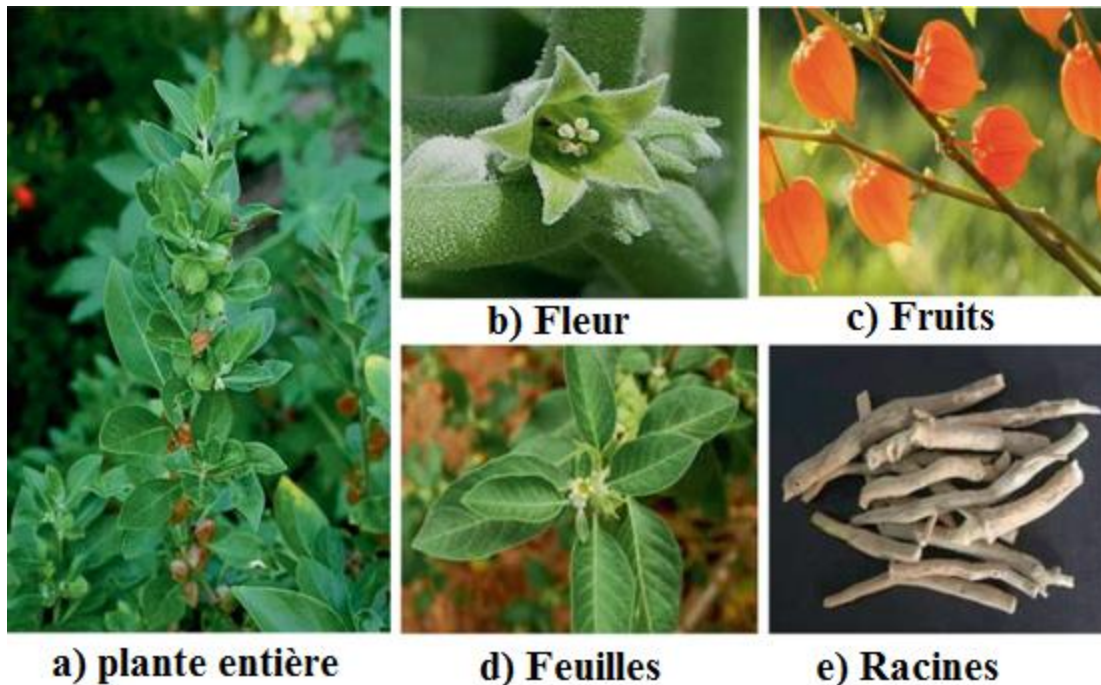


Figure 1: Différents parties de la plante *Withania somnifera* (Mounica *et al.*, 2022).

1.3. Distribution géographique

L'Ashwagandha pousse de manière sauvage dans les régions sèches et est largement répandu dans les régions subtropicales. On peut la constater dans des régions africaines comme le Maroc, le Congo, l'Égypte et l'Afrique du Sud, dans des régions du Moyen-Orient comme la Jordanie ainsi que dans des régions asiatiques comme l'Afghanistan, l'Inde et le Pakistan. En Inde, l'Ashwagandha est cultivé dans le Gujarat, le Pendjab, l'Uttar Pradesh, le Maharashtra Haryana et le Madhya Pradesh au Rajasthan. L'Ashwagandha est une plante annuelle résistante à la sécheresse. Les zones tropicales semi-arides avec des précipitations moyennes de 500 à 750 mm conviennent à l'Ashwagandha en ce qui concerne la culture (Kumar *et al.*, 2019).

1.4. Classification taxonomique

La famille des Solanacées comprend 84 genres comprenant environ 3000 espèces, dispersées à travers le monde. Les membres de cette famille sont généralement des arbustes annuels. Parmi elles, *W. somnifera*, c'est l'un des plus importants sur le plan économique et médical.

La classification taxonomique de l'Ashwagandha est la suivante (Kumar *et al.*, 2019) :

Royaume	→	Plantes
Sous-règne	→	Trachéobionte
Super division	→	Spermatophytes
Division	→	Angiospermes
Classe	→	Dicotylédones
Ordre	→	Tubiflores
Famille	→	Solanacées
Sous-famille	→	Solanoideae
Tribu	→	Physaleae
Sous-tribu	→	Withaninae
Genre	→	Withania
Espèce	→	somnifera Dunal

1.5. Utilisation traditionnelle

Dans l'Ayurveda, l'Ashwagandha est largement reconnu comme un moyen alternatif, réparateur et anabolisant et très bénéfique dans le traitement de marasme causé par la malabsorption chez les enfants. Il possède aussi des propriétés diurétiques, antidépressives, cardioprotectrices et est employé dans le traitement des affections de la peau (ulcères, gale), des problèmes du système nerveux central (évanouissements, vertiges, insomnie), des troubles de la mémoire, des troubles gastro-intestinaux (dyspepsie, coliques, infestation de vers), de la toux, de l'asthme et de l'hypertension (Dev, 2023).

1.6. Composition chimique

L'Ashwagandha est un trésor de métabolites très variés parmi les quels, les alcaloïdes, les saponines, les withanolides, les flavonoïdes et les composés phénoliques ce sont les principaux constituants de la plante qui lui confèrent son effet thérapeutique (Mishra, 2022 ; Polumackanycz *et al.*, 2023).

1.6.1 Composé phénolique

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés à partir de la voie du shikimate et le métabolisme des phénylpropanoïdes, présents dans toutes les plantes. Ils sont constitués d'au moins un noyau aromatique de type benzène, avec un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils peuvent avoir des structures simples, telles que les acides phénoliques, ou hautement polymérisées comme les tanins condensés (Laguna, 2019).

1.6.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés avec une structure de base commune qui se compose d'un squelette carboné en C6-C3-C6. Ces 15 carbones sont répartis sur deux noyaux benzéniques (A et B) qui sont reliés par un noyau C, qui est une chaîne à trois carbones qui peut former des hétérocycles oxygénés après avoir été condensés avec un OH phénolique du noyau A (Zeb, 2021).

1.6.3 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques d'origine naturelle et de distribution restreinte, avec une structure complexe. Leur atome d'azote fait partie d'un système hétérocycle et a une activité pharmacologique importante ; pour certains, ils sont exclusivement présents dans les tissus végétaux (Bruneton, 2009).

Les alcaloïdes sont classés selon leurs précurseurs biogénétiques communs et la position de l'atome d'azote en :

- Alcaloïdes vrais (Leur biosynthèse s'effectue à partir d'acides aminés et l'atome d'azote contenu dans un hétérocycle).
- Proto-alcaloïdes (Leur biosynthèse s'effectue à partir d'acides aminés mais l'atome d'azote ne faisant pas parti d'un hétérocycle).
- Pseudo-alcaloïdes (présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés d'acides aminés).

1.6.4. Saponines

Les saponines sont des substances glycosidiques abondantes dans les plantes. Elles sont des composés végétaux glycosidiques qui se composent d'un composé parent connu sous le nom de génine ou de spongénine et d'un composant sucré variable. On peut classer les saponines en glycosides triterpéniques, glycosides de spirostanol (synonyme de glycosides stéroïdiens) ou glycosides alcaloïdes stéroïdiens (Tsutomu, 1988).

1.6.5. Withanolides

De plus en plus de preuves suggèrent que la plupart des propriétés thérapeutiques de l'Ashwagandha peuvent être attribuées aux withanolides. Les withanolides sont un groupe de lactones stéroïdiennes et structurellement similaires aux stéroïdes qui sont omniprésents dans tous les organismes, des microbes à l'homme. Les withanolides sont les plus prolifiques chez Ashwagandha parmi toutes les Solanacées et sont caractérisés par un squelette stéroïdien basique en C28 avec une chaîne latérale à neuf carbones dans laquelle C22 et C26 sont oxydés de manière appropriée pour former une δ -lactonerie à six chaînons (Sangwan et Sangwan, 2014).

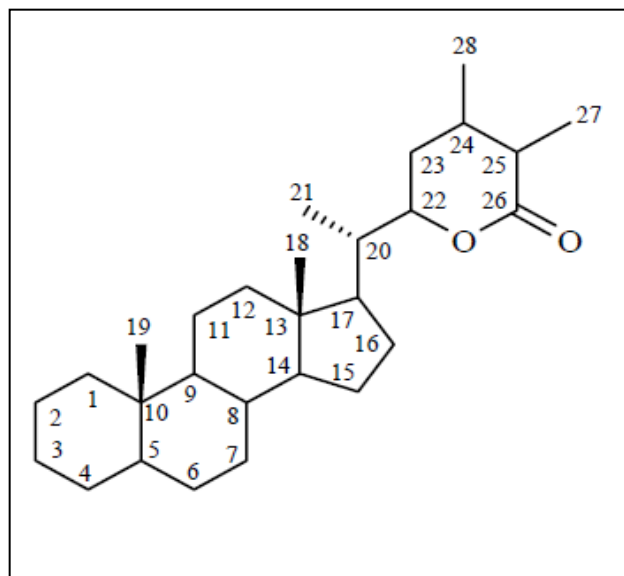


Figure 2: Structure de base des withanolides (Santhi et Aishwarya, 2011).

Tableau 1: Principaux composés chimiques de *Withania somnifera* et leurs propriétés (Mishra, 2022 ; Polumackanycz *et al.*, 2023).

Composées chimiques	Molécules bioactives	Propriétés
Alcaloïdes	Isopellertierine, Anahygrine, Somniferiene, Somniferinine, Somnine, 3-a glyloxytropane, Somniferinine, Pseudo- withanine, Withananine, Anaferine, Tropine, Choline, Pseudo-tropine, Cuscohygrine, Tropanol, Andanahydrine.	Les alcaloïdes présentent une activité antimicrobienne et sont utilisés comme relaxant.
Saponines	Sitoindoside VII and VIII.	Activité anti-hépatotonique et utilisée dans les molluscicides et les détergents.
Flavonoïdes	Flavanols, Flavonones, Kaempferol.	Activité anti-hépatotonique et utilisée dans les molluscicides et les détergents.
Withanolides	Sitonidoside XI et X, Asitoindoside, Withaferin A and Withanolide D, Lactones.	Ils possèdent une activité anti-tumorigène et anti-inflammatoire.
Composé phénolique	Acide gallique, catéchine, acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique, acide férulique, acide sinapinique, rutine, quercétine, naringénine.	Étroitement associés à l'activité antioxydante de la plante.

Chapitre 2

Certaines pathologies à traité avec l'Ashwagandha

Chapitre 2 : Certaines maladies à traiter avec l'Ashwagandha**2.1. Stress oxydant**

On peut définir le stress oxydatif comme un déséquilibre dans la cellule entre les espèces réactives à l'oxygène et les systèmes de défense anti-oxydants en faveur de l'état pro-oxydant.

2.1.1. Définition des radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, qui renferme un électron non apparié. Ce composé est extrêmement instable et peut interagir avec les molécules les plus stables afin d'apparier son électron (Tableau 1).

Le terme ERO (espèces réactives l'oxygène) englobe les radicaux libres de l'oxygène. En plus des ERO, il y a des ERN (espèces réactives nitrogénées) dont le $\text{NO}\bullet$ est le principal représentant. On le produit grâce aux NO synthases (NOS).

Le $\text{NO}\bullet$, un radical peu réactif, peut se combiner avec des radicaux libres oxygénés afin de former des molécules plus toxiques comme les peroxy-nitrites.

Tableau 2: Différentes formes des radicaux libres(Mohammedi, 2013).

Nomenclature	Structure	Principales réactions
Superoxyde	$\bullet\text{O}=\text{O}-$	Catalyseur de la réaction de Haber-WeiB par recyclage de Fe^{2+} et Cu^{+} ; formation du peroxyde d'hydrogène et peroxy-nitrite.
Peroxyde d'hydrogène	$\text{HO}=\text{OH}$	Formation du radical hydroxyle ; inactivation d'enzymes ; oxydation de biomolécules.
Radical hydroxyle	$\bullet\text{OH}$	Abstraction de l'hydrogène, production de radicaux libres et peroxydes lipidiques, oxydation des thiols.
Ozone	$-\text{O}=\text{O}^{+}=\text{O}$	Oxydation de biomolécules, spécialement celles contenant des doubles liaisons, formations des ozonides et des aldéhydes cytotoxiques.

Oxygène singulet	$\bullet\text{O}=\text{O}$	Réaction avec les doubles liaisons, formation de peroxydes, décomposition des aminoacides et nucléotides.
Oxyde nitrique	$\bullet\text{N}=\text{O}$	Formation de peroxyde nitrite, réaction avec autres radicaux.
Peroxyde nitrite	$\text{O}=\text{N}=\text{O}=\text{O}-$	Formation du radical hydroxyle, oxydation des groupements thiols et aromatiques, conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, oxydation des biomolécules.
Hypochlorite	$\text{ClO}-$	Oxydation des groupements amine et sulfure, formation de chlore.
Radical peroxy	$\text{R}=\text{O}=\text{O}\bullet$	Abstraction de l'hydrogène, formation des radicaux, décomposition de lipides et autres biomolécules.
Hydroperoxyde	$\text{R}=\text{O}=\text{OH}$	Oxydation de biomolécules, destruction de membranes biologiques.
Ions fer et cuivre	$\text{Cu}^{2+}, \text{Fe}^{3+}$	Formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton et Haber-Weib.

2.1.2. Système antioxydant

L'antioxydant désigne toute substance qui empêche ou répare les dommages oxydatifs d'une molécule ciblée. Les antioxydants sont également des substances qui sont produites naturellement par le corps ou apportées par l'alimentation afin de lutter contre les effets toxiques lors du stress oxydatif (Halliwell et Gutteridge, 2008).

L'organisme possède des systèmes antioxydants endogènes de défense contre les dommages induits par ERO / ERN (tableau 2).

Tableau 3: Principaux systèmes antioxydants endogènes (Mohammedi, 2013).

Antioxydant	Phase	Action
Superoxyde dismutase (SOD)	Hydrophile	Dismutase d'O ₂ •- en H ₂ O ₂ et O ₂ .
Catalase	Hydrophile	Dismutase d'H ₂ O ₂ en H ₂ O et O ₂ .
Glutathion peroxydases (GPx)	Hydrophile ou lipophile	Réduction de R-OOH en R-OH.
Glutathion réductase (GR)	Hydrophile	Réduction du glutathion oxydé.
Glutathion-S-transférase (GST)	Hydrophile	Conjugaison de R-OOH au GSH (→GS-OR).
Métallothionéines	Hydrophile	Fixation aux métaux de transition (= neutralisation).
Thiorédoxines	Hydrophile	Réduction de R-S-S-R en R-SH.
Glutathion (GSH)	Hydrophile	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction de R-S-S-R en R-SH. - Piégeur des radicaux libres. - Cofacteur de la GPX et GST.
Ubiquinol (Coenzyme Q10)	Lipophile	<ul style="list-style-type: none"> - Piégeage des radicaux libres. - Recyclage des tocophérols (vitamineE). - Maintient les enzymes dans leur état réduit.

2.2. Les maladies inflammatoires

L'inflammation est un mécanisme de défense physiologique de l'organisme face à une agression qui entraîne une altération tissulaire. La réponse inflammatoire a pour principale fonction d'éliminer l'agent agresseur, comme des bactéries, virus, parasite, tissus lésés du reste de l'organisme, pour permet la réparation des tissus le plus rapidement possible (Weill et Batteux, 2003).

Cette réaction, connue sous le nom d'inflammation aiguë, est bénéfique pour l'organisme, qui peut ainsi retrouver son équilibre interne. La réponse inflammatoire présente un aspect négatif lorsque celle-ci exagérée ou lorsqu'elle se prolonge et devient chronique. Dans cette situation, la réponse inflammatoire devient défavorable et nécessite un traitement médicamenteux pour la contrôler (Weill et Batteux, 2003).

2.2.1. Cellules et médiateurs de l'inflammation

Différentes cellules interviennent dans la réaction inflammatoire, cellules sanguines circulantes (basophiles, lymphocytes, monocytes, plaquettes, polynucléaire éosinophiles, polynucléaire neutrophiles) et cellules résidentes tissulaires (cellules endothéliales, fibroblastes, plasmocytes, macrophages, histiocytes, cellules apparentées) libèrent des différents médiateurs comme l'histamine, sérotonine, eicosanoïde, neuromédiateurs, molécules d'adhésions, facteur d'activation plaquettaire (PAF), protéases de destruction tissulaire, radicaux libres, cytokines. Ces derniers jouent un rôle essentiel dans l'activation de l'inflammation, sont des polypeptides solubles secrétées par des cellules activées lors de la réaction inflammatoire et peuvent être produites par différents types cellulaires, capables de transmettre des signaux entre les cellules, les cytokines clés de la réaction inflammatoire comprennent l'interleukine 6 (IL-6) ; l'interleukine 1 (IL-1), le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), l'interféron- γ (INF- γ) et le facteur de croissance transformante- β (TGF- β). Ces cytokines, IL-6 en tête, stimulent la synthèse des protéines de l'inflammation (protéine c réactive, fibrinogène, l'orosmucoïde, haptoglobine) au niveau hépatique. Elles sont également responsables des signes généraux de la réaction inflammatoire tels que fièvre, anorexie, asthénie, amaigrissement, algies diffuses (Blétry *et al.*, 2006).

2.2.2. Types d'inflammation

2.2.2.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est une réponse protectrice localisée provoquée par destruction du tissu ou par une blessure, qui sert à neutraliser à la fois l'agent nocif et le tissu blessé (Chalfant et Diegelmann, 2017). Se caractérise par les quatre signes de l'inflammation aiguë : rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur (Weill et Batteux, 2003).

L'inflammation aiguë est divisée en trois grandes phases :

- Une phase vasculaire, avec vasodilatation, transsudation plasmatique, œdème et fibrinoformation.
- Une phase cellulaire, fait d'un afflux extravasculaire interstitiel de leucocytes, principalement des polynucléaires neutrophiles, puis des cellules mononucléées dans un deuxième temps (Blétryet *al.*,2006).
- Une phase de résolution, ou de réparation, qui varie en fonction de la gravité des dommages aux tissus. Dans un premier temps, la réparation de l'endothélium est effectuée par les cellules endothéliales elles-mêmes, qui peuvent produire et remodeler les éléments de leur stroma (collagène de type I et III) ou de leur lame basale (collagène de type IV et V, laminine).D'autres cellules interviennent pour réparer le nouveau tissu si l'atteinte est plus grave et entraîne une destruction du tissu atteint (Weill et Batteux, 2003).

2.2.2.2. Inflammation chronique

Cette inflammation est définie comme une inflammation prolongée et persistante qui se caractérise principalement par la formation de nouveau tissu conjonctif. Elle peut être une continuation d'une forme aiguë ou une forme prolongée à bas degré d'intensité (Chalfant et Diegelmann, 2016).

Les symptômes initiaux sont similaires à ceux d'une inflammation aiguë, cependant les dommages tissulaires sont plus sévères et ont des conséquences fonctionnelles importantes. Il n'est pas toujours facile de déterminer si une inflammation est chronique : le critère le plus pertinent pour définir la chronicité est une durée supérieure à six semaines. L'inflammation apparaît d'emblée chronique dans de nombreux cas, avec des phénomènes de remodelage du tissu conjonctif, de destruction et de réparation dès le départ. La chronicité n'est pas toujours simple à comprendre (Weill et Batteux, 2003).

Deuxième partie
Synthèse sur les travaux
scientifiques choisis

Chapitre 3

La méthodologie suivie dans les travaux choisis

Matériel et méthode

Pour l'étude des activités antioxydant et immunomodulatrice de la plante, nous avons téléchargé 45 articles en utilisant les sites : Google Scholar, SpringerLink, Reserche Gate, Science Diercte, Pub Med. Nous avons sélectionné, parmi les articles téléchargés, 32 dont les résultats étaient clairs et facile à comparer. Le matériel et les méthodes utilisés dans ces derniers sont résumés ci-dessous. Les résultats obtenus sont comparés dans la partie résultats et discussion.

3.1. Matériel biologique

3.1.1. Échantillonnages de la plante

La plante *W.somnifera* entière, une partie d'elle ou des extraits préparés commerciales ont été achetés, ou bien collectés dans plusieurs régions (Inde, Bangladesh, Italie,Égypte, Iraq). La plante collectée a été séchée à l'ombre puis passée au four pour finir le séchage dans des conditions spécifiques (T°, temps).

3.1.2. Animaux utilisés

Les modèles animaux ont été largement utilisés pour comprendre et interpréter les mécanismes moléculaires et les approches thérapeutiques dans les maladies.

Les animaux utilisés sont les souris (*Swiss* albinos mâles et balb/c) pesant entre 20 et 35 g, les rats (albinos mâles *Wistar*, *Sprague Dawley*) pesant entre 140 et 300 g.

Les animaux ont été logés dans des cages en acier inoxydable avec un accès ad libitum à un régime alimentaire de laboratoire standard et à de l'eau dans une pièce exempte de toute contamination chimique à température contrôlée (20-25°C) et éclairée artificiellement (cycle d'obscurité/lumière de 12 heures). Les procédures animales ont été approuvées par des Comité d'éthique institutionnel.

3.1.3. Cellules utilisées

- Les macrophages des souris et les monocytes humains ont été utilisés pour l'étude de l'activité phagocytaire. Les cellules ont été cultivées dans le milieu de DMEM et le milieu RPMI 1640 respectivement, avec une supplémentation de 10% FBS, 1% de solution antibiotique-antimycotique et 1% de L-glutamine, puis conserver à 37°C et 5% CO2 dans

une atmosphère humidifiée et utilisées pour les expériences après trois passages consécutifs (Sajida et Prabhu, 2022).

- Des lymphocytes purs, utilisés dans le test de dégradation de l'ADN, ont été isolés du sang des rats (anti-coagulé et dilué avec un volume égal de PBS) à l'aide de la centrifugation sur gradient de densité (HiSep™ LSM), les lymphocytes ont été séparés sous forme d'une couche rose.

3.2. Méthodes

3.2.1. Obtention des extraits

- L'échantillon de la plante a été broyé.
- Mélangé avec différents solvants soit directement ou par extraction successive par polarité croissantes (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, acétone, éthanol, méthanol et eau) pour faire l'extraction par macération ou dans un Soxhlet.
- Récupération de surnageant après filtration. Ce processus a été répété plusieurs fois avec chaque solvant.
- Les solvants respectifs du surnageant ont été évaporés pour obtenir le rendement de différents extraits.

3.2.2. Evaluation de l'activité antioxydants

3.2.2.1. Test de piégeage du DPPH

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante dans les travaux de recherche, nous avons choisi de se concentrer sur les résultats du test de réduction du DPPH pour faciliter la comparaison des résultats.

Le test DPPH mesure l'activité antioxydante des composés capables de transférer des atomes d'hydrogène. Le DPPH de couleur violette perd sa coloration quand il se lie avec des substances antioxydantes (AOXH), et se réduit en un composé jaune DPPHH (figure 3), Cette réaction est rapide et proportionnelle à la capacité antioxydante de l'échantillon.

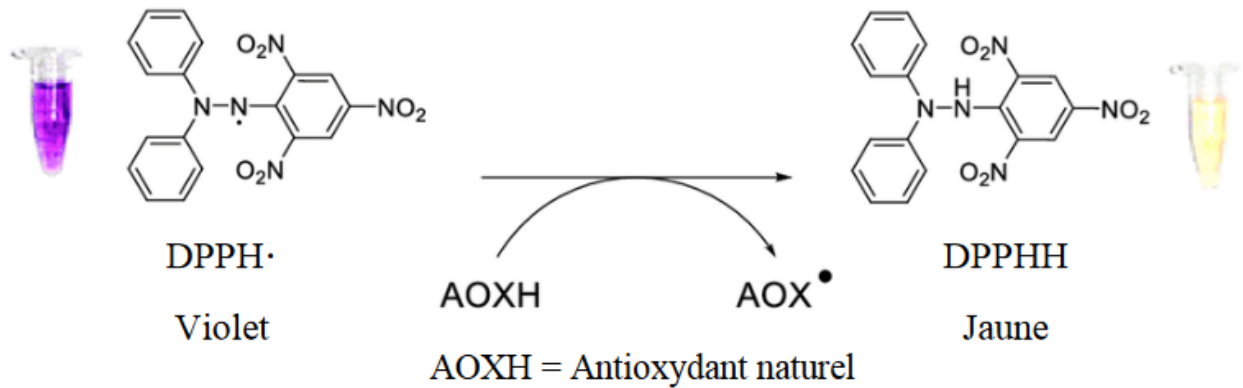


Figure 3: Réaction du radical libre DPPH· avec un antioxydant (Arce-Amezquita *et al.*, 2019).

Selon méthode de Blois (1985), qui a été utilisée par la plupart des articles avec des modifications. Le test est basé sur la mesure de la diminution de l'absorbance du DPPH (515-518 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre, suite à l'incubation avec des concentrations différentes des extraits de la plante à température ambiante 37° pendant 20-45 min.

3.2.2.2. Inhibition de l'oxydation des protéines

L'effet inhibiteur de la plante sur l'oxydation des protéines est mesuré par la protection de la BSA (5µg/ml) contre les dommages induits par d'AAPH (20mM), observée sur Gel d'électrophorèse. L'AAPH est un composé oxydant qui peut générer des radicaux libres (OH, H₂O₂,...), et provoquer dégradation des protéines par plusieurs mécanismes (Mayo *et al.*, 2003).

3.2.2.3. Inhibition de la dégradation de l'ADN

L'inhibition de l'endommagement de l'ADN des lymphocytes induite par le H₂O₂, a été évalués au microscope à fluorescence (microscope Olympus, Allemagne) avant et après l'ajout l'extrait de la plante, en mesurant le pourcentage de fluorescence dans la queue (appelé "queue cométaire"), qui correspond à la quantité d'ADN fragmenté à l'aide du logiciel d'imagerie RS. les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de la longueur de la queue (Singh *et al.*, 1988).

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Longueur de la queue témoin} - \text{Longueur de la queue avec extrait})}{\text{Longueur de la queue témoin}} \times 100$$

3.2.2.4. Inhibition de la xanthine oxydase

L'évaluation de l'efficacité inhibitrice de différents extraits d'Ashwagandha sur l'activité de l'enzyme XO, génératrice de radicaux libres, est basée sur une réaction colorimétrique *in vitro*, par dosage la formation de l'acide urique par la XO à partir la xanthine (Hashimoto, 1974).

3.2.2.5. Effet sur l'équilibre oxydatif

a. Induction du stress oxydant

L'effet de la plante sur le stress oxydant a été testé sur des animaux normaux ou après induction de ce dernier, par H₂O₂, plomb, la MPTP, la cyperméthrine, l'acide oléique, ou par un choc électrique.

- Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le H₂O₂ peut devenir toxique avec des concentrations élevées et endommager les cellules, notamment les protéines par oxydation des chaînes latérales ou les résidus des acides aminés (Rao *et al.*, 1997).

- Nitrate de Plomb (Pb(NO₃)₂)

L'injection intrapéritonéale des rats par du nitrate de plomb (40mg/Kg/j), pendant 15j provoque une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Pourrut, 2008).

- Choc électrique

Exposer des animaux à un choc électrique (2 mA) une fois par jour, à travers un sol grillagé à quelques secondes séparées, pendant une heure, induit un stress oxydant (Conti *et al.*, 1990).

- MPTP

L'administration de MPTP (20 mg/kg/j) aux souris par voie intra-péritonéale, pendant 4j, cause une perte neuronale (Langston et Ballard, 1996) qui est observée dans le cerveau des patients atteints de maladie de Parkinson (Gasser, 2007), et peut inhiber le complexe mitochondrial I

qui est associée avec l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), ce qui endommage les macromolécules, notamment les protéines et les lipides (Saggo *et al.*, 1989).

- **Cyperméthrine**

L'administration du cyperméthrine (pesticides toxique) (15 mg/kg/j) aux souris par voie orale, pendant 28 jours, provoque une hypothyroïdie et peut être responsable de l'induction du stress oxydatif par génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO), et la perturbation endocrinienne en interférant avec différentes voies dans certains organismes (Üner *et al.*, 2001).

- **Acide oléique**

L'injection d'une dose unique intraveineuse de l'acide oléique aux rats (50 µl/kg), pendant deux semaines, induit des lésions pulmonaires aiguës (ALI) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (Gonçalves-de-Albuquerque *et al.*, 2015), et peut générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et activer les cellules inflammatoires génèrent des ERO (Les neutrophiles), conduisant à des dommages cellulaires.

b. Dosage des paramètres du stress antioxydant

Après provocation d'un stress, différents paramètres ont été évalués dans différent organe des animaux après sacrifiés: les régions cérébrales (l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortex), desorganes périphériques (le foie, les reins, les poumons, les glandes thyroïdes).

L'activité de la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR), la glutathion-S-transférase (GST), la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), le taux de glutathion, le taux du MDA indicateur de la peroxydation lipidique (LPO), sont des indicateurs de la capacité d'une cellule ou d'un organisme à se protéger du stress oxydatif. Ces paramètres peuvent être mesurés par différentes méthodes, dont les plus courantes sont suivantes:

L'activité catalase (CAT) a été mesurée en suivant la décomposition de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par spectrophotométrie à 240 nm, en se basant sur la méthode décrite par Aebi (1984).

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) a été évaluée par son effet inhibiteur de la formation de nitrites à partir d'hydroxyl ammonium en présence de générateurs du radical superoxyde (O_2^-), l'absorbance a été lue à 530 nm (Nishikimi *et al.*, 1972).

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par une méthode modifiée de Paglia et Valentine (1976). L'azoture de sodium a été ajouté pour inhiber l'activité catalase résiduelle et les valeurs de test ont été soustraites des valeurs témoins (sans échantillon), Les substrats utilisés sont le H_2O_2 , le GSH et le NADPH. La consommation de NADPH est évaluée par spectrophotométrie à 340 nm.

L'activité spécifique de la glutathion-S-transférase (GST) a été mesurée selon la méthode de Habig *et al.* (1974). Les deux substrats 1-chloro-2, 4-dinitrobenzène (CDNB), comme second substrat standard, et du glutathion réduit (GSH) sont utilisés. La formation du CDBN-GSH est mesurée par l'absorbance à 340 nm.

Le dosage de l'activité de la G6PDH est réalisé par différentes méthodes, la plus courante est la méthode de Beutler *et al.* (1957). Cette méthode utilise les deux substrats le NADPH et le glucose-6-phosphate (G6P) et mesure la consommation de NADPH à 340 nm.

L'activité de la glutathion réductase (GR) a été déterminée par spectrophotométrie, selon la méthode de Carlberg et Mannervik (1985). Basée sur la mesure du NADPH à 340 nm, lors de la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) par la GR.

Le taux de glutathion réduit (GSH) a été mesuré selon la méthode de Beutler *et al.* (1963). Par la réaction de réduction de l'acide 5,50-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le glutathion et la production d'une couleur jaune, l'absorbance est mesurée à 405 nm.

La peroxydation lipidique a été mesurée par la réaction de thiobarbiturique (TBA) selon la méthode d'Ohkawa *et al.* (1979). Cette méthode repose sur la réaction du TBA avec des produits de peroxydation lipidique, tels que le malon-dialdéhyde (MDA), pour produire un pigment rouge, un pH optimal de 4,0 doit être utilisé pour obtenir des résultats précis.

3.2.3. Etudes de l'activité immunomodulatrice

3.2.3.1. Effet stimulant du système immunitaire

L'effet des extraits de la plante a été étudié sur le système immunitaire normal des animaux ou affaibli par différentes substances chimiques : cyclophosphamide (un agent alkylant relativement sélectif du tissu lymphoïde), azathioprine (inhibe la synthèse de l'ADN et possède une fonction anti-inflammatoire grâce à son activité myélosuppressive), prednisolone (un glucocorticoïde, particulièrement responsable d'une suppression des défenses cellulaires spécifiques et non spécifiques) et par les nanoparticules de ZnO (pourraient affecter la fonctionnalité des macrophages en diminuant la production d'oxyde nitrique et la phagocytose tout en augmentant la réponse inflammatoire) (Sajida et Prabhu, 2022). Après l'exposition des animaux aux différentes substances, l'effet de la plante est évalué sur différents paramètres :

a. Effet sur les paramètres hématologique

Après l'administration des extraits de la plante avec différent concentration pendant différent période, le taux de l'hémoglobine et le nombre des globules rouges, globules blancs et des plaquettes dans le sang ont été mesurés. En plus la densité cellulaire et les cellules positives à l' α -estérase (lymphocyte) ont été mesurés dans la moelle osseuse des fémurs des souris (Ziauddin *et al.*, 1996 ; Davis et Kuttan, 2000).

Le comptage des cellules et des plaquettes est réalisé en utilisant sur un automate hémocytomètre, alors que la méthode à la cyanméthémoglobine est utilisée pour le taux de l'hémoglobine et la méthode Bancroft et Cook pour les cellules positives à l' α -estérase.

b. Effet sur la viabilité et l'activité des macrophages

- Viabilité des macrophages

L'effet des extraits de *W. somnifera* (L.) Dunal sur la viabilité cellulaire des macrophages a été évalué par le test MTT, basé sur la capacité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes de réduire le MTT de couleur jaune en cristaux bleus de formazan (Trabelsi *et al.*, 2010).

Après le traitement des macrophages par différent concentration des extraits de la plante, ils ont été incubés avec le réactif MTT pendant 4 h à 37 °C, l'absorbance a été lue à 570 nm à l'aide

d'un lecteur de microplaques multimode (FluoSTAR Omega, BMG Labtech). La viabilité a été exprimée en pourcentage par rapport au contrôle non traité (Sajida et Prabhu, 2022).

- **Activité phagocytaire**

Après le traitement avec les extraits de la plante, les macrophages ont été isolés de la cavité intrapéritonéale après stimulation avec LPS, l'effet des extraits sur l'activité phagocytaire et pinocytaire des macrophages est testé comme suite :

- **Test de l'activité phagocytaire par piégeage d'oxyde nitrique**

L'oxyde nitrique est utilisé comme indice de l'activité phagocytaire, après le traitement du macrophage avec différentes concentrations de l'extrait de la plante, le surnageant de culture a été collecté pour estimer les niveaux d'oxyde nitrique à l'aide du réactif de Griess. Ensuite l'absorbance a été enregistrée à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode (FluoStar Omega, BMG Labtech, Allemagne). La présence de nitrite dans les milieux de culture cellulaire a été évaluée à partir de la courbe standard du nitrite de sodium (Sajida et Prabhu, 2022).

- **Test de l'activité phagocytaire par réduction du NBT**

La capacité des cellules immunitaires à phagocyter est évaluée en mesurant la réduction du NBT (nitrobleu tétrazolium). Les anions superoxydes issus de la production intracellulaire réduisent le NBT pour former du formazan, indiquant l'activité phagocytaire des cellules. Les macrophages et monocytes humains traités avec l'extrait de la plante ont été incubés avec une solution de NBT pendant 1h. L'intensité de la couleur formée a été mesurée à 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (FluoSTAR Omega, BMG Labtech) (Sajida et Prabhu, 2022).

- **Test de l'activité phagocytaire par la phagocytose des globules rouges du mouton ou de la levure *Saccharomyces cerevisiae***

L'activité phagocytaire des macrophages isolés, après un traitement par les extraits de la plante ou avec un composé majeur Withaferin A, a été déterminée après incubation avec des globules rouges du mouton opsonisés ou avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* pendant 1 h à 37°C. La phagocytose est observée, après coloration avec le colorant May Grünwald, à immersion dans l'huile (grossissement de 1000×) avec un microscope (Olympus Optical Co. Ltd, Japon). Le

pourcentage de phagocytose a été calculée en comparaison macrophages isolés du contrôle non traité (Kumar *et al.*, 2019).

- Test de l'activité pinocytaire

L'activité pinocytaire a été testé par le taux d'absorption du colorant rouge neutre, les macrophages et les monocytes humaine, traités avec les extraits de *W. somnifera*, ont été incubées avec une solution de rouge neutre à 0,1 % pendant 2 h, l'absorption du colorant a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (FluoSTAR Omega, BMG Labtech) (Sajida et Prabhu, 2022). Le pourcentage d'absorption du colorant a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ d'absorption du colorant} : \frac{\text{Abs Échantillon}}{\text{Abs Contrôle}} \times 100$$

c. Effet sur la réponse à l'introduction d'un Ag

Après immunisation des souris par des globules rouges humain (Ziauddin *et al.*, 1996) ou de mouton (Davis et Kuttan, 2000) ou l'infection par *leishmania donovani* (Sachdeva *et al.*, 2013), l'effet des extraits d'Ashwaghandha sur la réponse immunitaire générée contre ces l'antigènes a été évalué par le dosage du titre d'anticorps (IgG-1 et IgG-2), et des cytokines (IL-4, d'IL-10, IL-2 et IFN- γ).

3.2.3.2. Effet sur l'inflammation aigue

Une inflammation aigue est provoquée par l'injection de l'ovalbumine, l'adjuvant complet de Freund (ACF) ou les globules rouges de mouton (GRM) dans la patte postérieure des rats ou des souris. L'effet des extraits de *W. somnifera* sur l'œdème obtenue par ce type d'inflammation a été évalué en mesurant le volume du gonflement par micromètre (Agarwal *et al.*, 1999 ; Davis et Kuttan, 2000 ; Varalakshmi, 2006).

3.2.3.3. Effet sur l'inflammation chronique

Un modèle d'inflammation chronique est induit chez les rats par l'injection du collagène bovin de type II (200 $\mu\text{g}/\text{rat}$), les anticorps produits vont attaquer l'articulation produisant une inflammation chronique semblable à l'arthrite (Trentham *et al.*, 1977). L'effet du traitement par les extraits de la plante est évalué sur :

- Le score arthritique (nombre des articulations touchées).

- Les niveaux des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6, des cytokines anti-inflammatoires IL-10, du facteur de transcription NF- κ B, de la métalloprotéase MMP-8 ont été estimés par des kit Elisa standard et à l'aide d'un lecteur de microplaques. Le niveau de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) a été examiné par qPCR.

- L'activité des enzymes sériques impliquées dans le stress oxydant (SOD, CAT, GPx) a été mesurée à l'aide de kits standard (achetés auprès de Bioassay Systems, Hayward, CA, USA).

- Des coups histologiques des articulations ont été réalisés et la présence de cellules CD8+ dans les tissus articulaires a été analysée par coloration immunohistochimique par méthode de liaison à la streptavidine (LSAB) (Khan *et al.*, 2019).

3.2.3.4. Effet sur la dénaturation des protéines

La dénaturation des protéines est considérée comme marqueur de l'inflammation. Le test *in vitro* utilise une température élevée (72 °C) pour dénaturer les protéines (BSA avec 2% a pH 6,4) et évaluer l'effet inhibiteur des extraits de *W.somnifera* avec différentes concentrations sur cette dénaturation induite par la chaleur (Sajida et Prabhu, 2022). La turbidité a été mesurée à 660 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode (FluoSTAR Omega, BMG Labtech) et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de la dénaturation des protéines} : \frac{\text{Abs Control} - \text{Abs Sample}}{\text{Abs Control}} \times 100$$

3.2.3.5. Effet sur les enzymes impliquées dans l'inflammation

Les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) et la lipoxygénase (5-LOX) sont des enzymes impliqués dans la réponse inflammatoire, ces enzymes transforment l'acide arachidonique en prostaglandines, médiateur dans l'inflammation. L'effet inhibiteur des extraits de la plante *in vitro* sur les enzymes COX-1/COX-2 a été évalué à l'aide d'un kit de test d'inhibition des COX et l'effet inhibiteur sur 5-LOX a été calculé par une méthode polarographie connectée à une électrode à oxygène de Clark (Nile *et al.*, 2022).

Chapitre 4

Les résultats et discussion des travaux choisis

4.1. Activité Anti-oxydante

Vue la richesse de l'Ashwagandha de différents métabolites secondaires à propriétés antioxydantes (polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, withanolides, sucres réducteurs...etc.), elle pourrait être une source précieuse de composés antioxydants naturels pour le développement de thérapies contre diverses maladies liées au stress oxydatif.

Différents tests sont utilisés dans des travaux de recherche pour étudier l'activité antioxydante de cette plante : piégeage du radical DPPH, décoloration du radical ABTS, réduction du fer ferrique (FRAP), élimination des radicaux hydroxyles, élimination de l'oxygène singulet, dégradation du peroxyde d'hydrogène, piégeage de l'anion superoxyde, chélation des métaux, élimination de l'oxyde nitrique, élimination des anions peroxydite, inhibition de la peroxydation lipidique...etc. Nous avons choisi de se concentrer sur les résultats du test de réduction du DPPH pour faciliter la comparaison des résultats.

Les deux parties les plus étudiées de la plante sont les feuilles et les racines, les résultats obtenus dans ces études sont parfois contradictoires et montrent un pouvoir antioxydant de la plante plus-ou-moins élevé. Pal *et al.* (2015) ont essayé de séparer des groupes distincts de composés antioxydants présents dans les feuilles de la plante en utilisant une extraction séquentielle avec des solvants à polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, acétone, méthanol et eau). Les résultats montrent que les composés polaires obtenus par le méthanol et l'eau sont les plus efficaces avec des IC₅₀ respectifs de 197 et 231 µg/ml, alors que l'IC₅₀ des composés apolaires dans l'extrait hexanique est de 700 µg/ml. Les résultats de Rajangam *et al.* (2009) et de Sharma *et al.* (2012) confirment l'efficacité de l'extrait méthanoïque, avec une IC₅₀ de 174 µg/ml et une inhibition du DPPH de 27% avec la concentration 100 µg/ml, respectivement.

Par contre, il existe une contradiction avec les résultats de Scartezini *et al.* (2007) qui ont trouvé avec l'extrait méthanoïque des feuilles de la plante cultivé en Inde et en Italie des valeurs d'IC₅₀ dix fois plus élevées (3280 et 2670 µg/ml respectivement) et les résultats de Dhabian et Jasim (2021) qui ont trouvé une valeur trois fois plus élevée avec l'extrait aqueux (701 µg/ml).

Concernant les racines, l'extrait obtenu dans l'étude de Yadav et Rai (2018) avec l'acétone, l'éthanol et le méthanol (trois solvants à polarité moyenne) ont donné une inhibition similaire proche 80 % avec une concentration de 2 mg/ml, alors que l'extrait aqueux (polarité élevée) a

donné une inhibition plus faible avec la même concentration (35%). Les résultats de Yadava *et al.* (2011) sont cohérents avec le travail précédent, mais avec la moitié de la concentration utilisée (1mg/ml), les extraits obtenus par l'acétone et le méthanol ont donné une inhibition de 80 à 85%. En plus les extraits obtenus par le chloroforme et l'acétate d'éthyle ont donné une inhibition de 90% et 55%, respectivement.

Dans le travail de Shahriar *et al.* (2013), l'extraction a été réalisée de manière séquentielle en utilisant des solvants polarité croissante. Les extraits chloroformique, méthanoïque et éthanoïque, avec la concentration de 0.25 mg/ml, ont donné une inhibition de 75, 54 et 40%, respectivement, c'est-à-dire supérieur de 4 à 8 fois aux travaux précédents. Deux autres extraits obtenus par des solvants apolaires (éther de pétrole et hexane) ont donné aussi une inhibition avec la même concentration (63 et 30%).

D'autres travaux ont utilisé aussi des solvants de polarité moyenne pour l'extraction et ont exprimé les résultats en IC50. Ces extraits se sont montrés plus efficaces avec des valeurs IC50 faible dans l'intervalle de 60 à 380 µg/ml pour l'extrait méthanoïque, de 40 à 120 µg/ml pour l'extrait éthanoïque et de 100 à 186 µg/ml pour l'extrait aqueux (Jain et Agrawal, 2008 ; Rajangam *et al.*, 2009 ; Baldi *et al.*, 2010 ; Pal *et al.*, 2011 ; Nile *et al.*, 2022). Ces différences dans les valeurs obtenus peuvent être principalement expliquées par la façon d'exprimer les résultats dans les différents travaux, certains utilisent la concentration finale (réactionnelle) et d'autre la concentration initiale sans l'indiquer avec clarté rendant la comparaison difficile. D'autres facteurs peuvent aussi être incriminés ; la méthode d'extraction, le solvant utilisé, les conditions de croissance de la plante, le cultivar utilisé.

Dans l'étude de Pal *et al.* (2017), l'inhibition *in vitro* de l'oxydation des protéines par l'extrait méthanoïque des racines a été évaluée après initiation de l'oxydation de la BSA par l'AAPH. Les résultats démontrent qu'une concentration de 0.150 mg/ml de l'extrait inhibition presque complètement cette oxydation. La même équipe a provoqué la dégradation de l'ADN par H2O2 dans les lymphocytes de rat, la présence du même extrait (0.05 mg/ml) a inhibé cette dégradation de 88%.

Différentes études se sont intéressées à l'effet de la *Withania somnifera* sur les enzymes impliqués dans le stress oxydant (superoxyde dismutase (SOD), Catalase (CAT), glutathion

peroxydase (GPx), Glutathion-S-transférase (GST), glutathion réductase (GR), glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), xanthine oxydase (XO)) et le taux de glutathion réduit (GSH) marqueur antioxydants, et Malon-dialdéhyde (MDA) marqueur de ce stress.

L'enzyme XO est responsable des dommages oxydatifs à l'origine de nombreuses pathologies, telles que l'arthrite goutteuse, l'hyperuricémie, l'athérosclérose, l'hépatite, la carcinogénèse, les lésions de l'endothélium vasculaire et le vieillissement (Baltas *et al.*, 2016). Les résultats de Nile *et al.* (2019) montrent que différents extraits d'un mélange de feuilles et racines d'ashwagandha avaient de puissants effets inhibiteurs *in vitro* sur la xanthine oxydase. L'extrait de méthanoïque présent le plus d'effets inhibiteurs par rapport à l'éthanoïque et l'aqueux avec des valeurs respectives de 3.45, 1.85 et 0.98 mg EqAP/g (équivalent Allopurinol/g d'extrait). La withaferine A purifié de la plante a montré un bon effet inhibiteur sur l'enzyme, avec une IC50 de 130 µg/ml. Les résultats d'Akram *et al.* (2014) avec l'extrait éthanoïque confirment cet effet inhibiteur avec une valeur IC50 à 95 µg/ml.

Certaines études *in vivo* montrent que les extraits de *Withania somnifera* peuvent améliorer les systèmes enzymatiques antioxydants et réduire les marqueurs de l'oxydation.

Dans le travail de Panda et Kar (1997), l'administration de la poudre de racine d'Ashwagandha aux souris pendant 30 jours par voie orale (1,4 g/kg) a produit une diminution significative du MDA, marqueur de la peroxydation lipidique, dans le foie par 47.9%, une augmentation de la SOD par 60% et de la CAT par 35%. Les résultats de Namdev *et al.* (2023) confirment l'efficacité de la plante, l'extrait méthanoïque de la plante entière (200 mg/kg), administré pendant 28 jours aux souris, a provoqué une augmentation de la SOD et la CAT par 10% dans homogénat de tissus thyroïdiens, aucun changement significatif n'a été observé sur le taux du MDA et la GSH et l'activité de la GST et GR. L'étude clinique effectuée par Kuchewar *et al.* (2014) incluant neuf volontaires sains n'étaient pas concluante. La pris d'une dose journalière de 1g de l'extrait aqueux des racines de la plante pendant 6 mois n'a m montré aucune amélioration significative dans le taux du MDA et l'activité de la SOD.

L'exposition des animaux à l'H₂O₂, le plomb ou à un choc électrique provoque une perturbation du délicat équilibre pro-oxydant/antioxydant qui existe dans les cellules de ces derniers. Les résultats de Pal *et al.* (2017), ont montré que le traitement des lymphocytes des rats

pendant 30 minutes avec H₂O₂ (100µM), a diminué l'activités des cinq des enzymes antioxydants, à savoir SOD par 50%, CAT, GPx, GR et G6PDH par 40%, et a diminué la teneur en glutathion et augmenté celle de l'MDA, par 30% et 40%, respectivement, par rapport au groupe témoin normal. Le prétraitement par l'extrait méthanoïque des racines (0,05 mg/ml) a restauré les valeurs de ces différents paramètres les rapprochant de celles du témoin.

Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Kumar *et al.* (2014) qui ont provoqué le stress oxydant chez les rats par l'injection intrapéritonéale du nitrate de plomb pendant 15 jours (40mg/Kg/j). Ce stress a provoqué une diminution de l'activité de SOD et CAT par 37,6% et 49,2% respectivement, et une augmentation du taux du MDA par 107% dans différents organes (des régions cérébrales : l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortex, des organes périphériques tels que le foie et les reins). La pris orale de l'extrait aqueux des feuilles durant la même période (1g/kg/j) a inversé ces changements.

Un choc électrique journalier pendant 21 jours (1h, 2mA) a été utilisé pour la provocation du stress chez les rats dans le travail de Bhattacharya *et al.* (2001). Une diminution a été observé dans l'activité de CAT (47,2 %) et de GPx (66,7%) au niveaux le cortex frontal. Mais, contrairement aux autres travaux, l'activité de la SOD dans cette partie du corps a augmenté par 79,3%, la valeur de MDA a augmenté de 67,6% par rapport au contrôle. Le traitement pendant la même période, avec des doses 10, 20 et 50 mg/kgde l'extrait éthaoïque des racines, riches en sitoindosides (VII à X) et de la withaférine A de 28 à 30 %, a inversé ces changements, en normalisant l'activité de la SOD, CAT et GPX et le taux du MDA.

D'autres études ont utilisé des modèles de maladies liée au stress oxydante, tels que la maladie de Parkinson provoqué par la MPTP (RajaSankar *et al.*, 2009), l'hypothyroïdie provoqué par la cyperméthrine (Namdev *et al.*, 2023) et l'insuffisance respiratoire provoqué par l'acide oléique (Yazar, 2023).

Les résultats de RajaSankar *et al.* (2009), montrent que l'administration MPTP (20 mg/kg/j) aux souris par voie intrapéritonéale pendant 4 jours provoque des niveaux accrus d'activités SOD et CAT et le taux du MDA et une réduction de l'activités de GPx et le taux GSH dans le mésencéphale et le striatum par rapport au cerveau témoin. Le traitement avec l'extrait des feuilles de la plante pendant 7 jours (100 mg/kg/j) a diminué de manière significative l'activité de SOD

(25-30%), de CAT (20-25%) et le taux du MDA (20-50%) dans le mésencéphale et dans le striatum. L'activité de GPx et le taux GSH ont augmenté par 12 et 25%, respectivement.

L'hypothyroïdie provoquée par l'administration de la cyperméthrine aux souris pendant 28 jours (15 mg/kg/j), dans le travail de Namdev *et al.* (2023), est associée avec une augmentation significative de la concentration du MDA (125%) et une diminution de l'activité de la SOD (55.5%), la CAT (45%), la GST (45%) et la GR (57%), et le taux du GSH (60%) dans la glande thyroïde. Le traitement co-administratif avec l'extrait méthanoïque de la plante entière (200mg/kg) a diminué de manière significative le taux du MDA (40%) et augmenté les activités des enzymes SOD (27%), la CAT (46%), la GST (88%) et la GR (31%) et le taux du GSH (16%) par rapport au groupe d'hypothyroïdie.

Yazar (2023) a provoqué l'insuffisance respiratoire par injection intraveineuse de l'acide oléique (50 µl/kg), ce qui a conduit à une réduction aux niveaux de SOD et de GSH dans les poumons par 28% et 36%. Le prétraitement pendant 15 jours avec l'administration orale de l'extrait des racines l'Ashwagandha (500 mg/kg/j) a augmenté les niveaux des deux enzymes par 25% et 40%, respectivement.

4.2. Activité immunomodulatrice

Différents travaux chez les animaux ont montré la capacité des extraits de la plante à améliorer les performances du système immunitaire et à lutter contre les maladies inflammatoires.

Les résultats de Ziauddin *et al.* (1996) montrent que la prise quotidienne par des souris sains d'une dose de 100 mg/Kg de l'extrait des racines de la plante pendant 15 jours améliore significativement l'activité de la moelle osseuse par rapport aux témoins en augmentant le taux de l'hémoglobine et le nombre des globules rouges et des plaquettes dans le sang, mais pas d'amélioration du nombre des globules blancs. Ce dernier paramètre a, par contre, été significativement amélioré dans le travail de Davis et Kuttan (2000) qui ont obtenu, après traitement des souris avec une dose plus élevée de l'extrait méthanoïque (500 mg/Kg), une amélioration du nombre des GB dans le sang atteignant son maximum après 10 jour (17000 cellules/mm³) par rapport au témoin (8000 cellules/mm³). Le comptage du nombre des cellules de la moelle osseuse du fémur après 5 jours du même traitement a montré une augmentation de la population cellulaire (27 X 10⁶ cellule/fémur) par rapport au témoin (15 X 10⁶ cellule/fémur)

confirmant la stimulation de la moelle osseuse. L'examen d'un frottis de cette dernière a montré une augmentation des cellules positives à l' α -estérase témoin de la richesse en lymphocyte (Müller *et al.*, 1981).

En plus de l'augmentation du nombre des cellules, les racines de la plante ont montré aussi une capacité à activer les cellules immunitaires. Sajida et Prabhu (2022) ont étudié l'effet de différentes concentrations de l'extrait éthanoïque des racines de la plante sur l'activation des macrophages de souris et des monocytes humains. Après 24 h de traitement avec l'extrait, les deux cellules ont présenté une hypertrophie dose-dépendante indiquant leur activation. Le même traitement a augmenté d'une manière dose-dépendante l'activité phagocytaire des deux cellules, en augmentant leur capacité à synthétiser l'oxyde nitrique, et l'activité pinocytaire mesurée par absorption du colorant rouge neutre.

La stimulation du système immunitaire s'est répercutée sur sa capacité à répondre à l'introduction d'un antigène étranger. L'immunisation par des globules rouges humains (Ziauddin *et al.*, 1996) ou du mouton (Davis et Kuttan, 2000) des souris saines traitées par l'extrait des racines de la plante a généré un taux d'anticorps plus élevé par rapport aux souris immunisées sans traitement par l'extrait. L'activité phagocytaire des macrophages chez ces animaux a aussi augmenté ; 38% des macrophages récupérés de la cavité péritonéale des animaux traités ont phagocytés des Gr de mouton opsonisés, alors que le pourcentage ne dépasse pas 16% chez les animaux non traités.

L'extrait de la plante a montré une capacité à orienter le type de la réponse immunitaire Th2/Th1. Les résultats de Sachdeva *et al.* (2013) montrent que les souris infectées par *leishmania donovani* (est un parasite intracellulaire infectant les cellules phagocytaires notamment les macrophages (Marine, 2022)) pendant 30 jours ont montré une augmentation maximale des niveaux d'IgG-1, IL-4 et d'IL-10, alors que les niveaux de l'IgG-2, IFN- γ et IL-2 étaient faibles suggérant la génération d'une réponse de type Th2. Après 30 jours post-infection, le traitement par voie orale avec 350 mg/kg de l'extrait de plante entière dissous dans de l'eau distillée pendant 15 jours a inversé les taux de ces marqueurs en faveur d'une réponse immunitaire de type Th1.

Les travaux sur les animaux dont le système immunitaire a été affaibli par traitement médicamenteux ont montré la capacité de la plante à renforcer ce dernier. La myélosuppression chez les souris induites dans le travail de Ziauddin *et al.* (1996) par des médicaments

immunosuppresseurs cyclophosphamide (3 mg/kg), azathioprine (3 mg/kg) ou prednisolone (5 mg/kg) pendant 15 jours provoque une diminution de la concentration en hémoglobine, du nombre de globules rouges, du nombre de plaquettes et le nombre total de globules blancs. Le traitement combiné d'un médicament myélosuppresseur et de 100 mg/kg de l'extrait des racines d'Ashwagandha a entraîné une augmentation significative de la concentration d'hémoglobine, du nombre de globules rouges, du nombre de globules blancs et du nombre de plaquettes restaurant ainsi de l'activité de la moelle osseuse.

L'effet immunosuppresseur des nanoparticules de l'oxyde de zinc (NPZnO) a aussi été inversé par la plante. Les résultats de Kumar *et al.* (2019) ont montré que l'administration du NPZnO (50 mg/kg/jour) par voie orale chez les souris pendant 28 jours réduit la viabilité des macrophages péritonéaux, obtenus après stimulation par LPS, de 35%. Le cotraitement de NPZnO avec l'extrait éthanoïque de la plante (140 mg/Kg) ou le composé majeur Withaferine A (2,0 mg/kg) a donné une amélioration de la viabilité de ces cellules de 45 et 70%, respectivement. En plus de la viabilité, le traitement a restauré la capacité phagocytaire des cellules représenté par la synthèse de l'oxyde nitrique qui a été réduite trois fois par le traitement avec le NPZnO seul. Cet effet bénéfique a été confirmée par le test de phagocytose des levures *Saccharomyces cerevisiae*, l'administration de NPZnO a réduit la phagocytose des levures par les macrophages de 50%, alors que le traitement conjoint de ce dernier avec l'extrait de la plante ou Withaferin A a amélioré la phagocytose 2 ou 1,5 fois, respectivement.

En plus du renforcement du système immunitaire, la plante a montré sa capacité à réduire l'inflammation induite expérimentalement chez les animaux.

Agarwal *et al.* (1999) ont étudié l'effet protecteur de deux extraits commerciaux de la plante (WST et WS2) sur l'hypersensibilité immunitaire médiée par les anticorps. L'injection sous cutanée de l'ovalbumine dans la région plantaire de la patte postérieure des souris, immunisées par le même antigène, provoque un œdème par rapport à la patte arrière témoin ayant reçu une solution saline normale. Le traitement préventif par voie orale pendant 10 jours avec l'extrait WST (1000 mg/kg) a inhibé la formation de l'œdème par 37%, alors que l'extrait WS2 (300 mg/kg) a donné 44% d'inhibition. Cet effet est confirmé par le travail de Rasool et Varalakshmi (2006) où l'œdème a été provoqué chez les rats par l'injection de l'adjuvant complet de Freund (ACF). L'administration orale de 1000mg/Kg de la poudre des racines de la plante a réduit l'œdème de

55% et l'activité du complément de 87% par rapport au groupe dont l'inflammation a été provoqué sans traitement.

D'autre part, l'effet sur l'hypersensibilité immunitaire à médiation cellulaire a été étudié sur les souris immunisés par des globules rouges de mouton (GRM). Les résultats de Davis et Kuttan (2000) montrent que l'injection des GRM dans la région plantaire de la patte postérieure gauche a augmenté l'épaisseur de la patte et que le traitement préventif par l'extrait méthanoïque des racines de *W.somnifera* (500 mg/Kg) pendant 5 jours a diminué l'œdème de la patte de 95%. Des résultats similaires ont été obtenus par Rasool et Varalakshmi (2006), le traitement préventif, avec la poudre des racines (1000 mg/Kg), des rats stimulés de la même manière a réduit l'œdème de 25%.

L'effet de la plante sur l'inflammation chronique a été étudié par Khan *et al.* (2019). L'arthrite a été induite chez les rats par immunisation avec le collagène bovin de type II (200 µg/rat) avec une injection rappel avec la même dose après 14 jours. Le traitement curatif à partir du 25^{ème} jour avec l'extrait aqueux des racines (300 mg/kg/j) a provoqué une diminution de l'inflammation et de l'œdème de la patte et de la cheville chez les rats traité en comparaison avec les rats arthritique non traité. Les niveaux de cytokines pro-inflammatoires TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 ont diminué par 45, 50, 33% respectivement, alors que la cytokine antiinflammatoire IL-10 a augmenté de 65%. Les niveaux du facteur de transcription NF- κ B, de la métalloprotéase MMP-8 et de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) dans l'homogénat tissulaire ont été aussi réduits significativement de 52, 51 et 33%, respectivement. En plus des marqueurs inflammatoires, les enzymes sériques impliquées dans le stress oxydant ont été aussi affecté. Le traitement a provoqué une augmentation de l'activité de la SOD de 71% et une diminution de l'activité de GPx et CAT par 64% et 72% respectivement. Cet effet antiinflammatoire c'est répercuté par une amélioration histologique avec réduction du nombre des cellules CD8⁺ infiltrantes.

Des études *in vitro* ont essayé de comprendre l'origine de l'effet antiinflammatoire observé. Nile *et al.* (2022) ont étudié l'effet inhibiteur des extraits de la plante sur les enzymes impliqués dans le métabolisme inflammatoire, cyclooxygénases-1 et -2 (COX-1/COX-2) et la lipoxigénase (5-LOX), ces enzymes transforment les écosanoïdes de l'acide arachidonique en prostaglandines, médiateur de l'inflammation. Les deux extraits des racines utilisés, éthanoïque (EE) et aqueux (EW), ont montré une inhibition significative des enzymes COX-1, COX-2 et 5-LOX, avec des

valeurs IC50 de 18,33 ; 35,61 et 15,86 $\mu\text{g/ml}$, respectivement pour EE et des valeurs IC50 de 25,18 ; 48,12 et 22,97 $\mu\text{g/ml}$, respectivement pour EW.

La protection des protéines contre la dénaturation par l'augmentation de la température *in vitro* est utilisée comme indice du pouvoir antiinflammatoire. L'extrait éthanoïque des racines de la plante (25 à 1000 $\mu\text{g/ml}$) a montré une inhibition significative de la dénaturation des protéines de manière dépendante de la concentration (20 à 70%) (Sajida et Prabhu, 2022).

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Withania somnifera est utilisée depuis des siècles pour améliorer la santé physique et mentale, augmenter la longévité, la vitalité et la mémoire, comme tonique gériatrique et dans les remèdes traditionnels contre les inflammations, les conjonctivites et la tuberculose.

Différentes études expérimentales ont désormais validé de nombreuses utilisations traditionnelles de l'Ashwagandha. Il a été démontré que les extraits de la plante ont des effets bénéfiques sur la santé tels que la propriété antioxydante, antiinflammatoire, hypoglycémiant, immunomodulatrice, antitumorale.

Concernant l'activité antioxydante, la plante a montré une efficacité dans le test DPPH, une capacité à protéger les protéines contre l'oxydation induite par l'AAPH, une capacité à protéger l'ADN eucaryote contre le dommage induit par l'H₂O₂, un pouvoir inhibiteur sur l'enzyme xanthine oxydase génératrice des radicaux libres. Cette propriété a permis d'améliorer l'équilibre pro-oxydant/antioxydant par la stimulation de les défenses antioxydants enzymatiques endogène tels que le superoxyde dismutase, Catalase, Glutathion-S-transférase, glutathion peroxydase, glutathion réductase, glucose-6-phosphate déshydrogénase, et non enzymatiques (glutathion).

Cette capacité antioxydante peut être impliquée dans la modulation du système immunitaire. Différents travaux chez les animaux ont montré la capacité des extraits de la plante à améliorer les paramètres hématologiques et sérologiques, l'activité de la moelle osseuse, l'activité phagocytaire et pinocytaire des macrophages, la capacité du système immunitaire à répondre à l'introduction d'un antigène étranger. En plus ces extraits ont l'orienté le type de réponse immunitaire Th2 vers Th1.

Plusieurs publications ont montré la capacité antiinflammatoire de la plante contre l'inflammation induite expérimentalement comme l'hypersensibilité immunitaire médiée par les anticorps, l'hypersensibilité immunitaire à médiation cellulaire et contre l'inflammation chronique. La plante a permis de réduire l'œdème, les niveaux de cytokines pro-inflammatoires TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6, du facteur de transcription NF- κ B, de la métalloprotéase MMP-8 et de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et inhibé les enzymes productrices des médiateurs inflammatoire (cyclooxygénases-1 et -2 et la lipoxygénase).

Des études complémentaires sont nécessaires pour valoriser ces activités prouvées par la plante. Ces dernières doivent se concentrer sur :

- Isolement des principes actifs responsables des effets observés.
- Comprendre leurs mécanismes d'action.
- Etudier leur toxicité et effets indésirables et déterminer l'intervalle de sécurité.
- Etudier leurs interactions potentielles avec les médicaments standards.
- Exploiter ces principes dans des formulations pharmaceutiques et cosmétiques pour l'utilisation contre différentes conditions impliquant un stress oxydant ou une inflammation.

Référence bibliographique

1. Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. In Methods in enzymology. Vol 105, pp. 121-126. Academic press.
2. Agarwal R., Diwanay S., Patki P., Patwardhan B. 1999. Studies on immunomodulatory activity of *Withania somnifera* (Ashwagandha) extracts in experimental immune inflammation. Journal of Ethnopharmacology, 67(1): 27-35.
3. Akram M., Usmanghani K., Ahmed I., Azhar, I., Hamid A. 2014. *In vitro* xanthine oxidase inhibitory and *in vivo* hypouricemic activity of herbal coded formulation (Gouticin). Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 27(3): 541-550.
4. Arce-Amezquita P. M., Beltrán-Morales F. A., Manríquez-Rivera G. A., Cota-Almanza M. E., Quián-Torres A., Peralta-Olachea R. G. 2019. Nutritional value of conventional, wild and organically produced fruits and vegetables available in Baja California Sur markets. *Terra Latinoamericana*, 37(4): 401-406.
5. Baldi A., Hussain W., Tailor Y. 2010. Evaluation of *in-vitro* cultured cells of *Withania somnifera* for antioxidant activity. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 4(1): 589-595.
6. Baltas N., Yildiz O., Kolayli S. 2016. Inhibition properties of propolis extracts to some clinically important enzymes. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31(1): 52-55.
7. Beutler E., Robson M., Buttenwieser E. 1957. The mechanism of glutathione destruction and protection in drug-sensitive and non-sensitive erythrocytes. *In vitro* studies. The Journal of Clinical Investigation, 36(4): 617-628.
8. Beutler E., Mary K. Y. 1963. Erythrocyte glutathione reductase. *Blood*, 21(5): 573-585.
9. Bharti V. K., Malik J. K., Gupta R. C. 2016. Ashwagandha: multiple health benefits. In Nutraceuticals Academic Press. 718 p.
10. Bhattacharya A., Ghosal S., Bhattacharya S. K. 2001. Anti-oxidant effect of *Withania somnifera* glycowithanolides in chronic footshock stress-induced perturbations of oxidative free radical scavenging enzymes and lipid peroxidation in rat frontal cortex and striatum. Journal of ethnopharmacology, 74(1): 1-6.
11. Blétry O., Kahn J., Somogyi A. 2006. Immunopathologie Réaction inflammatoire: Module 8. 2^{ème} édition, France, Masson. p. 5-7.

12. Blois M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(4617): 1199-1200.
13. Boissière M. 2018. Consommation des plantes médicinales par les patients suivis en cabinet de médecine générale à La Réunion - Expériences, représentations et ressentis des patients dans le cadre de la communication médecin-patient, diplôme d'Etat de docteur en médecine, Université de Bordeaux, 94 p.
14. Bruneton J. 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2ème édition. France, Lavoisier. 937-938 p.
15. Carlberg I., Mannervik B. 1985. Glutathione reductase. In *Methods in enzymology*. Vol. 113, pp. 484-490. Academic press.
16. Chalfant C. E., Diegelmann R. F. 2016. Basic Biology and Clinical Aspects of Inflammation, Vol. 1, Bentham Science Publishers. p. 4.
17. Conti L. H., Maciver C. R., Ferkany J. W., Abreu M. E. 1990. Footshock-induced freezing behavior in rats as a model for assessing anxiolytics. *Psychopharmacology*, 102(4): 492-497.
18. Davis L., Kuttan G. 2000. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1-2): 193-200.
19. Dev S. 2023. Prime Ayurvedic Plant Drugs. 2ème édition. Springer International Publishing, Allemagne. 727-741 p.
20. Dhabian S. Z., Jasim R. S. 2021. Anticancer and Antioxidant activity of the Greenly synthesized Zinc nanoparticles composites using Aqueous extract of *Withania somnifera* plant. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(10): 5561-5574.
21. Gonçalves-de-Albuquerque C. F., Silva A. R., Burth P., Castro-Faria M. V., & Castro-Faria-Neto H. C. 2015. Acute respiratory distress syndrome: role of oleic acid-triggered lung injury and inflammation. *Mediators of inflammation*, 2015(1): 260465.
22. Habig W. H., Pabst M. J., Fleischner G., Gatmaitan Z., Arias I. M., Jakoby W. B. 1974. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10): 3879-3882.
23. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. 5ème édition, Royaume-Uni : Presse universitaire d'Oxford. 356 p.

24. Hashimoto S. 1974. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Analytical biochemistry*, 62(2): 426-435.
25. Jain P. K., Agrawal R. K. 2008. Antioxidant and free radical scavenging properties of developed mono-and polyherbal formulations. *Asian J. Exp. Sci*, 22(3): 213-220.
26. John J. 2014. Therapeutic potential of *Withania somnifera*: A report on phyto-pharmacological properties. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 5(6): 2131-2148.
27. Khan M. A., Ahmed R. S., Chandra N., Arora V. K., Ali A. 2019. *In vivo*, extract from *Withania somnifera* root ameliorates arthritis via regulation of key immune mediators of inflammation in experimental model of arthritis. *Anti-Inflammatory, Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*, 18(1): 55-70.
28. Kuchewar V. V., Borkar M. A., Nisargandha M. A. 2014. Evaluation of antioxidant potential of Rasayana drugs in healthy human volunteers. *AYU (An international quarterly journal of research in Ayurveda)*, 35(1): 46-49.
29. Kumar P., Singh R., Nazmi A., Lakhanpal D., Kataria H., Kaur G. 2014. Glioprotective effects of Ashwagandha leaf extract against lead induced toxicity. *BioMed Research International*, 2014(1):182029.
30. Kumar M., Muthusamy A., Kumar V., Bhalla-Sarin N. 2019. *In Vitro* Plant Breeding towards Novel Agronomic Traits: Biotic and Abiotic Stress Tolerance. Berlin/Heidelberg, Allemagne, Springer. p. 3.
31. Kumar J., Mitra M. D., Hussain A., Kaul G. 2019. Exploration of immunomodulatory and protective effect of *Withania somnifera* on trace metal oxide (zinc oxide nanoparticles) induced toxicity in Balb/c mice. *Molecular biology reports*, 46: 2447-2459.
32. Laguna O. 2019. Valorisation des composés phénoliques des tourteaux de colza et tournesol: du fractionnement des matières premières vers la synthèse de molécules multifonctionnelles. Thèse de doctorat d'état, Université Montpellier. p. 34.
33. Lehmann H. 2013. Le médicament à base de plantes en Europe: statut, enregistrement: Droit Pharmaceutique, Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, Europe, 16p.
34. Mandlik D. S., Namdeo A. G. 2021. Pharmacological evaluation of Ashwagandha highlighting its healthcare claims, safety, and toxicity aspects. *Journal of dietary supplements*, 18(2): 183-226.

35. Marine L. 2022. Rôle des acides gras polyinsaturés et du phospholipide bis (monoacylglycéro) phosphate dans l'infection à *Leishmania infantum*. Thèse de doctorat d'état, Université de Lyon. p. 42.
36. Mayo J. C., Tan D. X., Sainz R. M., Natarajan M., Lopez-Burillo S., Reiter R. J. 2003. Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1620(1-3): 139-150.
37. Mishra T. 2022. A Marginalised Adaptogen *Withania somnifera* (L.), Efficient Protocol for Conservation. Vol. 1, International Senior Expert of Project Management and Department of Geology, Desert Research Center, Egypte. p. 14.
38. Mohammedi Z. 2013. Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud-ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaïd. p. 43-58.
39. Mukherjee P. K., Banerjee S., Biswas S., Das B., Kar A., Katiyar C. K. 2021. *Withania somnifera* (L.) Dunal-Modern perspectives of an ancient Rasayana from Ayurveda. *Journal of ethnopharmacology*, 264: 113157.
40. Müller J., Keller H. U., Dürig P., Hagmann J., Cornioley D. M., Reinhard J., ... & Cottier, H. 1981. Nonspecific esterase in human lymphocytes. *International Archives of Allergy and Immunology*, 64(4): 410-421.
41. Namdev N., Namdev N., Rai G., Mahobiya P. 2023. Alteration in THR β of Hypothyroidism Mice: An Ashwagandha and. *Journal of Scientific Research*, 67(2).
42. Nile S. H., Nile A., Gansukh E., Baskar V., Kai G. 2019. Subcritical water extraction of withanosides and withanolides from ashwagandha (*Withania somnifera* L) and their biological activities. *Food and Chemical Toxicology*, 132: 110659.
43. Nile S. H., Liang Y., Wang Z., Zheng J., Sun C., Nile A., Kai G. 2022. Chemical composition, cytotoxic and pro-inflammatory enzyme inhibitory properties of *Withania somnifera* (L.) Dunal root extracts. *South African Journal of Botany*, 151: 46-53.
44. Nishikimi M., Rao N. A., Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and biophysical research communications*, 46(2): 849-854.

45. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2): 351-358.
46. Pal A., Naika M., Khanum F., Bawa A. S. 2011. *In-vitro* studies on the antioxidant assay profiling of *Withania somnifera L.* (Ashwagandha) *Dunal*root: Part 1. *Pharmacognosy Journal*, 3(20): 47-55.
47. Pal A., Kumar M., Saharan V., Bhushan B., CCS HAU H. 2015. Anti-oxidant and free radical scavenging activity of ashwagandha (*Withania somnifera L.*) leaves. *J. Glob. Biosci*, 4(1): 1127-1137.
48. Pal A., Kumar K. H., Bhushan B., Saharan V. 2017. Ashwagandha root extract inhibits acetylcholine esterase, protein modification and ameliorates H₂O₂-induced oxidative stress in rat lymphocytes. *Pharmacognosy Journal*, 9(3).
49. Panda S., Kar A. 1997. Evidence for free radical scavenging activity of Ashwagandha root powder in mice sunanda Panda and anand Kar. *Indian J Physiol Pharmacol*, 41(4): 424-426.
50. Paul S., Chakraborty S., Anand U., Dey S., Nandy S., Ghorai M., Dey A. 2021. *Withania somnifera(L.) Dunal* (Ashwagandha): A comprehensive review on ethnopharmacology, pharmacotherapeutics, biomedical and toxicological aspects. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 143: 112175.
51. Polumackanycz M., Petropoulos S. A., Śledziński T., Goyke E., Konopacka A., Plenis A., Viapiana A. 2023. *Withania somnifera L.*, phenolic compounds composition and biological activity of commercial samples and its aqueous and hydromethanolic extracts. *Antioxidants*, 12(3): 550.
52. Pourrut B. 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle : Ecotoxicologie, Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques et Bioingénieries, Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Toulouse, 93p.
53. RajaSankar S., Manivasagam T., Surendran S. 2009. Ashwagandha leaf extract: à potential agent in treating oxidative damage and physiological abnormalities seen in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 454(1): 11-15.
54. Rao M. V., Paliyath G., Ormrod D. P., Murr D. P., Watkins C. B. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes

- (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂). *Plant Physiology*, 115(1): 137-149.
55. Rasool M., Varalakshmi P. 2006. Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: An *in vivo* and *in vitro* study. *Vascular pharmacology*, 44(6): 406-410.
56. Sachdeva H., Sehgal R., Kaur S. 2013. Studies on the protective and immunomodulatory efficacy of *Withania somnifera* along with cisplatin against experimental visceral leishmaniasis. *Parasitology research*, 112: 2269-2280.
57. Saggu H., Cooksey J., Dexter D. A., Wells F. R., Lees A., Jenner P., Marsden C. D. 1989. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *Journal of neurochemistry*, 53(3): 692-697.
58. Sajida., Prabhu A. 2022. *Withania somnifera* deploys immunomodulation and exerts anticancer effects on lung adenocarcinoma cells. *South African Journal of Botany*, 151: 47-65.
59. Sangwan N.S., Sangwan R.S. 2014. Secondary Metabolites of Traditional Medical Plants, A Case Study of Ashwagandha (*Withania somnifera*). Nick, P., Opatrny, Z. *Applied Plant Cell Biology. Plant Cell Monographs*, vol 22. Springer, Berlin, Heidelberg. 335 p.
60. Scartezzini P., Antognoni F., Conte L., Maxia A. N. D. R. E. A., Troia A., Poli F. 2007. Genetic and phytochemical difference between some Indian and Italian plants of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Natural Product Research*, 21(10): 923-932.
61. Shahriar M., Hossain I., Sharmin F. A., Akhter S., Haque M. A., Bhuiyan M. A. 2013. *In Vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Withania Somnifera* root. *Iosr J Pharm*, 3: 38-47.
62. Sharma R., Samant S., Sharma P., Devi S. 2012. Evaluation of antioxidant activities of *Withania somnifera* leaves growing in natural habitats of North-west Himalaya, India. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(5): 657-661.
63. Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1): 184-191.
64. Sumathi S., Padma P. R., Gathampari S., Vidhya S. 2007. Free radical scavenging activity of different parts of *Withania somnifera*. *Ancient Science of Life*, 26(3): 30-34.

65. Tsutomu F. 1988. Saponins (*ginseng saponins*), Phytochemicals in Plant Cell Cultures. Academic Press. 213-234 p.
66. Trabelsi L., Ben Ouada H., Bassa H. 2010. Activités biologiques des métabolites excrétés par la cyanobactérie filamenteuse *Arthrospira platensis*. *Phytothérapie*, 8(5) : 282-289.
67. Udayakumar R., Kasthuriengan S., Mariashibu T. S., Sahaya Rayan J. J., Kim S. C., Choi C. W., Ganapathi A. 2010. Antioxidant activity of phenolic compounds extracted from the roots and leaves of *Withania somnifera* (L.) from different geographical locations in India. *Func Plant Sci Biotech*, 4: 28-33.
68. Uner N., Oruc E. O., Canli M., Sevgiler Y. 2001. Effects of cypermethrin on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in liver and kidney of the freshwater fish, *Oreochromis niloticus* and *Cyprinus carpio* (L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(5): 657-664.
69. Valentine W. N., Paglia D. E., Fink K., Madokoro G. 1976. Lead poisoning: association with hemolytic anemia, basophilic stippling, erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency, and intraerythrocytic accumulation of pyrimidines. *The Journal of clinical investigation*, 58(4): 926-932.
70. Weill B., Batteux F. 2003. Immunopathologie et réactions inflammatoires. 1^{er} édition Belgique : De Boeck Supérieur. p. 12.
71. Yadav A. K., Rai D. C. 2018. *In vitro* screening of Ashwagandha root extracts for the maximum functional components. *J Pharm Innov*, 7(2): 12-16.
72. Yadava S. A., Hakkim L., Sathishkumar F., Sathishkumar R. 2011. Antioxidant activity of *Withania somnifera* (L.) *Dunalby* different solvent extraction methods. *J Pharm Res*, 4(5): 1428-1430.
73. Koc K. 2023. Ashwagandha root extract attenuates inflammation in Oleic acid induced-ALI/ARDS rat model via inhibition of ACE and MAPK signaling pathways. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 10(1): 196-202.
74. Ziauddin M., Phansalkar N., Patki P., Diwanay S., Patwardhan B. 1996. Studies on the immunomodulatory effects of Ashwagandha. *Journal of ethnopharmacology*, 50(2): 69-76.
75. Zeb A., Zeb. 2021. Phenolic Antioxidants in Foods: Chemistry, Biochemistry and Analysis. Berlin/Heidelberg, Allemagne. Springer International Publishing. pp.197.

Résumés

ملخص

Withania somnifera L.، المعروف أيضًا باسم أشواغاندا، هو نبات طبي من عائلة الباذنجانيات، يستخدم على نطاق واسع وله قيمة في العديد من المجالات، وخاصة في المجالات العلاجية.

في هذا العمل، اهتمنا بتقييم النشاط المضاد للأكسدة والمناعي للمستخلصات المحضرة من النبات من خلال تجميع نتائج مقالات مختلفة مختارة.

أظهرت مستخلصات مختلفة من النبات تأثيرًا مضادًا للأكسدة من خلال القدرة على تحييد الجذور الحرة في اختبار تقليل DPPH، والقدرة على حماية البروتينات والحمض النووي وتقوية نظام مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية ضد الإجهاد التأكسدي.

في حين تم إثبات التأثير التعديلي للجهاز المناعي من خلال قدرة المستخلصات النباتية على تحسين المؤشرات الدموية والمصلية، ونشاط نخاع العظم، ونشاط البلعمة والخلايا البلعمية، وقدرة الجهاز المناعي على الاستجابة لإدخال مستضد أجنبي. بالإضافة إلى اتجاه نوع الاستجابة المناعية Th2 نحو Th1.

كما أظهر *Withania somnifera* L. تأثيرًا واضحًا مضادًا للالتهابات في نماذج مختلفة من الالتهابات المستحثة تجريبيًا: فرط الحساسية المناعية بوساطة الأجسام المضادة، وفرط الحساسية المناعية الخلوية، والالتهاب المزمن. قلل النبات من الالتهاب، ومستويات السيتوكينات المؤيدة للالتهابات TNF- α ، وIL-1 β ، وIL-6، وعامل النسخ NF- κ B، والبروتينات المعدنية-MMP-8، وسينسيز أكسيد النيتريك المحفز، ويمنع الإنزيمات التي تنتج وسطاء التهابات (إنزيمات الأكسدة الحلقية-1 و-2). ليبوكسيجيناز).

الكلمات المفتاحية: *Withania somnifera* L.، مضاد للأكسدة، DPPH، معدل مناعي، مضاد للالتهابات، إنزيمات مضادة للأكسدة.

Résumé

Withania somnifera L., également appelée Ashwagandha, est une plante médicinale, de la famille des Solanacées, largement utilisé et valorisée dans plusieurs domaines, notamment dans les domaines thérapeutiques.

Nous nous sommes intéressées dans ce travail à l'évaluation de l'activité antioxydante et immunomodulatrice des extraits préparés à partir de la plante en synthétisant les résultats de différents articles choisis.

Divers extraits de la plante ont montré un effet antioxydant par la capacité à neutraliser les radicaux libres dans le test de réduction du DPPH, la capacité à protéger les protéines et l'ADN et à renforcer le système enzymatique et non enzymatiques antioxydants endogènes contre le stress oxydant.

Alors que l'effet modulateur du système immunitaire a été prouvé par la capacité des extraits de la plante à améliorer les paramètres hématologiques et sérologiques, l'activité de la moelle osseuse, l'activité phagocytaire et pinocytaire des macrophages, la capacité du système

immunitaire à répondre à l'introduction d'un antigène étranger en plus de l'orientation du type de réponse immunitaire Th2 vers Th1.

Un effet anti-inflammatoire prononcé a été aussi démontré par *W.somnifera* dans divers modèles d'inflammation induite expérimentalement : hypersensibilité immunitaire médiée par les anticorps, hypersensibilité immunitaire à médiation cellulaire et inflammation chronique. La plante a permis de réduire l'œdème, les niveaux des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6, du facteur de transcription NF- κ B, de la métalloprotéase MMP-8 et de l'oxyde nitrique synthase inductible et a inhiber les enzymes productrice de médiateurs inflammatoire (cyclooxygénases-1 et -2 et la lipoxygénase).

Mot clés : *Withania somnifera* L., antioxydant, DPPH, immunomodulateur, antiinflammatoire, enzymes antioxydants.

Abstract

Withania somnifera L., also called Ashwagandha, is a medicinal plant, of the Solanaceae family, widely used and valued in several fields, particularly in therapeutic areas.

We were interested in this work in the evaluation of the antioxidant and immunomodulatory activity of extracts prepared from the plant by synthesizing the results of different selected articles.

Various extracts of the plant have shown an antioxidant effect by the ability to neutralize free radicals in the DPPH reduction test, the ability to protect proteins and DNA and to strengthen the endogenous enzymatic and non-enzymatic antioxidant system against oxidative stress.

While the immune system modulating effect has been proven by the ability of the plant extracts to improve hematological and serological parameters, bone marrow activity, phagocytic and pinocytic activity of macrophages, the ability of the immune system to respond to the introduction of a foreign antigen in addition to the orientation of the Th2 to Th1 type of immune response. A pronounced anti-inflammatory effect has also been demonstrated by *W.somnifera* in various models of experimentally induced inflammation: antibody-mediated immune hypersensitivity, cell-mediated immune hypersensitivity and chronic inflammation. The plant reduced edema, levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6, transcription factor

NF- κ B, metalloprotease MMP-8 and inducible nitric oxide synthase and inhibited enzymes producing inflammatory mediators (cyclooxygenases-1 and -2 and lipoxygenase).

Keywords: *Withania somnifera* L., antioxidant, DPPH, immunomodulator, anti-inflammatory, antioxidant enzymes.