



FÉDÉRATION ALGERIENNE DE PHARMACIE

Disponible en ligne sur

**ASJP**  
Algerian Scientific Journal Platform

<https://www.asjp.cerist.dz/en/PresentationRevue/436>



## ARTICLE ORIGINAL

# Formulation de comprimés orodispersibles à base des extraits de *Vitis vinefera*. L et de *Rosmarinus officinalis*. L à visée anti-inflammatoire

Formulation of orodispersible tablets based on extracts of *Vitis vinefera* L. and *Rosmarinus officinalis* L. for anti-inflammatory purposes

Fadila OLDACHE <sup>a,\*</sup>, Samia DJERABA <sup>b</sup>, Safia BOURKAIB <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Faculté de pharmacie, Université d'Alger 1

<sup>b</sup> Laboratoire de pharmacie galénique, Faculté de pharmacie, Université d'Alger 1

<sup>c</sup> Laboratoire de pharmacognosie, Faculté de pharmacie, Université d'Alger 1

### MOTS CLÉS

Extrait

Composés phénoliques

Anti-inflammatoire

Comprimés

### Résumé

**Introduction :** Les produits naturels jouent un rôle clé dans la découverte de médicaments, L'objectif de cette étude consistait à réaffirmer le potentiel anti-inflammatoire de deux plantes « *Vitis vinefera* » et « *Rosmarinus officinalis* », tout en élaborant une formulation de comprimés à partir de leurs extraits.

**Méthodes :** En premier lieu, la préparation des extraits des deux plantes a été réalisée, l'extrait de *Vitis vinefera* a été obtenu par épuisement, et ce, par macération et extraction par le Soxhlet à partir de la même drogue initiale, l'extrait de *Rosmarinus officinalis* a été obtenu par macération. Ensuite, ont été effectués des dosages spectrophotométriques des composés phénoliques totaux, flavonoïdes, dérivés de l'acide hydroxycinnamique, une évaluation de l'activité antioxydante par la méthode au DPPH, ainsi que l'activité anti-inflammatoire in vitro, enfin, quatre formules placebos ont été réalisées, afin de choisir la meilleure formule sur le plan pharmacotechniques et organoleptique pour la formulation des comprimés orodispersibles à base des extraits de *Vitis vinefera* et de *Rosmarinus officinalis*.

**Résultats :** Les teneurs en Composés phénoliques totaux respectives de *Vitis vinefera* et *Rosmarinus officinalis* ont été de 0.53 mg EAG/g d'extrait et 19.76 mg EAG/g d'extrait, avec une CI 50 égale à 44181.11 mg/L et 857.78 mg/L et une inhibition de l'hémolyse atteignant 79% et 70 % à la concentration de 250ug/mL comparé au diclofénac comme anti-inflammatoire de référence dont sa valeur a été de 68 %. Les résultats des dosages spectrophotométriques concordent avec les résultats des activités antioxydante et anti-inflammatoire. Concernant la partie de formulation galénique, tous les placebos ont donné des résultats pharmacotechniques conformes, la formule n°4 a été choisie pour la réalisation de la formule avec extraits de *Vitis vinefera* et *Rosmarinus officinalis*, cette dernière formule a eu également des résultats pharmacotechniques conformes.

**Conclusion :** Au terme de ce travail, des comprimés orodispersibles à base des extraits de *Vitis vinefera* et de *Rosmarinus officinalis* ont été formulés.

© 2023 Fédération Algérienne de Pharmacie. Tous droits réservés.

## KEYWORDS

Extract  
Phenolic compounds  
Anti-inflammatory  
Tablets

## Abstract

**Introduction :** Natural products occupy a key position in the exploration of new sources of medicinal products. Among these, *Vitis vinifera* and *Rosmarinus officinalis* stand out for their pharmacological properties, as anti-inflammatory agents. The aim of this study was to strengthen the recognition of the anti-inflammatory potential of these two plants, while developing a formulation of tablets from their extracts.

**Methods:** First, the preparation of extracts from both plants was performed; the extract of *Vitis vinifera* was obtained through exhaustion, using maceration and Soxhlet extraction from the same initial plant material. The extract of *Rosmarinus officinalis* was obtained through maceration. Spectrophotometric assays were then conducted to determine the total phenolic compounds, flavonoids, and hydroxycinnamic acid derivatives. The antioxidant activity was evaluated using the DPPH method, and in vitro anti-inflammatory activity was assessed. Finally, four placebo formulations were formulated to select the best formulation based on pharmacotechnical and organoleptic criteria for the formulation of orodispersible tablets containing extracts of *Vitis vinifera* and *Rosmarinus officinalis*.

**Results :** The total phenolic contents for *Vitis vinifera* and *Rosmarinus officinalis* were 0.53 mg GAE/g extract and 19.76 mg GAE/g extract respectively, with IC50 values of 44,181.11 mg/L and 857.78 mg/L, the hemolytic inhibition reached 79% and 70% at a concentration of 250 µg/mL compared to diclofenac as the reference anti-inflammatory drug, which exhibited a value of 68%. The results of the spectrophotometric assays were consistent with the antioxidant and anti-inflammatory activities. Regarding the formulation part, all placebos yielded conforming pharmacotechnical results, and formula n°4 was selected for the development of the formulation with extracts of *Vitis vinifera* and *Rosmarinus officinalis*. This latter formulation also met the pharmacotechnical criteria.

**Conclusion :** Orodispersible tablets containing extracts of *Vitis vinifera* and *Rosmarinus officinalis* were formulated.

© 2023 Fédération Algérienne de Pharmacie. All rights reserved.

## Introduction :

Les produits naturels ont une diversité chimique distincte, ce qui leur procure un large éventail d'activités biologiques et des qualités semblables aux médicaments, ils jouent un rôle clé dans la découverte de médicaments pour le traitement des maladies humaines (1).

*Vitis vinefera*, est le fruit le plus riche en resvératrol, un composé phénolique, il est souvent associé au "paradoxe français" qui est l'observation selon laquelle malgré une alimentation riche en graisses, les Français ont une incidence relativement faible de maladies cardiaques(1), il inhibe les deux formes des cyclo-oxygénases et possède un effet antioxydant (2).

*Rosmarinus officinalis* est une plante aromatique aux nombreuses propriétés thérapeutiques, qui exerce une action anti-inflammatoire par ses composés phénoliques comme l'acide rosmarinique, acide carnosique et le carnosol, molécules capables de piéger les espèces réactives de l'oxygène (ROS) soit directement par une réaction de réduction, soit indirectement par la régulation des défenses antioxydantes(3).

Le but de cette étude est de réaffirmer le potentiel anti-inflammatoire de *Vitis vinefera* et *Rosmarinus officinalis*, tout en élaborant une formulation de comprimés contenant une association des extraits de ces deux plantes.

## Matériel et méthodes

### Matériel divers

Machine à moulin (Proficook), Appareil de Soxhlet, évaporateur rotatif (Buchi), balance analytique (Shimadzu), balance de précision (Kern 572), pH mètre (Mettler Toledo), spectrophotomètre (Beckman Coulter), bain marie (Jouan), comprimeuse alternative (Frogerais), friabilimètre (Erweka TA), duromètre (Pharmatest), appareil de délitement (Erweka ZT3), centrifugeuse, agitateur électromagnétique, vortex.

### Matériel végétal

Les fruits de *Vitis vinefera* secs proviennent de Santiago, Chili, approvisionnés par épécia.

Les feuilles de *Rosmarinus officinalis* proviennent de Tizi-Ouzou, approvisionnées par Back to Nature(herboristerie).

### Excipients

Cellulose microcristalline (Avicel PH102), crospovidone, croscarmellose, lactose pour compression directe, mannitol (2080 Granular),

povidone (PVPK30), stéarate de Magnésium, talc, sucralose, arôme de framboise.

### Réactifs chimiques

Ethanol, acide chlorhydrique, soude, réactif Folin-Ciocalteu, carbonate de sodium, nitrite de sodium, trichlorure d'aluminium, molybdate de sodium, acide chlorogénique, eau distillée, eau physiologique, Tampon phosphate salin.

### Produit biologique

Echantillons de sang humain prélevés sur tube EDTA, le critère d'acceptation a été une NFS sans anomalies.

#### 1. Extraction

##### 1.1. Préparation de l'extrait de *Vitis vinefera* : par extraction par épuisement (macération + Soxhlet)

Le fruit de *Vitis vinefera* rincé, séché et broyé a été soumis à une macération de 12 heures dans de l'éthanol additionné de 10 ml d'acide chlorhydrique pour un ratio drogue/solvant de 1 : 2, selon la technique modifiée de Wang (4). L'éthanol a été évaporé à l'aide de l'évaporateur rotatif à pression réduite.

Le marc a été récupéré, pesé et extrait au Soxhlet pendant 3 heures. L'éthanol a été évaporé à l'aide de l'évaporateur rotatif à pression réduite.

##### 1.2. Préparation de l'extrait de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* (par macération)

Les feuilles de *Rosmarinus officinalis* rincées, séchées et broyées ont été soumises à une macération de 10 heures dans de l'éthanol pour un ratio drogue /solvant de 1 :5, selon la technique modifiée d'Angelov (5). L'éthanol a été évaporé à l'aide de l'évaporateur rotatif à pression réduite.

Le rendement d'extraction a été calculé par la formule suivante :

$$R = (mf/mo) * 100$$

R : rendement d'extraction (%)

mf : masse de l'extrait (g)

mo : masse de la prise d'essai

#### 2. Dosage des composés phénoliques totaux

La détermination des concentrations des composés phénoliques totaux des extraits a été effectuée à l'aide de la méthode de Folin-Ciocalteu.

Un volume de 200 uL de l'extrait de *Vitis vinefera*, ou de *Rosmarinus officinalis*, ou éthanol (blanc) a été introduit dans un tube à essai, ensuite, 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/10ème) a été ajouté, le tout vortexé, suivi de l'addition de 800uL de Carbonate de Sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 7.5 %, le tout vortexé. Les mélanges ont été incubés à l'obscurité pendant 30 minutes. Le protocole utilisé a été une adaptation du protocole décrit par Catalano (6).

L'absorbance a été mesurée à 760 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration des composés phénoliques totaux a été déterminée en utilisant l'équation de régression basée sur la gamme d'étalonnage établie avec le standard étalon d'acide gallique (0-100 µg/mL). Elle est exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par microgramme d'extrait (µg EAG/mg).

### 3. Dosage des flavonoïdes

La méthode utilisée pour quantifier les flavonoïdes a été une adaptation du protocole décrit par Zhishen et Kim(7,8) avec quelques modifications.

Un volume de 400uL de l'extrait de *Vitis vinefera*, ou de *Rosmarinus officinalis* ou éthanol (blanc) a été introduit dans des tubes à essai, 120 uL de solution de Nitrite de Sodium NaNO<sub>2</sub> (7,5%) a été ajoutée, le tout vortexé et incubé 5 minutes, 120 uL de Chlorure d'Aluminium AlCl<sub>3</sub> (10%) et 800 uL de NaOH (1N) ont été ajoutés, le tout vortexé et incubé 6 minutes.

L'absorbance a été mesurée à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration des flavonoïdes totaux a été déterminée en utilisant l'équation de régression basée sur la gamme d'étalonnage établie avec le standard étalon de Quercétine (0-45 µg/mL). Elle est exprimée en microgrammes d'équivalents de Quercétine par microgramme d'extrait (µg EQ/mg).

### 4. Dosage des dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Le dosage des dérivés de l'acide hydroxycinnamique (DAH) a été effectué en utilisant la méthode modifiée décrite par la pharmacopée européenne, qui utilise le Molybdate de Sodium et le Nitrite de Sodium.

Dans une fiole de 5 mL, un volume de 500uL de l'extrait de *Vitis vinefera* ou de *Rosmarinus officinalis* a été introduit avec, 1 mL d'acide Chlorhydrique (0.5 M), 1mL de solution de Nitrite et Molybdate de Sodium, 1 mL de NaOH,

complété au trait de jauge avec l'eau distillée, et vortexé.

Préparation du liquide de compensation (le blanc) :

Dans une fiole de 5 mL, un volume de 500uL de l'extrait de *Vitis vinefera*, ou de *Rosmarinus officinalis* a été introduit avec, 1 mL d'acide Chlorhydrique (0.5 M), 1 mL de NaOH, complété au trait de jauge avec l'eau distillée, et vortexé.

L'absorbance a été lue à 525 nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration des DAH a été déterminée en utilisant l'équation de régression basée sur la plage d'étalonnage établie avec l'étalon standard de l'acide chlorogénique (0,1-2 µg/mL). Elle est exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide chlorogénique par milligramme d'extrait (µg EAC/mg).

### 4. Activité antioxydante

La méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est une technique utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des substances, notamment des extraits de plantes.

Le principe de la méthode du DPPH repose sur la réduction du radical DPPH par des antioxydants présents dans les échantillons testés.

Lorsque le DPPH réagit avec un antioxydant, sa couleur violette caractéristique se réduit en jaune, qui est mesurable par spectrophotométrie à 517 nm.

La réaction a été réalisée dans un volume total de 1000 uL contenant 25 uL de l'extrait, volume auquel a été ajouté 975 uL de DPPH à 0,024 g/l solubilisé dans le méthanol. Les extraits ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu, ces solutions dites solutions mères ont ensuite été diluées afin d'obtenir les concentrations finales.

Les échantillons ont été ensuite incubés à l'obscurité pendant 30 minutes, et a été mesurée la décoloration, par rapport au témoin négatif contenant uniquement la solution du DPPH à 517 nm.

L'activité antioxydante a été estimée selon l'équation suivante :

$$AA = ([A \text{ contrôle} - A \text{ test}] / A \text{ contrôle}) \times 100 \quad (9)$$

AA : activité antioxydante

A contrôle : Absorbance du DPPH seul

A test : Absorbance du DPPH avec échantillon

Les résultats ont été calculés en prenant la moyenne de trois mesures, ensuite, ils ont été présentés sur la courbe où l'activité antioxydante (AA) est en fonction de la concentration de l'extrait. Puis, les résultats ont été exprimés en CI 50, qui est définie comme la concentration du substrat qui provoque une diminution de 50% de l'activité du DPPH. Elle a été déterminée graphiquement à partir des régressions linéaires des graphiques obtenus, qui montrent les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes dilutions des extraits testés. Cette valeur a ensuite été comparée à celle de l'acide ascorbique testé dans les mêmes conditions (plage de concentration de 50 à 10000 µg/ml).

## 5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, in vitro des extraits de *Vitis vinefera*, *Rosmarinus officinalis* et de leur mélange

### 5.1. Le choix des globules rouges comme modèle pour évaluer l'activité anti-inflammatoire, in vitro, des extraits *Vitis vinefera*, *Rosmarinus officinalis* et de leur mélange

Les globules rouges ont été choisis comme modèle pour le test de stabilisation membranaire, en raison de l'analogie de leur membrane à la membrane lysosomale. La stabilisation de la membrane érythrocytaire implique la stabilisation de la membrane lysosomale, en effet, la stabilisation de la membrane lysosomale est importante pour limiter la réponse inflammatoire, en empêchant la libération des composants lysosomaux des neutrophiles activés, tels que les enzymes et protéases, conduisant à une inflammation et à des lésions tissulaires après libération extracellulaire (10,11).

### 5.2. Préparation de la suspension de globules rouges humains

Sur chacun des dix échantillons de sang prélevé sur tubes EDTA, 500µl de sang total a été prélevé, lavé 3 fois avec de l'eau physiologique à 37 °C, en centrifugeant entre chaque lavage à 3000 rpm pendant 5 minutes. Le volume des érythrocytes a été mesuré afin de préparer une suspension de 10 % (v/v) de globules rouges humains, avec un tampon PBS (pH = 7.4 +/- 0.05).

### 5.3. Test de l'innocuité

En amont de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, un test de toxicité a été réalisé dans le but de choisir les concentrations cibles, en effectuant le calcul du taux d'hémolyse. Ainsi, en mettant au contact 1.5 ml des différentes concentrations testées (300, 600, 900, 1500, 2000µg/ml) avec 0.5 ml de suspension de globules

rouges humains, suivie d'une incubation à 37°C pendant 30 minutes, puis d'une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes, l'absorbance du surnageant a été lue à 560 nm.

Le calcul du pourcentage d'hémolyse a été effectué en utilisant les mêmes conditions expérimentales et les mêmes étapes. Un contrôle a été réalisé en mélangeant 0.5 mL de la suspension de globules rouges avec 1.5 mL d'eau physiologique ou d'eau distillée, afin de vérifier l'état des globules rouges ou d'obtenir une hémolyse totale à 100 %.

Le calcul du taux d'hémolyse a été fait selon l'équation :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (At / Ac) * 100 \quad (12)$$

At : absorbance de l'échantillon (test)

Ac : absorbance de control (100% d'hémolyse)

### 5.4. Test de l'activité de stabilisation de la membrane des globules rouges

En aval de l'évaluation de l'innocuité des extraits de *Vitis vinefera*, *Rosmarinus officinalis* et de leur mélange, un test de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été réalisé.

Le test repose sur l'impact des extraits des plantes étudiées sur la stabilisation des érythrocytes, suite à l'induction de l'hémolyse par une solution hypotonique en association avec une température élevée, conformément au protocole établi par Gadamsetty (6).

Ainsi, dans des tubes secs, 0.5ml de l'extrait de *Vitis vinefera*, ou de *Rosmarinus officinalis* ou de leur mélange (25-50-75-100-250-500 µg/mL), 1.5 ml de tampon PBS et 2ml de NaCl à 0.36% ont été incubés à 37 °C pendant 20 minutes. Ensuite, un volume de 0,5 mL de suspension d'érythrocytes (10 %) a été ajouté à chaque tube, suivi d'une nouvelle incubation à 56 °C pendant 30 minutes. Les tubes ont ensuite été placés dans de l'eau froide pendant 5 minutes pour arrêter la réaction, puis centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. La lecture de l'absorbance du surnageant a été réalisée à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le contrôle consistait en un mélange de 2 mL de solution hyposaline, 2 mL de tampon PBS, 0,5 mL de suspension de globules rouges et 0,5 mL d'eau physiologique.

Les mêmes étapes ont été reproduites, en utilisant le diclofénac comme référence anti-inflammatoire.

Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse a été calculé selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = [(Ac - At) / Ac] * 100$$

Ac : absorbance de control (100% d'hémolyse)

At : absorbance de l'échantillon (test)

## 6. Formulation galénique des comprimés orodispersibles avec les extraits de *Vitis vinefera* et de *Rosmarinus officinalis*

### 6.1. Le choix de formuler des comprimés orodispersibles

Les comprimés orodispersibles également appelés comprimés oraux à désintégration rapide, ont été choisis comme forme galénique par les avantages qu'ils offrent notamment :

- Les comprimés orodispersibles sont des formes unitaires qui ont une bonne stabilité, un dosage précis, sont faciles à fabriquer, ont une petite taille d'emballage et sont pratiques à manipuler pour les patients.
- La désintégration rapide du comprimé orodispersible conduit à une dissolution et une absorption rapides, ce qui entraîne un début rapide de l'action(14).
- L'absorption pré-gastrique évite le métabolisme hépatique, réduisant la dose et augmentant la biodisponibilité(15).

### 6.2. Approche de formulation

L'objectif étant la formulation par compression directe de comprimés orodispersibles d'extrait de *Vitis vinefera* et de *Rosmarinus officinalis*, plusieurs formules placebo ont été réalisées pour sélectionner celle qui donne les meilleurs résultats pharmacotechniques et organoleptique, pour ensuite introduire les extraits.

### 6.3. Déroulement de la fabrication

- **Pesée des matières premières** : À l'aide d'une balance de précision, les quantités des différents composants ont été pesées.
- **Mélange des poudres** : Introduction dans le mélangeur cubique de l'ensemble des excipients de la phase interne ; les extraits ont été additionnés avec la phase interne, la durée du mélange a été de 10 minutes.
- **Lubrification** : Les lubrifiants ont été rajoutés en phase externe et le mélange effectué pendant 3 minutes.
- **Compression** : La compression a été réalisée à l'aide d'une compresseuse alternative avec des poinçons de 12 mm.

### 6.4. Formules qualitatives et quantitatives des lots placebos

Six lots de comprimés placebos de formules différentes ont été préparés, quatre ont donné des

comprimés avec des résultats pharmacotechniques conformes, les deux autres ont présenté des phénomènes de grippage et de décalottage lors de la compression et donc, leurs formules ont été abandonnées.

Les formules des lots placebos sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1. Formules centésimales des placebos**

Constituants	Rôle	F1	F2	F3	F4
		<i>Cellulose microcristalline</i>	Diluant	69	40
<i>Lactose pour compression directe</i>	Diluant	20	-	-	-
<i>Mannitol</i>	Diluant	-	49	30	50
<i>Povidone</i>	Liant	-	-	-	1
<i>Crospovidone</i>	Désintégrant	5	5	5	5
<i>Croscarmellose</i>	Désintégrant	5	5	5	-
<i>Talc</i>	Lubrifiant	-	-	-	1
<i>Stéarate de Magnésium</i>	Lubrifiant	1	1	1	1
<i>Sucralose</i>	Edulcorant	-	-	-	1
<i>Arome de framboise</i>	Aromatisant	-	-	-	1
Pourcentage (%)		100	100	100	100

### 6.5. Formule quantitative du lot avec les extraits de *Vitis vinefera* et de *Rosmarinus officinalis*

La démarche a été, après avoir sélectionné la meilleure formule qui est la F4, de préparer des comprimés, en rajoutant les extraits.

La formule réalisée avec les extraits est présentée dans le tableau 2.

**Tableau 2. Formule centésimale avec extraits**

<i>Constituants</i>	<i>F5</i>
<i>Extrait de raisin adsorbé</i>	18,56
<i>Extrait de romarin</i>	11,2
<i>Cellulose microcristalline</i>	40
<i>Mannitol</i>	20,24
<i>Povidone</i>	1
<i>Crospovidone</i>	5
<i>Talc</i>	1
<i>Stéarate de Magnésium</i>	1
<i>Succralose</i>	1
<i>Arome framboise</i>	1
<i>Pourcentage(%)</i>	100

#### 6.6. Contrôle pharmacotechniques des comprimés finis

Les essais portant sur l'uniformité de masse, la friabilité, la dureté et la désagrégation ont été réalisés conformément aux normes établies par la pharmacopée européenne(16).

#### 7. Analyse statistique

Les dosages spectrophotométriques et l'activité antioxydante ont été réalisés en triplicata pour chaque échantillon. Les résultats obtenus ont été traités à l'aide du logiciel Excel 2007 et sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  écart-type (SD).

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in-vitro a été réalisée en triplicata pour chaque échantillon. Les résultats obtenus ont été traités à l'aide du logiciel Excel 2007 et sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne (S.E.M). L'analyse statistique a été réalisée par l'analyse de la variance (ANOVA) suivi du test de tukey. Les valeurs de  $p < 0.05$  ont été considérées significatives.

## Résultats

### 1. Rendements

Sont présentés dans le tableau 3.

**Tableau 3. Résultats des rendements des extractions**

<b>Plante</b>	<i>V.vinefera</i>	<i>R.officinalis</i>
Rendement (%)	71	16

### 2. Résultats des dosages

**spectrophotométriques des composés phénoliques totaux, flavonoïdes, dérivés de l'acide hydroxycinnamique**

Sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4. Résultats des dosages spectrophotométriques**

<b>Plante</b>	<i>V.vinefera</i>	<i>R. officinalis</i>
CPT (mg EAG/g d'extrait)	0.53 $\pm$ 0.007	19.76 $\pm$ 1.40
Flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait)	0.09 $\pm$ 0.02	4.46 $\pm$ 0.90
DAH (mg EAC/g d'extrait)	0.05 $\pm$ 0.01	1.39 $\pm$ 0.1

### 3. Résultats de l'activité antioxydante

Sont présentés dans le tableau 5.

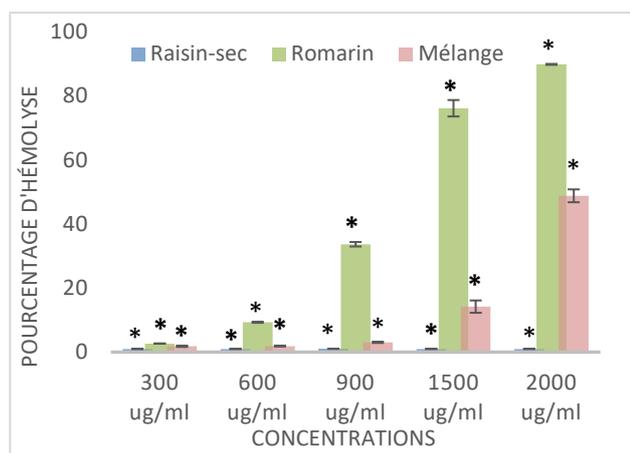
**Tableau 5. Résultats de l'activité antioxydante**

<b>Plante</b>	<i>V. vinefera</i>	<i>R. officinalis</i>	<b>Acide ascorbique</b>
IC50 (mg/l)	44181.11	857.78	383.79

#### 4. Résultats de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, in vitro des extraits *Vitis vinefera*, *Rosmarinus officinalis* et de leur mélange

##### 4.1. Résultats du test de l'innocuité

Sont présentés dans la figure 1.

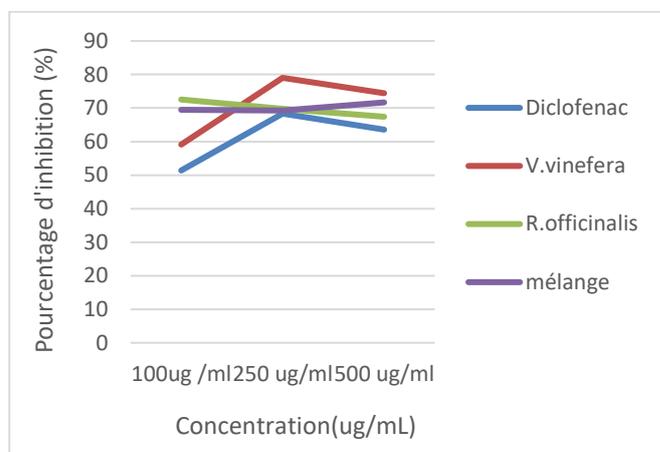


**Figure 1. : Effets des extraits de *V. vinefera* *R. officinalis* et leur mélange sur l'hémolyse des globules rouge en fonction des concentrations.**

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± (n=3), \*P<0.01 comparé au contrôle positif (préparé avec l'eau distillée, présente un taux d'hémolyse à 100 %).

#### 4.2. Test de l'activité de stabilisation de la membrane des globules rouges

Sont présentés dans la figure 2.



**Figure 2. : Effets des extraits de *V. vinefera* *R. officinalis* et leur mélange sur l'inhibition de l'hémolyse des hématies, induite par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations.**

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± (n=3). \*P<0.05 (comparaison de chaque concentration du même échantillon à la précédente).

#### 5. Résultats des essais pharmacotechniques

##### 5.1. Résultats des essais pharmacotechniques des lots placebos

Sont présentés dans le tableau 6.

**Tableau 6. Résultats des essais pharmacotechniques des lots placebos**

Test	F1	F2	F3	F4	Norme	Interprétation
Poids moyen (mg)	490.1	548.65	689.5	687.6	PM +/- 5 %	Conforme
Dureté (Kp)	3.97	3.64	4.89	5.03	-	Conforme
Friabilité (%)	0.61 %	0.42 %	0.51 %	0.83 %	<1%	Conforme
Désagrégation(s)	24 secondes	40 secondes	18 secondes	28 secondes	<3mn	Conforme

## 5.2. Résultats des essais pharmacotechniques du lot avec les extraits de *Vitis vinefera* et de *Rosmarinus officinalis*

Sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7. Résultats des essais pharmacotechniques du lot avec extraits**

Test	Résultat F 5	Norme	Interprétation
Poids moyen (mg)	634.9	PM +/- 5 %	Conforme
Dureté (Kp)	3.68	-	Conforme
Friabilité (%)	0.45 %	<1%	Conforme
Désagrégation(s)	59 s	<3mn	Conforme

## Discussion

### 1. Dosage des composés phénoliques totaux

La teneur en CPT de l'extrait de *Vitis vinefera* est de 0.53 mg EAG/g d'extrait, ce résultat est proche de celui Zhao et al (17) qui ont trouvé 3.45 mg EAG/g d'extrait, mais différent de celui de Williamson et al (18) qui ont trouvé 10.7 mg EAG/g et de Guiné et al (19) qui ont trouvé 34.0±0.4 mg EAG/g d'extrait, 69.7±0.6 mg EAG/g d'extrait et 33.8 ± 0.7 mg EAG/g. Cette différence peut être expliquée par la méthode de séchage qui selon certains auteurs, est un facteur influençant la teneur en CPT (20), en effet dans les travaux de Guiné et al (19) la drogue a été séchée dans des serres solaires et dans des chambres de séchage par convection à 50°C et à 60°C.

La teneur en CPT de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* est de 19.76 mg EAG/g d'extrait résultat différent de ceux Boudjelal et al (21) 26.59±0.957 mg EAG/g d'extrait et de Saini et al (22) 136.66±7.41 mg EAG/g.

### 2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes totaux l'extrait de *V. vinefera* sont à 9.4 mg EQ/100g d'extrait, résultat différent de celui de Mnari et al (23) qui ont trouvé 66.5 ± 1.6 mg EQ/100g d'extrait.

Les flavonoïdes totaux l'extrait de *R. officinalis* sont à 4.46 mg EQ/g d'extrait, résultat proche de celui de Loucif et al (24) 3,20±0,13 mg EQ/g d'extrait, et de Boudjelal (21) 7,64± 0,148 mg d'ER/g d'extrait, mais différent de Saini et al (22) qui ont trouvé 37.13±6.04 mg EQ/g d'extrait.

### 3. Dosage des dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Les DAH de l'extrait de *V. vinefera* sont à 0.05±0.01 ug EAC/mg d'extrait, résultat inférieur de celui d'Elejal et al de (25) qui ont trouvé 9.26 ±0.21 ug EAC/mg d'extrait.

Les DAH de l'extrait de *R. officinalis* sont à 1.39± 0.1 ug EAC/mg d'extrait, résultat supérieur de celui de Boudjelal (21) à 52.97 ug EAC/mg \*10<sup>-5</sup>.

On remarque que les teneurs obtenues sont inférieures aux travaux cités ci-dessus (surtout pour *V. vinefera*) ceci peut être expliqué par le temps et les conditions de conservations, en effet :

Concernant *V. vinefera* l'échantillon provient de Chili, il a été récolté en mars 2022, on ignore les conditions de conservation pendant le transport, étant donné que cette drogue est riche en anthocyanes, composés phénoliques très sensibles notamment à la chaleur et la lumière (20).

Les feuilles de *R. officinalis* ont été récoltées dans la région de Tizi-Ouzou, l'herboriste n'était pas en mesure de donner la date exacte de récolte, la durée de conservation pourrait être à l'origine de ces faibles teneurs (3,26,27).

### 4. Activité antioxydante par la méthode au DPPH

Le résultat de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique utilisé comme anti-oxydant de référence a donné une CI 50=383.79 mg/l.

Le résultat de l'activité antioxydante avec l'extrait de *V. vinefera* a donné une CI 50= 44181.11 mg/L soit 0.0089 fois l'activité antioxydante de l'acide ascorbique, ce qui concorde avec les faibles teneurs en composés phénoliques retrouvées plus haut.

Cependant pourcentage d'inhibition de 14.52 % a été obtenu à la concentration de 4,75mg/ml ce même pourcentage n'a été obtenu qu'à la concentration de 250mg/ml dans les travaux de Keser et al (28), soit une meilleure inhibition.

Le résultat de l'activité antioxydante avec l'extrait de *R. officinalis* a donné un résultat de CI 50= 857.78 (mg/l) soit 0.45 fois l'activité antioxydante de l'acide ascorbique.

Nos résultats sont proches des travaux de Fadili et al (29) dont la CI50 a été de 103,86 ± 3,5µg/ml pour l'extrait de *R. officinalis* comparé à l'acide ascorbique pris comme antioxydant de référence (CI50 =52,5±1,5µg/ml)

### 5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, in vitro des extraits *Vitis*

***vinefera*                      *Rosmarinus officinalis*  
et de leur mélange**

**5.1. Innocuité**

Pour l'évaluation de la toxicité des extraits vis-à-vis des globules rouges, les résultats du test de cytotoxicité sont présentés par l'évolution des pourcentages d'hémolyse des globules rouges, en fonction des concentrations des extraits et de leur mélange.

Les résultats révèlent que le taux d'hémolyse causé par l'extrait de *Rosmarinus officinalis* a augmenté significativement avec l'augmentation des concentrations ; en effet, l'extrait des feuilles de romarin ont présenté un taux d'hémolyse considérable (33%) à partir de 900 ug/mL pour atteindre 90% à 2000 ug/mL.

Cette toxicité de l'extrait *R. officinalis* à l'égard des hématies peut être expliquée par la présence de saponosides, qui sont des molécules qui induisent l'hémolyse par plusieurs mécanismes, et qui peut être évaluée par le taux de relargage de l'hémoglobine (30).

Tandis que le pourcentage d'hémolyse de l'extrait de *Vitis vinefera* est resté stable à 1% pour des concentrations allant de 300 à 2000 ug/ml.

Ceci peut être expliqué par la faible teneur en composés phénoliques de l'extrait de *V. vinefera*.

Concernant le taux d'hémolyse du mélange, il est de 14 % à 1500ul/ml et 49% à 2000ug/ml, ceci peut être expliqué par l'atténuation de la toxicité du *R. officinalis* par *V. vinefera*.

**5.2. Test de l'activité de stabilisation de la membrane des globules rouges**

Les résultats des essais in-vitro sur la stabilisation de la membrane du globule rouge, montrent que les extraits de *V.vinefera*, *R.officinalis* et leur mélange inhibent l'hémolyse induite par l'hypotonie et la chaleur.

Par ailleurs nos résultats montrent que les extraits de *V.vinefera*, *R.officinalis*, leur mélange et le diclofénac ne révèlent pas relation dose-réponse linéaire (entre leur concentration et le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse).

Cependant contrairement à l'essai de l'innocuité, les résultats stabilisation de la membrane du globule rouge n'ont pas donné

des valeurs statistiquement significatives ( $p>0.05$ ) après la comparaison de chaque concentration du même échantillon à la précédente.

Cela étant dit :

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse diminue avec l'augmentation de la concentration de *R. officinalis*, ceci peut être expliqué comme décrit précédemment, par l'augmentation de la concentration des saponosides (30).

Les pourcentages d'inhibition de l'hémolyse de l'extrait de *V. vinefera* et du diclofénac (référence) suivent une relation dose-réponse hormétique (U shaped), où les effets bénéfiques observés à de faibles doses sont absents à des concentrations plus élevées. Il a été rapporté que de telles relations dose-réponse se produisent avec une large gamme de médicaments chimio-thérapeutiques, y compris des antibiotiques, des antiviraux et des agents anti-tumoraux(31).

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse du mélange reste stable à 69 %, comme décrit un peu plus haut ceci peut être expliqué par l'atténuation de la toxicité du *R. officinalis* par *V. vinefera*.

L'activité stabilisatrice des extraits de *Vitis vinefera*, *Rosmarinus officinalis* et de leur mélange pourrait s'expliquer par la neutralisation des radicaux libres par les composés phénoliques, protégeant ainsi les lipides et protéines membranaires du stress oxydatif (32). Ainsi, l'étude actuelle révèle que l'action de stabilisation de la membrane des extraits de *Vitis vinefera* *Rosmarinus officinalis* et de leur mélange peut être importante dans leur action anti-inflammatoire.

**6. Approche de formulation des comprimés :**

L'orientation vers une compression directe a été motivée par l'utilisation d'excipients pour compression directe, à savoir la cellulose microcristalline et le lactose pour compression directe, les résultats des contrôles avec F1 étaient satisfaisants, l'orientation fût ensuite de remplacer le lactose par le mannitol, puisque c'est un excipient très utilisé dans la fabrication de comprimés orodispersibles par rapport à sa saveur agréable en bouche puisque contrairement à la cellulose microcristalline qui laisse une sensation granuleuse, le mannitol se dissout progressivement sans laisser de résidus, l'association mannitol-cellulose

microcristalline permet d'équilibrer la sensation en bouche.

Les formules F2 et F3 ont été réalisées en augmentant le poids des comprimés de 12% pour F2 et de 40% pour la F3 afin de diminuer la proportion des extraits et améliorer la comparabilité du mélange. Les résultats obtenus ont été satisfaisants.

Pour la F4, même si la dureté des comprimés était conforme, l'ajout de povidone comme liant a paru intéressante pour augmenter la dureté des comprimés, l'augmentation de la proportion de mannitol avait pour objectif d'améliorer la palatabilité des comprimés, avec en sus l'addition d'un édulcorant et d'un aromatisant. Le talc a été additionné comme astuce technique utilisée par les techniciens pour éviter le collage lors de la compression et éliminer l'aspect poudreux des comprimés.

La dernière formule placebo (F4) était conforme et a été utilisée pour préparer des comprimés à base d'extraits ; cette dernière a donné des résultats pharmacotechniques conformes.

## Conclusion

Des comprimés orodispersibles à base des extraits de *Vitis vinifera* et de *Rosmarinus officinalis* ont été formulés, dont chaque comprimé contient 94 mg d'extrait de raisin qui apporte une quantité de composé phénolique de 50 ug d'EAG, dont 8.5ug d'EQ de flavonoïdes et 10.34 ug d'EAC des dérivés d'acide hydroxycinnamique et 70mg d'extrait de Romarin qui apporte une quantité de composé phénolique de 1760 ug d'EAG, dont 310 ug d'EQ de flavonoïdes et de 96.6 ug d'EAC des dérivés d'acide hydroxycinnamique.

## Références bibliographiques

- Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French Paradox Revisited. *Front Pharmacol.* 17 juill 2012;3:141.
- baur, sinclair2006.pdf.
- Del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, del Río JA, Ortuño A, et al. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. *Antioxidant activity.* *J Agric Food Chem.* 16 juill 2003;51(15):4247-53.
- A simple method for the isolation and purification of.pdf.
- Angelov G, Condoret JS. Optimization of operational conditions of ethanol extraction of rosmarinic acid from lemon balm (*Melissa officinalis* L.). In: *Chemistry book.* 2007. p. 71-6.
- Catalano L, Franco I, Nobili M, Leita L. Polyphenols in olive oil mill waste waters and their depuration plant effluents: A comparison of the folin-ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica.* 1 sept 1999;43:193-205.
- Zhishen J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals - *ScienceDirect.*
- Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY. Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *J Agric Food Chem.* 1 oct 2003;51(22):6509-15.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. 2004;26(2).
- Chou CT. The Antiinflammatory Effect of an Extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F on Adjuvant-induced Paw Oedema in Rats and Inflammatory Mediators Release. *Phytother Res.* 1997;11(2):152-4.
- Muruges N, Vembar S, Damodaran C. Studies on erythrocyte membrane IV: In vitro haemolytic activity of oleander extract. *Toxicol Lett.* 1 avr 1981;8(1):33-8.
- Shobana S. Evaluation of in vitro hemolytic activity of different parts of *abutilon indicum* (LINN.). *World J Pharm Pharm Sci.* 2016;
- Scherer D. Drug-delivery Products and the Zydys Fast-dissolving Dosage Form. *J phaxm Pharmaco.* 1998;50:375-82.
- Behnke K, Søggaard J, Martin, Bäuml J, Ravindran A, Ågren H, et al. Mirtazapine Orally Disintegrating Tablet Versus Sertraline: A Prospective Onset of Action Study. *Journal of Clinical Psychopharmacology.*
- Clarke A, Brewer F, Johnson ES, Mallard N, Hartig F, Taylor S, et al. A new formulation of selegiline: improved bioavailability and selectivity for MAO-B inhibition. *Journal of Neural Transmission.* 2003;110:1241-55.

16. pharmacopée européenne 8ème édition.
17. Zhao B, Hall CA. Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. Food Chem. 15 mai 2008;108(2):511-8.
18. Williamson G, Carughi A. Polyphenol content and health benefits of raisins. Nutr Res. 1 août 2010;30(8):511-9.
19. Guiné RPF, Almeida IC, Correia AC, Gonçalves FJ. Evaluation of the physical, chemical and sensory properties of raisins produced from grapes of the cultivar Crimson. J Food Meas Charact. 1 sept 2015;9(3):337-46.
20. Bruneton J. Pharmacognosie Phytochimie des Plantes médicinales. 3ème édition. Paris: Editions Lavoisier. 2009. 1120 p.
21. Boudjelal K, Ghaout A, Bourkaib S. Contribution à l'étude de l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante des feuilles de romarin officinal *Rosmarinus officinalis* L.lamiaceae de la région d'El Alia. Faculté de Pharmacie d'Alger département de Pharmacie; 2016.
22. Saini A, Pandey A, Sharma S, Suradkar US, Ambedkar YR, Meena P, et al. Assessment of antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves extract. J Pharmacogn Phytochem. 2020;9(3):14-7.
23. Mnari AB. Phytochemical Content, Antioxidant Properties, and Phenolic Profile of Tunisian Raisin Varieties (*Vitis Vinifera* L.).
24. Loucif D, Kouloughli A. Etude comparative du contenu en composés phénoliques chez quelques plantes médicinales. Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF-Mila; 2022.
25. Elejalde E, Villarán MC, Lopez-de-Armentia I, Ramón D, Murillo R, Alonso RM. Study of Unpicked Grapes Valorization: A Natural Source of Polyphenolic Compounds and Evaluation of Their Antioxidant Capacity. Resources. mars 2022;11(3):33.
26. Guo HF, Wang MH. Impact of drying method on antioxidant, anti-diabetic, and anti-proliferation activities of *Cirsium setidens* in vitro. Acta Aliment. 2018;47(1):44-51.
27. Podsędek A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review - ScienceDirect.
28. Keser S, Celik S, Turkoglu S. Total phenolic contents and free-radical scavenging activities of grape (*Vitis vinifera* L.) and grape products. Int J Food Sci Nutr. 1 mars 2013;64(2):210-6.
29. Fadili kamal. (PDF) Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides* [ Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides* ].
30. Lorent JH, Quetin-Leclercq J, Mingeot-Leclercq MP. The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. Org Biomol Chem. 21 oct 2014;12(44):8803-22.
31. Calabrese EJ, Baldwin LA. Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. Trends Pharmacol Sci. 1 juil 2002;23(7):331-7.
32. Mohanty J. Frontiers | Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging.