

Université MUSTAPHA Stambouli  
Mascara



جامعة مصطفى اسطبولي  
معسكر

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, génie microbiologique et sécurité sanitaire

## THESE de DOCTORAT

Spécialité : Valorisation des substances naturelles

### Intitulée

Mise en évidence et l'activité biologique des phytoconstituants  
de la plante médicinale *Rubia tinctorum* L.

Présentée par : Houari Fatima Zohra  
Le 06/07/2022

Devant le jury:

|              |                      |            |                              |
|--------------|----------------------|------------|------------------------------|
| Président    | BELABID Lakhdar      | Professeur | Université de Mascara        |
| Examineur    | MEDDAH Boumediene    | Professeur | Université de Mascara        |
| Examineur    | ABOUNI Bouziane      | Professeur | Université de Sidi Bel Abbes |
| Examineur    | BENYOUCEF Abdelghani | Professeur | Université de Mascara        |
| Encadreur    | HARIRI Ahmed         | Professeur | Université de Mascara        |
| Co-encadreur | OUIS Naouel          | MCA        | Université de Mascara        |

Année Universitaire : 2021-2022

## REMERCIEMENT

En tout premier lieu, je remercie le bon **Dieu**, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Au Professeur **HARIRI Ahmed**. Je tiens à vous remercier vivement d'avoir accepté la direction scientifique de ma thèse de doctorat, de m'avoir soutenue et aidée à réaliser ce travail avec rigueur et patience. Je vous exprime sincèrement mon respect et ma gratitude.

Au Professeur **MEDDAH Boumediene**. Je tiens à vous remercier très sincèrement de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche, de m'avoir prodigué avec vos conseils judicieux et d'avoir accepté de juger ce modeste travail. Qu'il soit assuré de ma respectueuse et très sincère gratitude.

Au Professeur **BELABID Lakhdar**, Je tiens à vous remercier d'avoir accepté à participer à cette commission et à présider le jury. Que ce travail soit l'expression de ma profonde considération.

Au Professeur **ABOUNI Bouziane**, je tiens à exprimer à travers ce travail ma gratitude, et l'honneur de participer à cette commission et d'apporter un regard critique sur ce travail.

Au Professeur **BENYOUCEF Abdelghani**, je vous remercie pour votre participation au jury et je vous demande d'accepter toute ma reconnaissance.

Un immense merci pour le chef et les ingénieurs des laboratoires pédagogiques de science de la nature, de chimie et de l'hydraulique de l'université de Mascara pour leurs accueils et pour les moyens techniques mis à ma disposition afin de réaliser ce travail.

Je remercie en particulier : Aziz, Bouziane et la directrice de l'animalerie de l'université de Mascara pour m'avoir apporté de l'aide lorsque j'en avais besoin.

Je suis reconnaissant à tous mes amis (es) qui ont facilité le déroulement de ce travail en particulier, Dr khelaf Y, Dr Mechaala S, Dr Belaouni, Dr Brahmi M, Fedoul F, Benhemna A, Boualem D, Belhacen N et ma cousine Boutaleb A pour leurs conseils utiles et leur serviabilité, pour son soutien et sa belle amitié.

Enfin, je remercie chaleureusement ma famille, ma mère, mes sœurs et mes frères pour ses encouragements et son soutien inconditionnel. L'entière contribution à mes réalisations revient à ma mère et à ma famille qui m'ont apporté le soutien moral et les ressources nécessaires pour terminer mon travail. Leur foi inébranlable en moi a été une source d'inspiration constante.

**Merci à vous tous...**

## **DEDICACE**

**Je dédie cette thèse**

**A la mémoire de mon cher père, qui nous a quittés très tôt.**

**Je regrette que tu ne sois pas là en ce jour spécial**

A **ma chère mère**, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous de vos efforts. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorde santé, longue vie et bonheur.

**A mes chers neveux et ma chère nièce**, je vous aime.

**A mes chères Sœurs**, et **A mes chers frères**, mon soutien dans la vie.

**A mes chers amis (es)** (kheyra Hafida, Nassima, Feirouz, Samira, Fatiha, Foufa, Imene, Fethia, Inssaf, Soumia, Nour, Fatima Zohra, Mortada, Hichem, Okba, Menad, Bouroubey, Ghillase)

***Publications***

***&***

***Communications***

## ***Publications et communications***

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont donné lieu à des publications et des communications.

### **Les publications**

**Fatima Zohra Houari, Ramazan Erenler, Sena Bakir, Esra Capanoglu, Ahmed Hariri.**

LC-ESI-MS/MS analysis, toxicity and anti-anaemic activity of *Rubia tinctorum* L. aqueous extract. *Nova biotechnologica et chimica*. (2022).

**Fatima Zohra Houari, Ramazan Erenler, Ahmed Hariri.** Biological activities and chemical composition of *Rubia tinctorum* root and aerial part extracts thereof. *Acta Biologica Colombiana*, (2022);27(3). **(Accepté)**.

### **Les communications**

Etude de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques de *Rubia tinctorum*. Houari, F.Z, Hariri, A. Journée scientifique nationale sur la recherche et la valorisation des plantes d'intérêts écologique, économique et patrimonial. Université Ibn Khaldoun-Tiaret. 06 octobre 2018.

Evaluation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Rubia tinctorum*. Houari, F.Z, Hariri, A. 1<sup>er</sup> séminaire national sur l'environnement et le développement durable. Centre universitaire Ahmed Zabana de Relizane. Novembre 2018.

Etude de l'activité antimicrobienne des racines de *Rubia tinctorum*. Houari, F.Z, Hariri, A. Premiers journées nationales sur les énergies renouvelables et le développement durable. Ain Tmouchent. 14 et 15 juin 2019.

Criblage phytochimique préliminaire et l'étude de l'activité antimicrobienne de la plante *Rubia*. Journée d'étude sur le Génie des Procèdes sous le thème : Génie des procédés : Enjeux, Défis, et Perspectives (JEGP). Université Mustapha Stambouli. Mascara. 18-juin 2019.

Etude de la toxicité de la plante *Rubia tinctorum*. Houari, F.Z, Hariri, A. 9<sup>ème</sup> Rencontre International de Toxicologie. Société Algérienne de Toxicologie. Oran. 16-18 novembre 2019.

Evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'extrait méthanolique de la plante *Rubia tinctorum*. Houari, F.Z, Hariri, A. International Congress Valorization of Bio Resources : Application and Impact on Sustainable développement. Université de Mhamed Bougara –Boumerdes. 26-27 novembre 2019.

Evaluation de la toxicité aigüe par voie orale de l'extrait aqueux de *Rubia tinctorum*. 1<sup>er</sup> Colloque National de Bio toxicologie et Bio activité. Université oran1. 27 novembre 2019.

Phytochemical screening and evaluation of the antioxidant activity of the methanolic extract of *Rubia tinctorum*. Houari, F.Z, Hariri, A. The international Conférence Biosciences 2019- Biotechnology and Cancer. Ecole supérieur de biotechnologie d'Oran. 7-8 décembre 2019.

Analyse nutritionnelle et l'étude de l'activité antioxydante de la plante *Rubia tinctorum*. Houari, F.Z, Hariri, A. The first national seminar of nutrition and health. Université de Hassiba Ben Bouali. Chlef. 16-17 décembre 2019.

Etude phytochimique et les activités biologiques de la plante médicinales *Rubia tinctorum*. Houari, F.Z, Hariri, A. Conférence nationale sur l'environnement et le développement durable. Université Mustapha Stambouli .Mascara. 22-23 janvier 2020.

Criblage phytochimique et l'étude de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante *Rubia tinctorum*. Houari, F.Z, Hariri, A 1<sup>st</sup> international Symposium Enivrement & Sustainable Développement. Centre Universitaire de Relizane. 10-11 février 2020.

Antioxydant and antihemolytic activities of methanolic extract of *Rubia tinctorum* root. Houari, F.Z, Hariri, A. 1er Séminaire International perturbateurs endocriniens environnement & reproduction (peer 2021) .Université Blida 1. 07 au 08 juillet 2021.

Antimicrobial and HPLC analysis of *Rubia tinctorum* methanolic extract. Houari, F.Z, Bakir S, Hariri, A. 1<sup>st</sup> International E-day on microbial biotechnology. Université d'Alger. 18 novembre 2021.

Etude de l'activité antimicrobienne et caractérisation des métabolites secondaires par HPLC de l'extrait aqueux de la plante *Rubia tinctorum*. Houari, F.Z, Hariri, A Premier séminaire nationale en biologie végétale et environnement. Université Mohamed Cherif Messaidia. Souk-Ahras.24-25 novembre.2021.

Nutritional analysis, HPLC analysis and antimicrobial activity of *Rubia tinctorum* extracts. 1<sup>ères</sup> journées internationales des sciences de la nature et de la vie. Ecole normale supérieur de Ouargla .1-2 Mars 2022.

# *Résumé*

## RESUME

Ce travail vise à mettre en évidence les constituants phytochimiques des parties aériennes et racinaires de la plante *Rubia tinctorum* en utilisant des solvants avec différentes polarités, ainsi que d'évaluer leurs activités biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Six extraits ont été préparés par macération et les huiles essentielles par hydrodistillation. Les éléments minéraux et nutritionnels ont été estimés en utilisant des réactions chimiques. Les teneurs en polyphénols ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers les tests d'évaluation suivants : TAC, DPPH<sup>•</sup>, CUPRAC, et FRAP. L'activité anti hémolytique a été déterminée en utilisant un modèle d'érythrocytes. En outre, la détermination de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé et celle des dilutions en milieu liquide. L'analyse quantitative et qualitative des extraits actifs a été réalisée par LC-ESI-MS/MS et le criblage phytochimique, respectivement. L'analyse des huiles essentielles a été déterminée par GC-MS. Le test de toxicité aiguë a été évalué en administrant une dose unique de 2000 mg/kg de l'extrait ; l'anémie a été induite par l'administration de 40 mg de phénylhydrazine par injection intrapéritonéale pendant deux jours. De plus, le pouvoir anti-anémique a été évalué en mesurant les paramètres hématologiques après 15 jours de traitement.

L'analyse des éléments minéraux et nutritionnels a révélé la richesse des deux parties en lipides, en sucre et en fer. Les résultats de l'analyse qualitative ont montré la présence de plusieurs phytoconstituants dont les tannins, les phénols, les flavonoïdes et les alcaloïdes trouvés dans tous les extraits. Alors que, le profil LC-ESI-MS/MS de l'extraction n'a révélé que 11 composés bioactifs qui ont pu être extraits par tous les différents types de solvants (acide fumarique, acide chlorogénique, acide hydroxybenzoïque, acide vanillique, catéchine, épicatechine, acide caffeique, acide protocatechine, acide transcinnamique, acide *p*-couarique, et 4-hydroxybenzaldehyde) avec des différences dans leurs quantités. Par ailleurs, l'analyse de l'huile essentielle GC-MS a permis d'identifier et de quantifier six composés chimiques. Les principaux constituants étaient la cyclohexanone (88,74 %), le diploidalide b (3,5 %) et le phytol (2,4 %). Le dosage des composés phénoliques a montré la richesse de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne en tannins (134.11 mg EAG/g Ms), tandis que l'extrait hydrométhanolique de la partie racine présente des valeurs plus élevées en flavonoïde et en teneur phénolique avec 45.29 mg/EAG/gMS et 118.38 mg EAG/gMs respectivement. En outre, l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne (MF) a révélé le pouvoir antioxydant

le plus élevée pour le DPPH (83,23%) et le FRAP (1,51 ±0,22). L'extrait hydrométhanolique de la racine a montré le potentiel le plus élevé pour le TAC (61.09%) et l'activité antihémolytique (85,99%), tandis que l'extrait aqueux de la partie aérienne a montré la meilleure capacité de réduction des ions cupriques (1899.18 mg TEAC/100 ml). Concernant l'activité antimicrobienne, les huiles essentielles et l'extrait d'éthyle éther de la racine ont eu le meilleur effet contre cinq souches, avec des zones d'inhibition variant entre 06 et 19 mm.

Les résultats des tests toxicologiques effectués in vivo, ont montré que la DL50 de tous les extraits était supérieure à 2000mg/kg, néanmoins, l'extrait di éthyle éther des racines a induit une hémolyse des globules rouges chez les rats traités et une augmentation de certains paramètres biochimiques (créatinine, urée, TGP, et TGO).

Enfin, les extraits sélectionnés ont montré un effet anti anémique, cette activité est exprimée par le rétablissement des valeurs de HB, GR, HT, PCV, et MCH avec une certaine différence dans les degrés d'influence. La meilleure activité a été remarquée dans les groupes traités par l'extrait aqueux des racines.

Dans l'ensemble, notre étude pourra contribuer à valoriser la plante testée dans le domaine pharmaceutique en tant que source de nombreuses substances antioxydantes, antimicrobiennes et antianémiques.

**Mots clés :** *Rubia tinctorum*, LC-ESI-MS/MS, GC-MS, anémie, toxicité, activité biologique.

## ABSTRACT

The aim of this research is to identify the phytochemical constituents of the aerial parts and roots of the *Rubia tinctorum* plant using solvents with different polarities, and to evaluate their biological activities *in vitro* and *in vivo*.

Six extracts were prepared by maceration and the essential oils by hydrodistillation. Mineral and nutritional elements were estimated using chemical reactions. Polyphenol contents were determined by spectrophotometric techniques. Antioxidant activities were determined, *in vitro*, through the following evaluation tests: total antioxidant capacity, DPPH<sup>•</sup>, CUPRAC, and FRAP. Antihemolytic activity was determined using an erythrocyte model. In addition, the determination of antimicrobial activity was performed by the agar disk diffusion method and the liquid dilution method. Quantitative and qualitative analysis of active extracts was performed by LC-ESI-MS/MS and phytochemical screening, respectively. The analysis of essential oils was determined by GC-MS. Acute toxicity test was evaluated by administering a single dose of 2000 mg/kg of the extract; anemia was induced by administering 40 mg of phenylhydrazine by intraperitoneal injection for two days. In addition, the anti-anemic activity was evaluated by measuring the hematological parameters after 15 days of treatment.

The analysis of mineral and nutritional elements revealed the richness of both parts in lipids, sugar and iron. The results of the qualitative analysis showed the presence of several phytoconstituents including tannins, phenols, flavonoids and alkaloids found in all extracts. While, the LC-ESI-MS/MS profile of the extraction revealed that 11 bioactive compounds could be extracted by all the different types of solvents (fumaric acid, chlorogenic acid, hydroxybenzoic acid, vanillic acid, catechin, epicatechin, caffeic acid, protocatechin acid, trans-cinnamic acid, p-coumaric acid, and 4-hydroxybenzaldehyde) with differences in their quantity. In addition, GC-MS analysis of the essential oil identified and quantified six chemical compounds. The main constituents were cyclohexanone (88.74%), diploidalide b (3.5%) and phytol (2.4%). The determination of phenolic compounds showed the richness of the hydromethanolic extract of the aerial part in tannins (134.11 mg EAG/g Ms), while the hydromethanolic extract of the root part presented higher values in flavonoid and phenolic content with 45.29 mg/EAG/gMS and 118.38 mg EAG/gMs respectively. In addition, the hydromethanolic extract of the aerial part (MF) revealed the highest antioxidant activity for DPPH (83.23%) and FRAP (1.51 ±0.22). The hydromethanolic root extract showed the highest potential for TAC (61.09%) and antihemolytic activity (85.99%), while the aqueous extract of the aerial part showed the best copper ion reduction capacity (1899.18 mg

TEAC/100 ml). Regarding the antimicrobial activity, the essential oils and the ethyl ether extract of the root part had the best effect against five strains, with a zone of inhibition varying between 06 and 19 mm. The results of the toxicological tests carried out in vivo, showed that the LD50 of all the extracts was higher than 2000mg/kg, nevertheless, the ethyl ether extract of the roots induced hemolysis of red blood cells in treated rats and an increase of some biochemical parameters (creatinine, urea, TGP, and TGO).

Finally, the selected extracts showed an anti-anemic effect. This activity is expressed by the recovery of HB, RBC, HT, PCV, and MCH values with some difference in the degree of influence. The best activity was noticed in the groups treated with aqueous root extract.

Overall, our study may contribute to valorize the tested plants in the pharmaceutical field as a source of many antioxidant, antimicrobial and antianemic substances.

**Key words:** *Rubia tinctorum*, LC-ESI-MS/MS, GC-MS, anemia, toxicity, biological activity.

## الملخص

يهدف هذا العمل إلى إبراز المكونات الكيميائية النباتية للأجزاء الهوائية وجذور نبات باستخدام المذيبات ذات الأقطاب المختلفة ، وكذلك لتقييم أنشطتها البيولوجية في المختبر وفي الجسم الحي.

تم تحضير ستة خلاصات بالنقع والزيوت العطرية بالتقطير المائي. تم تقدير العناصر المعدنية والغذائية باستخدام التفاعلات الكيميائية. تم تحديد محتويات البوليفينول بواسطة تقنيات القياس الطيفي. تم تحديد الأنشطة المضادة للأكسدة ، في المختبر ، من خلال اختبارات التقييم التالية القدرة المضادة للأكسدة الكلية. DPPH ، CUPRAC ، وFRAP تم تحديد النشاط المضاد للدم باستخدام نموذج كرات الدم الحمراء. بالإضافة إلى ذلك ، تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات من خلال طريقة انتشار الأقراص في وسط أجار وتلك الخاصة بالتخفيفات في الوسط السائل. تم إجراء التحليل الكمي والنوعي للمستخلصات النشطة بواسطة (LC-ESI-MS/MS)، تم تحديد تحليل الزيوت الأساسية بواسطة (GC-MS).

تم تقييم اختبار السمية الحادة بإعطاء جرعة وحيدة مقدارها 2000 مغ/كغ من المستخلص. تم إحداث فقر الدم عن طريق إعطاء 40 ملغ من فينيل هيدرازين عن طريق الحقن لمدة يومين. بالإضافة إلى ذلك ، تم تقييم النشاط المضاد لفقر الدم عن طريق قياس المعلمات الدموية بعد 15 يومًا من العلاج.

وكشفت تحليل العناصر المعدنية والغذائية عن ثراء الجزأين في الدهون والسكر والحديد. أظهرت جرعة المركبات الفينولية ثراء المستخلص الهيدروميثانول للجزء الجوي في العفص 134.1 EAG / gMS ، بينما يقدم مستخلص الهيدروميثانول لجزء الجذر قيمًا أعلى في محتوى الفلافونويد والفينول 45.29 مغ EAG/gMS و 118.38 مغ EAG / جم على التوالي. علاوة على ذلك ، أظهر مستخلص الهيدروميثانول للجزء الجوي (MF) أعلى نشاط مضاد للأكسدة DPPH (1.51 ± 0.22) FRAP (83.23) أظهر مستخلص جذر الهيدروميثانول أعلى احتمالية (61.09) TAC و نشاط مضاد للتحلل (85.99٪) ، بينما أظهر المستخلص المائي للجزء الجوي أفضل أيونات نحاسية 1899.18 مغ / TEAC 100 مل. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للميكروبات ، كان للزيوت الأساسية ومستخلص إيثيل إيثر من الجزء الجذر أفضل تأثير ضد خمس سلالات وأربع سلالات ، على التوالي ، مع منطقة تثبيط تتراوح بين 06 و 19 مم. أظهرت نتائج التحليل النوعي وجود العديد من المكونات النباتية بما في ذلك التانينات والفينولات والفلافونويد والقلويدات الموجودة في جميع المستخلصات. بينما أظهر ملف LC-ESI-MS / MS لعملية الاستخراج أنه يمكن استخلاص 11 مركبًا حيويًا من جميع الأنواع المختلفة من المذيبات (حمض الفوماريك ، وحمض الكلوروجينيك ، وحمض الهيدروكسي ، وحمض الفانيليك ، والكاتشين ، والإبيكاتشين ، وحمض الكافيين ، والبروتوكاتشين. حمض ، وحمض ترانسسيناميك ، وحمض ب-كواريك ، و 4-هيدروكسي بنزالدهيد) مع وجود اختلافات في الكمية. بالإضافة إلى ذلك ، أتاح تحليل زيت GC-MS الأساسي تحديد ستة مركبات كيميائية وتحديد كميتها. المكونات الرئيسية كانت سيكلوهكسانون (88.74٪) ، ثنائي ديلايد ب (3.5٪) ، فيتول (2.4٪).

أظهرت نتائج الاختبارات السمية التي أجريت في الجسم الحي أن الجرعة المميتة 50 لجميع المستخلصات كانت أكبر من 2000 مغ / كغ ، ومع ذلك ، تسبب مستخلص الإيثيل الأثير للجذور في انحلال الدم لخلايا الدم الحمراء في الفئران المعالجة وزيادة في بعض المعلمات البيوكيميائية الكرياتينين واليوريا TGP وTGO .

أخيراً ، أظهرت المستخلصات المختارة تأثيراً مضاداً لفقر الدم. يتم التعبير عن هذا النشاط من خلال استعادة قيم (HB وGR وHT وPCV و MCH ) مع بعض الاختلاف في درجة التأثير. ولوحظ أفضل نشاط في المجموعات المعالجة بالمستخلص المائي للجذور.

بشكل عام، قد تساهم دراستنا في تقييم النباتات المختبرة في المجال الصيدلاني كمصدر للعديد من مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات والمواد المضادة لفقر الدم.

الكلمات المفتاحية : *Rubia tinctorum* ، LC-ESI-MS / MS ، GC-MS ، فقر الدم ، السمية ، النشاط البيولوجي.

*Liste*

*Des*

*Tableaux*

## **LISTE DES TABLEAUX**

|  |     |
|--|-----|
| Tableau 1 : Définition de l'anémie selon l'OMS .....   | 24  |
| Tableau 2. Les causes courantes des différentes classes d'anémie selon l'approche morphologique. ....  | 26  |
| Tableau 3: Quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'anémie.....   | 32  |
| Tableau 4 : Lieu de récolte des plantes et caractéristiques géographiques et bioclimatiques des stations d'étude.....  | 40  |
| Tableau 5 : Rendements des différents extraits du <i>Rubia tinctorum</i> .....   | 66  |
| Tableau 6 : La composition minérale, nutritionnelle et la teneur en eau. ....  | 67  |
| Tableau 7: Composition minérale de la plante <i>Rubia tinctorum</i> .....  | 69  |
| Tableau 8 : Criblage phytochimique des différents extraits de <i>Rubia tinctorum</i> .....   | 71  |
| Tableau 9. Profil métabolique des extraits de <i>Rubia tinctorum</i> analysés par la technique LC-ESI-MS/MS.....   | 73  |
| Tableau 10 : Teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tanins .....   | 78  |
| Tableau 11 : Détermination de CMI et CMB des extraits de <i>R. tinctorum</i> .....   | 100 |
| Tableau 12: Les signes cliniques de toxicité orale aiguë des extraits de <i>Rubia tinctorum</i> chez les rats Wistar exposés à une dose de 2000 mg/kg. ....              | 102 |
| Tableau 13: Effets des extraits de <i>Rubia tinctorum</i> sur les paramètres hématologiques chez les rats pendant 14 jours d'étude de toxicité aiguë par voie orale..... | 109 |
| Tableau 14: Effets des extraits de <i>Rubia tinctorum</i> sur les paramètres biochimiques chez les rats pendant 14 jours d'étude de toxicité aiguë par voie orale.....   | 111 |
| Tableau 15: Les valeurs des paramètres hématologiques avant l'induction de l'anémie. ....  | 113 |
| Tableau 16 : les valeurs des paramètres hématologiques après l'induction de l'anémie par phénylhydrazine .....   | 115 |
| Tableau 17: les valeurs des paramètres hématologiques après le traitement de l'anémie ....   | 116 |
| Tableau 18 : Les propriétés organoleptiques, les paramètres physico-chimiques des huiles essentielles de <i>Rubia tinctorum</i> .....                                    | 120 |
| Tableau 19 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Rubia tinctorum</i> . ....  | 121 |
| Tableau 20 : IC 50 de DPPH et activité antioxydant totale de l'huile et acide ascorbique et capacité antioxydant réductrice du cupric. ....                              | 126 |
| Tableau 21: Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Rubia tinctorum</i> par la méthode de diffusion en gélose.....   | 129 |
| Tableau 22 : Détermination de CMI et CMB d'huile essentielle de <i>R. tinctorum</i> .....  | 129 |

*Liste*  
*Des*  
*Figures*

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Structure du noyau phénol. ....   | 8  |
| Figure 2: Exemple d'un phénol.....   | 9  |
| Figure 3 : Exemple de tannins.....   | 10 |
| Figure 4: Structure chimique de certains flavonoïdes.....  | 12 |
| Figure 5 : Les composants sanguins.....  | 20 |
| Figure 6 : L'hématopoïèse (Jagannathan-bogdan <i>et al.</i> , 2013).....   | 23 |
| Figure 7 : Cycle du fer à l'état normal (Adulte sain) (a), et à l'état anormal (Anémie) (b).<br>(Handelman & Levin, 2008) .....  | 27 |
| Figure 8: Le mécanisme de destruction des hématies dans les anémies hémolytiques<br>intracapsulaire (Kato <i>et al.</i> , 2017) .....  | 29 |
| Figure 9: Le mécanisme de destruction des hématies dans les anémies hémolytiques auto-<br>immune (Longo, 2021).....  | 30 |
| Figure 10 : La plante <i>Rubia tinctorum</i> .....   | 34 |
| Figure 11: Représentation schématique des protocoles expérimentaux réalisés dans cette<br>étude. ....  | 39 |
| Figure 12: Carte géographique représentant le site de récolte .....  | 40 |
| Figure 13 : La partie aérienne (A) et les racines (B) de <i>Rubia tinctorum</i> .....  | 41 |
| Figure 14 : Montage d'hydrodistillation .....  | 46 |
| Figure 15 : Courbe d'étalonnage des polyphénols .....  | 50 |
| Figure 16: Courbe d'étalonnage des flavonoïdes .....   | 51 |
| Figure 17 : Courbe d'étalonnage des tannins. ....  | 52 |
| Figure 18: Réduction d'un radical 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH) .....  | 54 |
| Figure 19: La réaction CUPRAC et le complexe Cu-néocuproïne .....  | 56 |
| Figure 20: Courbe d'étalonnage de trolox.....  | 57 |
| Figure 21 : Prélèvement sanguin a été effectué par ponction de la veine abdominale .....   | 61 |
| Figure 22 : Résultats d'activité de piégeage du radical DPPH de différents extraits de <i>Rubia<br/>tinctorum</i> . ....   | 82 |
| Figure 23 : Les valeurs IC <sub>50</sub> en milligramme par millilitre, de différents extraits et standards<br>de <i>Rubia tinctorum</i> . ....  | 82 |
| Figure 24: Résultats de l'activité antioxydante FRAP des différents extraits de <i>Rubia<br/>tinctorum</i> . ....  | 85 |
| Figure 25 : Résultats de l'activité antioxydante Cuprac des différents extraits de <i>Rubia<br/>tinctorum</i> en mg de capacité antioxydante équivalente de trolox (TEAC)/100 ml sur la base du<br>poids fraîches..... | 87 |
| Figure 26 : Résultats de l'activité antioxydante totale des différents extraits de <i>Rubia<br/>tinctorum</i> . ....   | 89 |
| Figure 27: Relation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante DPPH. ....   | 90 |
| Figure 28 : Relation entre les composés phénoliques et les activités antioxydante FRAP.....  | 91 |
| Figure 29 : Relation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante totale.....   | 91 |
| Figure 30 : Relation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante CUPRAC. ...   | 92 |
| Figure 31 : Résultats de l'activité anti hémolytique des différents extraits de <i>Rubia tinctorum</i> .<br>.....  | 93 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 32 : Exemple des zones d'inhibition de l'extrait di éthyle éther de la partie racine contre <i>Staphylococcus aureus</i> (SA), <i>E. coli</i> (EC), et <i>Bacillus</i> (BC). ..... | 96  |
| Figure 33 : l'effet antimicrobien des extraits de la plante <i>Rubia tinctorum</i> . .....  | 97  |
| Figure 34 : Activité antimicrobienne des antibiotiques basée sur la zone d'inhibition (mm). .   | 98  |
| Figure 35 : Evolution pondérale des rats dans les conditions de la toxicité aigüe. ....   | 104 |
| Figure 36 : Poids des organes des rats traités et témoins dans les conditions de la toxicité aigüe. ....  | 106 |
| Figure 37: Les huiles essentielles de <i>Rubia tinctorum</i> .....  | 119 |
| Figure 38 : Constituants chimiques de l'huile essentielle de <i>Rubia tinctorum</i> . .....   | 122 |
| Figure 39 : Activité antioxydante de l'huile essentielle de <i>Rubia tinctorum</i> à l'aide du test DPPH. ....  | 124 |
| Figure 40 : Activité antioxydante de l'huile essentielle de <i>Rubia tinctorum</i> en utilisant le test du FRAP. ....   | 125 |
| Figure 41 : Activité antioxydante de l'huile essentielle de <i>Rubia tinctorum</i> en utilisant le test Phosphomolybdet. ....   | 126 |
| Figure 42 : Activité anti hémolytique de l'huile essentielle de <i>Rubia tinctorum</i> .....  | 128 |

*Liste*  
*Des*  
*Abréviations*

## LISTE DES ABREVIATIONS

| %                              | Pourcentage   |
|--------------------------------|---|
| $\lambda$                      | : Longueur d'onde   |
| °C                             | : Celsius   |
| ABS                            | : Absorbance  |
| ADN                            | : Acide désoxyribonucléique                                 |
| AF                             | : Extrait aqueux de la partie aérienne.                     |
| AlCl <sub>3</sub>              | : Chlorure d'aluminium                                      |
| AOAC                           | : International, Association of Analytical Communities      |
| AR                             | : Extrait aqueux de la partie racine.                       |
| <sup>a</sup> RT                | : Temps de rétention  |
| C <sub>50</sub>                | : Concentration provoquant 50% d'inhibition                 |
| Ca                             | : Calcium   |
| CuCl <sub>2</sub>              | : Chlorure de cuivre (II)                                   |
| CUPRAC                         | : Capacité antioxydante par réduction de cuivre             |
| DMSO                           | : Di méthylesulphoxide                                      |
| DO                             | : Densité optique   |
| DPPH                           | : 2,2-Diphenyl-1-picrylhrazyl                               |
| EDTA                           | : Acide éthylène diamine Tetra acétique                     |
| EEF                            | : Extrait d'éthyl éther de la partie aérienne               |
| EER                            | : Extrait d'éthyl éther de la partie racine                 |
| Fe                             | : Fer   |
| FNS                            | : Numeration Formule Sanguine                               |
| FRAP                           | : Pouvoir réducteur du fer                                  |
| GC-MS                          | : Chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse   |
| GR                             | : Globule rouge   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | : Peroxyde d'hydrogene                                      |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | : Acide sulfurique  |
| HB                             | : Hémoglobine   |
| HCl                            | : Acide chlorhydrique                                       |
| HClO <sub>3</sub>              | : Acide chlorique   |
| Ht                             | : Hématocrit  |
| IR                             | : Indice de rétention                                       |
| IRR                            | : Indice de rétention des références                        |
| K                              | : Potassium   |
| LC-ESI-MS /MS                  | : Liquid Chromatography Electrospray Ionisation Tandem Mass |
| M                              | : Molarité  |
| M.M                            | : Matière minérale  |
| M.O                            | : Matière organique   |
| MCH                            | : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine               |
| MCHC                           | : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine        |
| MCV                            | : Volume globulaire moyen                                   |
| MF                             | : Extrait hydromethanolique de la partie aérienne           |
| MH                             | : Muller Hinton   |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| mM                              | : Millimole par litre   |
| MR                              | : Extrait hydromethanolique de la partie racine.              |
| MS                              | : Matière sèche   |
| N                               | : Normalité   |
| Na                              | : Sodium  |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | : Carbonate de sodium   |
| NaCl                            | : Chlorure de sodium  |
| nm                              | : Nanomètre   |
| OCDE                            | : Organisation de coopération et de développement économiques |
| PBS                             | : Tampon phosphate salin                                      |
| pH                              | : Potentiel d'hydrogène                                       |
| PHZ                             | : Phénylhydrazine   |
| Ppm                             | : Partie par million  |
| rpm                             | : Rotation par minute   |
| SPSS                            | : <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>          |
| TAC                             | : Capacité antioxydante totale                                |
| TFC                             | : Composés flavonoïdes totaux TGO                             |
| TGO                             | : Glutamate-oxaloacetate-transaminase E                       |
| TGP                             | : Glutamate-pyruvate transaminase                             |
| TPC                             | : Composés phénoliques totaux                                 |
| TTC                             | : Composés tannins totaux                                     |
| UFC                             | : Unité formant colonie                                       |

*Table*  
*Des*  
*Matières*

## Table des matières

|                              |      |
|------------------------------|------|
| REMERCIEMENT .....           | I    |
| DEDICACE .....               | II   |
| RESUME .....                 | V    |
| ABSTRACT .....               | VII  |
| الملخص .....                 | IX   |
| LISTE DES TABLEAUX .....     | XII  |
| LISTE DES FIGURES .....      | XIV  |
| LISTE DES ABREVIATIONS ..... | XVII |

### Introduction Générale

|                    |   |
|--------------------|---|
| Introduction ..... | 1 |
|--------------------|---|

### Partie bibliographique

|   |    |
|---|----|
| I Médecine traditionnelle et la phytothérapie .....   | 5  |
| I.1 Différents types de la phytothérapie .....        | 5  |
| I.1.1 Aromathérapie .....                             | 5  |
| I.1.2 Gemmothérapie .....                             | 5  |
| I.1.3 Herboristerie .....                             | 6  |
| I.1.4 Homéopathie .....                               | 6  |
| I.1.5 Phytothérapie pharmaceutique .....              | 6  |
| I.2 Définition des plantes médicinales .....          | 6  |
| I.3 Les métabolites secondaires .....                 | 7  |
| I.3.1 Les polyphénols .....                           | 7  |
| I.3.1.1 Les non-flavonoïdes .....                     | 8  |
| I.3.1.2 Les flavonoïdes .....                         | 11 |
| I.3.2 Les saponines .....                             | 14 |
| I.3.3 Les alcaloïdes .....                            | 14 |
| I.3.4 Les huiles essentielles .....                   | 15 |
| I.3.4.1 Les terpènes .....                            | 15 |
| I.3.4.2 Les phénylpropanoïdes .....                   | 16 |
| I.4 La bio activité des métabolites secondaires ..... | 16 |
| II. Généralités sur le sang .....                     | 20 |
| II.1 Définition .....                                 | 20 |
| II.2 Les composants du sang .....                     | 20 |
| II.3 L'Hématopoïèse .....                             | 22 |

|  |    |
|--|----|
| II.4 Les maladies du sang .....  | 24 |
| II.5 L'Anémie .....  | 24 |
| II.5.1 Définition de l'anémie .....  | 24 |
| II.5.2 Les symptômes de l'anémie .....   | 25 |
| II.5.3 L'étiologie de l'anémie : mécanismes biologiques et classifications.....                                    | 25 |
| II.5.3.1 L'approche cinétique .....  | 25 |
| II.5.3.2 L'approche morphologique.....   | 26 |
| II.6 La physiopathologie de l'anémie .....   | 26 |
| II.6.1 La physiopathologie de l'anémie ferriprive.....   | 26 |
| II.6.2 La physiopathologie de l'anémie mégalo-blastique par carence en vitamine B12 et en acide folique (B9) ..... | 28 |
| II.6.3 La physiopathologie de l'anémie hémolytique .....   | 28 |
| II.4.4 Traitement de l'anémie.....   | 31 |
| II.4.4.1 En cas de carence de certains éléments .....  | 31 |
| II.4.4.2 En cas des anémies hémolytiques auto-immunes .....  | 31 |
| II.4.4.3 En cas de maladie rénale chronique.....   | 31 |
| II.4.4.4 En cas des maladies inflammatoire.....  | 32 |
| II.4.4.5 Traitement par la phytothérapie (traitement par les antioxydants naturels) .....                          | 32 |
| III. Aperçu bibliographique sur la plante <i>Rubia tinctorum</i> L.....  | 34 |
| III.1 Nomenclature .....   | 34 |
| III.2 Systématique.....  | 34 |
| III.3 Présentation et description botanique .....  | 34 |
| III.5 Habitat et répartition géographique .....  | 35 |
| III.6 Actions et utilisations .....  | 35 |
| III.7 les phytoconstituants .....  | 35 |
| III.8 La pharmacologie .....   | 36 |
| <b>Partie pratique</b>   |    |
| IV. 1 Objectifs de l'étude .....   | 38 |
| IV.2 Matériels biologiques .....   | 39 |
| IV.2.1 Matériel végétal.....   | 39 |
| IV.2.1.1 Présentation et situation de la zone de récolte.....  | 39 |
| IV.2.2 Modèle animal.....  | 41 |
| IV.4.2.3 Souches microbiennes .....  | 41 |
| IV.3 Méthodes .....  | 41 |
| IV.3.1 Évaluation de la composition minérale, nutritionnelle et la teneur en eau. ....                             | 41 |

|   |    |
|---|----|
| IV.3.1.1 Détermination de la teneur en eau (Helrich, 1990) .....                                  | 42 |
| IV.3.1.2 Dosage des sucres (Langemeier and Rogers, 1995).....                                     | 42 |
| VI.3.1.3 Détermination de la matière minérale et organique (Helrich, 1990).....                   | 43 |
| VI.3.1.4 Détermination des éléments essentiels (Na, Ca, K, et Fe) .....                           | 44 |
| IV.3.1.5 Dosage des protéines .....   | 44 |
| IV.3.2 Extraction des principes actifs.....   | 45 |
| IV.3.2.1 Extraction des composés phénoliques.....   | 46 |
| IV.3.2.2 Extraction des huiles essentielles .....   | 46 |
| IV.3.2.3 Analyse physico-chimique des huiles essentielle.....                                     | 47 |
| IV.3.3 Etude phytochimique.....   | 49 |
| IV.3.3.1 Etude qualitative (Screening phytochimique) .....  | 49 |
| IV.3.3.2 Etude quantitative (dosage des composés phénoliques) .....                               | 49 |
| IV.3.3.2.1 Dosage des polyphénols .....   | 50 |
| IV.3.3.2.2 Dosage des flavonoïdes .....   | 51 |
| IV.3.3.2.3 Dosage des tanins condensés (TTC) .....  | 52 |
| IV.3.3.3 Analyse chromatographique des composés phénoliques par LC-ESI-MS/MS.....                 | 52 |
| IV.3.3.4 Analyse des huiles essentielles par GC-MS .....  | 53 |
| IV.3.4 Evaluation de l'activité antioxydante des différents extraits et de l'huile essentielle .. | 54 |
| IV.3.4.1 Piégeage du radical DPPH .....   | 54 |
| IV.3.4.2 Capacité antioxydante totale (TAC).....  | 55 |
| IV.3.4.3 Pouvoir réducteur du fer (FRAP) .....  | 56 |
| IV.3.4.3 Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC).....                              | 56 |
| IV.3.5 Evaluation de l'activité anti-hémolytique .....  | 57 |
| IV.3.6 Etude de l'activité antibactérienne des différents extraits .....                          | 58 |
| IV.3.6.3 Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode des disques .....                | 59 |
| IV.3.6.4 Détermination des valeurs de CMI par la méthode de micro dilution .....                  | 59 |
| IV.3.6.5 Détermination des valeurs de CMB .....   | 59 |
| IV.3.7 Toxicité aiguë.....  | 60 |
| IV.3.7.1 Préparation des extraits .....   | 60 |
| IV.3.7.2 Préparation des groupes .....  | 60 |
| IV.3.7.3 Poids relatif des organes.....   | 61 |
| IV.3.7.4 La variation en pourcentage du poids corporel .....                                      | 61 |
| IV.3.7.5 Prélèvement sanguine.....  | 61 |
| IV.3.7.6 Analyse hématologique et biochimique .....   | 62 |

|  |    |
|--|----|
| IV.3.8 Evaluation de l'activité anti anémique .....  | 62 |
| IV.3.8.1 Induction de l'anémie.....                  | 62 |
| IV.3.8.2 Préparation des groupes et traitement ..... | 62 |
| IV.3.8.3 Analyse des paramètres hématologiques.....  | 63 |
| IV.3.9 Analyses statistiques .....                   | 64 |

### **Résultats et discussion**

|  |     |
|--|-----|
| V.1 Extraction.....  | 66  |
| V.2 Évaluation de la composition minérale, nutritionnelle et la teneur en eau..... | 67  |
| V.3 Détermination des éléments essentiels .....                                    | 69  |
| V.4 Etude phytochimique.....   | 70  |
| V.4.1 Etude phytochimique qualitative .....  | 70  |
| V.4.2 Etude phytochimique quantitative .....                                       | 72  |
| V.4.2.1 Analyse par LC-ESI-MS/MS.....  | 72  |
| V.4.2.2 Dosage des composés phénoliques.....                                       | 77  |
| V.5 Les activités antioxydantes.....   | 80  |
| V.5.1 Activité de piégeage du DPPH .....   | 81  |
| V.5.2 Test du pouvoir réducteur (FRAP) .....                                       | 84  |
| V.5.3 CUPRAC .....   | 86  |
| V.5.4 Activité antioxydante totale (TAC) .....                                     | 88  |
| V.5.5 Relation entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes ..... | 90  |
| V.6 Activité anti hémolytique .....  | 92  |
| V.7 Activité antimicrobienne .....   | 95  |
| V.7.1 Méthode de diffusion sur milieu gélosé .....                                 | 95  |
| V.7.2 CMI et CMB.....  | 100 |
| V.8 Toxicité.....  | 101 |
| V.8.1 Suivi du comportement des rats.....  | 103 |
| V.8.2 Suivi du poids corporel.....   | 104 |
| V.8.3 Suivi du poids des organes .....   | 105 |
| V.8.5 Analyses des paramètres biochimiques .....                                   | 110 |
| V.9 Anémie.....  | 112 |
| V.10 Huile essentielle.....  | 119 |
| V.10.1 Les caractères physiques et chimiques des huiles essentielles.....          | 119 |
| V.10.2 Les activités antioxydantes .....   | 124 |
| V.10.3 Activité anti-hémolytique des huiles essentielles.....                      | 127 |

|  |     |
|--|-----|
| V.10.4 Activité antibactérienne des huiles essentielles..... | 128 |
|--|-----|

**Conclusion Générale**

|                 |     |
|-----------------|-----|
| Conclusion..... | 132 |
| REFERENCE ..... | 136 |
| Annexes .....   | 162 |

# ***Introduction***

### Introduction

Dans le contexte de la valorisation de la médecine traditionnelle, ces dernières années, l'étude des plantes médicinales et de leur usage traditionnel dans les différentes régions du monde a suscité un intérêt croissant. Depuis l'Antiquité à nos jours, les produits d'origine végétale constituent une importante source d'agents thérapeutiques. Aujourd'hui, 25% des médicaments sont préparés à partir des plantes médicinales, ces dernières constituent une source directe ou indirecte dans leur composition (Ahmed, 2017). Dans la plupart des systèmes de guérison traditionnels, les plantes sont les principaux ingrédients des médicaments (Tlili *et al.*, 2019).

Des données récentes émanant du secteur pharmaceutique démontrent que, pour le traitement de plusieurs maladies complexes, les plantes médicinales constituent une ressource très précieuse pour le développement de nouveaux produits chimiques. En effet, elles sont encore utilisées dans les zones rurales des pays en développement (Hosseinzadeh *et al.*, 2015). Elles constituent souvent la seule forme de traitement du cancer pour de nombreuses personnes en Afrique du Nord (Savadi *et al.*, 2020). De fait, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé que 80% de la population mondiale dépend des plantes pour le traitement primaire (OMS, 2000).

Les plantes médicinales attirent les scientifiques pour leurs effets positifs sur la santé humaine ainsi que leurs effets secondaires minimes (Aye *et al.*, 2019). Elles peuvent être considérées comme une bibliothèque de petites molécules et de composés organiques qui ont de multiples intérêts mis à profit dans l'industrie, la cosmétologie, l'alimentation et la dermatopharmacie. Certains de ces constituants sont des composés phénoliques et des flavonoïdes, des glycosides et des tanins (Santos *et al.*, 2016). Ils prennent de plus en plus d'importance sur le marché, car ils sont considérés comme sûrs et non toxiques par rapport aux antioxydants, anti-inflammatoires et antimicrobiens synthétiques, qui ont été limités en raison de leurs divers effets négatifs (Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

Les indications et l'utilisation des préparations à base de plantes sont transmises oralement de génération en génération malgré que le fondement scientifique de ces pratiques est faible ou absent. De nos jours, il y a des efforts ciblés vers l'exploitation de l'information dérivée des systèmes de médecine traditionnelle. Cela implique principalement l'identification et l'isolement de produits naturels bioactifs et l'exploration de leurs mécanismes d'action qui restent encore inconnus pour la majorité d'entre eux.

L'Algérie dispose d'une grande diversité végétale avec plusieurs espèces de plantes qui présentent divers intérêts et qui constituent des axes de recherches scientifiques et surtout dans le domaine des substances naturelles (Haraoui *et al.*, 2019). Certaines espèces font l'objet de nombreuses recherches scientifiques depuis plusieurs décennies, et d'autres sont peu étudiées ou se limitent à une partie seulement d'entre elles. C'est le cas de *Rubia tinctorum*.

*Rubia tinctorum* appartient à la famille des Rubiaceae, comprenant 6000 espèces (Sharifzadeh *et al.*, 2014). Elle est également connue sous le nom de « El foua » (Ezzaki *et al.*, 2021), elle pousse dans les régions du nord de l'Afrique, les régions méditerranéennes de l'Espagne et dans certaines régions d'Asie. Elle est cultivée dans les régions centrales et occidentales de l'Iran (Sharifzadeh *et al.*, 2014). *Rubia tinctorum* a été largement utilisée comme source de couleur rouge avec ses variantes pour la teinture des textiles depuis des milliers d'années (Degano *et al.*, 2009). En outre, plusieurs études ethnobotaniques ont rapporté son utilisation dans le traitement de diverses maladies, telles que la diarrhée (El Haouari and Rosado, 2016), les rhumatismes, les maladies cardiovasculaires (Jouad *et al.*, 2001) et les calculs rénaux (Agarwal et Varma, 2015).

À notre connaissance, aucune étude comparative n'a été réalisée sur la composition chimique et les effets biologiques de différents extraits et huiles essentielles de la partie aérienne et la partie racine de cette plante jusqu'à présent. Ils nous semblent donc intéressants d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche.

La présente thèse est organisée en trois parties :

- La première : c'est la partie bibliographique qui comprend trois chapitres, le premier sur les plantes médicinales et les métabolites secondaires, le deuxième sur le sang et l'anémie et le troisième était un rappel botanique sur la plante *Rubia tinctorum* et leurs effets biologiques et pharmacologiques.
- La deuxième : la partie pratique qui présente les protocoles expérimentaux menés pour la mise en évidence des phytoconstituants et les activités biologiques *in vivo* et *in vitro* de différents extraits et l'huile essentiels de la plante *Rubia tinctorum*.
- La troisième : Expose les résultats obtenus, leurs interprétations et les discute avec des résultats antérieurs intéressant au même sujet.

*Partie*

*Bibliographique*

# ***Chapitre I:***

---

***Médecine traditionnelle et la  
phytothérapie***

## **I Médecine traditionnelle et la phytothérapie**

Depuis des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son mieux être. Avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tout type de remèdes naturels pour finalement élaborer ce que nous appelons aujourd'hui « la médecine traditionnelle » (Roumy, 2007).

Cette dernière est définie par l'OMS comme la somme des connaissances, des compétences et des pratiques qui reposent sur des théories, des croyances et des expériences propres à une culture et, qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en bonne santé ainsi que, pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales (De Smet, 2002).

Malgré les grands progrès de la médecine scientifique moderne, la médecine traditionnelle reste la principale forme de traitement des maladies de la majorité des populations des pays en développement (Dey *et al.*, 2012).

Selon OMS plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de santé (Guideline, 2002). En effet, la phytothérapie est devenue l'une des principales voies d'accès aux soins. Les laboratoires de chimie et de biologie à travers le monde ont emboîté le pas à la médecine traditionnelle pour la recherche des voies et des moyens de venir à bout des pathologies diverses. Ceci par la recherche de nouveaux principes actifs et la compréhension de leurs modes d'action.

Environ 61% des nouveaux médicaments était basé sur des produits naturels dont il a connu un grand succès, en particulier dans les domaines des maladies infectieuses et des maladies cancéreuse (Bhalodia et Shukla, 2011).

### **I.1 Différents types de la phytothérapie**

#### **I.1.1 Aromathérapie**

C'est une thérapeutique naturelle qui utilise les huiles essentielles végétales ou les extraits des plantes aromatiques par voie interne ou externe afin de soigner ou de prévenir les maladies (Lardry et Haberkorn, 2007).

#### **I.1.2 Gemmothérapie**

La gémmothérapie est une thérapeutique basée sur la mise en valeur biologique potentielle des végétaux et des minéraux. C'est une partie de la phytothérapie qui utilise les

tissus embryonnaires frais (bourgeons et jeunes pousses) sous forme de macérât glycérine (Andriane, 2008).

### **I.1.3 Herboristerie**

L'herboristerie correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée. Elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorces, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélules de poudre de plante sèche administrées par voie orale (Garreta, 2007).

### **I.1.4 Homéopathie**

L'homéopathie est une méthode de thérapeutique médicale, elle repose sur un principe selon lequel « les semblables sont guéris par les semblables ». Dans la pratique, cela signifie qu'une substance capable de produire certains effets quand elle est absorbée par un sujet sain, peut guérir n'importe quelle maladie qui présente des symptômes semblables (Sankaran, 2000).

### **I.1.5 Phytothérapie pharmaceutique**

Phytothérapie pharmaceutique utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats (Chabrier, 2010).

## **I.2 Définition des plantes médicinales**

Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques (Sofowora, 2010). Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments.

Selon la pharmacopée européenne, les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Elle peuvent avoir également des usages alimentaires ou condimentaires, ou encore servir à la préparation de boissons hygiéniques (Jean, 2009). Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (Sanago, 2006).

Les métabolites primaires se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie, ils sont classés en quatre grandes familles, à savoir : les

glucides, les lipides, les acides aminés (Protéines) et les acides nucléiques (Marouf *et* Joël, 2007).

En effet, à côté des métabolites primaires classiques, ils s'accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente, mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (De Jean-Jacques *et* Annie, 2005).

Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires ne participent pas directement à l'assimilation des nutriments ni à leur transformation, ils sont aussi chimiquement très différents (Jost *et* Jost-Tse, 2016). Cependant, ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement (Hynes *et* O'Coinceanainn, 2004). Ils appartiennent à des groupes chimiquement variés qui sont très inégalement répartis chez les végétaux mais dans le niveau d'accumulation peut quelque fois atteindre des valeurs élevées (Macheix *et al.*, 2005).

Dans le monde végétal, Plus de 8500 métabolites secondaires sont déjà connus. Il a été démontré que les métabolites secondaires possèdent divers effets biologiques, qui constituent la base scientifique de l'utilisation des herbes dans la médecine traditionnelle de nombreuses communautés anciennes. Ils ont été décrits comme antibiotiques, antifongiques et antiviraux et sont donc capables de protéger les plantes contre les agents pathogènes. En outre, ils constituent d'importants composés absorbant les UV, prévenant ainsi les graves dommages causés aux feuilles par la lumière (Hussein *et* El-Anssary, 2019).

### **I.3 Les métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires des plantes sont classés en plusieurs classes en fonction de leur structure chimique, ils comprennent : les polyphénols, alcaloïdes, saponines, terpènes et les huiles essentiels.

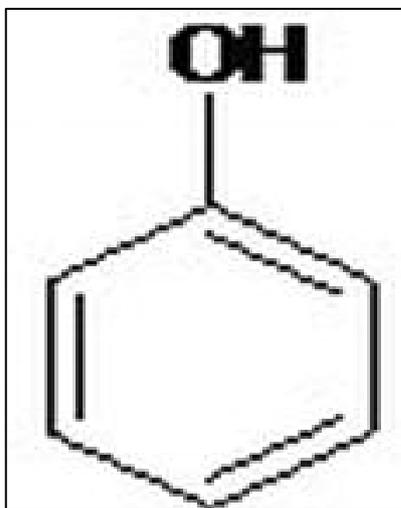
#### **I.3.1 Les polyphénols**

Les polyphénols sont un groupe large et complexe des métabolites secondaires (Kennedy, 2014). Ils sont présents dans toutes les parties des plantes, mais avec une répartition quantitative qui varie entre les différents tissus (Waksmundzka-Hajnos *et* Sherma, 2010).

Ils contribuent de manière significative à la couleur, au goût et à la saveur de nombreuses herbes, aliments et boissons (Hussein *et* El-Anssary, 2019). Certains phénoliques sont appréciés pharmacologiquement pour leurs activités anti-inflammatoires comme la

quercétine ou leurs propriétés anti-hépatotoxiques comme la silybine (Chen *et al.*, 2004). D'autres exercent une activité phytoestrogénique comme la génistéine et la daidzéine, tandis que d'autres sont insecticides comme la naringénine. De nombreuses molécules phénoliques sont également des antioxydants et des piègeurs de radicaux libres efficaces, en particulier les flavonoïdes (Kennedy, 2014).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'un élément structural fondamental qui est le noyau phénolique à six carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Bouaziz *et al.*, 2008).



**Figure 1 :** Structure du noyau phénol.

La classification la plus adoptée implique la subdivision des composés phénoliques en deux groupes principaux : les flavonoïdes et les polyphénols non-flavonoïdes.

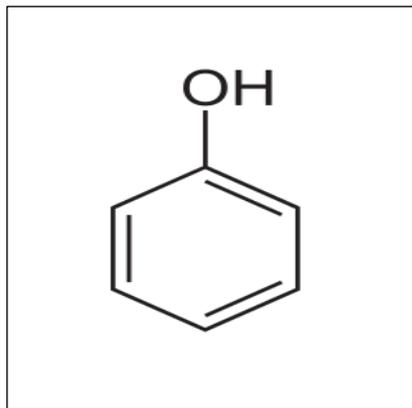
### **I.3.1.1 Les non-flavonoïdes**

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les tannins, les lignanes, les coumarines et les xanthones (Durazzo *et al.*, 2019).

#### **Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont caractérisés par un groupe carboxyle lié à un cycle benzénique (Heleno *et al.*, 2015). Ils sont dérivés de deux composés phénoliques principaux, les acides benzoïques (composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone) et cinnamique (dérivent de l'acide *p*-coumarique, lui-même formé à partir de l'acide cinnamique par la cinnamate-4- hydroxylase). Des exemples de

dérivés hydroxybenzoïques sont : l'acide gallique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique et l'acide syringique. Tandis que les acides caféïques, féruliques, sinapiques et *p*-coumariques appartiennent aux acides hydro-xy-cinnamiques (Amarowicz *et al.*, 2009). Les acides phénoliques peuvent apparaître dans les plantes alimentaires sous forme de glycosides ou d'esters avec d'autres composés naturels tels que les stérols, les alcools, les glycosides et les acides gras hydroxylés (Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011).



**Figure 2:** Exemple d'un phénol

### Les tannins

Les tannins sont des substances poly-hydroxy-phénoliques de structure variée, dont le poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Daltons et qui ont des propriétés communes, en particulier des propriétés tannantes (Jacob et Pignal, 1972). Ils ont la capacité de précipiter les protéines. Ces composés sont utilisés depuis des décennies pour transformer les peaux brutes d'animaux en cuir (Hussein et El-Anssary, 2019). Au cours de ce processus, les molécules de tanin réticulent les protéines et les rendent plus résistantes aux attaques bactériennes et fongiques.

Il existe deux grands types de tanins : les tanins hydro-lysables et les tanins condensés.

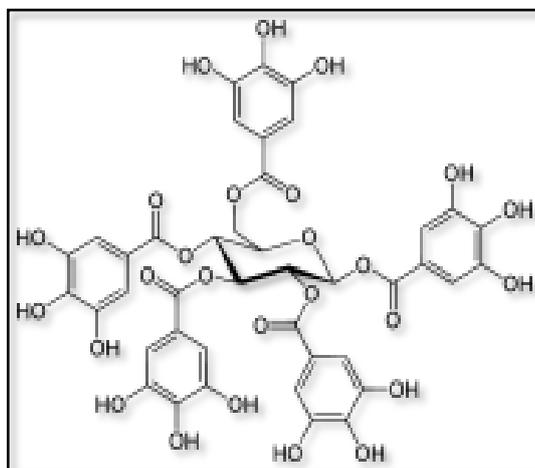
### Les tanins hydro-lysables

Les tanins hydro-lysables peuvent encore être divisés en gallotannins, qui fournissent du sucre et de l'acide gallique lors de l'hydrolyse, et en éllagitannins, qui lors de l'hydrolyse ne donnent pas seulement du sucre et de l'acide gallique, mais aussi de l'acide éllagique. Ces composés sont hydrolysés par des acides faibles et décomposés par des températures élevées pour donner du pyrogallol, un composé hépatotoxique et très irritant (Smeriglio *et al.*, 2017). Ce groupe principalement responsable des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaine plante (Paolini *et al.*, 2003).

### Les tannins condensés

Les tanins condensés, également appelés proanthocyanidines, sont les plus abondants des polyphénols d'origine végétale. Ce sont des oligomères de flavan-3-ol (monomère de catéchine) et/ou de flavan-3,4-diol, généralement liés par des liaisons C-C (4-8 ou 6-8) et occasionnellement par des liaisons C-O-C avec une grande diversité structurale (Lamy *et al.*, 2016). Ils sont également appelés pro-anthocyanidines oligomériques (OPC). Ces composés ne sont pas facilement hydrolysés, ils se décomposent dans des conditions alcooliques acides en donnant des pigments rouges appelés phlobaphènes.

Ce groupe ne traverse pas la barrière intestinale, il est aussi moins toxiques que les tanins hydrolysables (Paolini *et al.*, 2003).



**Figure 3 :** Exemple de tannins

### Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata* (Stefanachi *et al.*, 2018).

Ce sont des composés phénoliques non volatils, ils sont très répandues, notamment dans les racines et les écorces. Ils correspondent aux dérivés du phénylpropane dont les précurseurs sont des acides hydroxycinnamiques. L'acide cisortho hydroxy cinnamique ou coumarinique se trouve chez le végétal à l'état de glucoside hydrolysé par la  $\beta$ -glucosidase, il est immédiatement cyclisé en coumarine proprement dite (Garabeth *et al.*, 2007).

### Les lignanes

Les lignanes, sont des composés polyphénoliques, phytoestrogéniques à faible poids moléculaire, dérivés biosynthétiquement des phénylpropanoïdes. La plupart des lignanes se

trouvent librement dans les plantes, mais une petite proportion d'entre elles coexistent avec les sucres pour former des glycosides dans le bois et la résine des plantes. Ils se produisent presque dans toutes les parties morphologiques des plantes, y compris le xylème, les racines, les feuilles, les fleurs, les fruits, les rhizomes, les tiges et les graines (Zhang *et al.*, 2014).

### Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés non-flavonoïdes présentant une structure carbonée particulière en C6-C2-C6 (Riviere *et al.*, 2012). Ils sont structurellement caractérisés par la présence du noyau 1,2-diphényléthylène et peuvent être divisés en deux catégories : les stilbènes monomères et oligomères (Shen *et al.*, 2009). Ces composés ont été identifiés dans de nombreuses familles de plantes : Melanthiaceae, Polygonaceae, Moraceae, Vitaceae, etc. Ils sont également présents dans diverses sources alimentaires comme le raisin, les fruits rouges, les cacahouètes ou la rhubarbe (Pérez-Jiménez *et al.*, 2010). Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylées (monomères et oligomères de resvératrol), méthylés (pterostilbène), esterifiés, glycosylés (picéïdes) ou même prénylés (chiricanines). Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques (Shen *et al.*, 2009).

### Les xanthones

C'est une famille constituée des composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures répondant à une structure de base en C6-C1-C6 (Jean, 2009).

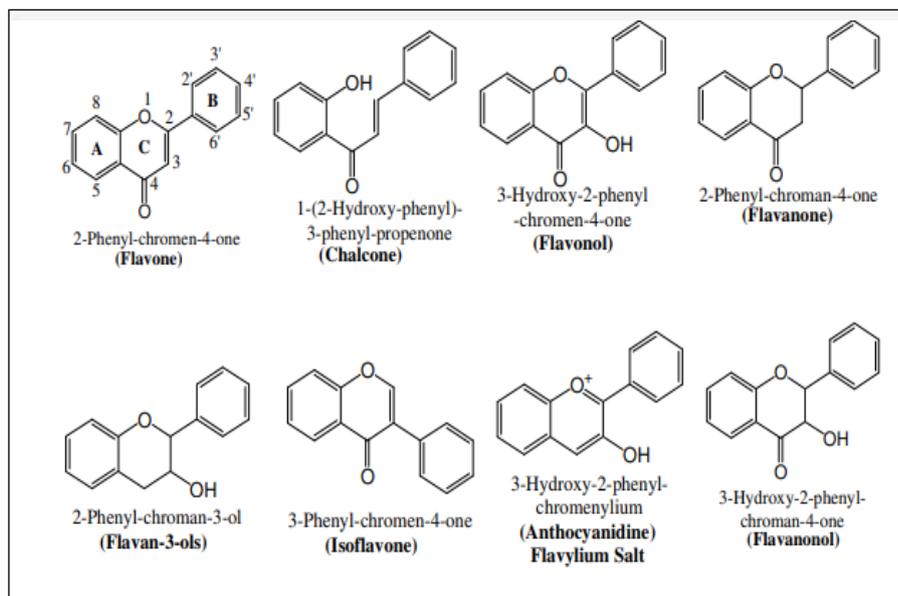
Les xanthones naturels peuvent être subdivisés en fonction de la nature des substituants dans l'échafaudage dibenzo- $\gamma$ -pirone en : simple oxygéné xanthones, xanthones glycosylées, xanthones prénylées et leurs dérivés, dimères de xanthone, et xanthonolignoïdes (Pinto *et al.*, 2005).

#### I.2.1.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une famille large de polyphénols avec une structure commune de diphenylepropanes constituée de deux noyaux aromatiques, liée par trois atomes carboniques C6-C3-C6 (Panche *et al.*, 2016). Ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels formant des pigments responsables des colorations jaunes, oranges et rouges des différents organes végétaux (Ghedira, 2005). Ainsi, ils protègent les plantes contre les divers stress biotiques et abiotiques. Ils présentent un spectre diversifié de fonctions biologiques et jouent un rôle important dans l'interaction entre la plante et son environnement. Les flavonoïdes ne sont pas essentiels à la survie des plantes ; néanmoins, ils sont bioactifs et influencent le transport de l'hormone végétale, l'auxine (Samanta *et al.*, 2011). Ils assurent

également la protection des tissus contre les agressions des ultraviolets, transport d'auxine, ainsi que la signalisation pendant la nodulation (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en différents sous-groupes, qui sont : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanols ou catéchines, anthocyanes et chalcones (Panche *et al.*, 2016).



**Figure 4:** Structure chimique de certains flavonoïdes.

### Flavanones

Les flavanones constituent une classe importante qui est généralement présente dans tous les agrumes tels que les oranges, les citrons et les raisins. L'hésperitine, la naringénine et l'ériodictyol sont des exemples de cette classe de flavonoïdes. Également ils sont appelés dihydroflavones. Ils ont le cycle C saturé, la double liaison entre les positions 2 et 3 est saturée. Ces composés sont responsables du goût amer du jus et du zeste des agrumes (Panche *et al.*, 2016).

### Les flavonols

Ce sont des flavonoïdes avec un groupement cétone. Ils sont caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position 3 de l'hétérocycle central C tels que le kaempférol, la quercétine et la rutine. Ils possèdent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres (Liu *et al.*, 2012). Ils

constituent peut-être le sous-groupe de flavonoïdes le plus courant et le plus important dans les fruits et légumes.

### Les flavones

La flavone est une classe de flavonoïdes basée sur le squelette de la 2-phénylchromen-4-one (2-phényl-1-benzopyran-4-one). La formule moléculaire de la molécule de flavone est  $C_{15}H_{10}O_2$ . Elle possède un squelette à trois cycles C6-C3-C6, les anneaux sont appelés anneaux A, C et B, respectivement et, trois groupes fonctionnels, dont l'hydroxy, le carbonyle et la double liaison conjuguée. Par conséquent, ils donnent lieu à des réactions typiques de ces trois groupes fonctionnels. La flavone est une substance cristalline incolore-jaune, soluble dans l'eau et l'éthanol (Singh *et al.*, 2013).

### Les chalcones

Les chalcones sont des intermédiaires dans la biosynthèse des flavonoïdes, qui sont des substances répandues dans les plantes, elles se caractérisent par l'absence du "cycle C" de la structure de base du squelette des flavonoïdes. Elles sont abondantes dans les plantes comestibles (tels que les tomates, les poires, les fraises, les raisins d'ours et certains produits du blé), et sont considérées comme des précurseurs des flavonoïdes et des isoflavonoïdes (Chavan *et al.*, 2016). Les principaux exemples de chalcones sont la phloridzine, l'arbutine, la phlorétine et la chalconaringénine.

### Les isoflavonoïdes

Les isoflavones, l'un des sous-groupes les plus importants de flavonoïdes, qui contient un squelette carboné C6-C3-C6 basé sur le 3-phénylchroman. Les isoflavones sont présents presque exclusivement dans les légumineuses et peuvent être trouvés en grande quantité dans les produits à base de soja. Ils sont principalement présents sous forme de glycosides (Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011, Monteiro *et al.*, 2018).

### Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments les plus importants des plantes vasculaires (Wrolstad *et al.*, 2005). Elles sont responsables de la couleur orange, rose, rouge, violet et bleue dans les fleurs et les fruits de certaines plantes (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Ils sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium (flavylium) porteur de 3 cycles aromatiques conjugués (Lima *et al.*, 2020). Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel.

### I.3.2 Les saponines

Les saponines sont des métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal. Ils agissent comme une barrière chimique dans le système de défense de la plante contre les agents pathogènes et les herbivores (Augustin *et al.*, 2011). Ils sont généralement connus comme des composés non volatils, tensio-actifs (Vincken *et al.*, 2007). Les saponines sont constituées d'un fragment de sucre contenant habituellement du glucose, du galactose, de l'acide glucuronique, de la xylose, du rhamnose ou du méthylpentose. Ils sont liés glycosidiquement à un aglycone hydrophobe (sapogénine) qui peut être de nature triterpénoïde ou stéroïdienne (Elekofehinti, 2015).

La structure complexe de la saponine est due à la variation de structure de l'aglycone, à la nature des chaînes latérales et à la position de fixation de ces fragments sur l'aglycone (Elekofehinti, 2015).

Les saponines se divisent en deux grandes classes qui sont : les glycosides stéroïdiens et les triterpénoïdes dont la caractérisation de la structure varie en fonction du nombre d'unités de sucre attachées à différentes positions. Les saponines ont de nombreuses applications commerciales en raison de leurs propriétés mouillantes, émulsifiantes et moussantes (Singh et Kaur, 2018).

### I.3.3 Les alcaloïdes

Initialement définis comme des substances azotées basiques d'origine naturelle et de distribution restreinte. Ils ont une structure complexe, leur atome d'azote est inclut dans un système hétérocyclique, ils possèdent une activité pharmacologique significative.

Les alcaloïdes sont bio synthétiquement formés à partir d'un acide aminé (Jean, 2009), tels que l'ornithine, la tyrosine, le tryptophane et autres (Jost et Jost-Tse, 2016).

Ils sont généralement classés en trois groupes :

#### I.3.3.1 Les alcaloïdes vrais

Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils apparaissent dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme d'un sel, soit comme N-Oxide (Milcent et Chau, 2003)

#### I.3.3.2 Les proto-alcaloïdes

Ce sont des amines simples, dont l'azote n'est pas inclut dans un hétérocycle (Milcent et Chau, 2003).

### I.3.3.3 Les pseudo-alcaloïdes

Ne sont pas dérivés d'acides aminés, ils peuvent cependant être indirectement liés à la voie des acides aminés par l'intermédiaire de l'un des leurs précurseurs, ou de l'un des leurs postcurseurs (Yinyang *et al.*, 2014).

### I.3.4 Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composés complexes naturels et volatils, caractérisés par une forte odeur. Elles sont formées par des plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires lipophiles très volatils, solubles dans les lipides et les solvants organiques (Bakkali *et al.*, 2008). Elles peuvent contenir plus de 300 composés différents (Sell, 2005), atteindre une masse inférieure à un poids moléculaire de 300, et être physiquement séparés des autres composants végétaux ou des tissus membranaires (Turek et Stintzing, 2013). Elles ont un indice de réfraction élevé.

Les huiles essentielles sont généralement obtenues à partir du matériel végétal (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines). Elles peuvent être obtenues par hydrodistillation, distillation à la vapeur, distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage (par exemple pour les agrumes) (Rubiolo *et al.*, 2010). Actuellement, 3000 huiles essentielles sont connues, dont environ 300 sont d'une importance commerciale (Bessah et Benyoussef, 2015).

Les constituants des huiles essentielles appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes :

Le groupe des terpénoïdes (terpènes) d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane beaucoup moins fréquents d'autre part. Les deux groupes sont caractérisés par un poids moléculaire bas (Bakkali *et al.*, 2008). Ils peuvent également renfermer divers produits issus d'un processus dégradatif mettant en jeu des constituants non volatils (Jean, 2009).

#### I.3.4.1 Les terpènes

Les terpènes, également appelés terpénoïdes ou isoprénoïdes, constituent la plus grande classe des produits naturels avec plus de 55 000 composés connus et structurellement diversifiés. Ces substances chimiques font partie du métabolisme secondaire des espèces végétales et animales et sont dérivées d'unités isoprènes en C5 jointes tête-bêche par deux voies de biosynthèse, via des intermédiaires qui sont soit l'acide mévalonique soit le 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate.

Les structures typiques contiennent des squelettes carbonés représentés par (C<sub>5n</sub>). elles sont classées en hémiterpènes (C<sub>5</sub>), monoterpènes (C<sub>10</sub>), sesquiterpènes (C<sub>15</sub>), diterpènes (C<sub>20</sub>), sesterpènes (C<sub>25</sub>), triterpènes (C<sub>30</sub>) et les tétraterpènes (C<sub>40</sub>) (Guimarãe *et al.*, 2014).

#### **I.3.4.2 Les phénylpropanoïdes**

Les phénylpropanoïdes constituent un vaste groupe de composés organiques produits par les plantes. Ils sont synthétisés à partir de l'acide aminé phénylalanine, qui est converti en acide cinnamique. La réduction du groupe acide carboxylique présent dans l'acide cinnamique donne un aldéhyde (par exemple, le cinnamaldéhyde) et une réduction supplémentaire produit des monolignols tels que les phénylpropènes (par exemple, l'eugénol et le safrole) (Andrade *et al.*, 2014).

#### **I.4 La bio activité des métabolites secondaires**

Les phyto-composés jouent un grand rôle dans l'adaptation des plantes à leur environnement, mais représentent également une source importante de produits pharmaceutiques (Jain *et al.*, 2019). En effet, le rôle des métabolites secondaires est largement montré dans la protection contre certaines maladies grâce à leurs propriétés biologiques : antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires, antiœstrogènes, antiallergiques, antitumorales, hépatoprotectrices, analgésiques ....

La plupart des plantes renferment divers composants aux propriétés antimicrobiennes permettant de se protéger contre les agents agressifs, notamment les micro-organismes. Les composants présents dans certaines plantes exercent une activité microcicide ou microstatique. Le mécanisme d'action de ces composés est relié à la désintégration de la membrane cytoplasmique, à la déstabilisation de la force motrice du proton, au flux d'électrons, au transport actif et à la coagulation du contenu cellulaire. En effet, les composés chimiques des huiles essentielles agissent sur les protéines de la membrane cytoplasmique (Jain *et al.*, 2019). Les hydrocarbures cycliques agissent sur les ATPases, enzymes connues pour être localisées au niveau de la membrane cytoplasmique et entourées de molécules lipidiques, les epicatechines sur la perturbation des membranes, les coumarines sur l'ADN. De plus, les hydrocarbures lipidiques peuvent fausser l'interaction directe des composés lipophiles avec les parties hydrophobes des protéines (Silva *et al.*, 2010).

Il est reconnu que les substances phytochimiques possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques grâce à leurs activités antioxydantes. Il existe divers composés phytochimiques isolés des plantes comme les vitamines A, C et E, les polyphénols,

flavonoïdes, tanins, lignanes, phytoestrogènes, saponine, bêta-carotène, anthocyanines et lycopène possédant des propriétés antioxydants (Monika *et al.*, 2016).

Chaque composant possède un mécanisme d'action particulier. Par exemple, Les composés phénoliques réduisent ou inhibent les radicaux libres par transfert d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupe hydroxyle. Le mécanisme de réaction d'un composé phénolique avec un radical peroxy ( $\text{ROO}\cdot$ ) implique un transfert concerté du cation hydrogène du phénol au radical, formant un état de transition d'une liaison H-O avec un électron (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

Les flavonoïdes ont un effet protecteur sur les lésions de l'ADN induites par les radicaux hydroxyles. L'un des mécanismes qui explique l'effet protecteur des flavonoïdes sur l'ADN est l'implication des ions métalliques chélateurs, tels que le cuivre ou le fer. Les flavonoïdes complexés avec le cuivre ou le fer empêchent la génération de ROS (Nimse *et al.*, 2015).

De plus, Les caroténoïdes sont connus pour piéger les radicaux peroxy plus efficacement que n'importe quel autre ROS. Les caroténoïdes sont connus pour jouer un rôle important dans la protection des membranes cellulaires et des lipoprotéines contre les ROS grâce à leur activité de piégeage des radicaux peroxy. Ils désactivent les radicaux peroxy en réagissant avec eux pour former des adduits de radicaux centrés sur le carbone stabilisés par résonance (Nimse *et al.*, 2015).

Parmi les différentes activités biologiques des produits végétaux naturels, l'anti-inflammation est l'un des effets les plus rapportés. L'action de l'anti-inflammatoire passe par la diminution de production des principaux médiateurs de l'inflammation par inhibition des enzymes de synthèse : cyclo-oxygénase pour les prostaglandines et lipo-oxygénase pour les leucotriènes. Plusieurs études ont montré l'effet anti-inflammatoire des constituants phytochimiques. Par exemple les triterpènes ( $\alpha/\beta$ -amyrine acétate, nimbine, filicène, acide oléanolique) ont montré une réduction significative du volume de l'œdème, les quercétines sont capables de moduler l'adhésion des monocytes au cours de l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (Azab *et al.*, 2016).

Les alcaloïdes quaternaires et leurs dérivés tétrahydro possèdent de nombreux effets biologiques et thérapeutiques avérés. Par exemple, la palmatine, la jatrorrhizine et la tétrahydropalmatine ont été signalées comme présentant une activité antipaludique *in vitro*... En Chine, la tétrahydropalmatine est utilisée comme analgésique et a été signalée comme présentant des activités bradycardiques, hypotensives et sédatives (Bribi, 2018).

En outre, il a été démontré que les flavonoïdes tels que les xanthones, la quercétine, la gossypétine, la myricétine et l'épicatéchine-3-gallate constituent des inhibiteurs efficaces de l'acétylcholinestérase (AChE) qui est une enzyme cible dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. En effet, ces produits naturels agissent en inhibant l'AChE qui va corriger le déficit en acétylcholine et améliorer son niveau dans le cerveau. Ainsi, l'augmentation du taux d'acétylcholine est le premier précurseur du traitement de la maladie d'Alzheimer (Ghnimi, 2015). De plus, plusieurs produits à base de plantes et de métabolites secondaires sont utilisés dans le traitement du diabète, ils agissent sur la régulation des voies de signalisation de l'insuline, la translocation du récepteur GLUT-4 et/ou l'activation du PPAR $\gamma$  ainsi qu'une action anti-inflammatoire et immunomodulatrice (Ota *et al.*, 2016).

# ***Chapitre II :***

---

## ***Généralités sur le sang***

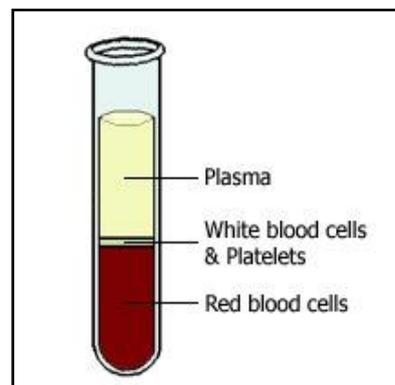
## II. Généralités sur le sang

Un adulte humain moyen a plus de 5 litres (6 quarts) de sang dans son corps. Le sang est un transporteur d'oxygène et de nutriments vers les cellules vivantes. En retour, il élimine leurs déchets. Il intervient aussi dans le transport des cellules immunitaires pour combattre les infections et contient des plaquettes qui peuvent former un bouchon dans un vaisseau sanguin endommagé pour empêcher la perte de sang (Dean, 2005).

### II.1 Définition

Le sang joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions vitales. L'ensemble de ses composants est indispensable à la bonne santé. Ces derniers ne présentent pas les mêmes caractéristiques ; leurs densités relative, leurs vitesse de sédimentation et leurs tailles diffèrent les unes des autres ce qui favorise leurs séparation lorsqu'une force centrifuge est appliquée (Dean, 2005).

Toutes les cellules présentes dans le sang proviennent de la moelle osseuse. Elles commencent leur vie en tant que cellules souches et se transforment en trois principaux types de cellules : les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes (Janeway *et al.*, 2009).



**Figure 5 :** Les composants sanguins

Par ordre croissant, la densité des composants sanguins est la suivante : le plasma, les plaquettes, les leucocytes (couche leucocytaire) et les culots globulaires (CGR).

### II.2 Les composants du sang

#### ❖ Les globules rouges

Les GR sont le type de cellules le plus courant dans le sang, chaque millimètre cube de sang contenant 4 à 6 millions de cellules, avec un diamètre de seulement 6  $\mu\text{m}$ . Les GR sont suffisamment petits pour se faufiler dans les plus petits vaisseaux sanguins. Ils circulent

dans l'organisme jusqu'à 120 jours, après quoi les GR anciens ou endommagés sont éliminés de la circulation par des cellules spécialisées (macrophages) dans la rate et le foie.

Chez l'homme, comme chez tous les mammifères, le GR mature est dépourvu de noyau. Cela permet à la cellule d'avoir plus de place pour stocker l'hémoglobine, la protéine de liaison à l'oxygène, ce qui permet au GR de transporter plus d'oxygène. Les GR sont également de forme biconcave ; cette forme augmente leur surface pour la diffusion de l'oxygène à travers. Chez les vertébrés non-mammifères, comme les oiseaux et les poissons, les GR matures possèdent un noyau (Glenn et Armstrong, 2019).

#### ❖ Les globules blancs

Les globules blancs (leucocytes) sont beaucoup moins nombreux dans le sang que les érythrocytes, ils représentent moins de 1% du volume sanguin total. Ils contiennent des noyaux et d'autres organites mais pas d'hémoglobine. Ils constituent la principale défense de l'organisme contre la maladie ; ils protègent contre les dommages causés par les agents pathogènes en éliminant les cellules endommagées, les toxines et les déchets (Lichtman *et al.*, 2011).

Il existe plusieurs types de leucocytes, qui varient en taille, structure et fonction. Ils peuvent être divisés par plusieurs caractéristiques différentes.

**Les granulocytes** sont des neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles. Ils sont tous de forme grossièrement sphérique et ont des noyaux lobaires. Ils contiennent des granules cytoplasmiques qui sont facilement colorés et visibles au microscope. Ils sont non spécifiques car ils peuvent être activés par un certain nombre de stimuli varié (Glenn et Armstrong, 2019).

**Les agranulocytes** sont constitués de lymphocytes et de monocytes (précurseurs des macrophages). Bien qu'ils contiennent encore des vésicules sécrétoires, celles-ci sont difficilement visibles en microscopie optique, d'où le terme d'agranulocytes. Ils sont très distincts les uns des autres sur le plan fonctionnel mais sont structurellement similaires (Glenn et Armstrong, 2019).

#### ❖ L'hémoglobine (Hb)

L'hémoglobine (Hb) est une métalloprotéine présente dans l'érythrocyte, responsable de plus de 99 % du transport de l'oxygène des poumons vers les tissus et représente 33 % de la masse des globules rouges. Elle est composée de quatre sous-unités contenant chacune une chaîne polypeptidique de globine et une porphyrine contenant du fer appelé hème. L'hème est

synthétisé à partir d'acide succinique et de glycine et contient un atome de fer (Fe) à l'état ferreux réduit (Fe<sup>2+</sup>). Le taux normal d'Hb pour les hommes est de 14 à 18 g/dl ; celui des femmes est de 12 à 16 g/dl. Lorsque le taux d'hémoglobine est faible, le patient est anémique (Walker *et al.*, 1990).

#### ❖ Le plasma

Le plasma est principalement composé d'eau, mais il contient également de nombreuses substances importantes telles que les protéines (albumine, facteurs de coagulation, anticorps, enzymes et hormones), les sucres (glucose) et les particules de graisse.

#### ❖ Les plaquettes

Les plaquettes, les plus petites des cellules sanguines humaines (3,6 à 0,7 µm), jouent un rôle central dans les processus d'hémostase et de thrombose. En outre, les plaquettes sont des cellules spécialisées de la défense immunitaire innée, des modulateurs de la réponse inflammatoire, et elles participent à la cicatrisation des plaies ainsi qu'aux métastases hémotogènes. Elles sont libérées par les mégacaryocytes de la moelle osseuse sous forme de fragments anucléés dans la circulation (Jurk et Kehrel, 2005).

### II.3 L'Hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes de fabrication et de remplacement à partir des cellules souches hématopoïétiques. Elle se déroule dans les organes hématopoïétiques. Elle débute dès la période embryonnaire, dans le sac vitellin de gestation, puis dans le foie fœtal, la rate et la moelle osseuse. Chez l'homme adulte, l'hématopoïèse n'a lieu que dans la moelle osseuse potentielle hématopoïétique.

La base de l'hématopoïèse est une CSH (cellules souches hématopoïétiques) primitive qui est multipotente et qui va, sous l'influence de facteurs stimulants, se différencier dans l'une ou l'autre des lignées cellulaires. Elle se transforme ensuite en une cellule dite progénitrice. Il existe 2 types de progéniteurs : celles qui se dirigeront vers la lignée lymphoïde et celles qui se dirigeront vers la lignée myéloïde. Le progéniteur lymphoïde, appelé CFU-L, va former les deux types de lymphocytes, T et B. Le progéniteur myéloïde, appelé CFU-GEMM (Colony Forming Unit - Granuleuse, Erythrocytaire, Macrophage et Mégacaryocytaire) ou CFU-MIX, va former le reste des cellules sanguines et est encore multipotent (Vainchenker et Reiffers, 2005).

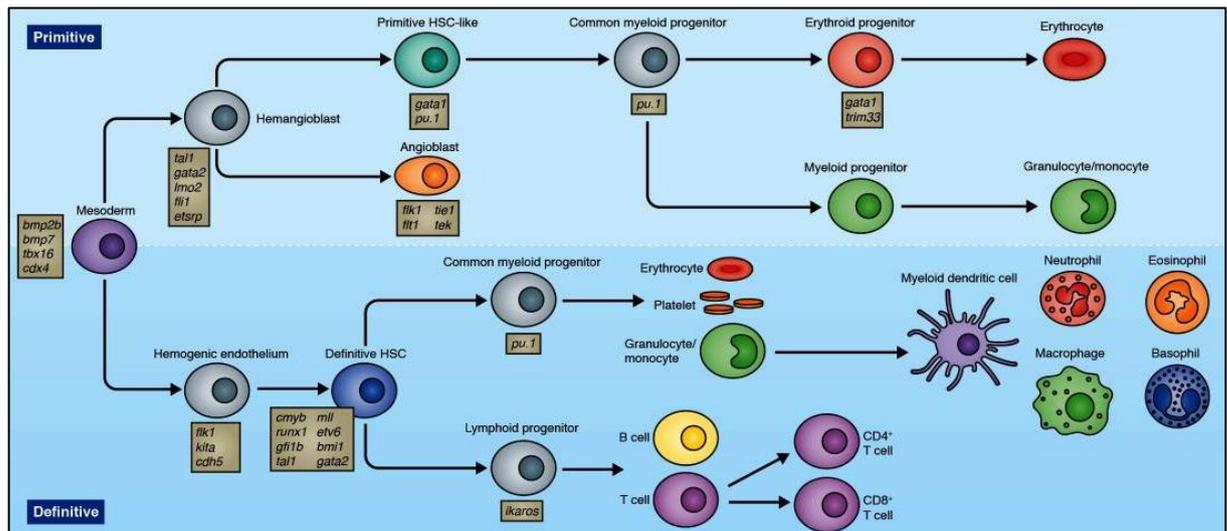


Figure 6 : L'hématopoïèse (Jagannathan-bogdan *et al.*, 2013)

- **La division**

Au bout de plusieurs divisions, ces progéniteurs deviennent spécifiques d'une lignée ; ce sont les cellules précurseur. Les précurseurs les plus immatures sont les myéloblastes, les proérythroblastes, les mégacaryoblastes, les lymphoblastes et les monoblastes. Il s'agit des premières cellules des lignées morphologiquement identifiables.

- **La maturation**

Pendant leur différenciation, les CSH subissent des changements morphologiques tels que la diminution de la taille des cellules, la diminution du rapport nucléo-cytoplasmique, la disparition des nucléoles, la condensation de la chromatine.

Elles vont également subir une maturation engendrant des modifications spécifiques du noyau, du cytoplasme et de la membrane.

- **La multiplication**

Si, lors de l'hématopoïèse, un précurseur ne donnait naissance qu'à un seul élément figuré mature, le rendement et l'efficacité de l'hématopoïèse seraient bien insuffisants. De ce fait, et parallèlement à la maturation, il se produit une division cellulaire à chaque stade de maturation. Selon les lignées, il se produit entre 3 et 5 mitoses de sorte qu'un précurseur peut donner naissance à 16 cellules filles et fournit donc une quantité de cellules suffisante à l'homéostasie sanguine.

## II.4 Les maladies du sang

Plusieurs pathologies peuvent affecter le sang et ses composants (les globules rouges, globules blanc, les plaquettes, et le plasma) à savoir : l'anémie, leucémie, lymphome, thrombocytopénie, hémophilie (Sell, 2005; Means, 2013; Safi *et al.*, 2019).

L'anémie est considérée parmi les troubles sanguins les plus courants et, selon L'OMS (organisation mondiale de Santé), elle touche 1,62 milliard de personnes, ce qui correspond à 24,8 % de la population (OMS, 2000).

## II.5 L'Anémie

### II.5.1 Définition de l'anémie

L'anémie est un état pathologique dans lequel le nombre des hématies est insuffisant pour répondre aux besoins physiologiques de l'organisme. Ces besoins varient en fonction de l'âge, du sexe, de l'altitude, de ses habitudes tabagiques et du stade de la grossesse (OMS, 2008). Elle provoque une diminution de l'apport d'oxygène aux tissus ce qui entraîne une hypoxémie tissulaire (Lord, 2008).

Elle est encore définie par une diminution de la concentration de l'hémoglobine circulante au-dessous des valeurs limites considérées comme normales et fixées par l'OMS (Ouédraogo *et al.*, 2012).

**Tableau 1** : Définition de l'anémie selon l'OMS

| Age /sexe                       | Taux d'hémoglobine (g / dl) |
|---------------------------------|-----------------------------|
| Enfants (6 - 59 mois)           | 11                          |
| Enfants (5 - 11 ans)            | 11,5                        |
| Enfants (12 - 14 ans)           | 12                          |
| Femmes non enceintes (> 15 ans) | 12                          |
| Femmes enceintes                | 11                          |
| Hommes (> 15 ans)               | 13                          |

Les groupes de populations les plus vulnérables à l'anémie comprennent les enfants de moins de 5 ans (42 % atteints d'anémie en 2016), en particulier les nourrissons et les enfants de moins de 2 ans et les femmes enceintes (46 % atteintes d'anémie en 2016).

Les femmes étaient systématiquement plus exposées au risque d'anémie que les hommes dans presque toutes les régions géographiques et dans la plupart des groupes d'âge. Les autres groupes à risque comprennent les personnes âgées, car la prévalence de l'anémie

chez les adultes de plus de 50 ans augmente avec l'avancée en âge (Chaparro et Suchdev, 2019).

### **II.5.2 Les symptômes de l'anémie**

La symptomatologie dépend classiquement du taux de perte de sang, ils sont généralement les suivants : la faiblesse ; la fatigue ; la léthargie des jambes sans repos ; l'essoufflement surtout à l'effort ; la syncope ; les douleurs thoraciques et la tolérance réduite à l'exercice en présence d'une anémie sévère. Par contre, l'anémie légère peut être asymptomatique (Lasch *et al.*, 2009).

### **II.5.3 L'étiologie de l'anémie : mécanismes biologiques et classifications**

L'anémie est fréquemment classée sur la base du mécanisme biologique de causalité. Deux approches sont utilisées : l'approche cinétique et l'approche morphologique (Broadway-Duren et Klaassen, 2013).

#### **II.5.3.1 L'approche cinétique**

L'approche cinétique examine le mécanisme responsable de la diminution de l'hémoglobine, elle est divisée en trois catégories : la perte accrue des globules rouges, la destruction des globules rouges et la diminution de la production des globules rouges.

**a.** Une perte accrue des globules rouges peut résulter d'une hémorragie aiguë où la perte du sang est rapide (par exemple une blessure grave), ou d'une hémorragie chronique où la perte de sang est légère, mais continue (par exemple, les hémorroïdes) (Marieb et Hoehn, 2014).

**b.** Destruction accrue des globules rouges peut résulter d'une anémie hémolytique (Broadway-Duren, 2013).

On distingue classiquement, des hémolyses « corpusculaires » liées à une anomalie d'un des constituants du GR (hémoglobine, enzyme du métabolisme énergétique du GR ou protéine constitutive de la membrane) et, des hémolyses « extra-corpusculaires » où l'hémolyse du GR est secondaire à un facteur extrinsèque (anticorps, agent infectieux, facteur mécanique, toxique...) (Loustau *et al.*, 2011).

**c.** Diminution de la production des globules rouges peut être causée par une carence nutritionnelle (fer, vit B12, folates) ; une carence martiale fonctionnelle (syndrome inflammatoire) ; les cytokines inflammatoires (Cartron, 2012) ; le manque d'hormones nécessaires à une érythropoïèse telles que l'hypothyroïdie et l'hypogonadisme (Broadway-Duren, 2013) et les maladies chroniques à type d'insuffisance rénale et d'inflammation chronique (Andrès *et al.*, 2008). La diminution de la production des globules rouges peut

également résulter de la suppression de la moelle osseuse par la chimiothérapie, la radiothérapie ou d'une maladie de la moelle osseuse (Nathan and Oski, 1987).

### II.5.3.2 L'approche morphologique

Dans l'approche morphologique la classification repose sur l'évaluation du volume globulaire moyen (VGM) et du réticulocyte adapté aux valeurs de l'hémoglobine. Elle permet de distinguer les anémies hémolytiques régénératives des anémies arégénératives micro-, macro- ou normocytaires (Colin *et al.*, 2018).

**Tableau 2.** Les causes courantes des différentes classes d'anémie selon l'approche morphologique.

| Type d'anémie   | Les causes   |
|---|--|
| Anémies régénératives (réticulocytes $150\ 000/\text{mm}^3$ ).  | Hyperdestruction périphérique de globules rouges (hyperhémolyse), hémorragie aiguë, ou à la réparation d'un déficit antérieur de la production érythrocytaire. (Blétryet <i>al.</i> , 2014).   |
| Anémies arégénératives microcytaires (VGM $\leq 80\ \mu\text{m}^3$ ). (Blétryet <i>al.</i> , 2014).                                       | Carence en fer,<br>Carence en cuivre,<br>Thalassémies,<br>Hémoglobinopathies,<br>Anémie de maladie chronique (inflammation). (Broadway-Duren and Klaassen, 2013)   |
| Anémies arégénératives macrocytaires (VGM $\geq 98\ \mu\text{m}^3$ , réticulocytes $100\ 000/\text{mm}^3$ ) (Blétryet <i>al.</i> , 2014). | Carence en vitamine B12 (cobalamine),<br>Carence en folate,<br>L'abus d'alcool,<br>Syndrome myélodysplasique,<br>L'anémie aplasique,<br>Reticulocytose (Ex. En réponse à l'hémolyse, perte de sang),<br>Anémie médicamenteuse (Ex. Hydroxyurée, méthotrexate, 6-mercaptopurine). |
| Anémies arégénératives normocytaires (réticulocytes $< 100\ 000/\text{mm}^3$ et VGM entre $80$ et $98\ \mu\text{m}^3$ )                   | Saignement sévère<br>L'insuffisance rénale chronique<br>Hypothyroïdie<br>Suppression de la moelle osseuse (Ex., Aplasie des globules rouges, anémie aplasique) (Broadway-Duren and Klaassen, 2013)   |

## II.6 La physiopathologie de l'anémie

### II.6.1 La physiopathologie de l'anémie ferriprive

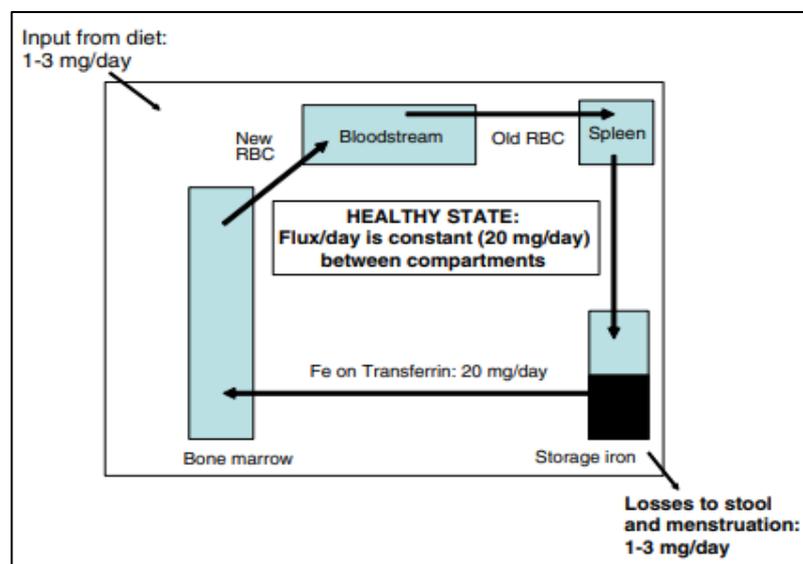
Le fer constitue un élément indispensable pour la synthèse de l'hémoglobine, 75% du fer de l'organisme servant à l'érythropoïèse, seuls 10 à 20% du fer proviennent de

l'alimentation. Il faut donc recycler le fer après une hémolyse physiologique (Murawska *et al.*, 2016).

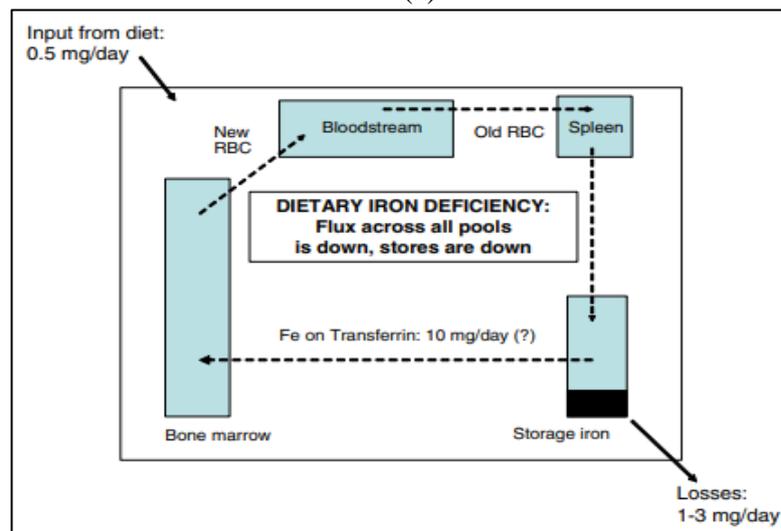
- A l'état normal, le cycle du fer est un circuit fermé (Figure (7a)),

-En cas d'anémie ferriprive, un déséquilibre chronique entre les besoins et les pertes en fer s'installe (Figure (7b)).

L'absorption digestive du fer se fait au niveau de l'intestin, elle est maximale au niveau du duodénum. Le transport du fer dans le plasma se fait grâce à une protéine dite Sidérophiline ou Transferrine. La réserve en fer représente 25% du fer total, soit 1 à 1.5g. Il existe 2 formes de réserve, la Ferritine et l'Hémosidérine.



(a)



(b)

**Figure 7** : Cycle du fer à l'état normal (Adulte sain) (a), et à l'état anormal (Anémie) (b).

(Handelman & Levin, 2008)

La carence en fer se développe par stades. Au cours de la première étape, les besoins en fer sont supérieurs aux apports, ce qui provoque l'épuisement progressif des réserves de fer de la moelle osseuse. À mesure que les stocks diminuent, l'absorption du fer alimentaire augmente par compensation. Au cours des étapes ultérieures, la carence altère la synthèse des globules rouges, puis finit par provoquer une anémie.

Une carence en fer sévère et prolongée peut également entraîner un dysfonctionnement des enzymes cellulaires.

### **II.6.2 La physiopathologie de l'anémie mégaloblastique par carence en vitamine B12 et en acide folique (B9)**

Le déficit en acide folique et en vitamine B12 est responsable d'un blocage partiel des cellules à renouvellement rapide, il s'associe à un défaut de synthèse d'ADN, un asynchronisme de la maturation nucléocytoplasmique et une érythropoïèse inefficace.

En cas de carence en facteurs antipernicieux, le défaut de synthèse de l'ADN se traduit par une réduction des mitoses qui est la cause du gigantisme des érythroblastes d'où les mégaloblastes (car la taille des cellules diminue à chaque mitose). Ces mégaloblastes présentent un développement asynchrone du noyau et du cytoplasme, le noyau conserve l'aspect observé dans érythroblastes matures.

Une autre conséquence est l'érythropoïèse inefficace par hémolyse intra médullaire. Le défaut de synthèse de l'ADN concerne également les cellules granuleuses et plaquettaires, s'exprimant par une poly-segmentation des polynucléaires neutrophiles et une macrothrombocytose.

Au niveau des cellules nerveuses, la carence en vitamine B12 entraîne un défaut de synthèse des gaines de myéline par défaut de synthèse de la méthionine, ceci explique la neuropathie qui est une sclérose combinée de la moelle.

### **II.6.3 La physiopathologie de l'anémie hémolytique**

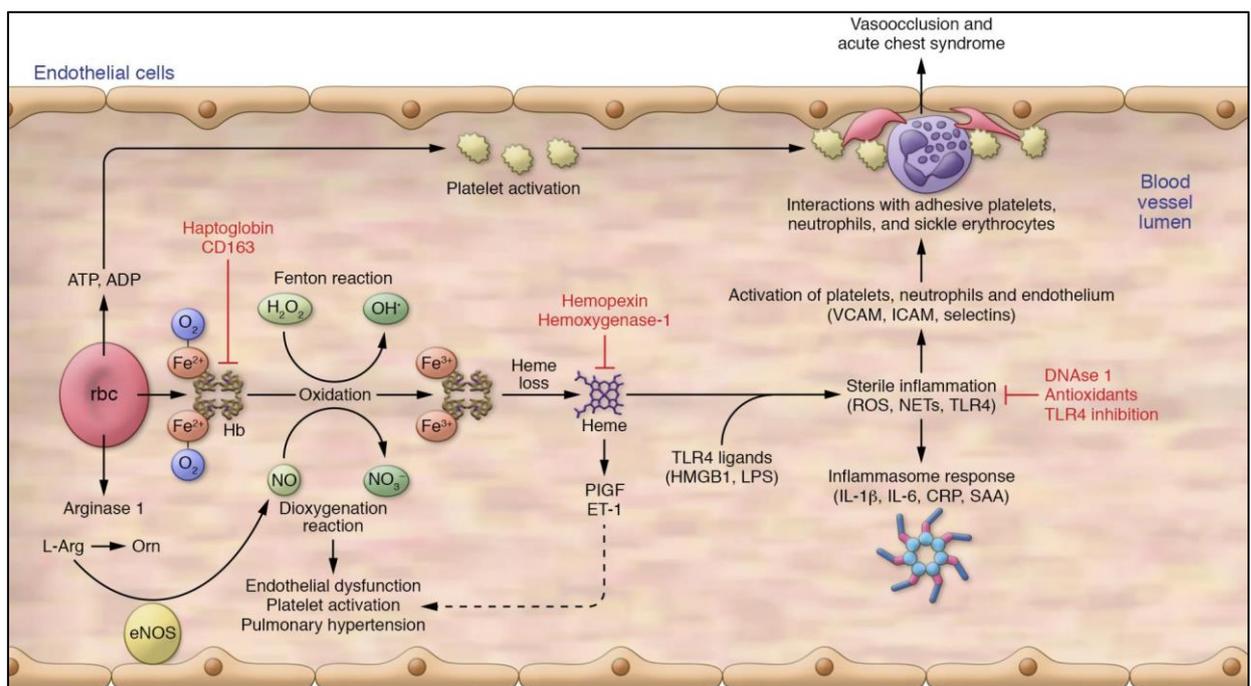
Il existe deux mécanismes d'hémolyse : l'hémolyse intra-vasculaire et l'hémolyse extra-vasculaire.

**-L'hémolyse intra-vasculaire** correspond à la destruction des globules rouges dans la circulation avec la libération du contenu cellulaire dans le plasma (Dhaliwal *et al.*, 2004).

L'hémolyse intra-vasculaire est une raison importante de la destruction prématurée des GR, elle se produit généralement lorsque la membrane cellulaire est gravement endommagée par un certain nombre de mécanismes différents, notamment :

- Les phénomènes auto-immuns ;
- Les traumatismes directs (par exemple, l'hémoglobinurie de marche) ;
- Les contraintes de cisaillement (par exemple, les valves cardiaques mécaniques défectueuses) ;
- La coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) ;
- Les toxines (par exemple, les toxines clostridiennes, les morsure de serpent venimeux) (Kato *et al.*, 2017).

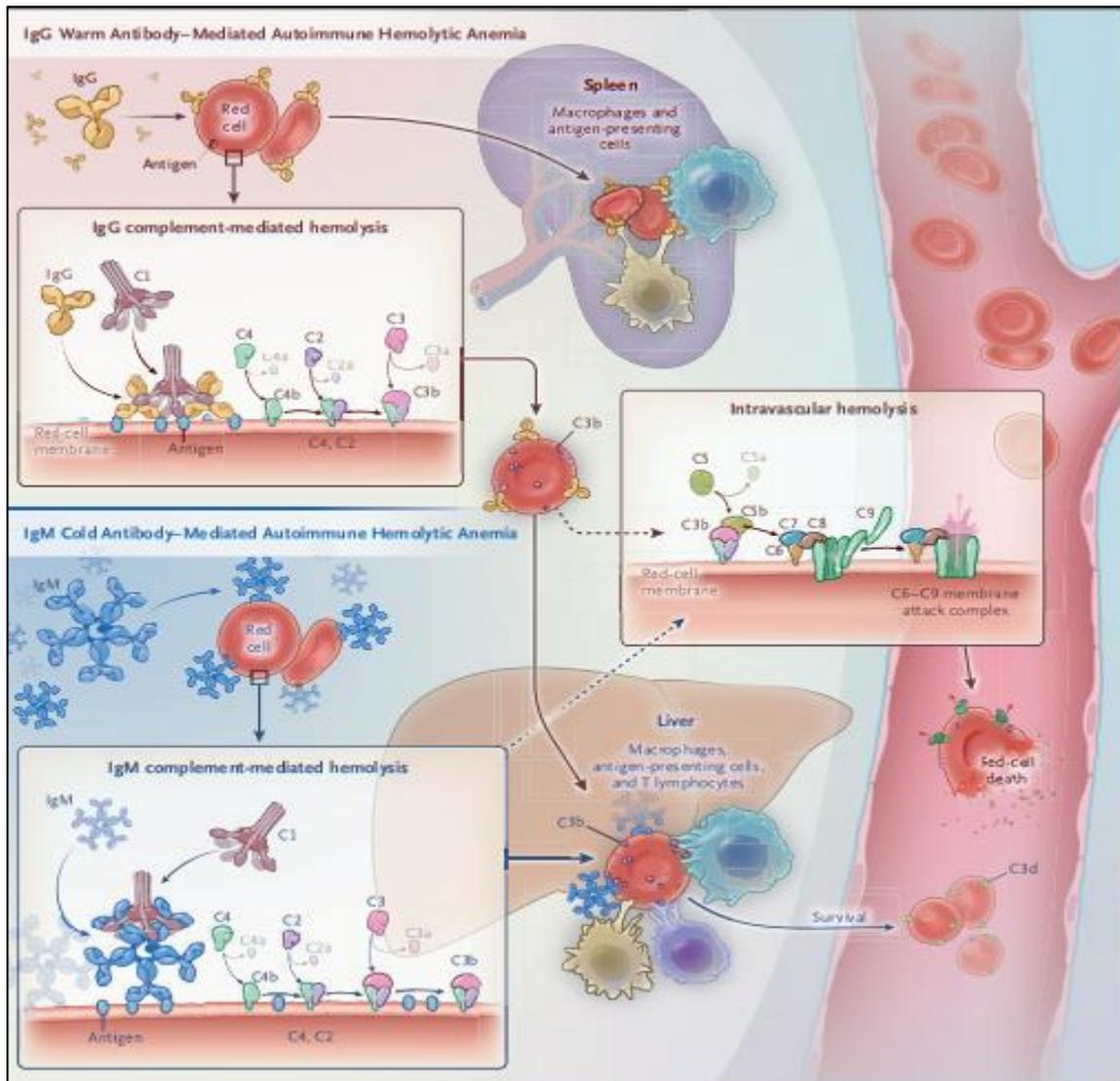
Lorsque les GR sont détruits, leur contenu interne s'échappe dans l'espace vasculaire, entraînant une augmentation marquée de l'hémoglobine circulante ainsi que d'enzymes telles que la lactate déshydrogénase (LDH). Les patients peuvent souvent présenter une anémie aiguë et sévère avec d'autres signes d'atteinte des organes terminaux, en particulier du système rénal, attribuable soit à la fixation du complément lui-même, soit à un rôle pathologique possible joué par l'hémoglobine circulante libérée par les globules rouges (Siddon *et al.*, 2019).



**Figure 8:** Le mécanisme de destruction des hématies dans les anémies hémolytiques intravasculaires (Kato *et al.*, 2017)

-L'hémolyse extra-vasculaire, plus courante, correspond à la destruction et l'élimination des globules rouges avec l'altération de la membrane par les macrophages de la rate et du foie (Dhaliwal *et al.*, 2004).

La rate contribue généralement à l'hémolyse en détruisant les GR légèrement anormaux ou les cellules recouvertes d'anticorps chauds. Une rate hypertrophiée peut même séquestrer des GR normaux. Les GR gravement anormaux ou les GR recouverts d'anticorps froids ou de complément (C3) sont détruits dans la circulation et dans le foie (Siddon *et al.*, 2019).



**Figure 9:** Le mécanisme de destruction des hématies dans les anémies hémolytiques auto-immune (Longo, 2021).

## II.4.4 Traitement de l'anémie

Le traitement d'une anémie repose sur le traitement de la cause.

### II.4.4.1 En cas de carence de certains éléments

#### A- Carence en fer

La supplémentation en fer ne vient que corriger le défaut de fer. Des règles hygiéno-diététiques simples permettent de prévenir et ou corriger une carence en fer en favorisant des aliments riches en fer (foie de veau, huitres, cacao...) en favorisant le fer hémique qui a une meilleure absorption que le fer non hémique (Belon *et al.*, 2013). Un traitement curatif par sels ferreux 100 à 200 mg de fer ferreux par jour (ex : fumarate ferreux (FUMAFER)) (Berrebi, 2009).

Pour les formes sévères, il peut être nécessaire d'avoir recours à l'administration de fer par voie intraveineuse (Belon *et al.*, 2013).

#### B- Carence en vitamine B12

S'il s'agit d'une anémie résulte d'une carence en vitamine B12 (anémie Biermer) (Ramírez *et al.*, 2017). Elle peut être traitée avec une dose élevée de vitamine B12 par voie orale, 1000 à 2000 mg par jour (Broadway-Duren et Klaassen, 2013).

#### C- Carence en acide folique

S'il s'agit d'une anémie résulte d'une carence en acide folique, elle peut être traitée avec une dose élevée de l'acide folique par voie orale (traitement : 5 mg / jour pendant 4 mois, entretien : 5 mg / semaine) (Ramírez *et al.*, 2017).

### II.4.4.2 En cas des anémies hémolytiques auto-immunes

Pour les anémies hémolytiques auto-immunes, le traitement repose essentiellement sur la prise de corticoïdes (cortisone ou un de ses dérivés). Ce type de médicament permet d'enrayer la destruction accrue des globules rouges. Le traitement se prend par voie orale. La dose de départ est maintenue pendant quatre à six semaines, ensuite progressivement réduite (Hill et Hill, 2018).

### II.4.4.3 En cas de maladie rénale chronique

Des injections d'érythropoïétine (ou EPO) sont nécessaires. Cette hormone naturellement fabriquée par le rein stimule la moelle osseuse pour fabriquer des globules rouges (Gouva *et al.*, 2004).

**II.4.4.4 En cas des maladies inflammatoire**

Si la personne souffre d'une maladie inflammatoire chronique, donc le médecin doit être la soigné pour réduire les symptômes de l'anémie inflammatoire.

**II.4.4.5 Traitement par la phytothérapie (traitement par les antioxydants naturels)**

Plusieurs plantes sont reconnues pour leurs effets thérapeutiques. Ils offrent une alternative potentiellement moins onéreuse aux traitements pharmacologiques conventionnels. De longue liste des plantes utilisées traditionnellement autrefois et aujourd'hui dans le traitement de l'anémie, voici celles que l'on peut retenir dans le tableau (3).

**Tableau 3:** Quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'anémie

| Noms scientifiques et Famille  | Partie utilisée                 | Mode de préparation  |
|--|---------------------------------|--|
| <i>Lophiralanceolata</i> Van. Tiegh.<br>ex Keay / Ochnaceae<br>(Koné <i>et al.</i> , 2002)               | Feuilles sèche,<br>écorce-tronc | Décoction des deux organes   |
| <i>Securidaca longepedunculata</i> Fres/<br>Polygalacea<br>(Koné <i>et al.</i> , 2002)                   | Racine                          | Mettre de petits morceaux des racines avec du miel dans une bouteille, faire boire un petit verre matin et soir. |
| <i>Annona senegalensis</i> Pers<br>(Annonaceae)<br>(Makumbelo <i>et al.</i> , 2008)                      | Feuilles, racines               | Décoction  |
| <i>Lippia multiflora</i> Griseb<br>(Bukulukutu: lingala) Verbanaceae<br>(Makumbelo <i>et al.</i> , 2008) | Feuilles                        | Infusion   |
| <i>Bridelia ferruginea</i> Benth<br>(Mavinu: kintandu) Euphorbiaceae<br>(Makumbelo <i>et al.</i> , 2008) | Racine                          | Décoction  |
| Betterave rouge ( <i>Beta vulgaris</i> )   | Racine                          | La consommation de betteraves sous forme de jus (100-200 ml) par jour.   |

# ***Chapitre III:***

---

**Aperçu bibliographique sur  
la plante *Rubia tinctorum* L**

### **III. Aperçu bibliographique sur la plante *Rubia tinctorum* L**

#### **III.1 Nomenclature**

- **Nom français** : la garance des teinturiers (Mouly, 2008)
- **Nom anglais** : Common madder (Angelini *et al.*, 1997)
- **Nom arabe** : Foua (الفوا) (Marhoume *et al.*, 2021)

#### **III.2 Systématique**

- **Règne** : Végétal
- **Ordre** : Gentianales
- **Genre** : *Rubia*
- **Famille** : Rubiaceae
- **Espèce** : *Rubia tinctorum*

#### **III.3 Présentation et description botanique**

Herbe vivace à tiges diffuses très rameuses, quadrangulaires munies sur les angles d'aiguillons crochues. Les feuilles sont assez grandes rigides, lancéolées, groupées en verticilles de 4 à 8 feuilles. Elles sont munies de dents crochues sur les bords et sur les nervures médianes offrant un réseau de nervures secondaires très saillantes en dessous. Apparemment verticillées, munies sur les bords et sur la nervure principale de petits aiguillons qui permettent à la plante de se soutenir en s'appuyant sur les autres plantes.

Les fleurs d'un jaune vif en cymes axillaires et terminales, corolle à divisions aigues anthères linéaires, ovales ; stigmates en massue. Elles s'épanouissent en début d'été (juin-juillet) et portent 4 à 5 pétales soudés à leur base.

Les fruits sont noirs de la grosseur d'un petit pois. La racine de la garance est très longue, rampante et rougeâtre.



**Figure 10** : La plante *Rubia tinctorum*

### **III.5 Habitat et répartition géographique**

La garance (*Rubia tinctorum* L.) est l'une des plus anciennes plantes tinctoriales utilisées dans l'histoire. La plante est originaire du sud et du sud-est de l'Europe, de la région méditerranéenne, de l'Asie Mineure et du Caucase. Aujourd'hui, la plante pousse aussi en Chine et au Japon, jusqu'à l'archipel de Malaisie, dans la partie ouest de l'Amérique du Nord, au Mexique et en Amérique du Sud. Elle se retrouve aussi en Afrique septentrionale (Agnhage *et al.*, 2017).

Elle pousse dans les sols très riches, sur les sols calcaires, les haies, les buissons et les bords de route humides et profonds.

### **III.6 Actions et utilisations**

*Rubia tinctorum* L. a été largement utilisée depuis l'Antiquité pour la teinture des textiles (Coton, laine ou soie), et pour peindre, elle était utilisée comme source de colorants rouges dans l'Égypte ancienne (Cuoco *et al.*, 2009). Elle est utilisée comme un agent aromatisant et comme un additif alimentaire (Siva *et al.*, 2011). En outre, plusieurs études ethnobotaniques ont rapporté son utilisation dans le traitement de diverses affections comme les maladies cardiovasculaires, les douleurs hépatiques, la diarrhée, les rhumatismes et les maladies rénales. De plus, de nombreuses études biologiques ont été menées de manière extensive sur *R. tinctorum* et ont prouvé son potentiel thérapeutique comme antiagrégant plaquettaire, antitumoral, hépatoprotecteur, vasoconstricteur et son effet protecteur sur l'aorte (Marhoume *et al.*, 2019).

### **III.7 les phytoconstituants**

Plusieurs phytoconstituants ont été isolés à partir de cette plante ,elle contient 2-4% de dérivés de di- et trihydroxyanthraquinone de type rubiadine, des dérivés de l'anthracène comme l'alizarine, la rubéarine, la rubéine et la rubéole, des dérivés de l'acide ruberythrinique comme la lucidine, la pseudopurpurine, la purpurine, la rubiadine et leurs dérivés glucosidiques et primverosidiques, ainsi que l'acide rubichlorique, l'acide citrique et d'autres acides végétaux, les tanins, les saponines, les pectines, sucres, protéines, les huiles essentiels et huiles grasses (Adams *et al.*, 2009). Les anthraquinones ont été précédemment signalées comme étant des composants majeurs des espèces de *Rubia tinctorum*. Plus de 28 anthraquinones ont été détectées précédemment comme étant isolées du cette plante ((Eltamany *et al.*, 2020); (Bányai *et al.*, 2006) ; (Rovčanin *et al.*, 2015)).

### **III.8 La pharmacologie**

Les extraits méthanoliques et éthanoliques des racines de *R. tinctorum* sont révélés comme les plus puissants agents anticancéreux, ils ont présenté une tendance similaire d'activité antitumorale dans les cellules CAL-27 et MDAMB-231 (Rashan *et al.*, 2018).

Les différents extraits de racines et des feuilles de *R. tinctorum* L. ont démontré une activité anti-fongique contre les levures. Certains extraits se sont révélés efficaces contre les *Candida albicans* ATCC 10231, les *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, les *Trichoderma viride*, les *Doratomycesstemonitis* et les *Penicillium verrucosum*. Les extraits de racine de *R. tinctorum* se sont prouvés plus actifs contre *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 et *Bacillus cereus* ATCC 7064 (Kalyoncu *et al.*, 2006).

Le traitement oral des rats diabétiques avec l'extrait méthanolique à une dose de 200 mg/kg de poids corporel a montré des résultats significatifs dans la diminution du poids corporel ; l'amélioration du profil lipidique ; la normalisation de l'hyperglycémie ; la résistance à l'insuline ; l'hyperinsulinémie et l'amélioration de la structure et la fonction du tissu hépatique (Eltamany *et al.*, 2020). De même l'extrait butanolique de la racine de *Rubia tinctorum* a montré un effet inhibiteur sur l'agrégation des plaquettes induite par le collagène (Marhoume *et al.*, 2019).

Le traitement par l'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* a montré un effet antidiarrhéique contre l'huile de ricin et une inhibition du transit gastro-intestinal du charbon de bois chez les souris à concentration de 800 mg/kg du poids corporels (Karim *et al.*, 2010)

Le traitement par l'extrait éthanolique des racines de *Rubia tinctorum* a permis de prévenir les altérations induites par éthylène glycol et chlorure d'ammonium. Il a également prévenu la perte du poids corporel induite par le traitement lithiasique. De même il empêche l'augmentation des taux sériques d'urée, de créatinine et de l'acide urique, et, les taux d'électrolytes (Ca, P, K<sup>+</sup> Na<sup>+</sup>, Na et Cl<sup>-</sup>). Il maintient l'équilibre électrolytique et il préserve le métabolisme cellulaire.

*P*artie

*P*ratique

### Partie pratique

#### IV. 1 Objectifs de l'étude

En Algérie, tout comme de nombreux pays en développement, une grande partie de la population a recours à la médecine traditionnelle pour ses soins de santé primaires. Les feuilles, l'écorce des tiges, les racines, l'écorce des racines ou la plante entière de différentes plantes ou arbres médicinaux ont été utilisés dans des préparations pour un usage traditionnel.

La sensibilisation aux connaissances traditionnelles et aux plantes médicinales peut jouer un rôle clé dans l'exploitation et la découverte des ressources végétales naturelles.

Afin de préserver ces connaissances, une approche globale et une collaboration sont nécessaires pour conserver les archives historiques sur les plantes médicinales et utiliser ces ressources en faveur des êtres humains, avant qu'elles ne soient détruites à jamais. C'est pourquoi cette étude a été réalisée afin de déterminer les activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-microbiennes, anti-hémolytiques, la toxicité et l'activité anti-anémique de la plante *Rubia tinctorum*.

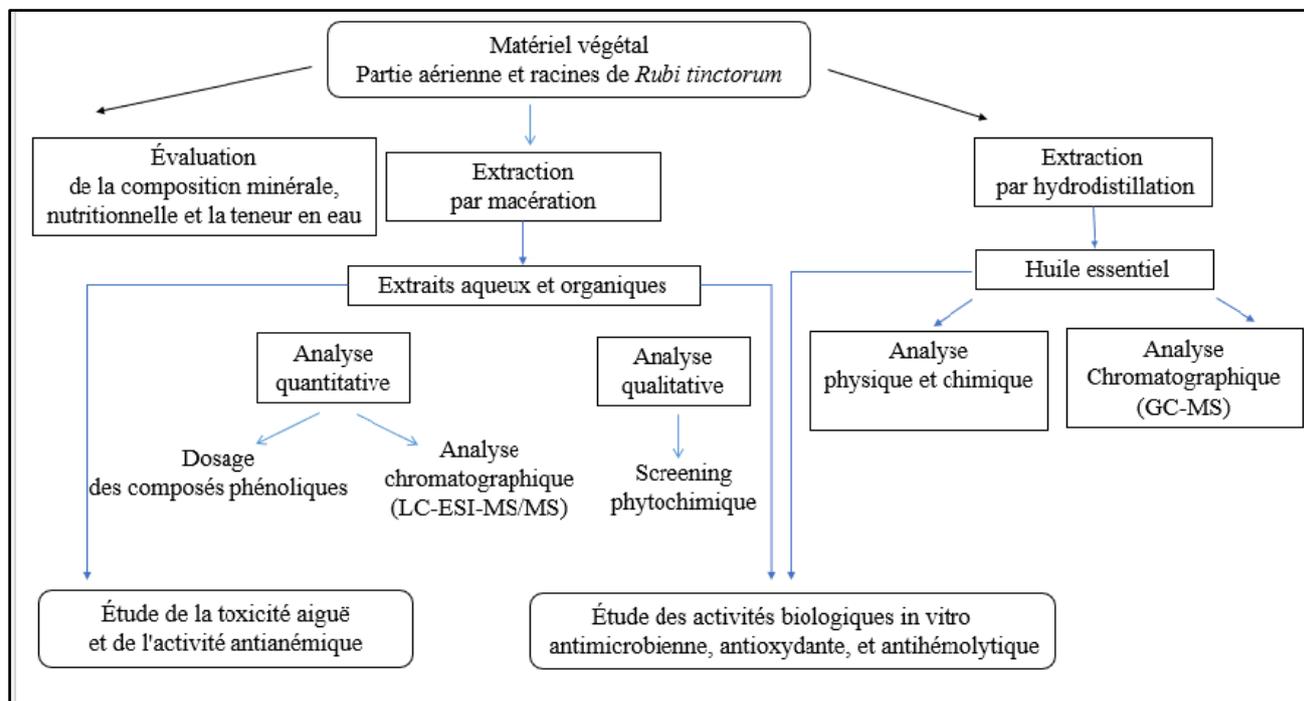
A cet effet, plusieurs étapes ont été suivies :

- Préparer les différents extraits (aqueux et organiques) de la partie racinaire et de la partie aérienne du *Rubia tinctorum* par une macération en utilisant de l'eau distillée, du méthanol à 70% et de l'éther éthylique.
- Extraire les huiles essentielles.
- Déterminer les principales classes de composés phytochimiques.
- Déterminer la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins des deux parties.
- Caractériser et identifier les différents groupes chimiques présents dans les extraits aqueux et organiques par LC-ESI-MS /MS.
- Caractériser et identifier les différents groupes chimiques présents dans les huiles essentielles par GC-MS.
- Evaluer les activités biologiques des différents extraits préparés et celles des huiles essentielles (antioxydants, antimicrobienne, et antihémolytiques).
- Evaluer la toxicité aiguë des extraits aqueux et organiques préparés sur des rats Wistar.
- Evaluer in vivo l'effet anti-anémique des extraits sélectionnés.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire et dans la ferme expérimentale de la Faculté des

Sciences Naturelles et de la Vie - Université de Mascara durant la période étalée entre le mois du juin 2018 jusqu'au janvier 2021.

Les extraits et les huiles essentielles de la plante médicinale ont été transportés à l'université de Ayazagua , Istanbul , Turquie pour l'analyse phytochimique.



**Figure 11:** Représentation schématique des protocoles expérimentaux réalisés dans cette étude.

## IV.2 Matériels biologiques

### IV.2.1 Matériel végétal

#### IV.2.1.1 Présentation et situation de la zone de récolte

Dans cette étude, nous avons utilisé comme espèce *Rubia tinctorum*. Le matériel végétal est constitué d'une partie aérienne (feuilles et fleurs) et une partie sous terrain (racines).

Le choix de la plante a été basé sur la valorisation de plantes qui n'ont pas été étudiées jusqu'à présent, pour essayer de proposer une contribution à la détermination d'autres activités biologiques non encore étudiées, particulièrement in vivo.

Les raquettes de la plante utilisées dans cette étude (*Rubia tinctorum*) ont été récoltées de la région d'Ain Berd dans la wilaya de Sidi bel Abbes au mois de juin 2018. L'identification a été effectuée par les enseignants botaniste de département de Biologie, Université de Mustapha Stambouli Mascara.

Les lieux de récolte ont été déterminés par le logiciel de Google Earth. Les situations géographiques ainsi les étages bioclimatiques de la zone de récolte sont représentés dans le tableau (4).



**Figure 12:** Carte géographique représentant le site de récolte

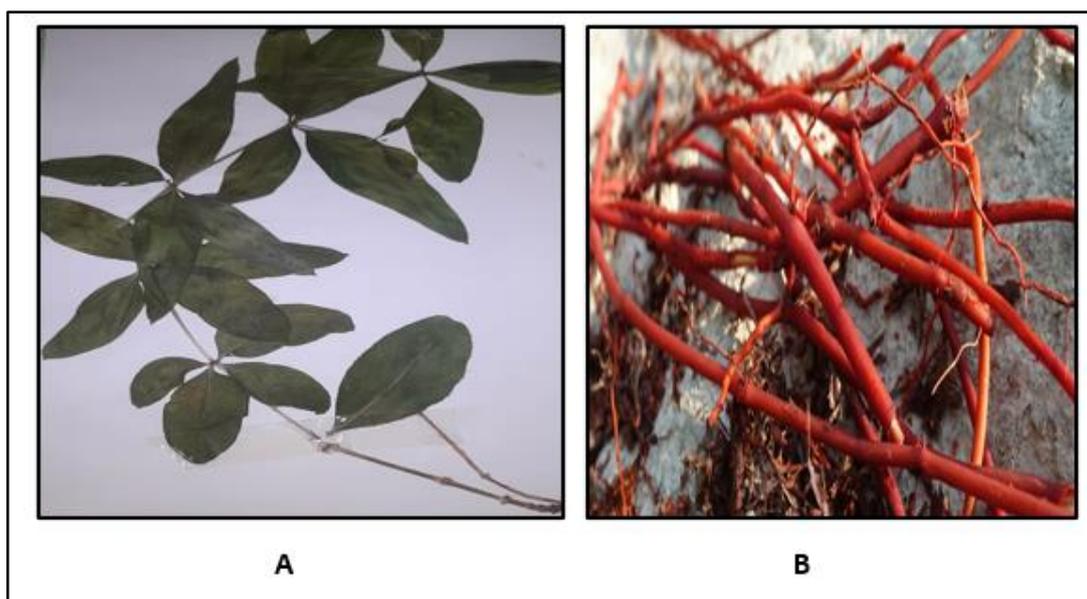
**Tableau 4 :** Lieu de récolte des plantes et caractéristiques géographiques et bioclimatiques des stations d'étude.

| La plante              | Station     | Longitude | Latitude | Altitude | Etage bioclimatique       |
|------------------------|-------------|-----------|----------|----------|---------------------------|
| <i>Rubia tinctorum</i> | Ain El Berd | -0.5°     | 35.383°  | 469m     | Méditerranéen, semi-aride |

Les deux parties de la plante ont été débarrassées de tous éléments étrangers, puis transportées dans des sacs en papiers dans les 24 heures qui ont suivi la récolte. Les plantes sont séchées à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant 14 jours.

Chaque échantillon a été broyé à l'aide d'un broyeur en poudre fine, ainsi la poudre obtenue est conservée dans un bocal hermétique à 4°C pour les utiliser dans la préparation des différents extraits polyphénoliques.

Pour la préparation des huiles essentielles, le matériel végétal a été stocké dans un endroit sec et obscur.



**Figure 13** : La partie aérienne (A) et les racines (B) de *Rubia tinctorum*

#### IV.2.2 Modèle animal

Des rats mâles sains (âgés de 8 semaines, pesant environ 162-233 g) ont été utilisés pour les études de toxicité aiguës et anti-anémiques. Ils ont été obtenus de l'unité d'animalerie de l'Université Mustapha Stambouli, Mascara (Algérie) et maintenus dans la salle d'expérience dans des conditions environnementales normales avec une température de  $22 \pm 3$  ° C, une humidité relative entre 30-70%, et un cycle lumière/obscurité de 12 heures, avec un accès libre à une alimentation régulière et à l'eau.

Les expériences et les conditions de traitement ont été effectuées en conformité avec les directives de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE).

#### IV.4.2.3 Souches microbiennes

Six micro-organismes ont été utilisés : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 6633, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella* ATCC 12022, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *E coli* ATCC 8739. Ils ont été obtenus de l'Institut Pasteur d'Algérie. Ils sont revivifiés à 37 °C par repiquage sur leurs milieux spécifiques. Ces micro-organismes ont été retenus pour leur pouvoir de pathogénicité et leur multi-résistance aux antibiotiques.

### IV.3 Méthodes

#### IV.3.1 Évaluation de la composition minérale, nutritionnelle et la teneur en eau.

Dans le cas des médicaments extraits de plantes ou d'huiles essentielles, la détermination des éléments minéraux et nutritionnels dans les plantes est cruciale, car la

concentration et le type de minéraux et de nutriments affectent la qualité de nombreux produits alimentaires ou d'un médicament (Kumar *et al.*, 2021). De plus, la forte teneur en eau d'une plante permet la formation d'un certain nombre de réactions enzymatiques, ce qui entraîne des conséquences néfastes sur l'aspect des médicaments, leurs caractéristiques organoleptiques, leurs propriétés thérapeutiques par dégradation des principes actifs au cours du temps et elle favorise la prolifération des microorganismes (Chabrier, 2010). C'est pourquoi il est nécessaire de vérifier les propriétés de la plante avant l'extraction.

### IV.3.1.1 Détermination de la teneur en eau (Helrich, 1990)

Pour déterminer la teneur en eau, une quantité de  $5 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$  de feuilles et de racines fraîches a été séchée dans une étuve à  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  jusqu'à l'obtention d'un poids constant, la masse des échantillons séchés (MS) a été déterminée en utilisant une balance précise à  $0,01 \text{ g}$  et la teneur en eau est exprimée par la formule :

$$T \text{ eau} = (M_f - M_s / M_f) \times 100$$

T eau : teneur en eau

Mf : Matière fraîche

Ms : Matière séchée

### IV.3.1.2 Dosage des sucres (Langemeier and Rogers, 1995).

En milieu acide chaud, le glucose est déshydraté en hydroxyméthylfurfural, formant un produit jaune-brun avec le phénol et présentant un maximum d'absorption en spectroscopie UV à  $490 \text{ nm}$ .

Pour déterminer la teneur en sucre,  $10 \text{ g}$  du matériel végétal ont été pesés et bouillis dans  $100 \text{ ml}$  de  $\text{HCl } 2,5 \text{ N}$  pendant  $20 \text{ min}$ . Le mélange a été refroidi à température ambiante, puis filtré par un papier filtre. Dans un tube à essai,  $1 \text{ ml}$  de phénol a été mélangé avec  $5\% \text{ m/v}$ ,  $1 \text{ ml}$  d'échantillon, le tout a été homogénéisé, puis  $5 \text{ ml}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré a été ajouté. Le tout était bouilli dans un bain-marie pendant  $5 \text{ min}$  à  $100^\circ \text{ C}$  pour hydrolyser les sucres. L'absorbance (densité optique [DO]) a été mesurée à  $490 \text{ nm}$  à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc contenant tous les réactifs sans échantillon. Ensuite, une quantité suffisante de carbonate de sodium solide a été ajoutée jusqu'à ce que l'effervescence cesse. Ceci indique une neutralisation complète.

Une filtration a été effectuée et le volume a été porté à  $100 \text{ ml}$ . Ensuite, un volume de  $0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 \text{ ml}$  de l'étalon de travail est introduit dans une série de tubes à essai.

Pour la courbe d'étalonnage, nous avons préparé des concentrations de standards différentes de 0 à 200µg/ml à partir d'une solution de glucose ; la teneur en sucres Q (mg) contenus dans chaque échantillon est calculée selon l'équation suivante :

$$Q=1.V.C /P$$

C : Concentration des sucres de l'échantillon déduite à partir de la courbe d'étalonnage ;

V : Volume d'échantillon ;

P : Poids de l'échantillon.

Après le tracé d'un graphique, la quantité totale de glucides dans l'échantillon a été calculée à partir du graphique standard du glucose. La courbe standard d'absorbance a été tracée à 490 nm sur l'axe "Y" représentant l'absorbance à 490 nm en fonction de la concentration de glucose dans µg/ml sur l'axe X

### VI.3.1.3 Détermination de la matière minérale et organique (Helrich, 1990)

Une quantité de la matière végétale sèche a été placée dans une capsule et pesée puis les deux ont été placées dans un four à moufle à 550 C° pendant 6h.

La teneur en matière minérale et organique été calculée selon les formules suivantes :

$$M.O = M1-M2/ PE \text{ (prise d'essai)}$$

M.O : Matière organique ;

M1 : Poids de la capsule+ échantillon avant séchage ;

M2 : Poids de la capsule +échantillon après séchage ;

PE : Prise d'essai.

$$M. M = M. S - M. O$$

M. M : Matière minérale ;

M. S : Matière sèche ;

M.O : Matière organique.

#### **VI.3.1.4 Détermination des éléments essentiels (Na, Ca, K, et Fe)**

##### **A- Détermination de (Na, Ca, K)**

Dans un flacon, 3 g de poudre de plante ont été mélangés à 8 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré à 98 % et 2 ml de HClO<sub>3</sub> (60 %) pendant 24 heures, le tout placé à une température de 80 °C à l'aide d'un bain de sable jusqu'à ce que le matériau de digestion devienne une poudre blanche. 8 ml d'eau déionisée ont ensuite été ajoutés à la poudre, les éléments minéraux ont été mesurés par un spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme.

##### **B- Détermination du fer (Bhuvanewari, 2015)**

Pour estimer la quantité de fer, 3 étapes ont été réalisées :

###### ***1. Préparation de la cendre***

Cinq grammes de l'échantillon de poudre ont été pesés et ensuite placés dans un four à moufle à 600 °C pendant 3 heures, l'échantillon a été complètement transformé en cendres. Ensuite, les cendres ont été mélangées avec de l'acide chlorhydrique 1 mol l<sup>-1</sup> et 5 ml d'eau distillée et enfin, le mélange a été filtré. Le fer a été mesuré par la méthode du thiocyanate en utilisant l'analyse spectrophotométrie.

###### ***2. Préparation de la solution de thiocyanate d'ammonium***

Dans un flacon de 500 ml, nous avons déposé 38 g de thiocyanate d'ammonium, puis on a complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait.

###### ***3. Estimation du fer par la méthode au thiocyanate***

Dans des tubes à essai, 10 ml d'échantillon ont été déposés. Ensuite, 10 ml de solution de thiocyanate d'ammonium ont été ajoutés. Par la suite, 10 ml de chacune des cinq solutions étalons de fer (contenant 2, 4, 6, 8, 10 x 10<sup>-5</sup> mol l<sup>-1</sup> de fer) ont également été ajoutées au mélange, qui ont tous été soigneusement mélangées par vortex. L'absorbance a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Des graphiques standard ont été utilisés pour mesurer la concentration en fer, le résultat a été exprimé en mg/100 g de l'échantillon.

#### **IV.3.1.5 Dosage des protéines**

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Bremner et Breitenbeck, (1983) avec quelques modifications. C'est une méthode qui consiste à minéraliser dans un milieu totalement acide la matière biologique, puis à distiller l'azote sous forme d'ammoniac.

Pour estimer la teneur en protéines, 3 étapes ont été réalisées :

### 1. La minéralisation

Dans un matras, 1g de la poudre végétale a été mélangé avec 15 g de sulfate de potassium : 1g de sulfate de cuivre ; 1g de sélénium et 25 ml d'acide sulfurique pure. Le mélange a été chauffé jusqu'à l'obtention d'une solution de couleur verdâtre.

### 2. La distillation

Après le refroidissement du mélange, 80 ml d'eau distillée et 80 ml de solution d'hydroxyde de sodium (33%) a été rajoutées aux solutions. Un erlenmeyer gradué contenant 25ml d'acide borique (4%) a été placé dans l'appareil distillateur. La distillation du mélange a été faite par chauffage du ballon jusqu' à atteindre 50 ml de distillat au niveau d'erlenmeyer.

### 3. Le titrage

Le Titrage a été fait avec  $H_2SO_4$  (0,1N), nous avons ajouté un volume de  $H_2SO_4$  (0,1N) (goutte à goutte) jusqu'à l'obtention d'un virage rose du distillat.

$$N\% = 0,014 \cdot V \cdot 100 / P$$

V : Volume de  $H_2SO_4$  versé lors du titrage en ml ;

P : Prise d'essai en g;

N : Azote.

La teneur en protéine est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Protéines \%} = N\% \cdot 6,25$$

6,25 : Facteur de conversion pour les protéines végétales.

#### IV.3.2 Extraction des principes actifs

Les études qualitatives et quantitatives des composés bioactifs des matières végétales dépendent principalement de la sélection d'une méthode d'extraction appropriée. L'extraction est la première étape de toute étude sur les plantes médicinales, elle joue un rôle important et crucial sur le résultat final. Cette étape doit répondre à une série d'exigences telles que la polyvalence ; la facilité d'utilisation ; l'efficacité ; la rentabilité, l'extraction et la préservation de la majeure partie des substances bio actives naturelles contenues dans le matériel végétal (Gullón *et al.*, 2017).

### IV.3.2.1 Extraction des composés phénoliques

La préparation des extraits aqueux et organiques des racines et ceux de la partie aérienne de *Rubia tinctorum* a été réalisée selon la méthode de Jean, (1999). Les extraits ont été préparés par macération en trempant 10 g de poudre de chaque partie de la plante (racine et parties aérienne) dans 100 ml d'eau distillée pour préparer les extraits aqueux.

Afin de préparer les extraits hydrométanoliques, nous avons procédé de la même manière que la précédente. Nous avons trempé 10g de chacune des poudres dans 100 ml de 70% méthanol.

La préparation des extraits organiques apolaires a été faite en mélangeant 10g de chaque poudre avec 100 ml di éthyle éther.

L'ensemble des préparations a été mis sous agitation constante pendant 2 jours, ensuite les mélange ont été filtrés par le papier filtre Whatman n° 1, puis les extraits obtenus ont été séché dans un four à 45 °C puis maintenu à 4 °C.

### IV.3.2.2 Extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée à l'aide d'un système d'hydrodistillation. 300 g de la partie arienne mélangés avec un litre d'eau distillée puis soumis à une ébullition dans un ballon d'une capacité de 2 L pendant 5 h. Le ballon couronné par un coude de 60 cm de haut relié à un réfrigérateur. L'isolation des huiles essentielles à partir de la phase aqueuse se fait par décantation en utilisant le cyclohexane. Pour éliminer les traces d'eau, l'huile essentielle était traitée par le sulfate de sodium déshydraté. Les huiles obtenues étaient stockées à l'abri de la lumière à 4 °C.



**Figure 14 :** Montage d'hydrodistillation

Le rendement est calculé selon la relation suivante :

$$R (\%) = (M \text{ EOs} / mv) \times 100$$

M EOs : Masse de l'huile essentielle ;

mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

### IV.3.2. 3 Analyse physico-chimique des huiles essentielle

Les méthodes d'analyse des huiles essentielles utilisées pour la détermination des indices physico-chimiques sont décrites par le Recueil de Norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

#### ➤ **Détermination de pH**

Son principe consiste à disposer quelques gouttes de l'huile essentielle sur le papier pH. Celui-ci prend alors une couleur particulière que l'on compare avec les couleurs témoins du boîtier qui contenait le papier pH.

#### ➤ **Propriétés organoleptiques (odeur, couleur, aspect)**

L'aspect, la couleur et l'odeur d'une huile essentielle sont déterminés de façon à apprécier la qualité de celle-ci.

#### ➤ **Mesure de la densité relative à 20°C (Norme NF T 75 - 111)**

La densité relative se définit comme le rapport entre la masse d'un volume de l'huile essentielle et la masse du même volume d'eau distillée à 20°C (Boukhobza et Goetz, 2014).

Un volume de 2 ml d'huile essentielle et d'eau distillée est pesé séparément à une température égale à 37°C. Ensuite, le rapport entre les deux est noté. La température de mesure a dépassé 20°C.

**❖ Indice de réfraction (Norme NF T 75-112)**

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile maintenue à une température constante (Novidzro *et al.*, 2014).

La mesure est faite par une lecture directe à la température ambiante et à l'aide d'un réfractomètre de type (Abbe). Ce réfractomètre est basé sur le principe de la déviation angulaire provoquée par la réfraction de la lumière.

Le tarage de l'appareil est réalisé par l'eau distillée caractérisée par un indice de réfraction égale à 1.336 mesuré à 20°C. Un volume de 500 µl d'huile essentielle est emprisonné entre les deux prismes de réfractomètre. Ensuite, l'indice de réfraction de référence est calculé selon la relation suivante (Mesplède et Saluzzo, 2004).

$$n^{20} = nt + 0, (t - 20)$$

$n^{20}$ : Indice de réfraction de référence ;

$nt$  : Indice de réfraction mesurée ;

t : Température au moment de la mesure.

**❖ Détermination de l'indice d'Acide (Norme NFT 75-103)**

L'acidité ou la teneur en acide gras initiale est le nombre des milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle.

Un gramme d'huile essentielle est mis dans un bécher. Un volume de 5 ml d'éthanol est ajouté. Ensuite l'ensemble est porté à agitation jusqu'à l'homogénéisation. 5 gouttes de phénolphtaléine sont additionnées au mélange précédant. Le titrage est fait avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH) préparé à 0,1 mol/l. La première goutte de KOH qui provoque le changement de la couleur jaune au rose indique le point équivalent. Le volume qui a servi la neutralisation est lu sur la burette (Guedouari, 2012). Puis, l'indice d'acide est exprimé selon la relation suivante :

$$I_A = \frac{56,1 \times C \times (V_{(KOH)} - V_0)}{m}$$

$V_{KOH}$  : Volume de KOH pour atteindre le point d'équivalence ;

$V_0$  : Volume de KOH pour le dosage à blanc ( $I_A$  du solvant) ;

$C$  : Concentration exacte de la solution de KOH éthanolique ;

$m$  : Masse de l'échantillon en g ;

56,1 : Masse molaire de KOH ( $\text{g. mol}^{-1}$ ).

### IV.3.3 Etude phytochimique

#### IV.3.3.1 Etude qualitative (Screening phytochimique)

Les plantes médicinales représentent une source importante des éléments chimiques et de nouveaux produits de santé et pharmaceutiques (Pan *et al.*, 2013). Plus la diversité et la quantité de ces éléments sont élevées, plus le spectre des activités biologiques d'une plante est fort et large. Donc une analyse phytochimique des extraits de plantes est requise pour révéler la présence de certaines familles chimiques.

La détection de certains composants phytochimiques des différents extraits polaires et apolaires de notre plante *Rubia tinctorum* a été réalisée par des tests de détection chimique basée sur des phénomènes de précipitation ou de coloration, à l'aide des méthodes impliquant l'ajout de substances chimiques et des réactifs appropriés aux extraits concentrés d'une plante dans un tube à essai. Les changements dans l'apparence de la solution confirment, selon le cas, la présence ou l'absence des différents composés phytochimiques.

Nous avons utilisé plusieurs techniques (Adou *et al.*, 2016) ; (Haddouchi *et al.*, 2016); (Hossain *et al.*, 2013) ; (kumar Bargah, 2015); (Joshi *et al.*, 2013); (Abodunrin *et al.*, 2015); (Ismail *et al.*, 2016) ; (Maria *et al.*, 2018).

Les méthodes sont présentées dans l'annexe n°01

#### IV.3.3.2 Etude quantitative (dosage des composés phénoliques)

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des plantes, ils déterminent leurs qualités sensorielles et nutritionnelles et constituent l'un des groupes de substances phytochimiques les plus répandus. Ils ont une importance physiologique et morphologique considérable pour les plantes. En tant que groupe important de produits chimiques bio actifs, ils ont diverses fonctions biologiques. Pour ces raisons, des analyses

chimiques ont été faites pour caractériser les phénols présents dans les différents tissus végétaux (Ignat *et al.*, 2011).

#### IV.3.3.2.1 Dosage des polyphénols

La teneur totale en phénol des différents extraits a été déterminée par la méthode Folin-Ciocalteu. Une aliquote de 250  $\mu$ l d'échantillon (1 mg/ml) et d'acide gallique (étalon) ont été introduites dans des tubes à essai puis elles ont été mélangées à 1,25 ml de réactif Folin-Ciocalteu récemment préparé (1/10) et à 1 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 75 g/l.

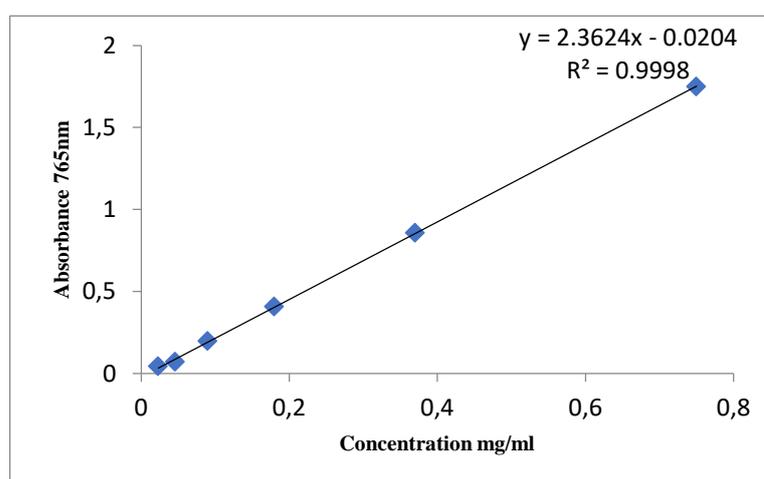
Après agitation, les différentes solutions ont été incubées à une température de 40 °C pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre (Shimadzu) à 765 nm. Une courbe standard a été préparée en utilisant des solutions d'acide gallique dans l'eau à 0.0312, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 et 1 mg/ml. Les résultats ont été pris en trois exemplaires et ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg GAE/g) selon la formule : (Amezouar *et al.*, 2013).

$$C = C1. V/m$$

C : Contenu phénolique total en mg d'EAG/g

C1 : Concentration d'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage en mg/ml

V : Volume de l'extrait en ml



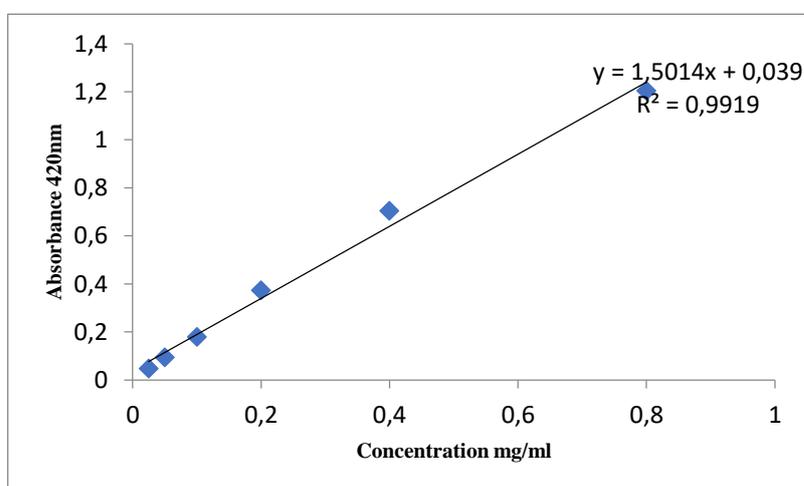
**Figure 15 :** Courbe d'étalonnage d'acide gallique

#### IV.3.3.2.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes est effectuée selon la méthode du trichlorure d'aluminium, tel que décrit par Ohikhena *et al.*, (2018) avec quelques modifications. Le protocole est basé sur la quantification de la couleur jaune-orange produite lorsque le flavonoïde réagit avec l' $\text{AlCl}_3$ . En bref, un volume de 500  $\mu\text{l}$  d'extrait aliquote (1 mg/ml) a été ajouté à 150  $\mu\text{l}$  de nitrite de sodium à 5% et à 2 ml d'eau distillée. Le mélange a été agité au vortex et laissé au repos pendant 5 minutes. Ensuite, un volume de 150  $\mu\text{l}$  d' $\text{AlCl}_3$  (10%) a été ajouté à la solution et laissé au repos pendant 5 minutes supplémentaires, puis 1 ml d'hydroxyde de sodium 1 M a été ajouté au mélange. Avec de l'eau distillée, la solution a été portée à 5 ml et l'absorbance a été mesurée à 420 nm en utilisant un spectrophotomètre à blanc avec la solution de contrôle (tous les composants sans extrait).

Une solution standard de catéchine a été préparée à des concentrations variables (0,0312-1 mg/ml) en utilisant la même procédure. Les teneurs ont été exprimées en milligrammes équivalents de catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg CAE/g Ext).

En utilisant la même formule que celle décrite dans les phénoliques ci-dessus. L'expérience a été réalisée en trois exemplaires (Amezouar *et al.*, 2013).



**Figure 16:** Courbe d'étalonnage de catéchine

#### IV.3.3.2.3 Dosage des tanins condensés (TTC)

La valeur des tannins a été estimée selon la procédure décrite par Hamdi *et al.*, (2018). L'expérience a été réalisée en trois exemplaires. Un volume aliquote de 50 µl d'extrait (1 mg/ml) a été mélangé à 3 ml de solution méthanolique de vanilline (4% p/v), puis 1,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré ont été ajoutés au mélange. La solution a été mélangée au vortex et incubée pendant 15 minutes et l'absorbance a été mesurée à 500 nm en utilisant un spectrophotomètre à blanc avec du méthanol. La TTC est exprimée en mg d'équivalente catéchine par gramme de poids sec (mg EAG/g MS).

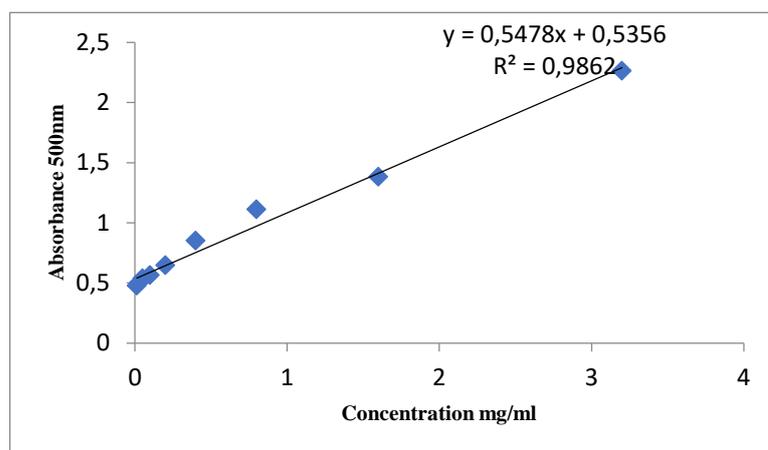


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de catéchine

#### IV.3.3.3 Analyse chromatographique des composés phénoliques par LC-ESI-MS/MS

La chromatographie est une technique biophysique importante qui permet la séparation ; l'identification et la purification des composants d'un mélange pour une analyse qualitative et quantitative dans laquelle une phase mobile contenant un mélange est mise en contact avec une phase stationnaire sélectivement absorbante (Al-Rubaye *et al.*, 2017).

Elle joue également un rôle fondamental en tant que technique analytique pour le contrôle de la qualité et la normalisation des produits phytothérapeutiques.

Les extraits de *Rubia tinctorum* ont été soumis à une analyse LC-ESI-MS/MS. Les composés ont été séparés sur une colonne Agilent Poroshell 120 EC-C18 en phase inverse (100 mm×3.0 mm, 2.7 µm). La température de la colonne a été fixée à 25 °C et le volume d'injection était de 5 µl. La phase mobile était constituée d'un gradient linéaire d'acétonitrile - 20 mM de formiate d'ammonium (pH 3,0) (15/100 ; v/v). Le taux d'injection était de 1 ml/min.

Le gradient d'élution était l'éluant A (eau + formiate d'ammonium 5mM) et l'éluant B (acétonitrile + acide formique 0,1%). Le débit du solvant était réglé à 0,250 ml/min et le

gradient était le suivant : 1 min 40 % A-60 % B ; 2 min 70 % A -30 % B ; min 50 % B ; 3 min 70 % A- 30 % B ; 4 min 40 % A-60 % B ; 5 min 10 % A- 90 % B. Nous avons utilisé le modèle de spectromètre de masse tandem Agilent 6460 triple quadripôle et la source d'ionisation electrospray (ESI) fonctionnant en modes d'ionisation négative et positive. Les conditions de l'analyse LC-ESI-MS/ MS étaient les suivantes : température du capillaire 350 °C, débit du gaz N<sub>2</sub> du nébuliseur 15 L/min, tension du fragmenteur -4400 V. Les énergies de collision (CE) ont été optimisées pour générer une fragmentation phytochimique optimale et une transmission maximale des ions produits souhaités.

L'analyse de validation de la méthode LC-MS/MS a été manipulée pour quantifier 37 substances phytochimiques (17 flavonoïdes, 15 acides phénoliques, 3 acides organiques non phénoliques, 1 aldéhyde phénolique et 1 benzopyrène) dans l'extrait de *Rubia tinctorum*. La méthode LC-MS/MS complète a été optimisée et validée (Yilmaz *et al.*, 2018). Des solutions standard ont été utilisées pour déterminer les caractéristiques de performance de la méthode.

Les paramètres sont énumérés dans le tableau (9).

#### **IV.3.3.4 Analyse des huiles essentielles par GC-MS**

L'analyse des huiles essentielles a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse (1310) équipé d'un spectromètre de masse quadripolaire simple ISQ (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX). Le processus a été initialement réglé à 60 °C pendant 6 min, puis réglé à 1 °C/min jusqu'à 145 °C, maintenu à 145 °C pendant 50 min, puis maintenu à 20 °C/min jusqu'à 230 °C et enfin pendant 20 min à 230 °C. Le détecteur de masse a été configuré avec un mode impact électronique (EI) à 70 eV (Türkmen *et al.*, 2014).

Les températures de la source d'ions et du détecteur étaient de 250 °C. 1 ml d'échantillon a été dissous dans 5 ml de CHCl<sub>3</sub> à 100%, puis filtré à travers un filtre seringue jetable de 0.22 µm. Un échantillon dilué de 1 µl a été injecté en mode fractionné (20 :1). La séparation de l'échantillon a été réalisée sur une colonne GC Thermo TG-WAXMS (60 m × 0.25 mm ID × 0.25 µm) en utilisant de l'hélium comme gaz porteur à 1.2 ml/min. La gamme de balayage du spectre de masse a été réglée au taux de 55-550 m/z. Les indices de rétention ont été déterminés en fonction des séries homologues d'alcane normaux (Adams, 2007). Les quantités relatives des composants individuels des huiles essentielles totales ont été rapportées en pourcentage de la surface du pic par rapport à la surface totale du pic. La quantification a été réalisée par la méthode de l'étalon externe en utilisant des courbes d'étalonnage générées par l'analyse GC de composés représentatifs.

L'identification des pics a été effectuée en comparant les composants connus stockés dans le NIST Demo, Wiley7, Wiley9, redlip, mainlip, et WinRI.

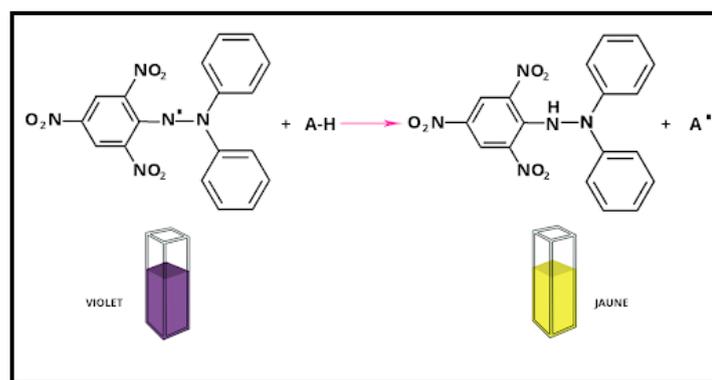
#### IV.3.4 Evaluation de l'activité antioxydante des différents extraits et de l'huile essentielle

Les antioxydants sont des composés chimiques qui se lient aux radicaux libres de l'oxygène et les empêchent d'endommager les cellules saines (Dontha, 2016), ils peuvent agir par transfert d'atome d'hydrogène ou par transfert d'électron.

Afin d'estimer le pouvoir antioxydant d'une molécule, l'activité antioxydante ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant (Alam *et al.*, 2013). Il est recommandé d'utiliser plusieurs tests pour confirmer une activité antioxydante. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de quatre tests chimiques à savoir : le piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) ; la capacité antioxydante totale (CAT) ; le pouvoir réducteur du fer (FRAP) et la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).

##### IV.3.4.1 Piégeage du radical DPPH

Le test de DPPH est un test réalisé à une température ambiante, il permet d'éliminer tout risque de décomposition des molécules thermolabiles (Hatzidimitriou *et al.*, 2007). Il est généralement utilisé pour les molécules qui contiennent des groupes SH, NH et OH (Salah *et al.*, 1995). Il est très utilisé pour les extraits hydrophiles très riches en composés phénoliques (Hatzidimitriou *et al.*, 2007).



**Figure 18:** Réduction d'un radical 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH)

L'activité antioxydante de nos échantillons a été mesurée par la méthode DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par (Rashid *et al.*, 2016) avec quelques modifications. Un volume de 200 µl d'extraits de plantes à différentes concentrations (0,031-1mg/ml) a été ajouté à 2 ml de solution de DPPH à 0.004 % (2.4 mg de DPPH dans 100 ml de

méthanol). Le même volume d'EOs a été ajouté également à 2 ml de la même solution. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif.

Le témoin négatif a été préparé par la même méthode en mélangeant 200 µl de méthanol avec 2 ml d'une solution méthanoïque de DPPH. Après agitation avec un vortex, tous les mélanges ont été laissés dans l'obscurité pendant 30 minutes, la densité optique a été mesurée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Varian) contre un blanc qui contient 200 µl de chaque concentration de l'extrait ou de l'étalon et 2 ml de méthanol.

La capacité antioxydante de la plante sur la DPPH a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Capacité de piégeage en \%} = (\text{Abs Contrôle} - \text{Abs Échantillon} / \text{Abs Contrôle}) \times 100$$

Abs Contrôle : est l'absorption de DPPH + méthanol ;

Abs Echantillon : est l'absorbance du radical DPPH + l'extrait de l'échantillon ou l'étalon (acide ascorbique).

#### IV.3.4.2 Capacité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits de *Rubia tinctorum* a été évaluée par spectrophotométrie au moyen du dosage du phosphomolybdène selon la technique décrite par Idris *et al.*, (2017). Cette méthode est caractérisée par la réduction du molybdène Mo (VI) existant sous forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  en molybdène Mo (V)  $\text{MoO}_2^{+}$  en présence de l'extrait ou de l'huile pour former un complexe phosphate/ Mo(V) vert à jaunâtre à pH acide.

Pour préparer la solution du réactif au molybdate : 1 ml d'acide sulfurique 0.6 M, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium ont été ajoutés à 20 ml d'eau distillée et leur volume a été porté à 50 ml par addition d'eau distillée (Phatak and Hendre, 2014).

Un volume de 3 ml de réactif (phosphate de sodium 28 mM, acide sulfurique 0,6 M et molybdate d'ammonium 4 mM) a été ajouté à 0.3 ml d'extrait d'échantillon de plante. Un autre volume de 3 ml a été ajouté pareillement à l'acide ascorbique (standard) à différentes concentrations (0.031-1 mg/ml). Les deux mélanges ont été chauffés au bain-marie pendant 90 minutes à 95 °C. À 695 nm, l'absorbance a été mesurée par rapport au blanc (solvant). L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif. Le pourcentage d'inhibition des différents extraits a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ du TAC} = [(A0 - A1) / A0] \times 100$$

A1 : Absorbance de la réaction de contrôle ;

A0 : Absorbance en présence de l'échantillon.

#### IV.3.4.3 Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

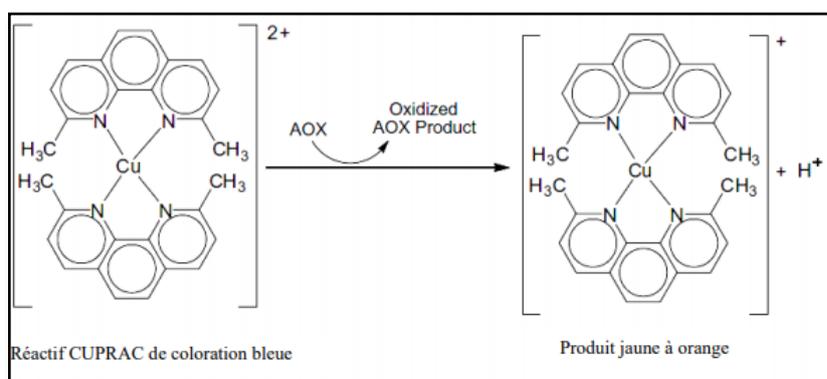
Ce test est basé sur la réduction du complexe  $\text{Fe}^{3+}$  en sa forme ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par un agent réducteur à un pH acide. Cela conduit à l'apparition d'une couleur bleue avec une absorbance maximale à  $\lambda = 593\text{nm}$ .

L'activité du FRAP a été évaluée selon la méthode de Amezouar *et al.*, (2013). Un volume de 0,2 ml de chaque échantillon dilué (0,093-3 mg/ml) a été ajouté à un mélange constitué de 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium 1%. L'ensemble des différentes préparations a été chauffé à 50 °C pendant 20 minutes. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique (10 %) ont été ajoutés à chacune. Les solutions obtenues ont été centrifugées pendant 10 minutes à 3000 rpm puis 2,5 ml de surnageant ont été prélevés pour les mélanger avec 1 ml de chlorure ferrique (1 %) et 2,5 ml d'eau distillée.

L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif. L'absorbance a été enregistrée à 700 nm ; le pouvoir réducteur élevé est présenté par l'absorption élevée.

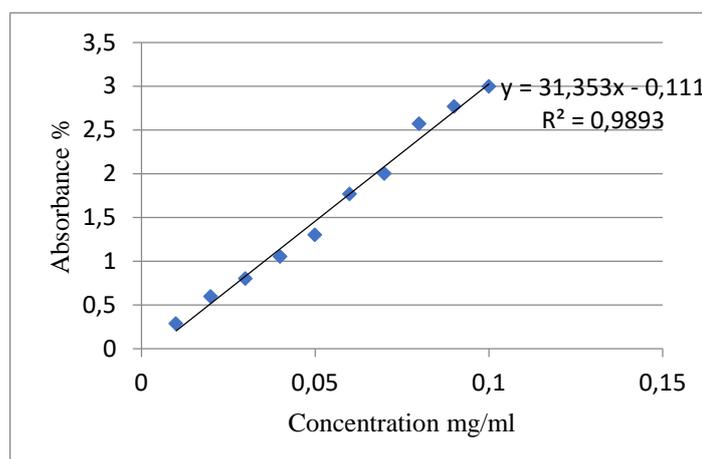
#### IV.3.4.3 Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

La méthode de mesure des antioxydants CUPRAC est basée sur la mesure de l'absorbance du chélate de Cu(I)-néocuproïne (Nc) formé à la suite de la réaction redox des antioxydants de rupture de chaîne avec le réactif CUPRAC, Cu (II)-Nc. En présence d'un agent réducteur, la couleur se transforme en une couleur orange.



**Figure 19:** La réaction CUPRAC et le complexe Cu-néocuproïne

Une quantité de 100  $\mu\text{l}$  de l'échantillon a été mélangée avec 1 ml du tampon aqueux d'acétate d'ammonium (1M, pH = 7) d'une solution alcoolique de néocuproïne et 500  $\mu\text{l}$  d'une solution de chlorure de cuivre (II) ( $\text{CuCl}_2$ ). Le mélange de couleur bleu est ensuite incubé à l'obscurité pendant 30 min. Les absorbances ont été mesurées contre un blanc à une longueur d'onde  $\lambda = 456\text{nm}$ . Les résultats sont exprimés en équivalent de trolox (Apak *et al.*, 2008).



**Figure 20:** Courbe d'étalonnage de trolox

#### IV.3.5 Evaluation de l'activité anti-hémolytique

Selon Hadouchi *et al.*, (2016), bien qu'une plante présente un pouvoir antioxydant important, son application en médecine traditionnelle et dans les préparations pharmacologiques ne sera pas possible en présence de leur effet hémolytique, qui est un indicateur de cytotoxicité. Donc, afin d'éviter tout éventuel risque de cytotoxicité, il est nécessaire d'évaluer l'effet anti-hémolytique.

Pour mesurer l'effet inhibiteur des extraits et d'huile essentielle, une suspension érythrocytaire du sang humain d'un donneur unique sain n'ayant jamais fumé a été utilisée.

Le sang a été collecté dans des tubes héparinés, puis il a été centrifugé à 4000 tours /minutes pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé 3 fois par PBS. La suspension érythrocytaire obtenue a été diluée dans un tampon phosphate (0.9 g de chlorure de sodium dissous dans 100 ml de tampon phosphate 0.2 mol/L, pH 7.4) pour obtenir une suspension de 4 %.

L'attaque radicalaire a été induite par l'addition du  $\text{H}_2\text{O}_2$  à la suspension érythrocytaire préalablement incubée (pendant 10 min) avec les extraits et les huiles essentielles.

Pour chaque extrait six concentrations ont été testées : (0.031, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 et 1 mg/ml), l'acide ascorbique a été utilisé comme standard.

Un volume de 0.5 ml de chaque dilution a été mélangé avec 2 ml de la suspension érythrocytaire, ensuite le volume a été porté à 5 ml avec la solution saline tamponnée au phosphate. Ce mélange a été préincubé pendant 5 minutes et les 500 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le mélange réactionnel ont été ajustés de manière à provoquer une hémolyse des cellules sanguines d'environ 90 % après 240 minutes. Après incubation, le mélange a été centrifugé à 1 500 r/min pendant 10 min et mesuré à 540 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé en utilisant la même formule que celle utilisée dans le test DPPH.

### **IV.3.6 Etude de l'activité antibactérienne des différents extraits**

L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits et de l'huile essentielle de la plante *Rubia tinctorum* a été initialement réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé où la zone d'inhibition a été mesurée. Ensuite, elle a été suivie par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) dans une série de dilutions doublées en utilisant la méthode de microdilution en bouillon. Les deux essais antimicrobiens ont été réalisés sur six souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 6633, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella* ATCC 12022, *E coli* ATCC 8739 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

#### **IV.3.6.1 Préparation des extraits et la solution de l'huile essentielle**

Les extraits préparés et l'huile essentiels ont été dissouts dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour obtenir une solution mère de 500 mg/ml puis ils ont été dilués pour obtenir les différentes dilutions 500, 250, 125, 63.5 mg/ml. Ensuite filtrées à travers un microfiltre stérile de 0,22 µm.

#### **IV.3.6.2 Préparation des suspensions bactériennes**

L'activité antibactérienne a été effectuée à partir des colonies jeunes de 18 à 24 h en phase de croissance exponentielle. Les souches bactériennes ont étéensemencées sur des boites contenant des milieux spécifiques pour chaque bactérie, puis elles ont été incubées à 37 °C pendant 18-24 heures. A partir des cultures pures, l'inoculum a été préparé en utilisant l'eau physiologique comme diluant. Les suspensions bactériennes ont été ajustées en les comparant à 5,0 McFarland et en utilisant le spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde

de 625 nm. La densité optique obtenue doit être comprise entre 0.08 et 0.1 ce qui correspond à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  UFC/ml selon McFarland.

### **IV.3.6.3 Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode des disques**

L'activité antibactérienne a été déterminée par la méthode de diffusion sur disque selon NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards (Standards and Barry, 1999) qui est basé sur la diffusion d'un composé antimicrobien dans un milieu solide.

Les disques utilisés ont été préparés par du papier Whatman n°1 (6 mm), ils ont ensuite été imprégnés de l'extrait ou de l'huile essentielle, puis déposés à la surface d'un milieu MH préalablement inoculé par la suspension bactérienne.

Toutes les boîtes de Pétri ont été conservées à 4°C pendant 2 h puis incubées à 37°C pendant 24 h. Les contrôles négatifs ont été préparés avec du DMSO (20 µl) et les contrôles positifs avec de l'acide nalidixique. Les diamètres (mm) des zones d'inhibition ont été ensuite mesurés.

### **IV.3.6.4 Détermination des valeurs de CMI par la méthode de micro dilution**

Tous les tests ont été effectués dans un milieu de bouillon Mueller Hinton. Les extraits étudiés ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 1%. Des dilutions sérielles ont été préparées dans une microplaque à 96 puits dans la gamme de concentration choisie. Des souches bactériennes, dont les concentrations finales ont été ajustées à  $5 \times 10^5$  CFU/ml, puis introduites dans chaque puits et incubées pendant 24 heures à 37 °C. La croissance des microorganismes a été indiquée par la turbidité.

La CMI est définie comme la plus faible concentration de l'extrait à laquelle le microorganisme ne présente pas de croissance visible.

### **IV.3.6.5 Détermination des valeurs de CMB**

La CMB est la concentration la plus basse à laquelle l'extrait a empêché la croissance bactérienne visible.

Après avoir identifié la CMI, tous les tubes, en partant de la CMI jusqu'aux concentrations les plus élevées, ont été inoculés avec une anse de platine sur des boîtes de Pétri contenant du milieu agar MH. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24 h. La concentration de l'extrait qui ne présente aucune croissance microbienne est la concentration bactéricide minimale (CMB).

### IV.3.7 Toxicité aiguë

Les plantes produisent une variété de métabolites secondaires qui sont subdivisés par les chimistes en plusieurs classes (les saponines, les terpénoïdes, cyanogènes, les tanins, les acides aminés toxiques, les glycosides, les alcaloïdes ...). Elles sont la principale source de découverte de nouveaux médicaments. Bien que les métabolites secondaires soient principalement utilisés pour leur activité biologique bénéfique, la toxicité de certains d'entre eux peut limiter leur utilisation.

Cela dit, qu'il apparaît clairement que les plantes médicinales doivent être utilisées avec précaution, et que des études toxicologiques doivent être menées afin d'accroître les connaissances sur la plante où la préparation végétale administrée aux populations.

Les études de toxicité aiguë sont conçues pour déterminer la dose qui produira la mortalité ou des effets toxicologiques graves lorsqu'elle est administrée en une fois.

Pour évaluer la toxicité orale aiguë des différents extraits de la plante *Rubia tinctorum*, le protocole de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE, 2001) a été utilisé avec quelques modifications. 48 rats mâles pesant entre  $170 \pm 7.5$  g et  $232 \pm 7.02$  g ont été répartis au hasard en 8 groupes de 6 rats. Les procédures ont été réalisées en deux étapes, pour chacune d'entre elles 3 rats Wistar ont été utilisés. Tous les animaux ont été soumis à un jeûne de nuit, ils avaient accès juste à l'eau. Ensuite, chaque animal est identifié par un numéro et pesé.

Les huiles essentielles n'ont pas été testées en raison de leur faible rendement.

#### IV.3.7.1 Préparation des extraits

Une dose de 2000 mg/kg de chaque extrait MR, MF, AR et AF de *Rubia tinctorum* a été dissoute dans de l'eau physiologique à un volume de 2 ml/kg. Les extraits EER et EEF ont été dilués dans du tween 80 (0,1%).

#### IV.3.7.2 Préparation des groupes

Dans les tests de toxicité aiguë, un total de 48 rats mâles Wistar a été réparti au hasard en 8 groupes composés de 6 rats par groupe.

Le groupe 1 (témoin (1)) : soumis à un gavage de 10 ml/kg du sérum physiologique), le groupe 2 (témoin (2)) : soumis à un gavage de 10ml/kg du tween 80 (0.1%). Les groupes : 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 et 8 ont reçu une dose unique de 2000 mg /kg de MR, MF, AF, AR, EER, et EEF, respectivement.

Les animaux ont été sous surveillance pendant les 4 premières heures suivant l'administration. Aucune nourriture n'a été donnée pendant cette période. Des changements physiques et comportementaux (agitation, convulsions, anorexie, asthénie, diarrhée et mort) ont été observés pendant 14 jours à raison d'une fois par jour. Les rats ont aussi été pesés pour suivre l'évolution de leur poids. Pendant la période d'observation (15 jours), le nombre de morts ainsi que les troubles symptomatiques ont été notés.

### IV.3.7.3 Poids relatif des organes

Au 15<sup>ème</sup> jour de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés. Les organes suivants : foie, poumons, reins, cœur, rate sont soigneusement prélevées, rincés avec la solution du NaCl 9% ; puis leurs poids ont été enregistrés en grammes pour déterminer le poids relatif (Kifayatullah *et al.*, 2015).

Le poids relatif des organes a été calculé comme suit :

$$\text{Poids relatif} = (\text{Poids des organes} / \text{poids du rat (le jour du sacrifice)}) \times 100\%$$

### IV.3.7.4 La variation en pourcentage du poids corporel

La variation en pourcentage du poids corporel des animaux a été calculée comme suit :  $(\text{poids corporel final} - \text{poids corporel initial}) / (\text{poids corporel final}) \times 100$  (Desai et Singh, 2009).

### IV.3.7.5 Prélèvement sanguine

Le prélèvement sanguin a été effectué au 15<sup>ème</sup> jour par ponction de la veine abdominale à l'aide d'une seringue, puis mis dans des tubes contenant 0.1% EDTA pour le test FNS et des tubes secs pour les tests biochimiques.



**Figure 21** : Prélèvement sanguin a été effectué par ponction de la veine abdominale

Cette technique permet de collecter du sang stérile et la capacité à réaliser une exsanguination complète.

### IV.3.7.6 Analyse hématologique et biochimique

Pour le dosage des paramètres biochimiques ; le sang a été centrifugé à 2500 tr/mn à une température de 4°C pendant 10 minutes. Le sérum obtenu a été récolté puis des dosages de glucose, urée, créatinine, les transaminases (TGO, TGP), triglycéride et cholestérol ont été effectués.

Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide d'un automate de chimie clinique (mindray BA-88A).

### IV.3.8 Evaluation de l'activité anti anémique

L'activité antianémique a été évaluée selon la méthode de Pandey *et al.*, (2016), sur des rats mâles adultes (pesant entre  $170 \pm 7.5$  et  $232 \pm 7.02$ ). Les rats ont été répartis en 11 groupes de six (Groupe 1 : témoin ; Groupe 2 : control négative ; Groupe 3 : traité par le fer ; Groupe 4, Groupe 5, Groupe 6, Groupe 7, Groupe 8, Groupe 9, et Groupe 10 ont traités par les différents extraits).

Nous avons sélectionné 04 extraits (MR, MF, AR, et AF) selon les résultats du test anti hémolytique et le test de la toxicité.

#### IV.3.8.1 Induction de l'anémie

Pour induire une anémie, nous avons effectué des injections (intra-peritoniale) d'un produit de phénylhédrazine à 40 mg/kg au niveau de l'abdominale droite à raison d'une seule fois pendant deux jours. Tous les groupes d'animaux ont été concernés par l'injection de la phénylhédrazine, sauf le groupe Groupe 1.

#### IV.3.8.2 Préparation des groupes et traitement

Les rats qui ont développé une anémie avec une concentration d'hémoglobine inférieure à 13 g / dl ont été utilisés pour l'étude. Les rats anémiques ont été divisés en cinq groupes (six animaux par groupe) et traités quotidiennement pendant 15 jours.

- **Groupe 1** : témoin a reçu (Nacl 0.9 ; 10 ml/kg).
- **Groupe 2** : contrôle négative a reçu du PHZ i.p. 40 mg/kg de poids corporel, une fois par jour pendant 2 jours consécutifs.
- **Groupe 3** : contrôle positive a reçu du PHZ i.p. 40 mg/kg de poids corporel, une fois par jour pendant 2 jours consécutifs + traitement standard (Orofer plus) ;

- **Groupe 4** : a reçu du PHZ i.p. 40 mg/kg de poids corporel, une fois par jour pendant 2 jours consécutifs + Extrait (AR) (200 mg/kg) ;
- **Groupe 5** : a reçu du PHZ i.p. 40 mg/kg de poids corporel, une fois par jour pendant 2 jours consécutifs + Extrait (AR) (400 mg/kg).
- **Groupe 6** : a reçu du PHZ i.p. 40 mg/kg de poids corporel, une fois par jour pendant 2 jours consécutifs + Extrait (AF) (200 mg/kg).
- **Groupe 7** : a reçu du PHZ i.p. 40 mg/kg de poids corporel, une fois par jour pendant 2 jours consécutifs + Extrait (AF) (400 mg/kg).
- **Groupe 8** : a reçu du PHZ i.p. 40 mg/kg de poids corporel, une fois par jour pendant 2 jours consécutifs + Extrait (MF) (200 mg/kg).
- **Groupe 9** : a reçu du PHZ i.p. 40 mg/kg de poids corporel, une fois par jour pendant 2 jours consécutifs + Extrait (MF) (400 mg/kg).
- **Groupe 10** : a reçu du PHZ i.p. 40 mg/kg de poids corporel, une fois par jour pendant 2 jours consécutifs + Extrait (MR) (200 mg/kg).
- **Groupe 11** : a reçu du PHZ i.p. 40 mg/kg de poids corporel, une fois par jour pendant 2 jours consécutifs + Extrait (MR) (400 mg/kg).

### IV.3.8.3 Analyse des paramètres hématologiques

Le sang a été prélevé de chaque rat dans un tube d'EDTA par ponction oculaire avant l'induction de l'anémie (jour 1) et pendant le test (jour 3) avec manipulation douce et calme de l'animale afin de ne pas trop l'exciter ni l'effrayer. Le sinus veineux rétro-orbitale est ponctionné à l'aide d'un tube capillaire d'hématocrite introduire dans l'angle (30°) à l'intérieur de l'œil, par pression rotative. La fragile paroi des vaisseaux est perforée et le sang prélevé par capillarité est immédiatement recueilli dans des tubes à EDTA. Ensuite, des tests FNS ont été effectués à chaque stade pour évaluer les paramètres sanguins à l'aide d'un compteur automatique.

Le 15<sup>ème</sup> jour, tous les animaux ont été sacrifiés sous anesthésie en utilisant le chloroforme dans une cloche en verre (figure 9). Un test FNS a été réalisé pour évaluer les paramètres sanguins (RBC, HB, HT, MCV, MCHC, et MCH) à l'aide d'un compteur automatique.

#### **IV.3.9 Analyses statistiques**

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type SD. Toutes les expérimentations ont été réalisées en triplicata. Un test t test non apparié est réalisé par le logiciel SPSS. Les valeurs de  $p \leq 0.05$  sont considérées statistiquement significatives.

*Résultats*  
&  
*Discussion*

## V. Résultats et discussion

### V.1 Extraction

L'étape d'extraction constitue la première étape avant l'analyse des composants phytochimiques des plantes. Dans cette étude, une méthode d'extraction par macération à froid a été réalisée. Par conséquent, les effets des solvants ont été étudiés en termes de rendement d'extraction. La préparation des différents extraits de la partie aérienne et de la racine de *Rubia tinctorum* a été réalisée à l'aide de trois solvants de polarités différentes (eau, méthanol 80%, di éther éthylique). Le rendement obtenu par les différents extraits, la couleur, et l'aspect sont indiqués dans le tableau (5). Le rendement a été calculé à partir de la quantité de poudre végétale.

**Tableau 5** : Rendements des différents extraits du *Rubia tinctorum*.

| Partie<br>aérienne | Solvant         | Rendement | Couleur<br>de l'extrait | Aspect<br>de l'extrait |
|--------------------|-----------------|-----------|-------------------------|------------------------|
|                    | Méthanol        | 16,1%     | Vert foncé              | Visqueux               |
|                    | Di éthyle éther | 5 %       | Vert-noir               | Visqueux               |
|                    | Eau             | 16.7%     | Vert foncé-marron       | Poudre                 |
| <b>Racine</b>      | Méthanol        | 17.3%     | Rouge foncé             | Visqueux               |
|                    | Di éthyle éther | 9 %       | Rouge-noir              | Visqueux               |
|                    | Eau             | 18.8 %    | Rougefonce              | Poudre                 |

D'après les résultats, on constate que tous les extraits aqueux (AR, AF) et hydrométhanoliques (MR, MF) ont montré les meilleurs rendements en comparant les extraits organiques apolaires (EER, EEF). Le rendement a été trouvé dans l'ordre décroissant suivant : AR > MR > AF > MF > EER > EEF. Le rendement d'extraction obtenu pour les racines est toujours plus élevé pour les trois solvants.

Ce résultat est en accord avec le rapport de Barchan *et al.*, (2014), qui ont montré que l'eau est le solvant le plus approprié pour l'extraction des composés phénoliques des plantes de *M. spicata*, *M. pulegium* et *M. piperita* où le rendement le plus élevé étant dans les extraits aqueux et le moins dans n-Hexane.

Les résultats obtenus montrent que le rendement d'extraction dépend à la fois de l'organe et du type de solvant. Les différences dans le rendement d'extraction de la plante analysée dans la présente étude peuvent être attribuées à la différence dans la disponibilité des composants extractibles, résultante de la variété et des composants chimiques dans les plantes.

De plus, des différences de la polarité des solvants influencent leur solubilité (Felhi *et al.*, 2017).

### **V.2 Évaluation de la composition minérale, nutritionnelle et la teneur en eau.**

L'analyse de la composition nutritionnelle est un indice important pour classer la valeur nutritionnelle d'un produit alimentaire. Elle est évaluée par leur teneur en protéines ; glucides ; graisses et huiles ; minéraux ; vitamines et d'eau qui sont responsables de la croissance et du développement de l'homme et des animaux (Begum *et al.*, 2018).

Plusieurs recherches ont révélé la présence des éléments nutritionnels dans les plantes que nous consommons comme compléments alimentaires ou un médicament. Ces éléments se trouvent en différentes quantités dans diverses sections des plantes, en particulier dans les racines, les graines et les feuilles.

La teneur en eau ; en cendre ; lipides ; protéines et en sucres, des deux parties de la plante *Rubia tinctorum* sont représentés dans le tableau (6).

**Tableau 6 :** La composition minérale, nutritionnelle et la teneur en eau.

| <b>Paramètre/la partie étudiée</b> | <b>Racine</b>        | <b>Partie aérienne</b> |
|------------------------------------|----------------------|------------------------|
| <b>Teneur en eau (%)</b>           | 87.37 <sup>b</sup>   | 60,54 <sup>b</sup>     |
| <b>Teneur en cendre (mg/g MS)</b>  | 42.8 <sup>c</sup>    | 42 <sup>c</sup>        |
| <b>Teneur en lipides (%)</b>       | 8.1 <sup>c</sup>     | 6.56 <sup>d</sup>      |
| <b>Teneur en protéines (%)</b>     | 0.53 <sup>d</sup>    | 6.25 <sup>d</sup>      |
| <b>Teneur en sucres µg/ml</b>      | 2489.30 <sup>a</sup> | 2352.94 <sup>a</sup>   |

Les lettres différentes dans la même colonne indiquent une différence significative à  $P < 0.05$ .

La teneur en eau, en lipide et en sucres a montré des quantités remarquablement élevées dans les racines comparée à celle de la partie aérienne, avec des valeurs de 87.37% et 60.57% respectivement pour la teneur en eau. Et des teneurs de 2489.30 et 2352.94 µg/ml pour le sucre ; des valeurs de 8.1% et 6.56% pour les lipides.

D'autre part, la concentration de la protéine la plus élevée a été enregistrée au niveau des racines (6,25%), tandis que la valeur la plus faible a été atteinte dans la partie aérienne (0.53%).

Concernant la cendre, la concentration est approximativement la même, une teneur de 42.8 mg /g MS et 42 mg /g MS pour les racines et la partie aérienne, respectivement.

Selon la littérature, il y a peu de travaux portant sur la qualité nutritionnelle et minérale de la plante *R tinctorum*. Ishmuratova *et al.*, (2020) ont évalué la teneur en cendre et les éléments minéraux de la plante *Rubia tinctorum* en Arabakistan. Ils ont constaté que la teneur en cendre était >105,25 mg/g. En revanche, Amirteymouri *et al.*, (2015) ont montré que la teneur en protéines et celle en cendre étaient plus faibles par rapport à ce que nous avons retrouvé. Elles étaient respectivement de 1,72 et 3,065 mg/g. Et selon le résultat enregistré par Jalill, (2017) la teneur en protéine était plus importante (5.8125%) que la nôtre.

L'étude globale de la littérature montre que nos résultats de l'analyse des nutriments ne se situent pas dans la fourchette de l'ensemble des études. La différence marquée par rapport aux autres valeurs rapportées pourrait être associée à plusieurs attributs tels que : la saison et le stade de maturité du l'échantillon utilisé pour l'analyse (Kumar *et al.*, 2021), ainsi que l'emplacement et les conditions de croissance des plantes (Bakari *et al.*, 2017).

La quantité et la qualité de ces éléments trouvés dans les échantillons de plantes sont essentielles pour le choix des espèces végétales en fonction de leur importance nutraceutique, les programmes d'amélioration des plantes, et la classification systématique.

Les sucres, les protéines et les graisses jouent un rôle essentiel dans la création d'un système de contrôle des organes sains chez les êtres humains. En effet, les protéines sont des composants nécessaires au remplacement des tissus et pour la fourniture d'énergie et d'acides aminés, elles sont destinées à la construction et à la réparation des tissus de l'organisme , la régulation des processus corporels, la formation d'enzymes, d'hormones et d'anticorps qui permettent à l'organisme de lutter contre les infections (Ogidi *et al.*, 2019).

Les glucides peuvent être facilement oxydés pour produire de l'énergie instantanée, leurs polymères servent de molécules de stockage de l'énergie et leurs dérivés sont présents dans un certain nombre de molécules biologiques, notamment les coenzymes et l'acide nucléique (Kumar *et al.*, 2021).

Par ailleurs, les graisses fournissent de l'énergie et favorisent l'absorption des vitamines liposolubles et les fibres brutes qui facilitent la digestion. Les lipides sont plus utiles dans le corps des animaux. Les lipoprotéines sont des constituants cellulaires importants , des composants essentiels de la membrane cellulaire et une source d'énergie métabolique pour l'entretien des cellules (Habib *et al.*, 2015).

Concernant la teneur en eau, c'est la quantité d'eau contenue dans un matériau. L'eau est un composant essentiel de nombreux aliments. 20 % de la consommation totale d'eau provient de l'humidité des aliments. Elle fournit d'avantage des informations sur la durée de conservation et la viabilité de la croissance des micro-organismes (Bakari *et al.*, 2017).

Le pourcentage des cendres est le reflet de la teneur en minéraux conservés dans cette espèce végétale. Les cendres contiennent des matières inorganiques de la plante, notamment des oxydes et des sels contenant des anions tels que les phosphates ; les sulfates ; les chlorures et autres halogénures et, des cations tels que le sodium ; le potassium ; le calcium ; le magnésium, le fer et le manganèse (Datta *et al.*, 2019). Elles sont également un indicateur de haute digestibilité de la plante. Elles facilitent les processus métaboliques, la croissance et le développement.

### V.3 Détermination des éléments essentiels

La détermination des éléments minéraux dans les plantes est cruciale étant donné que la concentration et le type de minéraux affectent la qualité de nombreux aliments. L'existence d'une composition phytochimique et élémentaire contribue à l'efficacité médicinale de la plante.

**Tableau 7:** Composition minérale de la plante *Rubia tinctorum*.

| Ppm     | Na           | k          | Ca           | Fe          |
|---------|--------------|------------|--------------|-------------|
| Feuille | 0.207±0.001* | 1.51±0.031 | 0.023±0.02   | 2.97±0.07   |
| Racine  | 0.115±0.012  | 1.68±0.015 | 0.043±0.021* | 3.32±0.07** |

Na: sodium; K: potassium; Ca: calcium; Fe: fer. \* p<0.05, \*\* p<0.01

Le tableau (7) montre le contenu minéral des racines et la partie aérienne de la plante *Rubia tinctorum*. Les résultats ont révélé les éléments macro minéraux (sodium (Na), potassium (K), calcium (Ca)) et les éléments micro minéraux (fer (Fe)) à des concentrations variables. La teneur en fer dans cette étude a montré la quantité la plus élevée dans les deux parties étudiées par rapport aux autres minéraux (2.97±0.07 ppm et 3.32 ± 0.07ppm pour la partie aérienne et les racines, respectivement), suivi par le potassium avec une teneur de 1.51±0.031 pour la partie aérienne et de 1.68±0.015 pour les racines. En outre, les données ont révélé la présence de sodium en faible proportion en comparaison de celle du fer et du K. Concernant le Ca, il apparaît en quantité limitée sur les deux parties étudiées. En général, les résultats obtenus révèlent la richesse en éléments minéraux des racines comparativement à la partie aérienne.

Ces résultats sont conformes à ceux d'Aboud (2010), qui a indiqué que les concentrations de sodium (Na), de potassium (K) et de fer (Fe) dans la racine de *Rubia tinctorum* étaient plus élevées, tandis que le calcium (Ca) a été trouvé à la plus faible concentration.

Jalill (2017) a rapporté que la teneur en K et Fe est de 833 et 93.95 ppm, respectivement, dans les racines collectées à Bagdad, en Irak. Ces données ne sont pas en accord avec nos résultats qui montrent que la teneur en K est plus importante que la teneur de Fe alors que les teneurs des deux éléments ont été trouvées trop faibles dans notre échantillon. Ces variations des résultats peuvent être dues au changement de variété, de climat, de la méthode de fertilisation et les circonstances environnementales (Ogidi *et al.*, 2019).

Selon des rapports antérieurs, il a été établi que chacun de ces éléments intervient dans le fonctionnement physiologique de l'organisme. Le calcium (Ca) contribue à la régulation de la contraction musculaire nécessaire aux enfants, aux nourrissons et aux fœtus pour le développement des os et des dents. Le Fe est nécessaire à la production d'hémoglobine, au transport de l'O<sub>2</sub> et au renforcement de l'immunité de l'organisme. Le K et le Na permettent de maintenir l'équilibre ionique nécessaire et de prévenir l'hypertension (Bakari *et al.*, 2017; Datta *et al.*, 2019).

### **V.4 Etude phytochimique**

#### **V.4.1 Etude phytochimique qualitative**

Les composants phytochimiques des plantes sont reconnus comme des composés biologiquement actifs et responsables de différentes activités telles que les antioxydants, les antimicrobiens, les antifongiques et les anticancéreux. Le tableau (8) résume les résultats obtenus du criblage biochimique.

**Tableau 8 :** Criblage phytochimique des différents extraits de *Rubia tinctorum*.

| Constituants                  | Observation               | Extrait |     |     |     |    |     |
|-------------------------------|---------------------------|---------|-----|-----|-----|----|-----|
|                               |                           | AR      | AF  | EEF | MR  | MF | EER |
| <b>Stéroïde</b>               | Anneau pourpre            | -       | -   | -   | --  | -  | -   |
| <b>Saponines</b>              | Formation d'une mousse    | -       | +   | -   | +   | -  | -   |
| <b>Tanins</b>                 | Coloration vert foncée    | +       | +   | +   | +   | +  | +   |
| <b>Quinone</b>                | Coleut violet             | +       | -   | -   | +   | -  | +   |
| <b>Phenol</b>                 | Couleur verte -noir       | +       | +++ | +   | +++ | ++ | ++  |
| <b>Coumarine glucosidique</b> | Couleur verte             | +       | -   | +   | +   | +  | +   |
| <b>Anthraquinone libre</b>    | Rose- rouge               | +++     | -   | -   | ++  | -  | ++  |
| <b>Antraquinone combine</b>   | Couleur rose              | -       | -   | -   | -   | -  | +   |
| <b>Flavonoïde</b>             | Coloration rose-rouge     | ++      | ++  | +   | +   | ++ | +   |
| <b>Alkaloïde</b>              | Turbidité                 | +       | +   | ++  | +   | +  | ++  |
| <b>Cardiacglucoside</b>       | Coloration brun-rougeâtre | -       | ++  | +   | +   | ++ | -   |
| <b>Proteine</b>               | Couleur violette          | -       | -   | -   | +   | -  | -   |

+ : présence ; - : absence ; ++ : présence en faible quantité ; +++ : présence en abondance ; AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EER : Extrait di éthyle éther de la partie racine ; EEF : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne ; MR : Extrait hydrométhanologique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanologique de la partie aérienne.

On note la présence des alcaloïdes, les flavonoïdes, les phénols et les tanins dans les six extraits étudiés de *R. tinctorum*. Cependant, les stéroïdes sont absents. Tandis que les coumarines glucosides, les protéines et les anthraquinones combinées n'ont été détectées que dans les extraits AF, MR et EER, respectivement.

Concernant les anthraquinones et les quinones libres, elles n'ont été détectées que dans les extraits AR, MR et EER. Toutefois, les cardiaques glucosides ne sont détectés que dans les extraits AF, EEF, MR et MF.

L'étude de la composition phytochimique des plantes est une étape importante pour l'évaluation des propriétés biologiques des plantes médicinales. À la lumière de nos connaissances, il s'agit du premier rapport décrivant la composition phytochimiques de la partie aérienne de *Rubia tinctorum*. Les résultats de notre étude sont cohérents avec l'étude de Aboud, (2010), qui a démontré la présence des mêmes constituants, à l'exception de la saponine, dans les extraits hydrométhanologique et aqueux de *R. tinctorum*. D'autre étude a montré la présence des anthraquinones et les tanins dans l'extrait méthanoliques des racines

de *Rubia tinctorum*. Cependant, les flavonoïdes ont été totalement absents (Essaidi *et al.*, 2017).

Différents facteurs environnementaux ont également un effet sur les constituants des plantes, tels que les précipitations, les changements climatiques et d'autres facteurs édaphiques (Karkanis *et al.*, 2019).

D'autre part, la différence entre les composants des deux parties est liée à plusieurs facteurs à savoir : les sites de culture ; les facteurs géographiques ; les conditions climatiques ; la fertilité du sol ; les interactions entre les plantes et l'expression des gènes (Iloki-Assanga *et al.*, 2015 ; Szakiel *et al.*, 2011).

En ce qui concerne la différence entre la composition des extraits d'une même plante, elle contribue à la solubilité des composés phénoliques qui est principalement influencée par la nature du solvant utilisé et sa polarité. Comme il est bien connu, le méthanol est un solvant protique polaire, tandis que l'acétone et l'éther d'éthyle sont des solvants aprotiques polaires et non polaires, respectivement. La récupération des substances phytochimiques de la plante peut être influencée par la constante diélectrique, la structure chimique des solvants organiques, ainsi que par les propriétés chimiques des substances phytochimiques de la plante (Karkanis *et al.*, 2019).

### V.4.2 Etude phytochimique quantitative

#### V.4.2.1 Analyse par LC-ESI-MS/MS

Les extraits MR, MF, AR, AF et EEF de *R. tinctorum* ont été criblés pour la présence de différents composés phytochimiques via une quantification LC-ESI-MS/MS. Les chromatogrammes sont illustrés dans les figures (Annexe 2) et les quantités sont mentionnées dans le tableau (9). Parmi les 37 différents composants testés, les extraits MR et AF se sont avérés contenir 17 composants phytochimiques, tandis que les extraits AF et EEF contenaient 16 composants. En plus, l'extrait MF a révélé la présence de 15 composés phytochimiques.

**Tableau 9.** Profile métabolique des extraits de *Rubia tinctorum* analysés par la technique LC-ESI-MS/MS.

| Composants               | RT    | Unité | Parent ion<br>(m/z) | Transitions Ions<br>(m/z) |          | MF     | MR      | AR     | AF      | EEF    |
|--------------------------|-------|-------|---------------------|---------------------------|----------|--------|---------|--------|---------|--------|
| Acide tartarique         | 1.895 | µg/mg | 149                 | 87                        | Négative | 1.0752 | ND      | 1.4523 | ND      | 1.4519 |
| Acide citrique           | 1.744 | µg/mg | 1.793               | 191.1                     | Négative | 3.3788 | 15.3502 | 4.4653 | 116.580 | 32.790 |
| Acide ascorbique         | 1.752 | µg/mg | 1.802               | 175.1                     | Négative | ND     | ND      | 1.3414 | 64.9996 | 1.4232 |
| Acide fumarique          | 1.821 | µg/mg | 1.821               | 115                       | Négative | 0.2350 | 0.5293  | 0.2933 | 16.094  | 0.3374 |
| Acide maleique           | 1.813 | µg/mg | 1.821               | 115                       | Négative | ND     | ND      | ND     | ND      | ND     |
| Acide chicorique         | 1.782 | µg/mg | 1.989               | 472.8                     | Négative | 0.9680 | ND      | 1.4480 | 31.7746 | 0.8263 |
| Acide gallique           | 2.647 | µg/mg | 2.605               | 169                       | Négative | ND     | ND      | ND     | ND      | ND     |
| Acide chlorogénique      | 5.468 | µg/mg | 353                 | 191                       | Négative | 1.1153 | 0.9038  | 0.9126 | 47.4291 | 0.9920 |
| Acide 4-hydroxybenzoïque | 6.507 | µg/mg | 137                 | 93.1                      | Négative | 1.1635 | 1.2310  | 1.1293 | 49.9302 | 1.2639 |
| Catéchine                | 6.594 | µg/mg | 288.9               | 245.1                     | Négative | 0.6581 | 0.6828  | 0.7569 | 31.4229 | 0.6744 |
| Epicatéchine             | 6.865 | µg/mg | 353                 | 191                       | Positive | 1.0282 | 1.0247  | 1.0240 | 50.7805 | 1.0159 |
| Hesperidine              | 6.665 | µg/mg | 611.3               | 357                       | Positive | 3.9865 | ND      | ND     | ND      | ND     |
| Rutin                    | 6.468 | µg/mg | 608.9               | 299.4                     | Négative | 2.2025 | ND      | ND     | ND      | ND     |
| Acide vanillique         | 6.414 | µg/mg | 6.687               | 167                       | Négative | 1.0424 | 1.1286  | 1.0336 | 52.8816 | 1.0599 |
| Acide syringique         | 6.603 | µg/mg | 6.703               | 197.1                     | Négative | ND     | ND      | ND     | ND      | ND     |
| Acide caféïque           | 6.786 | µg/mg | 6.703               | 178.9                     | Négative | 0.0547 | 0.0633  | 0.0350 | 1.0283  | 0.0767 |
| Liteolin-7-glucoside     | 6.699 | µg/mg | 6.740               | 449                       | Positive | ND     | ND      | ND     | ND      | ND     |

|                          |       |       |       |       |          |        |        |        |         |        |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|----------|--------|--------|--------|---------|--------|
| Apigenin-7-O-glucoside   | 6.485 | µg/mg | 6.808 | 430.8 | Négative | ND     | ND     | ND     | ND      | ND     |
| Quercetin-3-glucoside    | 6.808 | µg/mg | 432.7 | 99.5  | Négative | ND     | ND     | ND     | ND      | ND     |
| Oleuropein               | 6.783 | µg/mg | 539.1 | 275.1 | Négative | ND     | ND     | ND     | ND      | ND     |
| Acide rosmarinique       | 6.858 | µg/mg | 358.9 | 160.7 | Négative | ND     | 0.5535 | 0.5628 | 27.9655 | ND     |
| Acide <i>p</i> -coumaric | 6.936 | µg/mg | 6.919 | 163   | Négative | 0.1330 | 0.1536 | 0.2012 | 10.2367 | 0.1680 |
| 4-hydroxybenzaldehyde    | 7.070 | µg/mg | 6.929 | 121   | Négative | 0.1991 | 0.2164 | 0.2034 | 10.7900 | 0.2072 |
| Acide trans-ferulique    | 6.819 | µg/mg | 6.968 | 193.1 | Négative | 0.6571 | 0.5570 | 0.5711 | 51.0571 | 0.8144 |
| Acide protocatéchique    | 7.268 | µg/mg | 7.243 | 152.9 | Négative | 0.6178 | 0.6227 | 0.6141 | 30.2216 | 0.6113 |
| Quercetine               | 7.240 | µg/mg | 7.306 | 300.7 | Négative | ND     | ND     | ND     | ND      | ND     |
| Apigenine                | 7.555 | µg/mg | 7.555 | 269   | Négative | ND     | 0.2309 | ND     | ND      | ND     |
| Naringenine              | 7.605 | µg/mg | 7.588 | 270.9 | Négative | ND     | ND     | ND     | ND      | ND     |
| Acide trans-cinnamique   | 7.657 | µg/mg | 7.591 | 148.8 | Négative | 0.5464 | 0.5053 | 0.5287 | 26.1761 | 0.5168 |
| Kaempferol               | 7.861 | µg/mg | 7.613 | 284.9 | Négative | ND     | ND     | ND     | ND      | ND     |

AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, ND : non détecté.

Des profils métaboliques relativement similaires ont été trouvés dans les extraits aqueux ; hydrométhanoliques et les extraits apolaires de la partie aérienne et des racines de la plante *Rubia tinctorum*. L'extrait (AR) a montré une forte abondance de l'acide citrique (165.8091 µg/mg) en comparant avec les autres extraits, et une abondance moyenne de l'acide ascorbique 64.9996 µg/mg, de l'acide trans-ferulique (51.0571 µg/mg) et de l'acide vanillique 52.8816 µg/mg.

Dans le cas de l'extrait MR, l'acide citrique a également présenté une concentration élevée (15,3502 µg/mg), les autres composés ont été trouvés en faibles quantités comprises entre 0.0063 et 1.23 µg/mg.

Pour l'extrait MF, le composé hespéridine a été marqué comme un composé principal (3,9865 µg/mg), suivi par l'acide citrique (3,3788 µg/mg).

Dans l'extrait AF, l'acide citrique constitue le principal composé, représenté par 4.4653 µg/mg, suivi de l'acide chicorique et l'acide tartarique avec des teneurs de 1.4480 µg/mg et 1.4523 µg/mg respectivement. Concernant les autres composés, ils ont été trouvés à l'état de traces, tableau (9).

Le profil LC-ESI-MS/MS de l'extraction a révélé que 11 composés bioactifs ont pu être extraits par tous les différents types de solvants (acide fumarique, acide chlorogénique, acide hydroxybenzoïque, acide vanillique, catéchine, épicatechine, acide caffeique, acide protocatechine, acide trans-cinnamique, acide *p*-coumarique, et 4-hydroxybenzaldehyde) avec des différences dans leurs quantités. L'acide tartarique est présent seulement dans la partie aérienne (AF, AR, et EEF, dont la concentration est de 1.0752, 1.4523, 1.4519 µg/mg, respectivement). Par ailleurs, nous constatons que l'extrait MR est le seul extrait contenant de l'apigénine. Cependant il est dépourvu d'acide chicorique lequel se retrouve dans tous les autres extraits. Également, on note que l'extrait MF est le seul extrait contenant l'hespéridine et le rutin. D'autre part, on remarque que l'acide ascorbique est absent totalement dans les deux extraits méthanoliques (MR et MF).

Lorsqu'on compare entre la composition de la partie aérienne avec celle de la partie racine, on note que l'extrait AR contient la teneur la plus élevée en composés phytochimiques.

A la lumière de nos connaissances, il s'agit de la première étude révélant les constituants chimiques de la partie aérienne de *R. tinctorum*. La comparaison est donc impossible. Cependant, l'identification des principaux constituants des racines de *R. tinctorum*

par LC-MS/MS et LC-HRMS a été réalisée précédemment (Lajkó *et al.*, 2015; Eltamany *et al.*, 2020; Langa-Lomba *et al.*, 2021), révélant la présence de nombreuses anthraquinones comme la munjistine, l'acide rubyrique, la lucidine, la rubiadine, la pseudopurpurine et le nordamnacanthal. Nous constatons une absence de ces constituants dans nos extraits, ce qui ne signifie pas une absence totale, mais ils n'ont pas été identifiés en raison du manque de standards.

Aboud, (2010) a révélé la présence d'anthocyanidines, de chalcone et de kaempférol. De plus, d'autres études ont révélé que la quercétine, la rutine, l'hespéridine et le kaempférol étaient les principaux composés phénoliques des extraits alcooliques de *Rubia tinctorum* (Derksen *et al.*, 2002; Eltamany *et al.*, 2020). Marhoume *et al.*, (2019) ont utilisé HPLC pour identifier l'extrait butanolique des racines, les analyses ont montré la présence de la vanilline, l'acide rosmarinique, l'acide cinnamique, et quercétine. En comparaison avec nos résultats, les extraits présentent des similitudes, à l'exception de l'absence de quercétine et de kamphérol.

Différentes études concernant les effets de la sécheresse et du stress osmotique sur la composition des polyphénols dans des espèces distinctes ont démontré que ces composés pouvaient augmenter ou diminuer avec le type et l'intensité du stress. Certaines études ont révélé que certains facteurs environnementaux tels que le rayonnement UV, la lumière bleue, la forte intensité lumineuse, les blessures, les attaques de pathogènes, la sécheresse et la carence en nutriments ont une influence sur l'accumulation des anthocyanes dans les plantes. En plus de tous ces facteurs externes, tous les paramètres appliqués lors de l'extraction (température, temps et pourcentage de solvant) ont également une grande influence sur la quantité de composés extraits (Kassim *et al.*, 2009; Akula et Ravishankar, 2011).

Concernant la variation du profil métabolique des feuilles et des tiges, il semble être principalement lié aux précipitations et aux niveaux d'humidité. Alors que les inflorescences et les racines ont été regroupées en fonction de la disponibilité de certains nutriments dans le sol, en particulier les macronutriments du sol (Ca, Mg, P et K) et le micronutriment Cu. Le rayonnement solaire et la température affectent également et de manière significative le profil métabolique des inflorescences (Sampaio *et al.*, 2016).

Donc, les proportions des métabolites secondaires dans les parties de la plante sont étroitement liées à la partie anatomique et, la variabilité des composés phénoliques dans les tissus végétaux dépend de nombreux facteurs, tels que les conditions environnementales, notamment la température, la lumière UV et la nutrition.

En général, la comparaison de l'ensemble des résultats permet de confirmer la richesse de la racine de *R. tinctorum* en termes de diversité de composés phénoliques.

Il est bien connu que ces molécules ont de nombreuses activités biologiques. En effet, il a été précédemment rapporté comme ayant une excellente efficacité en tant qu'anti-inflammatoires et antioxydants (Kadam *et al.*, 2018). L'acide chlorogénique est l'un des composés phénoliques retrouvés dans notre analyse. Il a été démontré qu'il a un effet anxiolytique et antioxydant (Bouayed *et al.*, 2007). Une autre étude rapportée par Cemeli *et al.*, (2009) a révélé l'effet protecteur de l'acide gallique et de la rutine contre les effets néfastes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In *et al.*, (2013) ont expliqué l'effet antioxydant et l'effet antimicrobien de l'acide citrique contre *Shigella*. L'épicatéchine est un autre composé, il possède de nombreuses activités biologiques, notamment l'activité antioxydante, antitumorale, anti-inflammatoire, antidiabétique, antimicrobienne et cardioprotectrice (Ullah *et al.*, 2020). Pareillement, l'acide *p*-coumarique possède également plusieurs activités biologiques dont l'activité antioxydante, anticancéreuse, antimicrobienne, antivirale, anti-inflammatoire, antiagrégante plaquettaire, anxiolytique, antipyrétique, analgésique et anti-arthrite (Pei *et al.*, 2016). En outre, il a été constaté que l'acide trans-cinamique est un inhibiteur de la formation de biofilms, il est peut être utilisé comme un conservateur naturel alternatif pour prolonger la durée de conservation de la laitue fraîche coupée (Letsididi *et al.*, 2018).

#### V.4.2.2 Dosage des composés phénoliques

Dans cette partie nous avons envisagé de faire une étude quantitative en terme polyphénolique, flavonoïdes et tannins content dans la partie aérienne et racine de la plante *Rubia tinctorum*.

Les résultats de la détermination du contenu phénolique total des six extraits de la partie aérienne et racinaire de *R. tinctorum*, obtenus en utilisant trois solvants différents (eau, méthanol, et di éthyle éther) sont présentés dans le tableau (10).

**Tableau 10** : Teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tanins

| La teneur             | AR                 | AF                | MR                | MF               | EER                 | EEF                  |
|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------|----------------------|
| TPC<br>(mg EAG/ g MS) | 38.49<br>±0.001*   | 34.40<br>±0.09*   | 118.38<br>±0.07** | 71.47<br>±0.021* | 75.88<br>± 0.036*   | 69.71<br>±0.01*      |
| TFC<br>(mg EC/g Ms)   | 10.32<br>±0.003*   | 34.74<br>±0.03*** | 45.29<br>±0.04*** | 30.30<br>±0.009* | 4.21<br>±0.006*     | 16.65<br>±0.002*     |
| TTC<br>(mg EC/g Ms)   | 131.68<br>±0.00*** | 127.24<br>±0.03*  | 42.57<br>±0.088*  | 134.11<br>±1***  | 116.38<br>±0.238*** | 128.88<br>± 0.006*** |

AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait d'éthyl éther de la partie aérienne ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, TPC : teneur totale en phénols, TFC : teneur totale en flavonoïdes, TTC : teneur totale en tanins. Les données ont été analysées par anova à sens unique, les valeurs représentent la moyenne ± SD ; n=3. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

La partie racine a montré la plus grande quantité de phénols totaux. La teneur la plus élevée a été observée dans l'extrait MR, à savoir  $118.38 \pm 0.07$  mg EAG/g MS. Alors que les niveaux les plus élevés de tanins et de flavonoïdes ont été déterminés dans la partie aérienne. La teneur en flavonoïdes variait entre  $16.65 \pm 0.002$  et  $34.74 \pm 0.03$  mg EAG /g MS, tandis que la teneur en tanins variait entre  $127.24 \pm 0.03$  et  $134.11 \pm 1$  mg EAG/g MS.

La concentration de flavonoïdes dans les différents extraits de *R. tinctorum* a été déterminée par une méthode spectrophotométrique utilisant du chlorure d'aluminium. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en termes d'équivalents de catéchines (mg EC/g Ms). Les concentrations de flavonoïdes dans les extraits MR, MF, AR, AF, EER et EEF étaient respectivement de  $4.21 \pm 0.006$ ,  $30.30 \pm 0.009$ ,  $34.74 \pm 0.03$ ,  $4.21 \pm 0.006$ ,  $16.65 \pm 0.002$  et  $45.29 \pm 0.04$  mg EC/g Ms. L'extrait MR a montré des quantités plus élevées de flavonoïdes. En revanche, l'extrait EER présentait la plus faible quantité.

Dans la comparaison des concentrations des flavonoïdes dans tous les extraits de la partie aérienne et des racines de *R. tinctorum*, nous avons constaté que les extraits hydrométhanoliques sont particulièrement riches en flavonoïdes par rapport aux autres solvants.

Concernant les polyphénols, la teneur la plus élevée a été détectée dans l'extrait MR avec une teneur de  $118.38 \pm 0.07$  mg EAG/g MS. Les extraits EER et MF contenaient également des niveaux élevés en ces composés ( $75.88 \pm 0.036$ ,  $71.47 \pm 0.021$ , respectivement), alors que les extraits AR ( $38.49 \pm 0.001$ ) et AF ( $34.40 \pm 0.09$  mg EAG/g MS) présentaient des teneurs faibles par rapport à celles de l'extrait MR.

Par ailleurs, les résultats ont révélé que les contenus phénoliques totaux des extraits de la partie aérienne étaient significativement plus faibles que ceux obtenus à partir des parties racinaires.

En outre, les résultats présentés dans le tableau (10) montrent que dans la partie racinaire, l'extrait aqueux (AR) présente la plus grande quantité en tannins ( $131.68 \pm 0.009$  mg EC/g Ms) suivi par l'extrait EER ( $116.38 \pm 0.238$  mg EC/g Ms) et l'extrait MR ( $42.57 \pm 0.088$  mg EC/g Ms). Dans les extraits des parties aériennes, l'extrait hydrométhanolique (MF mg EC/g Ms) contenait la plus forte concentration de composés tanniques ( $134,11 \pm 1$  mg EC/g Ms), suivi par l'extrait EEF ( $128.88 \pm 0.006$  mg EC/g Ms) et de l'extrait AF ( $127.24 \pm 0.03$  mg EC/g Ms).

D'autre part, nous avons remarqué que les tannins totaux ont été trouvés en concentration plus élevée dans la partie aérienne comparée à la partie racinaire (tableau 10).

Alors, di éthyle éther est un solvant efficace pour extraire les TTC, tandis que les TFC et TPC ont été d'avantage extraits par le méthanol (80%).

La variabilité du contenu phénolique total dans les différents extraits pourrait être le résultat de la solubilité variable des composés phénoliques ; cette dernière peut être déterminée par la polarité du solvant. En effet les solvants les moins polaires sont généralement considérés comme convenant à l'extraction des phénols lipophiles, et les solvants polaires sont utilisés pour les phénols hydrophiles (Medini *et al.*, 2014).

D'autre part, la présente étude a révélé que la distribution des polyphénols diffère significativement entre les différentes parties de *R. tinctorum* pour tous les solvants. Les différentes parties d'une même plante peuvent synthétiser et accumuler différents composés ou différentes quantités d'un composé particulier en raison de l'expression différentielle de leurs gènes. La différence dans la structure morpho-anatomique et l'activité physiologique des différentes parties de la plante contribuent à la variation du contenu phénolique et des activités antioxydantes et affectent d'autres propriétés biologiques des extraits de plantes. De nombreuses études ont confirmé que la quantité et la composition des composés phénoliques et flavonoïdes sont diversifiés au niveau subcellulaire et au sein même des tissus végétaux. Les facteurs de stress environnementaux auxquels les plantes sont soumises favorisent l'expression des composés de réponse au stress, y compris les polyphénols (Kaczorová *et al.*, 2021).

Dans l'ensemble, nous concluons que les différentes parties de la plante du *Rubia tinctorum* contiennent différents niveaux de métabolites secondaires avec une polarité

spécifique qui nécessite un solvant particulier montrant un indice de polarité approprié pour l'extraction et le rapport entre soluté et solvant.

La quantité, la pureté et la qualité de l'extrait brut dépendent grandement de la partie de la plante, du solvant utilisé pour l'extraction et de la solubilité des composés phénoliques dans les solvants d'extraction (Wakeel *et al.*, 2019).

Des études précédentes sur la racine de *R. tinctorum* ont rapporté une teneur plus élevée en composés phénoliques et flavonoïdes totaux (78.26 mg GAE /g et 25.36 mg GAE /g, respectivement) dans l'extrait hydrolysé de la racine de *R. tinctorum* (Essaidi *et al.*, 2017). Le même travail a confirmé la plus haute teneur en phénols que les flavonoïdes dans l'extrait non hydrolysé préparé avec 80 % de méthanol ( $38.84 \pm 0.6$  ;  $13.41 \pm 0.34$  mg/g, respectivement) (Essaidi *et al.*, 2017). De plus, Rovčanin *et al.*, (2015) ont constaté que les valeurs de tanins dans la racine de *R. tinctorum* étaient de 6,2 mg GAE /g d'extrait sec, et le niveau de phénols et de flavonoïdes était de 14.7 mg GAE/ g, 1.1 mg de CE/g d'extrait, respectivement.

De même, Marhoume *et al.*, (2019) ont constaté que la teneur totale en polyphénols de l'extrait butanolique de racine était de  $1.1 \pm 0.041$  mg GAE/100 g de MS, tandis que la teneur totale en flavonoïdes était de  $0.7 \pm 0.0055$  mg CAE/100 g de MS. On peut dire que nos résultats sont en accord avec ces recherches qui montrent une richesse de l'extrait méthanolique et les extraits organiques apolaires des racines en polyphénols et en tannins que les flavonoides.

Il semble que ces différences observées dans la quantité de composés phénoliques peuvent être dues à la maturité de la plante, aux étapes de la croissance de la plante, aux processus biochimiques et structurels du tissu végétal, à l'altitude, à l'éclairage, à l'humidité et à la saison de récolte (Cezarotto *et al.*, 2017).

### V.5 Les activités antioxydantes

Les antioxydants naturels fonctionnent selon différents mécanismes comme la prévention de la réaction d'initiation en chaîne, la décomposition des peroxydes, le piégeage des radicaux, la capacité de réduction, l'abstraction continue d'hydrogène et la liaison aux catalyseurs d'ions de métaux de transition. Il est donc très difficile d'attribuer un profil complet du potentiel antioxydant d'un extrait de plante par un seul test antioxydant d'où la nécessité d'effectuer plusieurs techniques différentes.

Dans notre étude, et afin de déterminer l'activité antioxydante de *R. tinctorum*, quatre méthodes ont été utilisées (l'activité de piégeage des radicaux libres (DPPH), l'activité du pouvoir réducteur ferrique (FRAP), la capacité antioxydante de réduction du cuivre (Cuprac), et la capacité antioxydante totale (TAC)). Ces tests sont relativement peu coûteux, faciles à réaliser et hautement reproductibles, ils ne nécessitent pas d'équipement ultrasensible et sont utilisés pour évaluer à la fois des composés isolés et des extraits complexes (Granato *et al.*, 2018).

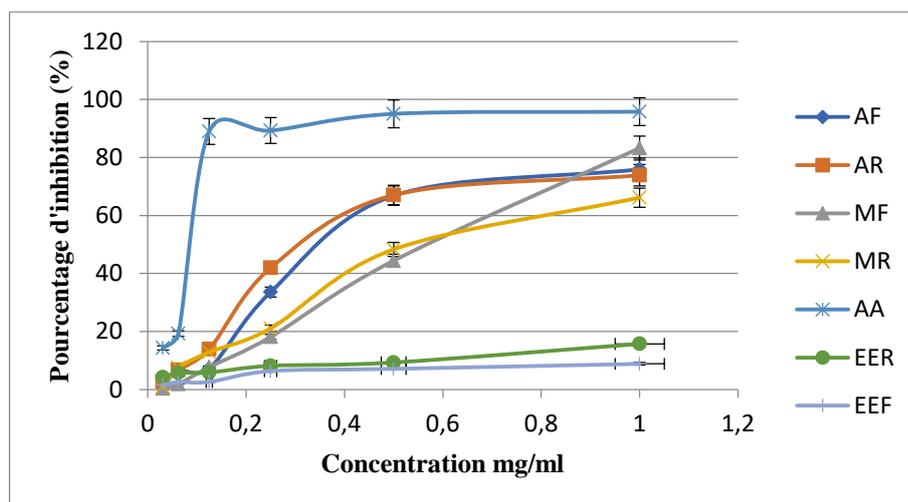
Les résultats sont résumés dans les figures (18, 20, 21, et 22). Les extraits ont montré un important potentiel antioxydant.

### V.5.1 Activité de piégeage du DPPH

La méthode de piégeage du DPPH a été largement utilisée pour évaluer le potentiel antioxydant et de piégeage des radicaux libres de différents composés naturels et synthétiques (Chekroun-Bechlaghem *et al.*, 2019).

Le test antioxydant DPPH est basé sur la capacité du DPPH, un radical libre stable, à décolorer en présence d'antioxydant. Le radical DPPH contient un électron impair, qui est responsable de l'absorbance à 517 nm et de la couleur violette profonde visible. Le DPPH accepte un électron donné par un composé antioxydant, il est décoloré, ce qui peut être mesuré quantitativement à partir des éléments suivants les changements d'absorbance.

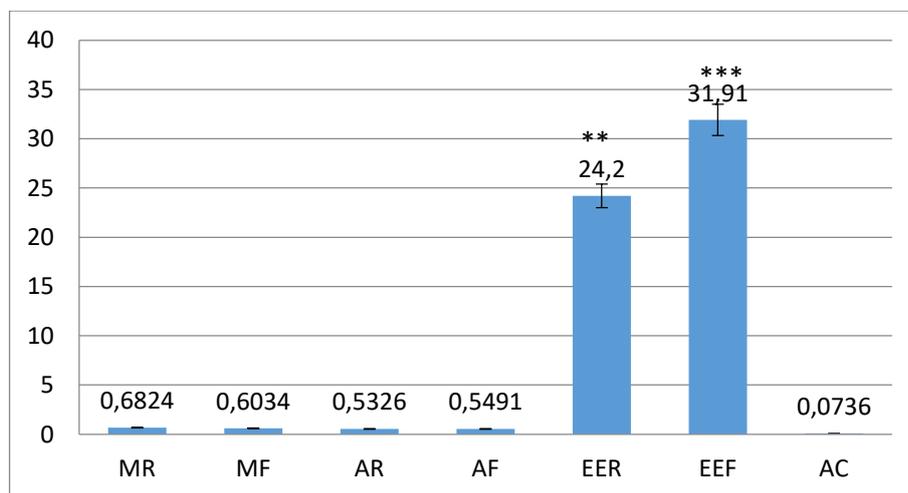
Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH a été déterminé à six concentrations différentes (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 mg/ml) de chaque extrait. Les résultats ont montré que les extraits ont présenté une activité dose-dépendante dans le piégeage des radicaux DPPH (Figure 22).



Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), AA : Acide ascorbique ; AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne ; EER : Extrait di éthyle éther de la partie racine ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne.

**Figure 22** : Résultats d'activité de piégeage du radical DPPH de différents extraits de *Rubia tinctorum*.

Le potentiel antioxydant est inversement proportionnel à la valeur  $IC_{50}$ , qui est calculée à partir de la régression linéaire de l'activité antioxydante en fonction de la concentration de l'extrait. L'acide ascorbique, qui a été utilisée comme standard, a montré une inhibition de 50% à 0.070 mg/ml. Le potentiel antioxydant variait de 0.532 à 31.91 mg/ml, il était comme le suit  $AR > AF > MF > MR > EER > EEF$  (figure 19).



AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne ; EER : Extrait di éthyle éther de la partie racine ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, AA : acide ascorbique, Les données ont été analysées par anova à sens unique, les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD ; n=3. \*\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 23** : Les valeurs  $IC_{50}$  en milligramme par millilitre, de différents extraits et standards de *Rubia tinctorum*.

Nous avons remarqué que la littérature est pauvre en termes d'études sur l'activité antioxydante de la plante *R. tinctorum* et aucun rapport sur l'activité DPPH n'a été trouvé pour les parties aériennes et les racines de cette plante. Cela, rend donc la comparaison difficile.

Nos résultats sont en d'accord avec l'étude de Kaczorová *et al.*, (2021), qui ont démontré que les extraits polaires (aqueux et éthanoliques) présentaient la plus faible valeur de la IC50 comparés aux extraits de pétrole éther et de chloroforme. Ils ont constaté que l'activité antiradicalaire est due aux présences de l'acide rosmarinique dans les deux extraits. Ceci confirme les résultats obtenus dans notre étude, montrant que l'acide rosmarinique est présent uniquement dans AR, AF et MR, et la concentration la plus élevée se trouve dans l'extrait AF (27.9655 µg /mg). De même, nos résultats sont conformes aux rapports antérieurs sur les algues brunes et rouges, qui ont indiqué que l'activité la plus élevée ( $47.9 \pm 0.67 \%$ ) a été observée dans l'extrait aqueux, tandis que les extraits hydrométhanoliques étaient de  $38.6 \pm 0.95$  (López *et al.*, 2011). Une autre étude a été réalisée sur la plante *D.hastata*, elle a démontré que l'extrait aqueux possède le bon pouvoir antiradicalaire ( $IC_{50}=4.9\pm 0.3 \mu g/ml$ ), suivi par l'extrait méthanolique ( $62.1\pm 2.6 \text{ mg /ml}$ ), l'extrait de pétrole éther ( $68.6\pm 3.5 \text{ mg /ml}$ ), l'extrait de l'acétone ( $216.8\pm 8.6 \text{ mg /ml}$ ), et l'extrait de l'éthyle acétate ( $250.3\pm 10.2 \text{ mg /ml}$ ) (Erkan *et al.*, 2011).

Cependant, nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de (Rolim *et al.*, 2018) qui ont montré qu'effet de piégeage des radicaux DPPH était plus important dans l'extrait hydrométhanolique ( $30.1\pm 0.23\%$ ) de la plante *Cucumismelo* L. tandis que l'extrait aqueux a enregistré ( $28.6\pm 0.31\%$ ).

L'effet antioxydant pourrait être attribuable à la teneur en substances phytochimiques. Widyawati *et al.*, (2014) ont rapporté que les flavonoïdes, la saponine, les tannins, l'hydroquinone phénolique, les alcaloïdes et les glycosides cardiaques possèdent un pouvoir antioxydant.

Pápay and Antal, (2014) ont testé l'activité de piégeage des radicaux de l'apigénine et de ses glycosides. Ils ont montré que l'aglycone (flavonoïde sans sucre) avait l'activité la plus élevée, ce qui peut être attribué à l'absence de composants de sucre sur les C7-OH. DeMenezes Epifanio *et al.*, (2020) ont constaté qu'il existe deux relations structure-activité principales qui jouent un rôle dans l'activité de piégeage des radicaux des flavonoïdes : la structure dihydroxyl en position ortho dans l'anneau B (qui forme une liaison H avec les radicaux) et la double liaison C2-C3 en conjugaison (qui est responsable de l'élimination des radicaux).

En outre, Kaczorová *et al.*, (2021), a indiqué que les extraits contenant des niveaux significatifs d'acide caféique, salicylique, chlorogénique, *p*-coumarique, *p*-hydroxybenzoïque et rosmarinique possèdent également une forte activité antioxydante contre le radical DPPH stable.

D'autre part, selon le tableau (10), l'extrait AF représente la concentration la plus élevée en composés phénoliques, par conséquent le pouvoir antioxydant était faible en le comparant avec l'extrait AR. Ce fait peut être attribué à l'interaction (synergie ou antagonisme) entre les composés phénoliques (Iacopini *et al.*, 2008) ou à la présence d'autres composés qui ne sont pas quantifiés en raison de l'absence de standard.

La structure chimique a un impact sur l'activité de piégeage des radicaux, plus les groupements hydroxyle sont nombreux, plus l'activité antioxydante est élevée. De même, la position des groupes hydroxyle et des groupes ortho-dihydroxy est une caractéristique structurale importante qui influence également l'activité antioxydante des composés phénoliques.

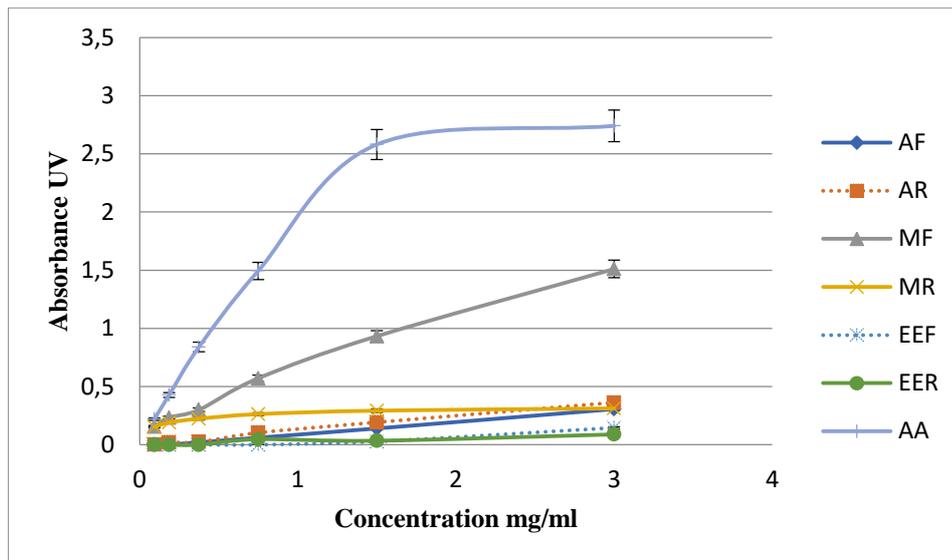
Basant sur les résultats obtenus, la sélection des parties de la plante et l'utilisation d'un solvant approprié pour l'extraction influencent grandement la capacité antioxydante.

### V.5.2 Test du pouvoir réducteur (FRAP)

La technique FRAP est une méthode permettant de mesurer le pouvoir réducteur d'un antioxydant qui réagit avec un complexe ferrique et produit les ferreux.

Les propriétés réductrices sont associées à la présence des composés donneurs d'hydrogène qui exercent leur action par la rupture de la chaîne du radical libre. Cette réduction est rapide avec tous les réducteurs ayant des potentiels de la demi-réaction de réduction supérieurs à ceux du couple  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ .

La figure (24) montre les changements de l'absorbance résultante de la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  par les extraits de *Rubia tinctorum* et le standard acide ascorbique en fonction de la concentration. L'extrait hydrométhanolique MF a montré un pouvoir réducteur plus puissant que tous les autres extraits avec une ABS de 1.51, suivi de l'extrait AR (ABS = 0,363), l'extrait MR (ABS=0.312), l'extrait AF (ABS = 0,306), puis l'extrait EEF (ABS = 0,14) et en dernier lieu l'extrait EER (ABS= 0,089). En outre, le standard (acide ascorbique) avait une valeur FRAP beaucoup plus élevée (2.74) par rapport à tous les extraits utilisés.



AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait d'éthyle éther de la partie aérienne ; EER : Extrait di éthyle éther de la partie racine ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, AA : acide ascorbique, les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD ; n=3.

**Figure 24:** Résultats de l'activité antioxydante FRAP des différents extraits de *Rubia tinctorum*.

D'après ces résultats, on peut remarquer que les extraits solubles dans l'eau ont le pouvoir réducteur le plus puissant que les extraits insolubles dans l'eau (EER et EEF). En plus, le solvant hydrométhanolique était plus efficace pour extraire les antioxydants des composés végétaux par rapport à l'éthyle éther. Il est évident, d'après les résultats obtenus, que les valeurs FRAP dépendent fortement du type du solvant utilisé (figure 24).

La littérature a démontré que les solvants organiques polaires ont tendance à donner une meilleure activité antioxydante que les solvants organiques apolaire et aqueux.

Des études antérieures d'Essaidi *et al.*, (2017) et Siva *et al.*, (2011) sur l'extrait de racine de *R. tinctorum*, démontrent la capacité de cette plante à réduire les ions ferriques. Ces résultats sont cohérents avec notre étude. La présence de composés phénoliques et de flavonoïdes dans les extraits de la racine et de la partie aérienne constitue une explication possible des résultats obtenus. En effet, Afsar *et al.*, (2016) ont rapporté que la quantité élevée de polyphénols dans les extraits pourrait être responsable de leur pouvoir réducteur ferrique. Parmi ces composés phénoliques : le catéchine, l'acide 3,4-dihydroxycinnamic, l'acide ferulique et la quercetine qui ont montré une capacité distincte à réduire les ions  $Fe^{3+}$  à des concentrations submicromolaires (Degraft-Johnson *et al.*, 2007), ils sont caractérisés par la présence d'un cycle de catéchol qui est considéré comme la seule structure positivement associée à la FRAP dans le modèle de régression multivarié impliquant tous les composés testés, ce qui suggère

l'implication prédominante des groupes -OH du catéchol dans la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  (Degraft-Johnson *et al.*, 2007).

En outre, l'activité antioxydante la plus élevée de l'extrait MF peut être due à l'apparition de la troisième structure des protéines en raison de leur dénaturation partielle par la chaleur. La présence des résidus d'acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) ou de chaînes latérales aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine) est donc augmentée et ceux-ci pourraient présenter des propriétés antioxydantes en raison de leur libération facile de protons (Hanachi *et al.*, 2019).

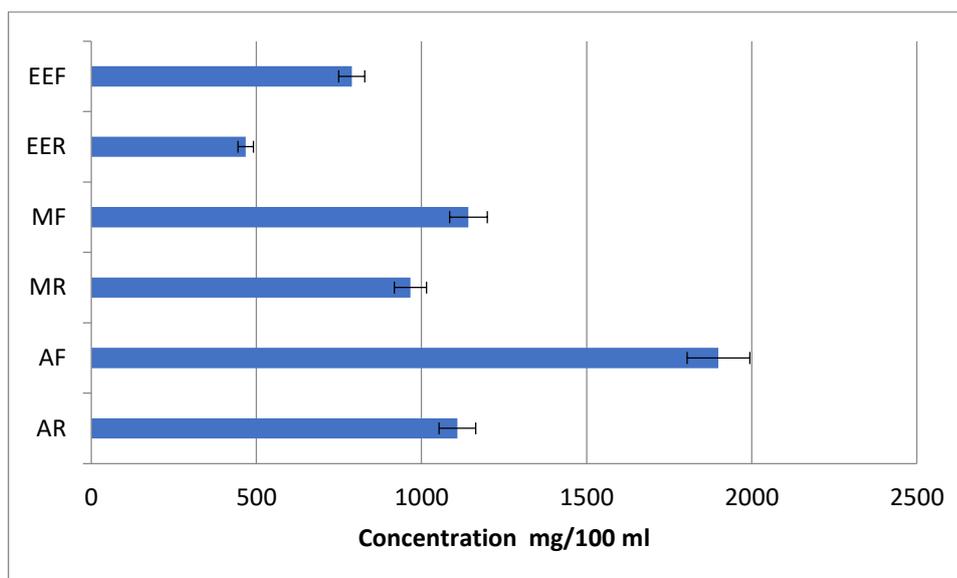
Plusieurs études ont rapporté que l'activité antioxydante des herbes est significativement associée à leur contenu phytochimique, particulièrement celui des flavonoïdes. Cependant, les résultats du test antioxydant n'ont pas montré une aptitude cohérente avec la littérature concernant les flavonoïdes. En effet, malgré la présence des flavonoïdes dans les différents extraits testés, nous n'avons pas pu démontrer une activité antioxydante importante. Prenons l'exemple de l'extrait MR qui présente la plus grande teneur en flavonoïde mais son pouvoir réducteur reste faible. Tous ces résultats approuvent que le fait que l'activité antioxydante d'un extrait phénolique ne dépend pas seulement de son contenu phénolique total, mais aussi du profil des phénols, de la structure chimique et de la nature du composé phénolique.

En outre, l'activité antioxydante d'une matière végétale est déterminée par les interactions entre les différents composés bios actifs, qui ont des mécanismes de réaction distincts pour retarder ou inhiber la détérioration oxydative causée par les radicaux libres.

### V.5.3 CUPRAC

Bien que la méthode antioxydante FRAP soit bien établie, la méthode CUPRAC est une méthode relativement nouvelle développée par Apak *et al.*, (2008). Ce test est basé sur la capacité de réduction des ions cupriques en présence de cuivre (II)-néo-cuproïne.

La figure (25) montre les résultats de l'activité antioxydante CUPRAC (exprimée en  $\mu\text{mole Trolox/ml}$ ) des extraits de *Rubia tinctorum* en utilisant trois solvants différents. Les analyses statistiques ont dévoilé une différence significative.



AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne ; EER : Extrait di éthyle éther de la partie racine ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, AA : acide ascorbique, les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SD ; n=3.

**Figure 25** : Résultats de l'activité antioxydante Cuprac des différents extraits de *Rubia tinctorum* en mg de capacité antioxydante équivalente de trolox (TEAC)/100 ml sur la base du poids fraîches.

L'activité antioxydante CUPRAC de l'ensemble des extraits de la plante *R tinctorum* a présenté des valeurs en ordre décroissant : AF > MF > AR > MR > EEF > EER. Les extraits de la partie aérienne étaient les plus actifs en les comparant avec les racines quel que soit le solvant utilisé. D'après la littérature, aucune étude n'a été réalisée sur le dosage du cuprac de la plante *Rubia tinctorum*. Néanmoins, plusieurs analyses se sont intéressées à l'effet antioxydant des différents éléments phytochimiques. Dans une étude réalisée par Masek *et al.*, (2016), dans l'objectif de l'activité antioxydante cuprac de l'acide caféique et de l'acide *p*-coumarique a été mesurée, il a été montré que l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique ont un potentiel de réduction des ions Cu (II). Çelik *et al.*, (2010) ont constaté que les dérivés de la catéchine, l'épigallocatechingallate, et quercétine présentaient une capacité antioxydante élevée, probablement en raison du nombre et de la position des groupes -OH sur la molécule et de la structure o-dihydroxy (catéchol) dans l'anneau B qui confère une plus grande stabilité à l'aryloxy. La double liaison 2,3, en conjugaison avec la fonction 4-oxo et la géométrie plane qui en résulte, qui délocalise le radical dans toute la molécule, ce qui favorise le transfert d'électrons. D'autre part, la présence de groupes 3- et 5-OH, qui permet la formation de structures quinoniques stables lors de l'oxydation des flavonoïdes (Çelik *et al.*, 2010).

En outre, Apak *et al.*, (2008), ont indiqué que les capacités antioxydantes les plus élevées dans la méthode cuprac étaient observées chez le gallate d'épicatéchine, la quercétine,

la fisétine, l'épigallocatechine, la catéchine, l'acide caféique, l'épicatéchine, l'acide gallique, la rutine et l'acide chlorogénique.

Sur la base de ces précédentes recherches, nous constatons que l'effet antioxydant du *Rubia tinctorum* est probablement lié à la catéchine, l'acide coumarique, l'acide caféique, l'épicatéchine, l'acide gallique, la rutine et l'acide chlorogénique qu'elle contient.

### V.5.4 Activité antioxydante totale (TAC)

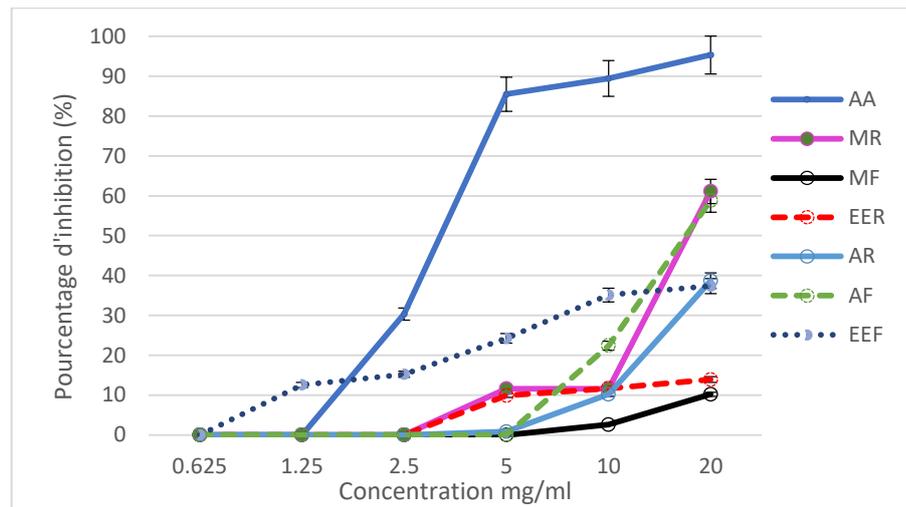
Dans la présente étude, la méthode du phosphomolybdate a été adaptée pour évaluer l'impact de la polarité du solvant sur la capacité antioxydante totale dans les deux parties différentes du *R. tinctorum*. La méthode du phosphomolybdate est optée par un grand nombre de chercheurs pour évaluer la capacité antioxydante, elle est considérée comme l'une des méthodes les plus authentiques, utilisées pour le TAC (Chekroun-Bechlaghem *et al.*, 2019).

Cette technique est basée sur la réduction de l'ion phosphomolybdate. En présence d'antioxydants, le Mo (VI) est réduit à la forme Mo (V), formant ainsi un complexe de phosphore vert et de molybdène V à pH acide (Castro-López *et al.*, 2017).

Le TAC des extraits a varié de manière significative entre les différents solvants et les différentes parties de plantes, ce qui indique que chaque solvant avec une polarité particulière peut isoler des composés spécifiques qui ont une capacité antioxydante distincte.

Les résultats sont présentés dans la figure (26). L'extrait MR a montré la plus forte réduction de l'activité Mo (VI) de manière dose-dépendante (61,09 % ;  $p < 0,01$ ) avec un effet marginal par rapport à l'acide ascorbique (95,35 %). Alors que le MF a montré un pouvoir réducteur plus faible (10,23 %).

L'extrait EEF a montré une capacité antioxydante à toutes les concentrations testées. Alors que l'extrait EER n'a débuté son pouvoir qu'à partir d'une concentration de 2,5mg/ml. En ce qui concerne les deux extraits aqueux AR et AF, la capacité antioxydante a eu lieu à une concentration de 5, de 10 et de 20 mg/ml, ils ont révélé une activité antioxydante relativement élevée. Ces données indiquent qu'une augmentation de la concentration de l'extrait contribue de manière significative à l'augmentation de la capacité antioxydante totale.



AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait d'éthyle éther de la partie aérienne; EER : Extrait d'éthyle éther de la partie racine ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, AA : acide ascorbique, les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SD ; n=3.

**Figure 26** : Résultats de l'activité antioxydante totale des différents extraits de *Rubia tinctorum*.

D'après les résultats, la capacité antioxydante la plus élevée a été enregistrée dans l'extrait hydrométhanolique des racines alors que l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne a marqué la capacité la plus faible. Donc, nous pouvons déduire qu'une bonne réduction du phosphomolybdate dépend de la partie de la plante étudiée, du type du solvant et de la concentration de l'extrait.

Dans la littérature, nous n'avons pas trouvé d'étude dans laquelle la capacité antioxydante totale des *Rubia tinctorum* a été évaluée par la même méthode. Par conséquent, nous avons effectué notre comparaison avec d'autres recherches étudiant l'impact de la polarité des solvants sur l'activité antioxydante totale d'autres plantes. Nos résultats sont en accord avec ceux de Laraib *et al.*, (2021) qui montrent que l'absorbance de l'extrait polaire est supérieure à celle des extraits non polaires et l'absorbance montrée par l'acide ascorbique est beaucoup plus élevée que celle des échantillons à toutes les concentrations.

Nos résultats impliquent que *R. tinctorum* pourrait réduire Mo (VI) en Mo (V) grâce aux phytoconstituants qui y sont présents, tels que les flavonoïdes et les polyphénols apparentés ((Khan *et al.*, 2012); (Sharififar *et al.*, 2009)). En outre, l'analyse phytochimique quantitative a révélé qu'un contenu plus élevé de composés polyphénoliques a été trouvé dans l'extrait MF. Cependant, la capacité antioxydante la plus élevée a été détectée pour le MR, indiquant que l'activité antioxydante du TAC pourrait être attribuée à un autre composé non phénolique. Il est souligné par certains auteurs que le dosage du phosphomolybdène est généralement lié à d'autres substances antioxydantes tel que les vitamines, les caroténoïdes,

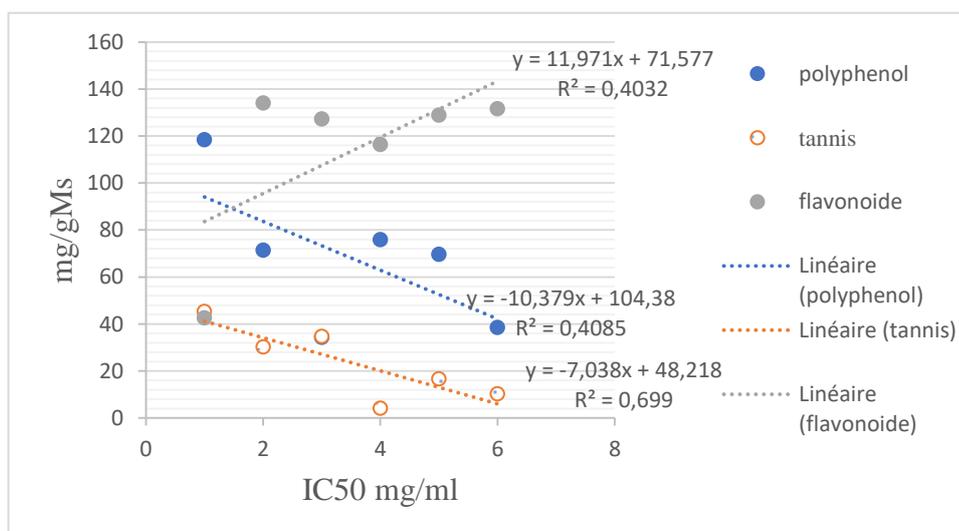
l' $\alpha$ -tocophérol, la cystéine et les amines aromatiques pour leur capacité à donner de l'hydrogène et des électrons (Afsar *et al.*, 2016).

### V.5.5 Relation entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes

Nous avons essayé dans cette partie de déterminer une relation entre la présence de composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits étudiés. Cette relation permet d'établir une corrélation linéaire entre les deux.

La corrélation du contenu phénolique total, avec les activités DPPH, FRAP, TAC et CUPRAC est montrée dans les Figures (27), (28), (29) et (30), respectivement. Le coefficient de corrélation était plus élevé entre l'activité DPPH et la teneur en tannins, polyphénols et flavonoïdes, ( $R^2 = 0.6, 0.4$  et  $0.4$ , respectivement).

En revanche pour les activités TAC, FRAP, et CUPRAC, de faibles liens à la présence des composés phénoliques ont été détectés. En effet la régression linéaire établie entre les composés phénoliques (polyphénols, tannins, et flavonoïdes) et les activités AAO correspondantes donne des corrélations ( $R^2$ ) extrêmement faible situées entre 0.001 et 0.2.



**Figure 27:** Relation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante DPPH.

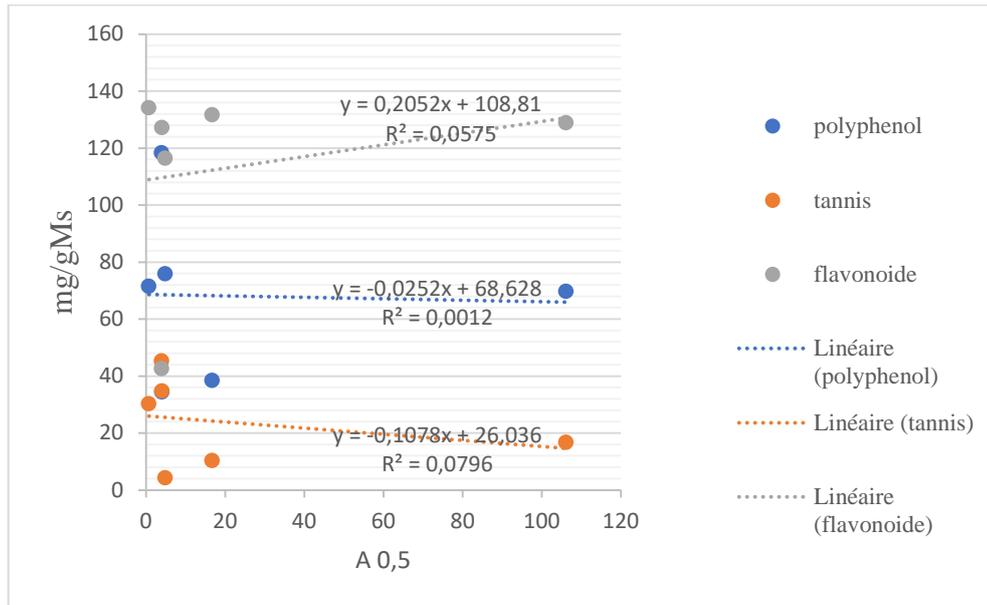


Figure 28 : Relation entre les composés phénoliques et les activités antioxydante FRAP.

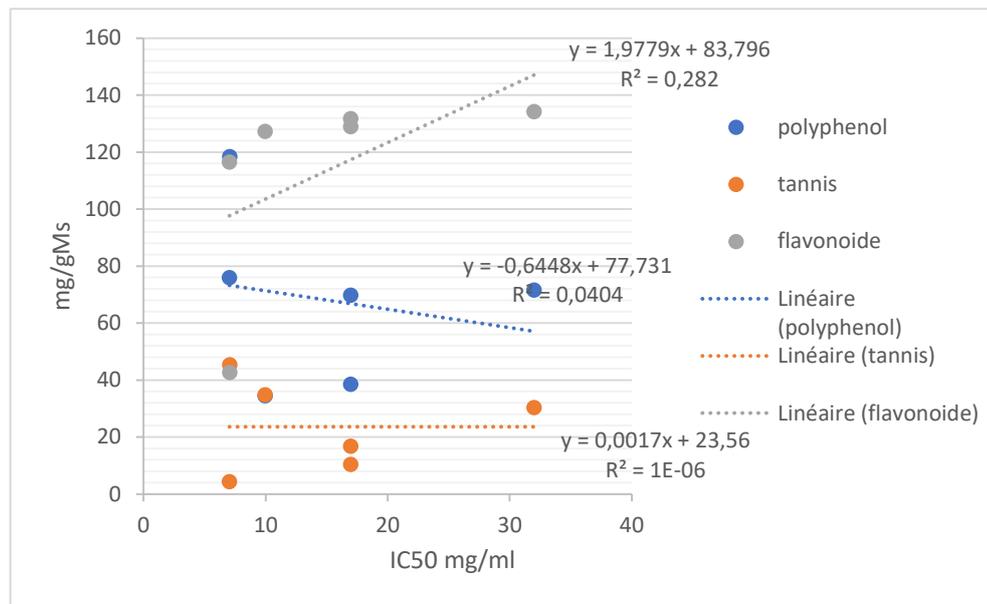


Figure 29 : Relation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante totale.

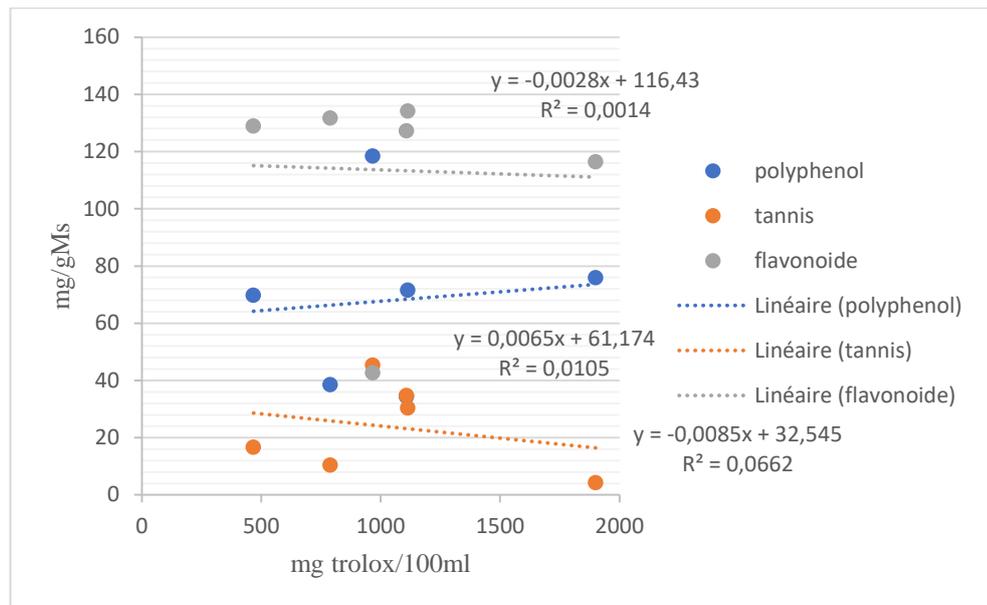


Figure 30 : Relation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante CUPRAC.

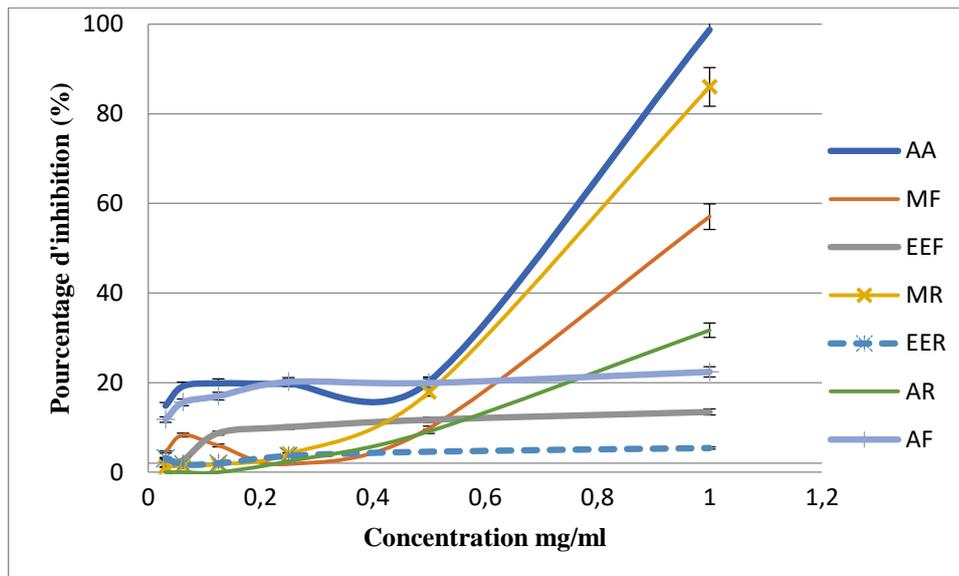
### V.6 Activité anti hémolytique

Les cellules les plus abondantes du corps humain sont les érythrocytes, qui possèdent de nombreuses caractéristiques biologiques et morphologiques, et qui ont donc été largement exploitées pour le transport des médicaments. Les acides gras polyinsaturés et les molécules d'hémoglobine sont des molécules de transport d'oxygène redox actives et de puissants agents d'espèces d'oxygène activées. La mutilation oxydative des lipides et des protéines de la membrane érythrocytaire peut être responsable de l'hémolyse qui s'accompagne de plusieurs facteurs : hémoglobinopathies, médicaments oxydants, excès de métaux de transition, radiations diverses et déficiences de la coordination antioxydante de l'érythrocyte. L'ampleur de l'hémolyse s'est avérée beaucoup plus importante lorsque les globules rouges ont été exposés à des substances toxiques comme le peroxyde d'hydrogène (Afsar *et al.*, 2016).

Cette expérience était destinée à tester si *R. tinctorum* empêchait les dommages oxydatifs de la membrane érythrocytaire contre les dommages causés par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas un radical libre, mais il est néanmoins très important en raison de sa capacité à pénétrer dans les tissus biologiques. Le mécanisme qui augmente la puissance toxique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> c'est la réaction de Haber-Weiss, qui génère des radicaux hydroxyle (-OH) à partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxyde d'hydrogène) et de superoxyde (-O<sub>2</sub>-), catalysés par les ions de fer (Sabuncuoğlu et Şöhretoğlu, 2012).

L'effet inhibiteur des extraits de *R. tinctorum* et de l'acide ascorbique contre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est présenté dans la figure (31).



AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait d'éthyle éther de la partie aérienne ; EER : Extrait d'éthyle éther de la partie racine ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, AA : acide ascorbique, les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SD ; n=3.

**Figure 31** : Résultats de l'activité anti hémolytique des différents extraits de *Rubia tinctorum*.

Lorsque nous avons traité les globules rouges associées à l' $H_2O_2$  avec les extraits hydrométhanoliques et l'acide ascorbique à des faibles concentrations de (0.031-0.125mg/ml), nous avons remarqué une diminution du taux d'anti hémolytique. Cela peut être dû à l'augmentation du pourcentage d'hémolyse qui a été provoqué par  $H_2O_2$  responsable la mobilisation de  $Fe^{2+}$  par  $Ca^{2+}$  via la réduction de Fenton en stimulant la production des radicaux OH. Tous ces facteurs combinés provoquent la déstabilisation de la membrane cellulaire, ce qui est probablement l'événement clé de la lyse de la cellule (Chakraborty et Shah, 2011). A une concentration de 0.25- 1 mg/ml, une augmentation de l'effet anti hémolytique a été observée. Cela peut être dû à l'activité de piégeage des radicaux par les composants bioactifs présents dans les extraits qui montrent un effet anti hémolytique puissant.

En ce qui concerne les extraits AF, EEF et EER, un effet stable a été détecté, le pourcentage anti hémolytique était de 22.40%, 13.45% et 5.40%, respectivement. Tandis que l'extrait AR a présenté un effet dépendant de la concentration. D'autre part, nous constatons que l'extrait MR a montré le meilleur effet antihémolytique (85.99%), suivie par MF (57.05%) et AF (22.40%) tandis que l'extrait EER a montré le plus faible effet inhibiteur (5.40%). En outre, la partie racine a montré un effet important pour tous les extraits en comparaison avec la partie aérienne, à l'exception du solvant de l'éther éthylique, dont l'extrait EER a montré un faible effet en comparaison avec l'extrait EEF.

La peroxydation lipidique est considérée comme l'une des principales raisons des dommages cellulaires. Les sites membranes érythrocytaires sont sensibles à la peroxydation parce qu'elles sont riches en acides gras polyinsaturés. Elles contiennent de l'hémoglobine, qui peut catalyser l'oxydation, car elles sont continuellement exposées à une forte concentration d'oxygène. L'oxydation des érythrocytes sert de bon modèle pour les dommages oxydatifs des membranes biologiques. Il a été constaté que certains produits chimiques, ayant la capacité de générer des radicaux, attaquent la membrane érythrocytaire, induisant les oxydations en chaîne des lipides et des protéines et provoquant finalement des dommages membranaires conduisant à l'hémolyse (Chakraborty et Shah, 2011).

Les résultats de la présente étude démontrent la présence des antioxydants qui ont un effet anti hémolytique. Les composés bioactifs présents dans les extraits pourraient être responsables de l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En effet, plusieurs recherches antérieures ont montré que la présence de polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits bruts améliore la stabilité de la membrane des globules rouges en inhibant ainsi l'hémolyse (Chaudhuri *et al.*, 2007).

Besbas *et al.*, (2020) ont évalué l'effet anti hémolytique de trois extraits de différentes polarités de la plante *Ononis mitissima* L. L'activité anti hémolytique la plus forte a été observée avec l'extrait hydroéthanolique, tandis que les extraits de l'ethyl acétate et de butanol ont montré des propriétés anti hémolytiques modérées avec des valeurs de pourcentage d'inhibition de l'hémolyse de 19 % et 38 %, respectivement à une concentration de 0,8 mg/ml. Ces résultats sont en accord avec notre étude, dans laquelle les extraits polaires ont montré l'effet le plus fort, tandis que les extraits apolaires ont manifesté l'effet le plus faible.

Les différentes études antérieures ont établi la relation entre l'effet anti hémolytique des extraits bruts et la présence des molécules ayant des activités antioxydantes du fait de leur capacité à piéger les radicaux libres. Cet effet a été attribué à la capacité des extraits à interagir avec la couche externe de la membrane lipidique, où ils provoquent des changements dans l'arrangement de l'emballage des têtes polaires des lipides. Cela rend la membrane plus élastique et plus résistante aux changements de pression de l'environnement osmotique, par conséquent, plus insensible aux dommages causés par le stress oxydatif (Balderrama-Carmona *et al.*, 2020).

Les flavonoïdes, les phénols et les alcaloïdes pourraient être liés à la protection des membranes cellulaires, car ils interrompent l'interaction des composants phospholipidiques et

inhibent leur oxydation, les protégeant ainsi des dommages causés par les molécules oxydantes (Salem *et al.*, 2021).

L'effet anti hémolytique peut s'expliquer par l'activité antioxydante des anthocyanes, qui pourrait empêcher l'hémoglobine de s'oxyder en méthémoglobine (MetHb) et inhiber la génération de radicaux libres. Il a également été déclaré que les extraits d'anthocyanes exerceraient cet effet protecteur en fonction de leurs propriétés réductrices empêchant que la membrane lipidique, l'hémoglobine et le matériel enzymatique soient détruits ou inactivés par oxydation (Mbula *et al.*, 2018)

### V.7 Activité antimicrobienne

La résistance aux antibiotiques est un problème qui continue de menacer la santé publique dans de nombreux pays et l'effet du traitement antibactérien actuel. La recherche d'antimicrobiens à partir de sources naturelles a fait l'objet d'une grande attention, et des efforts ont été déployés pour identifier les composés qui peuvent agir comme agents antimicrobiens appropriés pour remplacer les agents synthétiques. De nombreuses études ont été menées avec des extraits de diverses plantes, pour le dépistage de l'activité antibactérienne ainsi que pour la découverte de nouveaux composés antimicrobiens.

Dans la présente étude, l'activité antibactérienne des extraits des parties aériennes et des racines de *Rubia tinctorum* a été testée contre des bactéries Gram-négatives et Gram-positives (*Staphylococcus aureus* ATCC 12386, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella* ATCC 12022 et *Bacillus cereus* ATCC 6633). La susceptibilité de chaque extrait végétal a été testée par la méthode de diffusion sur milieu gélose et la méthode de microdilution en série (MIC).

#### V.7.1 Méthode de diffusion sur milieu gélosé

Il est évident d'après les résultats obtenus à travers la présente étude que la plante *R tinctorum* fût toxique contre toutes les bactéries sélectionnées à différentes concentrations et aux différents extraits. Selon la figure (33), l'EER était le plus efficace comparé aux autres extraits, suivis par l'extrait AR. En effet, l'extrait EER a inhibé toutes les bactéries Gram-positives et Gram-négatives à l'exception d'*E coli*. *Staphylococcus aureus* était la bactérie la plus sensible (15,5 mm à 500 mg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* présentait la plus faible zone d'inhibition (9mm à 500 mg). En outre, l'extrait AR a été efficace contre toutes les souches sauf *Salmonella*. Les autres extraits (MF, EEF, AF et MR) n'étaient actifs que sur deux souches avec des zones d'inhibition variant entre (0.5 et 1.6 cm). *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* étaient les plus sensibles.

L'extrait organique apolaire de la partie racinaire (EER) a fourni une activité antimicrobienne plus puissante que les extraits aqueux et hydroalcooliques. Cette observation indique clairement l'existence de résidus non polaires ayant des capacités bactéricides et bactériostatiques plus importantes. Cowan, (1999) a mentionné que la plupart des composés antibiotiques déjà identifiés dans les plantes sont des molécules organiques saturées qui peuvent facilement se solubiliser dans des solvants organiques. (Cristofoli *et al.*, 2019) affirment que le composant antimicrobien actif présent dans les extraits est plus facilement extractible avec les solvants de faible polarité et la fraction lipidique est plus efficace car elle présente des stérols.

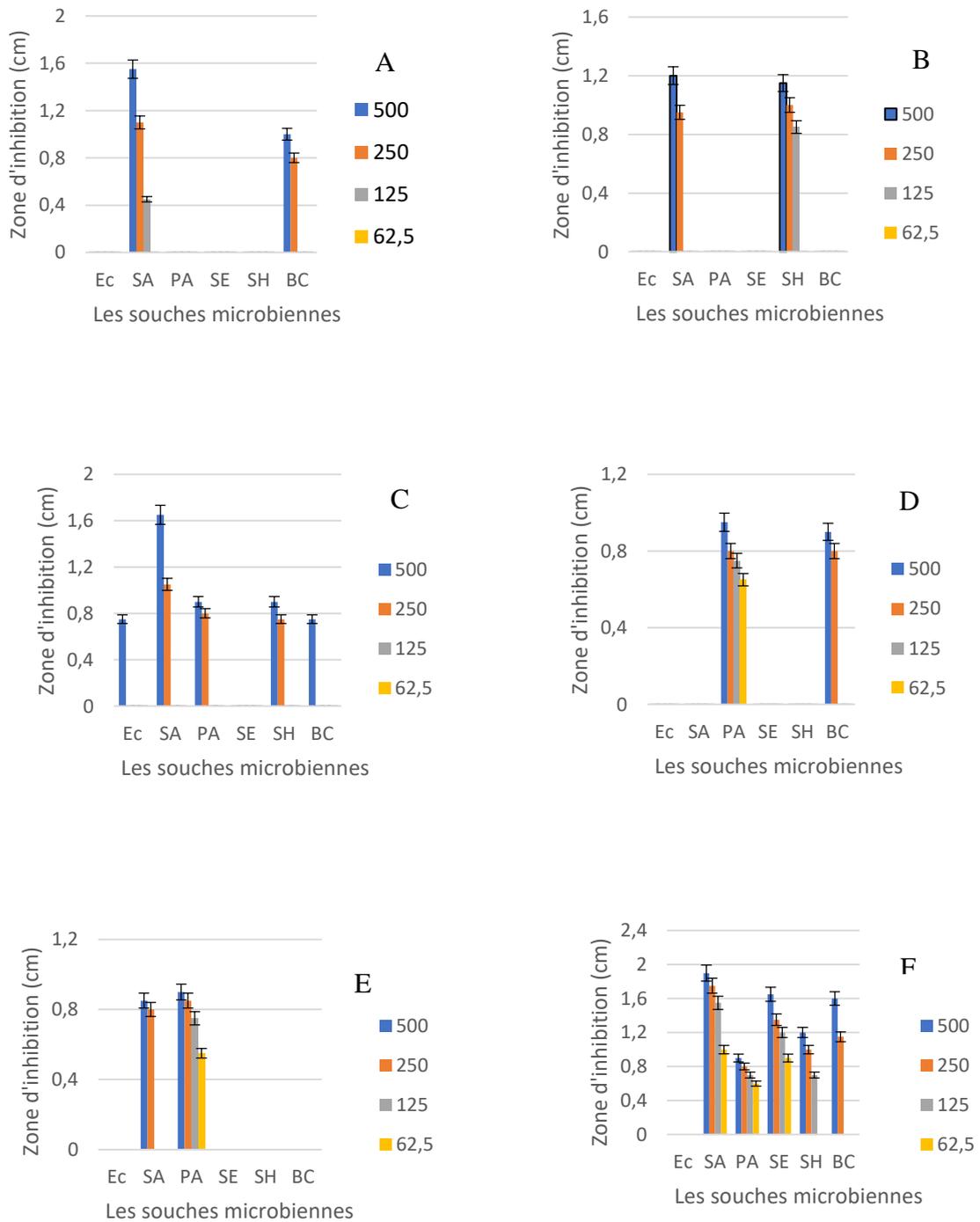


C1 : concentration de 500mg/ml, C2 : concentration de 250mg/ml.

**Figure 32 :** Exemple des zones d'inhibition de l'extrait di éthyle éther de la partie racine contre *Staphylococcus aureus* (SA), *E. coli* (EC), et *Bacillus* (BC).

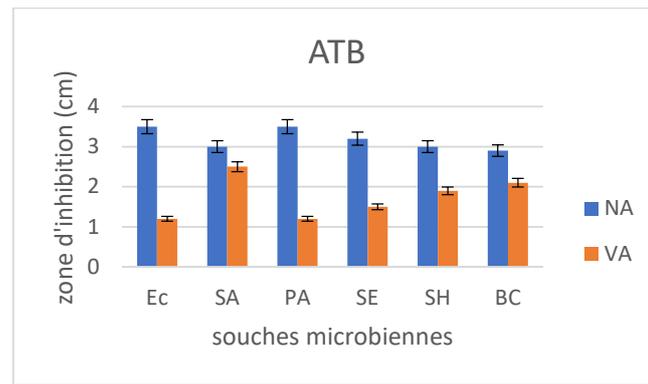
L'effet antimicrobien est peut-être également dû à l'antraquinone de *R. tinctorum*, qui est considérée comme le principal composé antibactérien, il faut souligner qu'elle est peu soluble dans l'eau et dans l'éthanol. Ainsi, cela implique qu'elle est responsable de l'effet antibactérien de l'extrait EER (Rovčanin *et al.*, 2015). Egalement, Olah *et al.*, (2003) ont rapporté que les flavonoïdes polyméthoxylés, les dérivés d'acide caféique, et l'acide rosmarinique possèdent une activité antimicrobienne contre un large spectre de bactéries et de levures. Par conséquent, ces composants peuvent être à l'origine de l'activité antimicrobienne de la plante *Rubia tinctorum*.

En outre, nous pouvons remarquer que l'extrait EER contient des quantités plus élevées de phénols comparé aux autres extraits ce qui est pourrait expliquer son effet antibactérien le plus important.



(A: MR), (B: MF), (C: AR), (D: AF), (E: EEF), (F: EER).

**Figure 33** : l'effet antimicrobien des extraits de la plante *Rubia tinctorum*.



SA : *Staphylococcus aureus*, EC : *Escherichia coli*, PA : *Pseudomonas aeruginosa*, SE : *Salmonella enteritidis*, SH: *Shigella* et BC : *Bacillus cereus*, NA: Acide nalidixique ; VA : Vancomycine.

**Figure 34** : les diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques vis à vis les souches testés.

Kalyoncu *et al.*, (2006) ont testé l'effet des feuilles et des racines de *R tinctorum*, en utilisant le méthanol, éthanol, éthyle acétate et l'eau comme solvants, contre l'*Escherichia coli* ATCC 11230, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ils rapportent que les extraits méthanoliques et éthanolique de la racine et de la partie aérienne avaient un effet inhibiteur sur *E. coli* et *Bacillus*, alors qu'aucun effet sur *Staphylococcus aureus* n'a été observé. L'extrait aqueux n'a aucun effet sur toutes les bactéries, tandis que l'extrait organique (éthyle acétate) n'a montré d'effet bactéricide que sur *Proteus*.

Cependant, ces résultats ne sont pas en accord avec nos données, cette différence entre notre recherche et les autres rapports sur l'activité antimicrobienne *R. tinctorum* peuvent être influencées par plusieurs facteurs. En effet, la composition chimique et l'activité antimicrobienne des extraits de plantes peuvent varier considérablement d'un pays à l'autre, et l'activité antimicrobienne des extraits de plantes peuvent être significativement affectées par les techniques d'extraction réalisées, le type de solvant utilisé, les méthodes des tests effectuées, les différentes souches de microorganismes testées, et l'origine géographique des matériaux végétaux (Romulo *et al.*, 2018).

Ghafari *et al.*, (2018) ont également évalué l'effet antimicrobien de l'extrait hydro méthanolique des racines de *R tinctorum* sur des bactéries à Gram-positif et des bactéries à Gram-négatif. Les résultats indiquent que l'extrait est efficace à des degrés variables contre toutes les souches testées. Les souches à Gram-positif sont plus inhibées que les souches à Gram-négatif. En outre, ils trouvent des halos d'inhibition de 17, 12.2, 10, 13.4 et 13 mm pour les *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *E. coli* et *Klebsiella*, respectivement. Ce résultat confirme notre étude indiquant que les bactéries à Gram-positives sont plus sensibles aux extraits comparées aux bactéries à Gram-négatives. En revanche, ils ne

concordent pas avec nos résultats en ce qui concerne leur effet inhibant sur les *Pseudomonas* et *E coli*. Cette divergence pourrait être liée à la nature des composés présents dans chaque extrait (Essaidi *et al.*, 2017).

Mehrabian *et al.*, (2000) ont évalué l'activité antimicrobienne de l'extrait des racines de *R. tinctorum* soumis à une macération pendant 24 h et ils ont conclu que l'extrait obtenu par méthanol avait le plus grand pouvoir antimicrobien par rapport à l'extrait aqueux. D'autre part, dans une étude comparative entre l'extrait aqueux et éthanolique de la plante *Rubia* sur *E coli*, Rovčanin *et al.*, (2015) a révélé que l'extrait aqueux donne un effet inhibiteur sur *E coli*.

Par ailleurs, l'ensemble de ce résultats, y compris les nôtres, ont montré que l'efficacité des extraits contre les bactéries testées augmente en fonction de la concentration et change avec le type du solvant utilisé ainsi que le type de microorganisme. Selon certains auteurs, le type de phénols (Celis *et al.*, 2011), la nature des extraits (Singh *et al.*, 2013), et le type de micro-organisme (Kannan *et al.*, 2009), pourraient affecter l'activité antimicrobienne.

D'autre part, il a été constaté que les bactéries à Gram-négatif présentaient la plus grande résistance aux agents antimicrobiens par rapport aux bactéries à Gram-positif. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de Boulekbache-Makhlouf *et al.*, (2013) et Trigui *et al.*, (2013). Cette résistance pourrait être liée à la richesse en liposaccharides de la membrane externe, qui fait défaut aux bactéries à Gram-positif, constituant ainsi une barrière contre les biomolécules (Özkan *et al.*, 2015).

L'activité antimicrobienne des composés phénoliques pourrait s'expliquer par la modification de la perméabilité des membranes cellulaires, les changements de diverses fonctions intracellulaires induits par la liaison hydrogène des composés phénoliques aux enzymes ou, par la modification de la rigidité de la paroi cellulaire.

Il a été démontré que les acides phénoliques perturbent l'intégrité des membranes en provoquant la fuite des constituants intracellulaires essentiels. Tandis que les flavonoïdes peuvent retarder la croissance des micro-organismes en inhibant la synthèse des acides nucléiques, la fonction de la membrane cytoplasmique et le métabolisme énergétique. Ils se lient aux protéines solubles situées à l'extérieur des cellules et aux parois cellulaires des bactéries, favorisant ainsi la formation des complexes (Kaczorová *et al.*, 2021).

D'autre part, les résultats illustrent que les différentes parties de plantes ont présenté une activité antimicrobienne, mais avec des proportions variables. Ces différences peuvent être attribuées à l'accumulation de différents agents antimicrobiens dans les différentes parties de *R. tinctorum*. Plusieurs rapports antérieurs ont montré que les changements dans la

composition chimique d'un extrait affectent directement ses activités biologiques. Dans notre étude, l'activité antimicrobienne des racines s'est avérée plus forte que celle de la partie aérienne.

### V.7.2 CMI et CMB

L'efficacité des extraits sur les souches bactériennes testées a été déterminée en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI a été réalisée uniquement pour les bactéries qui ont montré une zone d'inhibition et qui étaient sensibles aux extraits de plantes dans les études antimicrobiennes précédentes par la méthode de diffusion en puits d'agar.

**Tableau 11** : Détermination de CMI et CMB des extraits de *R. tinctorum*

| Extrait | Les souches bactériennes |     |     |      |     |      |     |     |     |      |     |      |
|---------|--------------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|------|
|         | SA                       |     | EC  |      | PA  |      | SE  |     | SH  |      | BC  |      |
|         | CMI                      | CMB | CMI | CMB  | CMI | CMB  | CMI | CMB | CMI | CMB  | CMI | CMB  |
| MF      | 250                      | 500 | /   | /    | /   | /    | /   | /   | 250 | >500 | /   | /    |
| MR      | 125                      | 500 | /   | /    | /   | /    | /   | /   | /   | /    | 125 | 500  |
| EER     | 62.5                     | 250 | /   | /    | 500 | >500 | 250 | 500 | 250 | 500  | 125 | 250  |
| EEF     | 250                      | 500 | /   | /    | 500 | >500 | /   | /   | /   | /    | /   | /    |
| AR      | 125                      | 500 | 500 | >500 | 500 | >500 | /   | /   | 500 | >500 | 500 | >500 |
| AF      | /                        | /   | /   | /    | 250 | >500 | /   | /   | /   | /    | 500 | >500 |

AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne ; EER : Extrait di éthyle éther de la partie racine; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, (/): Non déterminé. CMI : concentration minimale inhibitrice ; CMB : concentration minimale bactericide. SA : *Staphylococcus aureus*, EC : *Escherichia coli*, PA : *Pseudomonas aeruginosa*, SE : *Salmonella enteritidis*, SH: *Shigella* et BC : *Bacillus cereus*.

Parmi tous les extraits testés, l'extrait EER a montré une forte activité antimicrobienne avec des CMI variant de 62.5-125 mg/ml sur cinq souches microbiennes, l'extrait de MR a démontré une activité antibactérienne contre les *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* avec une CMI de 125 mg/ml, l'extrait MF a donné une CMI de 250 mg/ml contre deux souches *S. aureus* et *Shigella*. En outre l'extrait AR a prouvé également une activité positive sur cinq bactéries, mais avec une CMI allant de 150 à 500 mg/ml, montrant une activité plus faible que les autres extraits.

Nos résultats ne sont pas en accord avec l'étude de Ghafari *et al.*, (2018), qui rapporte des CMI de 0.312 à 0.156 mg/ml pour des extraits méthanoliques des racines de *R tinctorum* contre *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, et *P. aeruginosa*. Comparées à nos résultats, ces valeurs sont inférieures à nos données. Selon Zambrano *et al.*, (2019), la CMI varie en fonction de la variété de la plante, de la méthode d'extraction, de la fraction résiduelle et du microorganisme utilisé.

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est généralement classée sur la base de tests de sensibilité qui produisent des valeurs de CMI comprises entre 500 et 1500 µg/ml (Maregesi *et al.*, 2008).

La classification est considérée comme :

- Forte inhibition : CMI inférieure à 500 µg/ml
- Inhibition modérée : CMI varie de 600 à 1 500 µg/ml
- Faible inhibition : CMI supérieure à 1 600 µg/ml.

Ainsi, sur la base de ces données, nous constatons que les extraits du *R tinctorum* reflètent une très faible inhibition de la croissance bactérienne.

D'après les résultats obtenus (Tableau 11), nous remarquons que la majorité des échantillons n'avaient pas de CMB contre les agents pathogènes dans la gamme de concentrations étudiée. Lorsque la CMB a été déterminée, elle était moins double ou mois triple de la CMI retrouvée pour l'échantillon correspondant. Il est intéressant de noter que, malgré la haute sensibilité montrée lors des essais CMI, les souches de *Bacillus* et *Staphylococcus* n'ont pas été tuées par des concentrations d'extraits inférieures à 500 mg/ml à l'exception pour EER.

En générale, la plante *R. tinctorum* a des propriétés antibactériennes modérées, probablement dues à la présence de certains composés phénoliques.

### V.8 Toxicité

Malgré l'utilisation répandue des plantes médicinales dans les pays en voie de développement, il existe très peu de données scientifiques concernant leur toxicité et leurs effets sur la santé. Pour prévoir le risque de toxicité, des études systématiques sont nécessaires afin de fournir des informations scientifiques permettant de déterminer les doses inoffensives pour l'homme (El Kabbaoui *et al.*, 2017).

Dans cette étude, la toxicité aiguë des extraits aqueux et organiques a été étudiée en utilisant une dose unique de 2000 mg/kg/poids corporel sur 48 rats. Des tests de la fonction

hépatique (TGP et TGO) et de la fonction rénale (UREE et créatinine) ont été réalisés, des analyses biochimiques (glucose, triglycérides, et cholestérol global) et hématologiques ont été effectuées.

**Tableau 12:** Les signes cliniques de toxicité orale aiguë des extraits de *Rubia tinctorum* chez les rats Wistar exposés à une dose de 2000 mg/kg.

| Observation           | T1 | ER | EF | MF | MR | EER     | EEF     | T2 |
|-----------------------|----|----|----|----|----|---------|---------|----|
| Température           | NR | NR | NR | NR | NR | NR      | NR      | NR |
| Prise alimentaire     | NR | NR | NR | NR | NR | diminué | NR      | NR |
| Taux de respiration   | NR | NR | NR | NR | NR | NR      | NR      | NR |
| Changement de la Peau | NO | NO | NO | NO | NO | NO      | NO      | NO |
| Couleur des yeux      | NR | NR | NR | NR | NR | NR      | NR      | NR |
| Diarrhée              | NO | NO | NO | NO | NO | NO      | NO      | NO |
| Changement physique   | NO | NO | NO | NO | NO | fatigue | fatigue | NO |
| Coma                  | NO | NO | NO | NO | NO | NO      | NO      | NO |
| Sommeil               | NO | NO | NO | NO | NO | P       | P       | NO |
| Décès                 | NO | NO | NO | NO | NO | NO      | NO      | NO |

T1 : Témoin 1, T2 : Témoin 2 ; AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne ; EER : Extrait di éthyle éther de la partie racine ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne. NR : normale ; NO : Absence.

La mortalité est un signe évident de toxicité, mais d'autres variables peuvent indiquer des effets indésirables plus subtils, tels que la perte de poids pendant le test. Le nombre de mortalité ou de morbidité a été déterminé après 14 jours. Outre la morbidité, des changements comportementaux tels que la respiration, la température, les convulsions, la diarrhée, les tremblements et les démangeaisons ont été notés pendant la période du test.

### V.8.1 Suivi du comportement des rats

Selon le tableau (12), l'administration d'une dose unique des extrait MR, MF, AR, et AF n'a provoqué aucun signe de toxicité (morbidity ou mortalité) chez tous les rats. De même, aucun changement comportemental n'a été observé.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Marhoume *et al.* (2019) qui ont trouvé que l'extrait butanolique de la partie racine (0.5, 1, 2, 3.5, 5 g/kg) n'avait aucun effet toxique sur les rats traités. En outre, ils concordent avec l'étude de Karim *et al.*, (2010), rapportant que la dose tolérée de l'extrait aqueux des racines de *Rubia tinctorum* allait jusqu'à 10 g/kg de poids corporel chez les souris albinos et aucune mortalité ni aucun symptôme toxique n'ont été observés.

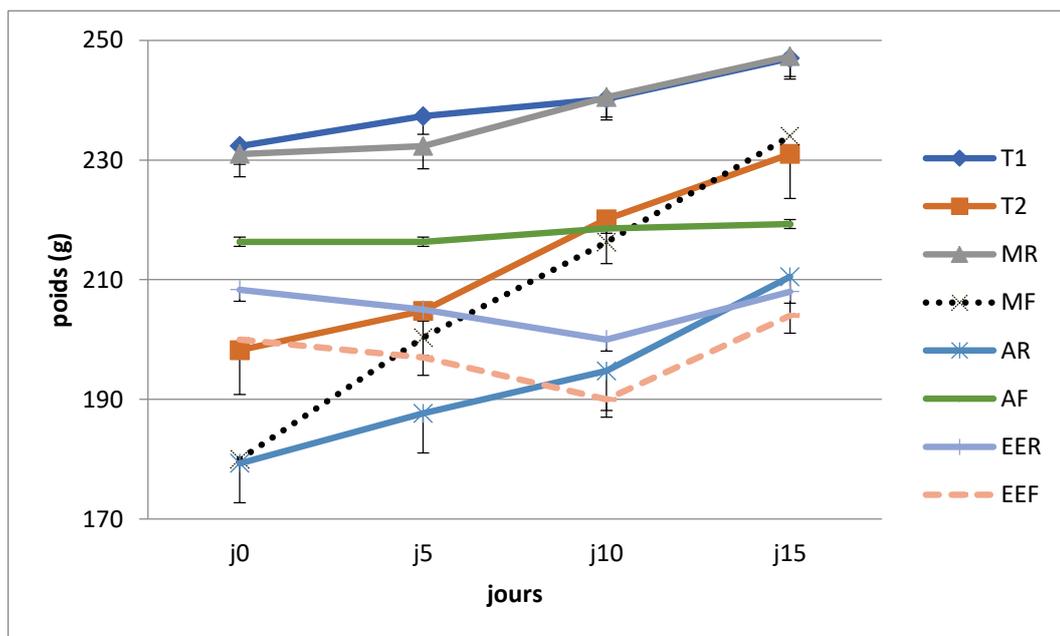
En revanche, nos résultats n'ont montré aucun changement significatif après 15 jours, des poids des organes des rats traités et non traités (foie, des reins, du cœur et du pancréas), (figure 35). Pareillement aucune altération morphologique ni changement de texture ou de couleur n'ont été révélés.

Cependant, les rats traités avec EER et EEF manifestent des signes d'une respiration lente et difficile, l'isolement et l'anorexie par rapport aux témoins. Leurs mouvements et leurs appétits diminuent, ils commencent à souffrir des convulsions durant les premières deux heures. Tous ces signes ont disparu après les 48 heures.

Les signes cliniques observés peuvent être dû probablement aux alcaloïdes. Selon les résultats illustrés dans le tableau (08), la quantité des alcaloïdes est importante. Basé sur la littérature (Benbott *et al.*, 2013), les alcaloïdes sont responsables de la paralysie du système nerveux qui provoque la mort par arrêt respiratoire chez les vertébrés, qui traduit un blocage du GABA cérébral (acide gamma amino butyrique) et donc leur médiation inhibitrice, produisant ainsi un effet stimulant qui est responsable de l'augmentation du tonus musculaire et d'un maximum de convulsions et d'excitabilité neuronale. De plus, les alcaloïdes exercent une action inhibitrice sur le système dopaminergique central, induisant une sédation et des troubles du sommeil paradoxal. Ceci explique la diminution de la mobilité et l'augmentation des symptômes de fatigue chez les rats.

### V.8.2 Suivi du poids corporel

Dans la présente étude, le traitement par les extraits AR, AF, MR, et MF n'a pas montré de perte de poids. Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience a démontré qu'il y a une augmentation modérément significative en fonction du temps (Figure 34). Nous pouvons affirmer que les extraits n'ont pas interféré avec le métabolisme normal des animaux.



T1 : Témoin 1, T2 : Témoin 2 ; AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne ; EER : Extrait di éthyle éther de la partie racine ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine ; MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne.

**Figure 35** : Evolution pondérale des rats dans les conditions de la toxicité aiguë.

Cependant, le poids des animaux traités par les extraits EER et EEF a diminué tout au long des dix premiers jours comparativement au témoin (T2) (Figure 34). Puis, durant les cinq derniers jours, le poids a repris, mais toujours moins que le poids initial.

Les altérations du poids corporel sont des indices des effets indésirables des médicaments et des produits chimiques. La perte du poids peut être expliquée par une réduction de la consommation des aliments (la perte d'appétit) qui est la conséquence de la perturbation du métabolisme des glucides, des protéines, ou des graisses. Elle peut être dû également à la diminution de la nourriture absorbée à cause des tanins et d'autres substances phénoliques qui interfèrent avec l'absorption des nutriments et les rendant indisponibles tout en réduisant la prise alimentaire et les interactions dose /absorption.

En outre, cette perte de poids peut être dû au certain composés phytochimiques tel que les anthraquinones qui sont responsables des effets toxiques, (l'ataxie et la faiblesse musculaire) (Silva *et al.*, 2011). Silva *et al.*, (2011) ont mentionné que l'effet toxique de

certaines plantes était dû à la présence de dianthrone, un composé dérivé de l'antraquinone. Il est possible que cette anthraquinone soit présente dans les deux extraits EER et EEF.

Le stress expérimental dû au gavage ou de la manipulation, peut aussi constituer un facteur provoquant la perte du poids (Deyno *et al.*, 2020).

La présence des alcaloïdes pourrait aussi être incriminée dans la perte du poids. En effet, une étude antérieure sur la toxicité de la fraction d'alcaloïde de *H. umbellata*, a montré que les alcaloïdes provoquaient une perte du poids significative chez les rats traités (Adeneye et Crooks, 2015).

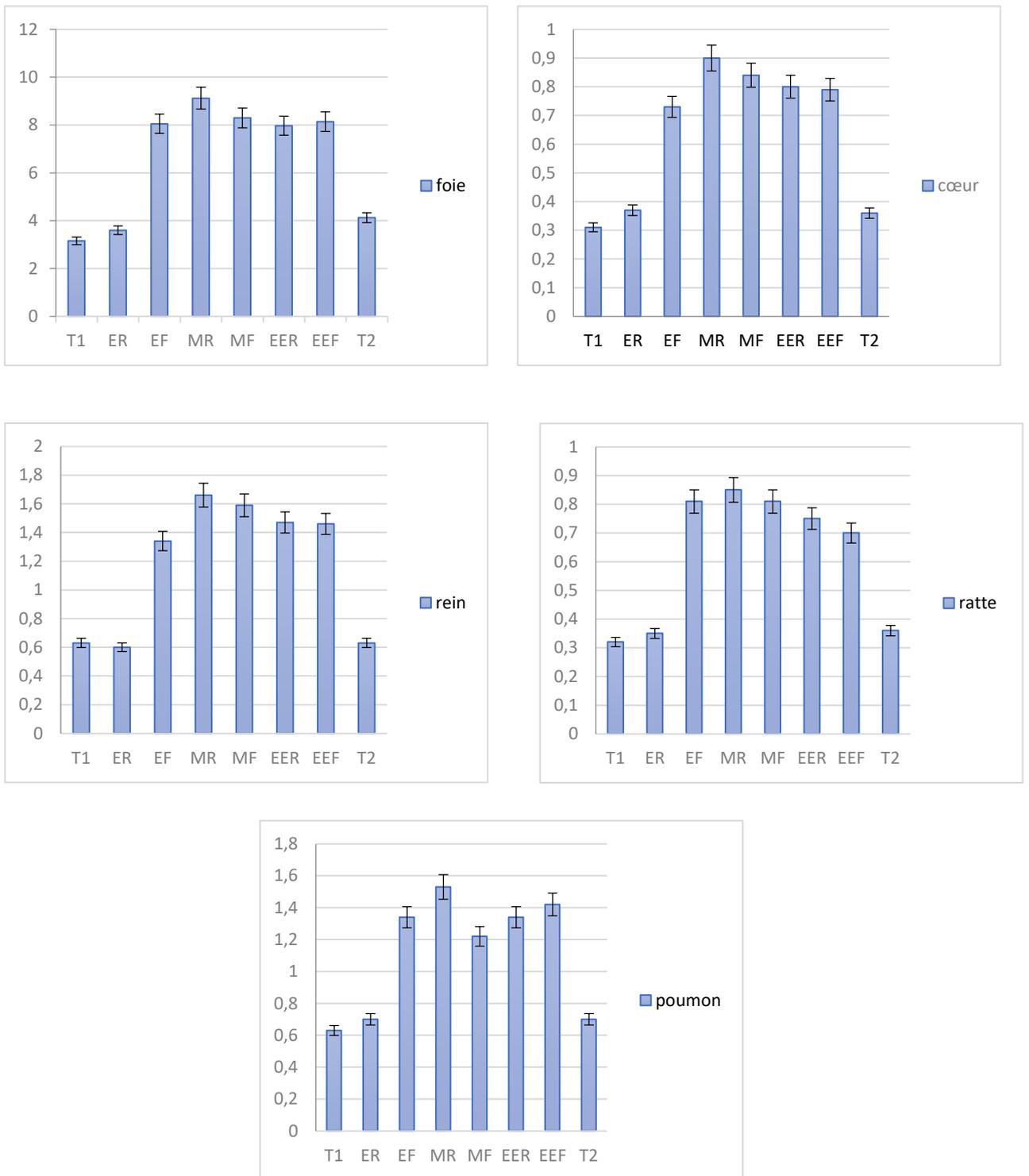
Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer laquelle des anthraquinones ou lequel des produit sont responsables de cet effet.

D'autre part, la réduction de l'activité des rats et de la réaction au bruit peut être due à un effet dépresseur et sédatif sur le système nerveux central. Des études phytochimiques de l'écorce de la tige de *S. barteri* ont révélé la présence des saponines. Ces derniers provoquait l'anorexie et la perte du poids chez les animaux (Atsafack *et al.*, 2015). Leur présence dans notre plante pourrait justifier la diminution de la consommation alimentaire et de la perte du poids observée lors de l'étude de toxicité aiguë chez les rats.

### V.8.3 Suivi du poids des organes

Le poids des organes est un indicateur important de l'état physiologique et pathologique chez les êtres humains. Le poids relatif d'un organe est fondamental pour diagnostiquer si l'organe a été exposé ou non à la blessure. Le cœur, le foie, les reins, la rate et les poumons sont les principaux organes affectés par la réaction métabolique causée par l'exposition à des substances chimiques (Rajeh *et al.*, 2012).

Les résultats de cette étude n'ont montré aucune différence significative entre le poids relatif des organes des rats traités et celui des rats témoins, ce qui signifie qu'aucun des organes n'a montré de signes de toxicité ou n'a été affecté négativement pendant l'étude (Figure 34).



T1 : Témoin 1, T2 : Témoin 2 ; ER : Extrait aqueux de la partie racine ; EF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne ; EER : Extrait di éthyle éther de la partie racine ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne.

**Figure 36 :** Poids des organes des rats traités et témoins dans les conditions de la toxicité aigüe.

Cependant, pour les animaux traités par les extraits AF, MR, MF, EEF et EER, des élévations significatives des valeurs du poids des reins, de la rate, du poumon et du foie, sont observées.

Rappelons que le foie joue un rôle crucial dans le métabolisme et l'excrétion des produits chimiques, il est considéré comme l'organe le plus sensible à la toxicité. Et puisque, les extraits sont métabolisés dans le foie, l'augmentation de son poids pourrait être une réaction afin de répondre à la demande accrue de son métabolisme (Aouachria *et al.*, 2017). D'autre part, la néphrotoxicité pourrait être impliquée dans l'augmentation du poids des reins, absolue ou relative.

A son tour, le poids de la rate peut augmenter à cause de la stimulation accrue des lymphocytes requise par le système de défense de l'organisme contre les composés chimiques administrée par voie orale (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003).

Toutefois, nous pouvons dire que les changements du poids chez les rats traités par AF, et MR ne sont pas forcément liés à la toxicité, car ils n'ont pas été confirmés par les résultats des analyses biochimiques (tableau 13) et hématologiques (tableau 14).

### V.8.4 Analyse des paramètres hématologiques

Le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus sensibles aux composés toxiques, c'est un indice important de l'état physiologique et pathologique (Liju *et al.*, 2013).

Les données hématologiques et biochimiques jouent un rôle important dans la détermination de la toxicité induite par les médicaments. Le sang est le principal moyen de transport de nombreux médicaments et xénobiotiques dans l'organisme et pour cette raison, les composants du sang sont exposés à des concentrations importantes de composés toxiques. Les dommages et la destruction des cellules sanguines sont préjudiciables au fonctionnement normal de l'organisme, tant chez l'homme que chez l'animal (Romulo *et al.*, 2018).

L'effet des différents extraits (MR, AR, AF, EER, EEF et MF) de *Rubia tinctorum* sur les paramètres hématologiques est résumé dans le tableau (13).

Tous les paramètres hématologiques testés y compris l'hémoglobine, les globules rouges, les globules blancs, les lymphocytes, l'hématocrite, les MCV, les TCMH, les CCMH, le volume et la numération plaquettaire étaient évalués.

Nous avons observé une diminution des globules blancs (GB) et des lymphocytes chez les rats exposés aux extraits AR et MF ( $p < 0,05$ ), et une diminution des plaquettes (PLT) chez les rats exposés aux extraits MF et AF par rapport au groupe témoin (1).

Dans les groupes traités avec des extraits d'éther di éthylique, une diminution significative des globules rouges (GR), des plaquettes (PLT), du MCV et de l'hémoglobine (HB), ( $p < 0,01$ ) a été notée en comparaison avec le groupe témoin (2).

La diminution des taux de PLT suggère que les extraits peuvent provoquer une thrombocytopénie, et produisent des perturbations de la cascade de coagulation. Ces perturbations sont fréquemment associées à une toxicité hépatique aiguë (Ibrahim *et al.*, 2016)

En outre, les diminutions significatives des lymphocytes (LYM) dans les groupes sont probablement dues à la suppression de la fonction immunitaire. Alors que la diminution significative du paramètre GR indique que l'extrait végétal a affecté négativement le système érythropoïétique, celle des paramètres MCV et CCMH pourrait suggérer une augmentation de la taille moyenne des GR et une diminution du poids de l'hémoglobine (Kharchoufa *et al.*, 2020).

Ces résultats confirment l'effet toxique des extraits di éthyle étherique des parties racinaires et des parties aériennes.

**Tableau 13:** Effets des extraits de *Rubia tinctorum* sur les paramètres hématologiques chez les rats pendant 14 jours d'étude de toxicité aiguë par voie orale.

| Paramètres                | T1           | AR         | AF          | MR          | MF            | EEF          | EER            | T2          |
|---------------------------|--------------|------------|-------------|-------------|---------------|--------------|----------------|-------------|
| GB (10 <sup>3</sup> /μl)  | 12.24±1.30   | 9.43±1.09* | 12.29±3.81  | 12.63±0.89  | 7.93±3.77*    | 8.89±3.38*   | 6.32±3.2*      | 11.28±1.33  |
| LYM (10 <sup>3</sup> /μl) | 7.96±0.47    | 6.34±1.62* | 8.06±2.93   | 8.44±0.16   | 5.69±3.33**   | 6.32±2.25*   | 7.43±1.3       | 7.85±0.11   |
| GR(10 <sup>6</sup> /μl)   | 9.263±0.30   | 8.26±0.68  | 8.10±0.08   | 8.84±0.25   | 8.73±0.93*    | 7.30±1.54    | 8.42±0.02      | 8.57±0.30   |
| HB (g/dl)                 | 17.06±1.19   | 16.16±1.15 | 15.33±35**  | 15.76±0.66* | 15.25±1.62*   | 13.8±3.25**  | 14.6±1.05**    | 16.88±1.08  |
| CCMH(g/dl)                | 33.9±0.78    | 33.9±0.78  | 34.26±0.23  | 33.35±0.65  | 34.75±0.07    | 34.16±0.68   | 36.23±2.20*    | 33.56±0.06  |
| PLT(10 <sup>3</sup> /μl)  | 625.33±10.87 | 652±37     | 539±46.87*  | 684.66±14.5 | 56.85±0.35*** | 67.03±3.0*** | 44.06±32.66*** | 633.54±13.3 |
| TCMH                      | 18.43±0.83   | 19.5±0.26  | 18.93±0.49  | 18.53±0.51  | 19.8±0.28     | 18.76±0.70   | 19.96±1.77     | 18.85±0.44  |
| MCV (HT)                  | 54.33±3.05   | 56.33±0.57 | 44.79±0.76* | 47.08±2.45* | 43.92±4.68*   | 40.08±9.8*   | 45.70±0.20*    | 51.25±2.3   |

T1 : Temoin1 ; T2 : temoin 2 ; AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne. GR : globule rouge ; LYM : lymphocyte ; GB : globule blanc ; HB : hémoglobine ; CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; PLT : plaque ; MCV : volume globulaire moyen ; TCMH : La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine. Les données ont été analysées par anova à sens unique, les valeurs représentent la moyenne ±SD ; n=3. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, p\*\*\*<0.001.

### V.8.5 Analyses des paramètres biochimiques

En ce qui concerne les niveaux des paramètres biochimiques, les résultats sont présentés dans le tableau (14). Par rapport aux témoins, aucune modification significative ( $p > 0,05$ ) des taux de créatinine (Crea), de glutamate-pyruvate transaminase (TGP), de triglycérides (TRIGLYC) et de cholestérol n'a été observée chez les rats traités par les extraits AR, AF, MR et MF. De plus, une diminution significative de l'urée et du cholestérol a été détectée.

Cependant, chez les rats ayant reçu l'EER, des élévations des taux de la créatinine, du cholestérol, des triglycérides et de la glycémie ont été observées avec les valeurs suivantes :  $26.02 \pm 6.71$ ,  $2.05 \pm 1.04$ ,  $1.62 \pm 0.94$ ,  $1.53 \pm 0.09$ , respectivement. Le TGP et le TGO ont largement dépassé les normes. Il est intéressant aussi, de noter qu'une augmentation significative du niveau de créatinine a été observée chez le groupe traité avec l'extrait EEF.

La créatinine est un marqueur de la toxicité rénale, son taux augmente dans le sérum lorsque le cortex et/ou le glomérule sont endommagés (Atsafack *et al.*, 2015).

Les niveaux des enzymes sériques (TGP et TGO) sont largement utilisés comme marqueurs sensibles pour évaluer l'effet toxique sur le foie (Mukinda et Syce, 2007).

Le foie est un organe vital qui joue un rôle essentiel dans la biotransformation des médicaments, sa fonction normale est évaluée par divers biomarqueurs enzymatiques sériques (El Kabbaoui *et al.*, 2017). L'augmentation des taux du TGP et TGO dans le sérum reflète l'hypertrophie et les lésions des tissus hépatiques (Costa-Silva *et al.*, 2008).

Le taux du TGO, en plus d'être un indicateur du dysfonctionnement hépatique, est également utilisé pour évaluer les maladies musculaires et cardiaques (Adeyemi *et al.* 2008). Le TGP est présent principalement dans les cellules qui tapissent le biliaire du foie, il est utilisé dans le diagnostic des pathologies du canal biliaire (Ramaiah, 2011). Par conséquent, l'augmentation de l'activité du TGO et du TGP dans le sérum des rats traités avec l'extrait d'EER, indique que ce dernier est le responsable de la catastrophe structurelle et fonctionnelle du système hépatique causée chez les rats.

En ce qui concerne les extraits MR, MF, AR, AF, et EEF, nous remarquons que les valeurs des TGP et TGO sont dans les normes, ce qui suggère l'absence d'effet hépatotoxique apparent chez les rats.

## Résultats et discussion

**Tableau 14:** Effets des extraits de *Rubia tinctorum* sur les paramètres biochimiques chez les rats pendant 14 jours d'étude de toxicité aiguë par voie orale.

| Paramètres          | T1          | AF           | AR           | MR          | MF           | EER           | EEF            | T2         |
|---------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------|----------------|------------|
| <b>UREE</b>         | 0.56±0.01   | 0.5±0.02     | 0.38±0.03*   | 0.34±0.032* | 0.5±0.055    | 0.47±0.052    | 0.53±0.1       | 0.51±0.021 |
| <b>Crea</b>         | 4,76± 0,3   | 4.5±0.72     | 6,02 ± 6,71  | 7.57±0.69   | 6.95±3.18    | 26.02±6.71*** | 14.43±2.11***  | 4.96±0.2   |
| <b>TGO</b>          | 66.69±20.81 | 58.49±13.10  | 54.58±13.65* | 59.12±14.38 | 42.81±2.39** | /             | 40.82±28.62*** | 65.96±10.2 |
| <b>TGP</b>          | 32.3±3.39   | 34.53±22.37* | 32.2±6.89    | 34.86±9.49  | 25.45±6.85   | /             | 21.5±10.57     | 32.87±5.4  |
| <b>Cholesterol</b>  | 0.66±0.05   | 0.7±0.030    | 0.48±0.10    | 0.33±0.056  | 0.42±0.083   | 2.05±1.04***  | 0.44±0.09*     | 0.71±0.014 |
| <b>triglyciride</b> | 0.4±0.06    | 0.41±0.04    | 0.42±0.14    | 0.33±0.19   | 0.28±0.01*   | 1.62±0.94***  | 0.22±0.04      | 0.42±0.04  |
| <b>Glycémie</b>     | 1.4±0.5     | 2.64±1.2     | 1.19±0.08    | 1.1±0.04    | 1.2±0.01     | 1.53±0.09*    | 1.33±0.02**    | 1.68±0.4   |

T1 : témoin 1 ; T2 : témoin 2 ; AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait d'éthyle éther de la partie aérienne ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne. Les données ont été analysées par anova à sens unique, les valeurs représentent la moyenne ±SD ; n=3. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01

**V.9 Anémie**

L'effet de l'administration aiguë des extraits de la plante *Rubia tinctorum* sur les paramètres hématologiques est présenté dans les tableaux 15, 16 et 17. Les paramètres hématologiques ont été mesurés avant l'induction de l'anémie (J0), après l'induction de l'anémie induite par la phénylhydrazine (J2) et le 15<sup>ème</sup> jour.

Comme indiqué dans le tableau 16, le traitement avec la phénylhydrazine a diminué les niveaux des RBC, HB, HT, MCH, MCV et a augmenté le niveau du MCHC par rapport au groupe témoin.

Cependant, l'administration du fer et d'extrait aqueux de la racine a significativement augmenté les niveaux des GR, HT, HB, MCH, et PCV, ( $p < 0,01$ ) (Tableau 17). En effet, le traitement par le fer a présenté une forte amélioration des taux des GR (de  $4,66 \pm 0,04 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  à  $6,96 \pm 1,25 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ). De même, l'extrait AR et MR ont amélioré les niveaux des GR d'une manière dose /dépendante, de 9.82, 71.67, 56.59 et 62.56% pour AR<sub>C1</sub>, AR<sub>C2</sub>, MR<sub>C1</sub> et MR<sub>C2</sub>, respectivement. De plus, une augmentation de l'hémoglobine (HB) et de l'hématocrite (Ht) dans les groupes traités (AR<sub>C1</sub> et AR<sub>C2</sub>, MR<sub>C1</sub> et MR<sub>C2</sub>) a été notée par rapport au groupe des rats anémiques (control -).

Nos résultats ont révélé que le MCHC a augmenté considérablement dans tous les groupes après le traitement avec la phénylhydrazine. Cependant, l'extrait aqueux, le fer et l'extrait MR<sub>C2</sub> ont entraîné une diminution du niveau du MCHC de  $40 \pm 0.21$ ,  $52.88 \pm 3.45$ ,  $37.35 \pm 3.04$ ,  $36.27 \pm 0.84 \text{ g/dl}$  à  $30,55 \pm 2,89$ ,  $31,3 \pm 0,92$ ,  $32,86 \pm 0,65 \text{ g/dl}$ ,  $34.7 \text{ g/dl}$  dans les groupes FER, AR<sub>C1</sub> et AR<sub>C2</sub>, MR<sub>C2</sub>, respectivement.

**Tableau 15:** Les valeurs des paramètres hématologiques avant l'induction de l'anémie.

| Paramètres                 | Témoin + | Control - | Fer      | AFC1    | AF C2   | MFC1    | MFC2    | MRC1    | MRC2    | AR C1    | ARC2    |
|----------------------------|----------|-----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|
| GR (10 <sup>6</sup> /μl)   | 8.26     | 07        | 08.76    | 07.07   | 07.92   | 08.91   | 7.55    | 9.39    | 7.61    | 8.23     | 7.84    |
|                            | ±0.3     | ±0.03     | ±0.25    | ±0.60   | ±1.025  | ±0.05   | ±0.97   | ±1.23   | ±1.42   | ±0.078   | ±0.03*  |
| HB (g/dl <sup>-1</sup> )   | 17.6     | 15.7      | 17.9     | 15.7    | 16.5    | 16.2    | 15.6    | 17.4    | 14.95   | 16.3     | 16.3    |
|                            | ±1.19    | ±0.43     | ±0.31    | ±0.8    | ±1.27   | ±0.42   | ±0.14   | ±1.34   | ±1.62   | ±0.11*   | ±0.06*  |
| HT (%)                     | 45.83    | 43.28     | 50.96    | 41.98   | 45.47   | 45.85   | 40.85   | 49.06   | 42.18   | 47.99    | 46.38   |
|                            | ±2.30    | ±0.22     | ±0.14*   | ±2.85   | ±4.70   | ±1.27   | ±1.11   | ±1.09   | ±6.68   | ±0.35*   | ±0.03   |
| MCHC (g.dl <sup>-1</sup> ) | 34.3     | 33.8      | 35.2     | 37.44   | 36.45   | 35.4    | 38.15   | 35.5    | 35.55   | 33.8     | 35.1    |
|                            | ±0.72    | ±0.02     | ±0.32*   | ±1.43   | ±0.91   | ±0.14   | ±1.34   | ±1.67   | ±1.62   | ±0.27*   | ±2.23*  |
| MCH (fl)                   | 17.7     | 19.5      | 35.2     | 22.23   | 20.86   | 18.2    | 20.8    | 18.6    | 19.75   | 33.8     | 35.1    |
|                            | ±0.64    | ±0.02     | ±0.32*** | ±.81    | ±1.18   | ±0.28   | ±2.82   | ±1.37   | ±1.48   | ±0.27**  | ±2.23** |
| PCV (%)                    | 40.59    | 43.28     | 50.96    | 59.33   | 57      | 51.5    | 54.5    | 52      | 55.5    | 47.99    | 46.38   |
|                            | ±0.12    | ±0.03*    | ±0.71*** | ±2.30** | ±1.41** | ±0.70** | ±4.94** | ±1.59** | ±2.12** | ±0.001** | ±0.04** |

AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, C1 : concentration de 200 mg/ml ; C2 : concentration 400 mg/ml. GR : globule rouge ; LYM : lymphocyte ; GB : globule blanc ; HB : hémoglobine ; CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; PLT : plaque ; MCV : volume globulaire moyen ; TCMH : La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine. Les données ont été analysées par anova à sens unique, les valeurs représentent la moyenne±SD ; n=3. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01

Nos résultats sont similaires à ceux de Pandey *et al.*, (2016) qui ont rapporté une réduction significative des paramètres hématologiques chez les rats injectés de la phénylhydrazine par rapport à un groupe témoin, ce résultat est lié à sa toxicité. En effet, l'administration de phénylhydrazine dans le sang provoque un stress oxydatif dans les érythrocytes, une perturbation et une fragilisation de la membrane ainsi qu'une hémolyse qui déclenche des événements tels que le vieillissement prématuré des érythrocytes, entraînant un manque d'hémoglobine et d'érythrocytes circulants (Ogbe *et al.*, 2010, Marhoume *et al.*, 2019).

La phénylhydrazine provoque l'oxydation de l'oxyhémoglobine et entraîne la formation de méthémoglobine, puis se transforme en hémichromes irréversibles, ce qui entraîne la précipitation de l'hémoglobine dans la formation du corps de Heinz. En outre, la phénylhydrazine provoque une déficience des protéines du squelette, une peroxydation des lipides, une déplétion et un épuisement de l'ATP, un déséquilibre des cations et une diminution de la déformabilité des membranes (Shwetha *et al.*, 2019). Ce qui explique la baisse du contenu en globules rouges, des HB, et PCV.

Concernant la MCHC, son taux élevé est dû à une concentration d'hémoglobine supérieure à la normale en raison de la dégradation des globules rouges.

Comme indiqué dans le tableau (17), l'anémie a été rétablie par l'administration orale quotidienne des extraits AR et MR de *Rubia tinctorum* (200, 400 mg /kg/poids corporel) et de fer pendant 15 jours. À notre connaissance, il s'agit de la première étude révélant l'activité anti-anémique de la plante *Rubia tinctorum*.

Plusieurs explications sont possibles à ce résultat. La première, est qu'elle pourrait être due à la composition des extraits en composés phytochimiques. Comme indiqué dans les tableaux (8 et 9), la plupart des composés détectés et identifiés ont été précédemment rapportés dans la littérature pour leur bioactivité antioxydante et/ou anti-inflammatoire. Ogbe *et al.*, (2010) et Asgary *et al.*, (2005) ont signalé que les métabolites secondaires, à savoir : les flavonoïdes et les alcaloïdes, réparent les dommages causés aux globules rouges par les radicaux libres ou les espèces d'oxygène hautement réactives et, les protègent du stress oxydatif. Par conséquent, les alcaloïdes et les flavonoïdes présents dans l'extrait testé dans notre étude, peuvent agir comme des antioxydants, afin de protéger les globules rouges.

**Tableau 16** : les valeurs des paramètres hématologiques après l'induction de l'anémie par phénylhydrazine

| Paramètres                 | Temoin +       | Control -                     | Fer                           | AFC1                          | AF C2                         | MFC1                         | MFC2                          | MRC1                          | MRC2                          | ARC1                          | ARC2                          |
|----------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| GR (10 <sup>6</sup> /μl)   | 8.32<br>±0.51  | 4.25<br>±0.035 <sup>***</sup> | 4.66<br>±0.04 <sup>***</sup>  | 4.39<br>±0.18 <sup>***</sup>  | 5.64<br>±0.69 <sup>***</sup>  | 3.98<br>±0.04 <sup>***</sup> | 4.65<br>±0.37 <sup>***</sup>  | 3.85<br>±0.37 <sup>***</sup>  | 4.43<br>±0.62 <sup>***</sup>  | 4.72<br>±0.21 <sup>***</sup>  | 4.63<br>±0.02 <sup>***</sup>  |
| HB (g/dl <sup>-1</sup> )   | 17.78<br>±0.26 | 11.35<br>±0.35 <sup>***</sup> | 11.1<br>±0.21 <sup>***</sup>  | 9.43<br>±1.6 <sup>***</sup>   | 9.25<br>±0.91 <sup>***</sup>  | 11.2<br>±0.42 <sup>**</sup>  | 10.86<br>±0.77 <sup>***</sup> | 9<br>±1.09 <sup>***</sup>     | 10.75<br>±1.48 <sup>***</sup> | 12.05<br>±0.15 <sup>***</sup> | 12.85<br>±0.07 <sup>***</sup> |
| HT (%)                     | 45.88<br>±0.33 | 35.98<br>±2.26 <sup>***</sup> | 38.01<br>±0.33 <sup>***</sup> | 26.13<br>±1.48 <sup>***</sup> | 32.16<br>±3.70 <sup>***</sup> | 45.8<br>±1.27                | 30.03<br>±2.46 <sup>***</sup> | 24.62<br>±2.38 <sup>***</sup> | 29.76<br>±4.62 <sup>***</sup> | 36.58<br>±0.35 <sup>***</sup> | 38.12<br>±0.02 <sup>***</sup> |
| MCHC (g.dl <sup>-1</sup> ) | 33.9<br>±0.47  | 39.85<br>±0.49 <sup>**</sup>  | 40<br>±0.21 <sup>***</sup>    | 35.9<br>±4.10 <sup>**</sup>   | 38.1<br>±1.55 <sup>***</sup>  | 35.4<br>±0.14 <sup>**</sup>  | 36.2<br>±0.36 <sup>**</sup>   | 36.6<br>±1.02 <sup>**</sup>   | 36.2<br>±0.84 <sup>**</sup>   | 52.8<br>±3.45 <sup>***</sup>  | 37.35<br>±3.04 <sup>**</sup>  |
| MCH (fl)                   | 18.81<br>±0.51 | 17.8<br>±1.41 <sup>*</sup>    | 18.6<br>±0.49 <sup>*</sup>    | 21.4<br>±2.77 <sup>**</sup>   | 21.75<br>±1.06 <sup>**</sup>  | 18.2<br>±0.28                | 23.36<br>±0.35 <sup>**</sup>  | 23.4<br>±1.43 <sup>**</sup>   | 24.25<br>±0.21 <sup>**</sup>  | 17.4<br>±0.3 <sup>*</sup>     | 18.15<br>±0.07                |
| PCV (%)                    | 41.33<br>±2.4  | 33.48<br>±5.79 <sup>***</sup> | 39.25<br>±2.16 <sup>*</sup>   | 59.66<br>±2.06 <sup>***</sup> | 57 <sup>***</sup>             | 51.5<br>±0.70 <sup>**</sup>  | 63.66<br>±1.15 <sup>***</sup> | 64<br>±1.24                   | 66<br>±1.41                   | 32.03<br>±5.86 <sup>***</sup> | 42.62<br>±3.55                |

AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, C1 : concentration de 200 mg/ml ; C2 : concentration 400 mg/ml. GR : globule rouge ; LYM : lymphocyte ; GB : globule blanc ; HB : hémoglobine ; CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; PLT : plaque ; MCV : volume globulaire moyen ; TCMH : La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine. Les données ont été analysées par anova à sens unique, les valeurs représentent la moyenne ±SD ; n=3. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01

Tableau 17: les valeurs des paramètres hématologiques après le traitement de l'anémie

| Paramètres                 | Temoin +       | Control -         | Fer               | AF C1             | AFC2              | MFC1              | MFC2              | MRC1              | MRC2             | ARC1              | ARC2              |
|----------------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| GR (10 <sup>6</sup> /μl)   | 8.66<br>±0.03  | 6.07<br>±0.30**   | 6.96<br>±1.25**   | 4.41<br>±0.95***  | 5.59<br>±0.16***  | 6.02<br>±2.44**   | 6.11<br>±0.59**   | 6.32<br>±0.78**   | 7.07<br>±0.36*   | 6.76<br>±0.35**   | 6.46<br>±0.17***  |
| HB (g/dl <sup>-1</sup> )   | 17.89<br>±0.41 | 11.95<br>±0.21*** | 13.25<br>±0.77**  | 9.7<br>±1.41***   | 9.75<br>±0.21***  | 11.05<br>±0.77*** | 11.75<br>±0.4***  | 14.6<br>±0.87**   | 16.3<br>±0.84*   | 12.66<br>±0.69*** | 12.9<br>±0.52***  |
| HT (%)                     | 46.02<br>±1.45 | 35.28<br>±0.86*** | 39.6<br>±1.27*    | 25.10<br>±5.19*** | 33.66<br>±0.14*** | 25.95<br>±6.34*** | 33.32<br>±2.47*** | 40.32<br>±0.02**  | 47.04<br>±3.69   | 32.09<br>±1.88*** | 38.13<br>±1.70*** |
| MCHC (g.dl <sup>-1</sup> ) | 33.97<br>±0.85 | 32.2<br>±0.28***  | 30.55<br>±2.89*** | 38.75<br>±2.47**  | 37.8<br>±0.84**   | 33.65<br>±3.04    | 35.86<br>±1.45**  | 36.1<br>±0.88**   | 34.7<br>±0.98    | 31.3<br>±0.92**   | 32.86<br>±0.65**  |
| MCH (fl)                   | 18.98<br>±0.10 | 19.15<br>±0.07*   | 18.35<br>±1.90**  | 22.15<br>±1.62*** | 22.7<br>±0.28***  | 19.85<br>±5.16*   | 22.76<br>±0.75*** | 23<br>±0.22***    | 23.1<br>±0***    | 18.43<br>±0.61    | 20.63<br>±2.08**  |
| PCV (%)                    | 41.56<br>±0.78 | 33.28<br>±0.86*** | 42.6<br>±1.27     | 57***             | 60.5<br>±2.12***  | 58.5<br>±10.60*** | 64.66<br>±1.52*** | 65.12<br>±3.22*** | 67.5<br>±2.12*** | 34.09<br>±2.30**  | 43.13<br>±1.70    |

AR : Extrait aqueux de la partie racine ; AF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, C1 : concentration de 200 mg/ml ; C2 : concentration 400 mg/ml. GR : globule rouge ; LYM : lymphocyte ; GB : globule blanc ; HB : hémoglobine ; CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; PLT : plaque ; MCV : volume globulaire moyen ; TCMH : La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine. Les données ont été analysées par anova à sens unique, les valeurs représentent la moyenn e±SD ; n=3. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01

Les alcaloïdes sont connus pour leur capacité à inhiber la phosphodiesterase de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), provoquant une accumulation des niveaux d'AMPC qui stimule la phosphorylation et la synthèse des protéines, avec une possible amélioration de l'érythropoïèse (Kolawole *et al.*, 2021).

Les anthocyanines ont été utilisées pour renforcer la fonction rénale, traiter l'anémie, favoriser la circulation sanguine et éliminer la stase sanguine dans la médecine traditionnelle chinoise (Sari *et al.*, 2019).

Koriem *et al.*, (2018) ont observé que l'administration orale de l'acide 5-O-caféoylquinique pendant une période de deux semaines protège contre l'anémie et les perturbations minérales dans la toxicité du 4-tert-octylphénol en augmentant le stress oxydatif et l'apoptose chez les rats.

En outre, Innih *et al.*, (2020) ont rapporté que l'extrait aqueux de feuilles de *Spondias mombin* riche en polyphénols a provoqué une stimulation du follicule lymphoïde à différents degrés, de léger à modéré, et il a augmenté le nombre de globules rouges dans la pulpe rouge.

D'autre part, le retour à la normale des indices hématologiques dans le groupe traité n'est pas nécessairement lié aux constituants phytochimiques rapportés (Ohadoma, 2016), ce qui nous fait penser aux éléments minéraux. En effet, Musyoka *et al.*, (2016) ont rapporté que le cuivre et le fer ont des effets synergiques favorisant l'hématopoïèse. De plus, Sheth *et al.*, (2021) ont souligné dans leur étude que l'activité anti-anémique de la formulation polyherbale de Raktavardhak Kadha peut être attribuée à sa teneur en fer qui peut prévenir l'anémie hémolytique induite par la phénylhydrazine. Ainsi, il n'est pas surprenant de trouver un effet anti-anémique positif dans la présente étude, car le fer est l'élément le plus abondant dans notre plante. Il est connu comme étant une partie intégrante importante de l'hémoglobine, de la myoglobine et du cytochrome (Ekweogu *et al.*, 2020). Des études ont établi que le fer hémique a une biodisponibilité élevée, qu'il est absorbé plus efficacement que le fer inorganique alimentaire et qu'il est crucial pour la génération rapide de nouveaux globules rouges. Le fer hémique contenu dans notre extrait pourrait donc être un remède nutritionnel potentiel contre l'anémie (Wood *et al.*, 2020).

Par ailleurs, l'effet antianémique de *Rubia tinctorum* pourrait être dû à la présence de vitamines, telles que l'acide ascorbique, ou dû à la présence des acides organiques. De nombreux auteurs ont démontré que les vitamines B6, B12, C, E et l'acide folique jouent un rôle important dans le mécanisme érythropoïétique, notamment en présence de fer, de cuivre et d'autres minéraux comme le cobalt (Musyoka *et al.*, 2016).

Par exemple, l'acide folique est nécessaire à l'absorption du fer par le tractus gastro-intestinal pour la synthèse de l'Hb. L'acide ascorbique pourrait réduire le stress oxydatif et jouer un rôle important dans le métabolisme du fer et son application dans la formation des globules rouges.

La vitamine A pourrait augmenter les concentrations d'Hb et de ferritine sérique chez les enfants et les femmes enceintes anémiques, et améliorer l'apport en fer aux tissus hématopoïétiques, probablement, en favorisant la mobilisation du fer délivré, et en augmentant la saturation plasmatique en fer et en transferrine.

Tandis que, la vitamine B2 améliore la réponse de l'Hb, de l'Hct et de la numération érythrocytaire à la supplémentation en fer pendant la grossesse, et restaure l'état hématologique des enfants et adultes anémiques (Ahmed *et al.*, 2018).

Par conséquent, l'administration d'une grande quantité de racines de *Rubia tinctorum* permettrait non seulement de prévenir l'effet négatif de la phénylhydrazine sur l'Hb mais aussi d'améliorer la biosynthèse de l'Hb.

Une étude réalisée par Zhang *et al.*, (2020) sur les effets des acides maliques et citriques sur les performances de croissance, la capacité antioxydante, l'hématologie et la réponse immunitaire de *Carassius auratus gibelio*, a montré que l'ajout approprié d'acide citrique et d'acide malique au régime alimentaire régulaient les paramètres hématologiques et l'expression des gènes liés à l'immunité et améliorait la capacité antioxydante des poissons *Carassius auratus gibelio*.

De même, dans une étude précédente Salovaara *et al.*, (2002), il a été suggéré que les acides organiques améliorent l'absorption du fer. En étudiant l'effet des acides tartriques, maliques, succiniques, citriques, oxaliques, et fumariques sur l'absorption du Fe (II) et du Fe (III) dans la lignée cellulaire épithéliale humaine Caco-2, ils ont montré que, les acides tartriques, maliques, succiniques et fumariques ont augmenté l'absorption du Fe (II) et Fe (III) et, que les acides citriques et oxaliques augmentent l'absorption de Fe (III) uniquement.

Sur la base de ces résultats, on peut affirmer que la présence d'acides organiques dans notre plante peut être l'un des facteurs ayant contribué à l'activité antianémique. En outre, Tang *et al.*, (2013) ont constaté que l'acide citrique et l'acide L-malique ont des effets protecteurs sur les lésions d'ischémie/reperfusion myocardiques, ce qui peut être associé à leurs effets anti-inflammatoires, antiagrégants plaquettaires et protecteurs directs sur les cardiomyocytes.

D'autre part, en comparant l'effet de la partie aérienne et de la partie racinaire, nous constatons que les extraits racinaires (MR et AR) ont le meilleur effet. L'activité anti-anémique des extraits de la plante a augmenté dans l'ordre suivant : MRC2> MRC1> ARC2> ARC1> MFC2> MFC1> AFC2 > AFC1. Cela peut être lié à la quantité élevée des flavonoïdes et du fer dans les racines.

En résumé, ces résultats ont montré des effets antianémiques remarquables, ils constituent une base scientifique justifiant l'utilisation traditionnelle des racines de *Rubia tinctorum* dans les maladies anémiques. D'autre part, dans les études futures, il sera préférable de mesurer également les niveaux de ferritine et de vitamines sériques qui sont des marqueurs importants dans le diagnostic de l'anémie.

Cette composition phytochimique donne du crédit à l'efficacité de l'utilisation traditionnelle de plantes ayant des propriétés antioxydantes et d'effet anti-anémique (N'guessan *et al.*, 2010).

### V.10 Huile essentielle

#### V.10.1 Les caractères physiques et chimiques des huiles essentielles.

L'hydrodistillation de la plante *Rubia tinctorum* a permis d'obtenir un rendement de 0,02% avec une couleur jaune.



**Figure 37:** Les huiles essentielles de *Rubia tinctorum*

**Tableau 18** : Les propriétés organoleptiques, les paramètres physico-chimiques des huiles essentielles de *Rubia tinctorum*

| Paramètres chimique         | Résultats                  |
|-----------------------------|----------------------------|
| Rendement (%)               | 0.02                       |
| Densité (g/l)               | 0.93                       |
| pH                          | 6                          |
| Indice d'acide (%)          | 5.049                      |
| Couleur                     | Jaune pâle -Aspect liquide |
| Indice de réfraction (20°C) | 1.32                       |

Il a été établi par l'étude de Navaei *et al.*, (2006) sur la plante *R. tinctorum* que la partie aérienne contient 0.1% d'huile essentielle. Notre étude n'a donné qu'un rendement de 0.02 % seulement. Le faible rendement pourrait s'expliquer par la situation géographique du site d'échantillonnage, la nature du sol, l'altitude, la latitude et la longitude des populations, le climat, le refroidissement du distillat et la régularité de sa coulée, la méthode et la durée de distillation (Fernández-Sestelo et Carrillo, 2020).

En fonction des caractéristiques physico-chimiques, la qualité d'une huile essentielle est déterminée. La littérature ne contient pas de données sur les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de la plante *Rubia tinctorum*.

La densité de l'huile est définie comme le rapport de masse entre un volume d'huile et un volume égal d'eau distillée, tous deux maintenus à 20°C. La mesure de la densité a montré une valeur approximable à celle de l'eau (0.93%). Selon la norme AFNOR, les densités des huiles essentielles acceptables sont comprises entre 0,87 et 0,98. Le site de densité relative à 20°C de l'essence de *R. tinctorum* est conforme à la norme AFNOR (2000).

L'indice d'acidité donne une idée sur la teneur en acide libre. Le résultat que nous avons obtenu montre une valeur élevée, ceci peut être expliqué par la dégradation des huiles essentielles suite à l'hydrolyse des esters lors de leur stockage, contrairement à un indice d'acidité inférieur à 2 qui indique une bonne conservation de ces huiles et une faible quantité d'acide libre. (Boukeria *et al.*, 2018).

L'indice de réfraction dépend de la composition chimique de l'échantillon et varie essentiellement avec la teneur en oxygènes et en mono terpènes, dont une forte teneur en ces derniers donne un indice élevé. Un faible indice de réfraction des huiles essentielles indique

une faible réfraction de la lumière qui pourrait favoriser leur utilisation dans des produits cosmétiques (Boukeria *et al.*, 2018). Le résultat a révélé que l'indice de réfraction (IR20) est de 1.32, c'est une valeur faible qui est révélatrice de la bonne qualité d'une HE.

En ce qui concerne la valeur du pH, il a été constaté qu'elle est égale à 6, ce qui en fait un paramètre important, puisque dans cette condition, l'inhibition de plusieurs souches bactériennes est possible (Sena *et al.*, 2010).

#### V.10.2 Analyse chromatographique par GC-MS des huiles essentielles.

L'analyse de l'huile essentielle de *R. tinctorum* par une chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) a permis d'identifier et de quantifier six composés chimiques répertoriés dans le tableau 1.

Les principaux constituants étaient la cyclohexanone (88,74 %), le diplodialide b (3,5 %) et le phytol (2,4 %) (Figure 1). Les indices de rétention des composés de l'huile essentielle ont été comparés avec la littérature et leurs cohérences. Une étude de la littérature a montré la présence de seulement deux rapports sur la composition chimique des huiles essentielles de cette plante provenant d'une région différente.

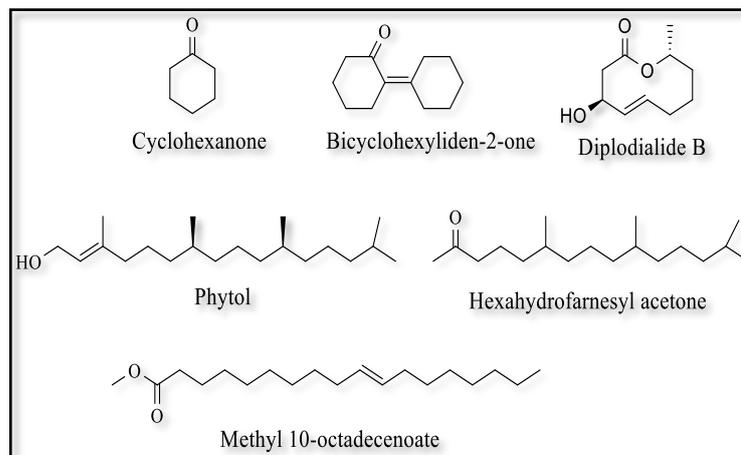
**Tableau 19** : Composition chimique de l'huile essentielle de *Rubia tinctorum*.

| No | Compounds                 | <sup>a</sup> RT | <sup>b</sup> RI | <sup>c</sup> RI | <sup>d</sup> % |
|----|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| 1  | Cyclohexanone             | 23.85           | 1285            | 1295            | 88.74          |
| 2  | Bicyclohexyliden-2-one    | 95.23           | 1551            | 1564            | 1.22           |
| 3  | Diplodialide B            | 96.45           | 1656            | 1660            | 3.49           |
| 4  | Hexahydrofarnesyl acetone | 97.25           | 1838            | 1845            | 1.19           |
| 5  | Methyl 10-octadecenoate   | 97.75           | 2085            | 2092            | 1.97           |
| 6  | Phytol                    | 105.67          | 2593            | 2601            | 2.40           |

<sup>a</sup>RT : Temps de rétention, b : Indice de rétention des références, c : Indice de rétention calculé à partir des temps de rétention relatifs à celui de la série des n-alcanes, d% : Pourcentages des composés obtenus à partir de la normalisation de la surface des pics. La colonne TG-Vax a été utilisée.

Dans les huiles essentielles obtenues par Navaei *et al.*, (2006) à partir de *R tinctorum* cultivé à Téhéran, 34 composants ont été identifiés desquels le pentadécane (20,2%) et le tridécanal (16,7%) formaient les principaux composés. Tandis que les huiles obtenues par Hoseinzadeh *et al.*, (2020) contenaient différents composés dont l'ocimène, l'acétate d'hydrate

de sabinène, l'acétate de bornyle, le thymol, le méthylisoeugénol, l'isoelemicine, l'asarone et le néophytadiène. L'asarone est considérée comme le principal composé.



**Figure 38** : Constituants chimiques de l'huile essentielle de *Rubia tinctorum*.

Comme indiqué ci-dessus, il y avait une grande variabilité entre la composition chimique des huiles essentielles obtenues dans notre étude et celles des autres études discutées, en particulier, le composant cyclohexanone, que nous l'avons trouvé en grande quantité (88,74%), alors qu'il était absent dans les études précédentes.

Selon la littérature, la cyclohexanone a été définie comme un composé organique, liquide incolore avec une odeur de menthe poivrée et d'acétone, miscible avec la plupart des solvants organiques tels que l'éthanol, l'éther diéthylique, le benzène, le chloroforme et d'autres solvants organiques courants.

En outre, on sait que la cyclohexanone est soluble dans l'eau à 24080 mg/l (Api *et al.*, 2020). Par conséquent, sa capacité à se solubiliser dans ces produits peut être l'un des facteurs qui a favorisé sa présence dans notre huile essentielle. Une autre explication possible de ces résultats pourrait être que l'augmentation de la température et de la pression entraîne des réactions secondaires, comme l'hydrogénation du phénol, dans laquelle l'hydrogène est ajouté au cycle aromatique par un mécanisme de débordement. Le phénol est ensuite partiellement hydrogéné en un intermédiaire instable, le cyclohexanol (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>OH), qui est facilement isomérisé en cyclohexanone (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O) ou hydrogéné en C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>OH (Chen et Sun, 2020).

La présence de la cyclohexanone peut également être causée par des micro-organismes endophytes. En effet, certains auteurs ont affirmé qu'il existe des endophytes ayant la capacité de générer des métabolites secondaires. Chowdhury *et al.*, (2018) ont signalé que les endophytes des plantes, qu'il s'agisse de bactéries ou de champignons, produisent une grande

variété de composés organiques volatils (COV) qui comprennent des acides, des alcools, des aldéhydes, des aromatiques, des esters, des hétérocycles, des cétones, des terpènes et des thiols. Ces métabolites secondaires sont considérés comme un facteur important pour le développement de la relation symbiotique dans un environnement hautement compétitif avec l'hôte. En outre, Devi *et al.*, (2012) ont analysé l'extrait d'acétate d'éthyle de *Penicillium* sp. isolé de *Centella asiatica*, leurs résultats ont révélé la présence d'alkaloïdes, de phénols, de flavonoïdes, de tanin et de glycosides.

D'autre part, en comparant la composition chimique de l'huile essentielle des deux études précédentes, nous pouvons noter que leurs compositions sont entièrement différentes à l'exception de la présence de sabinan et de bornéol dans chaque thème.

Prises globalement, ces variations dans la composition de l'huile essentielle pourraient être dues à de nombreux facteurs tels que le chémotype, les variations génétiques et les facteurs environnementaux (climat, saison de récolte, régions géographiques) (Guo *et al.*, 2018).

En raison du manque de littérature sur les huiles essentielles de *Rubia tinctorum*, nous nous sommes efforcés de les comparer avec d'autres espèces appartenant au genre *Rubia*. Plusieurs études ont rapporté une variété de composants chimiques et différente par rapport à notre étude.

Par exemple, les parties aériennes fraîches de *G. verum* ont été décrites comme contenant un total de vingt-huit composés, dont l'hexanal, le Z-2-hexenal, le 1-hexanol, l'eucalyptol, le linalool et le camphre, qui sont considérés comme des composants abondants (Tava *et al.*, 2020) en plus du phytol qui a été répertorié dans notre plante.

Les huiles essentielles de *Rubia cordifolia* Linn poussant en Chine ont été rapportées comme produisant de 62 composants. Les principaux composants sont la mollugine, la furomollugine, l'eugénol, le (E)-anéthole et le 4-tert-butyl-2-phényl phénol (Li *et al.*, 2019). Il est intéressant de noter la présence de l'hexahydrofarnesyl acétone qui a également été retrouvée dans notre analyse.

Par ailleurs, les huiles essentielles obtenues à partir du *C. Leavipes* ont été caractérisées par la présence de plus de 70 composés dont, le cis-3-Hexen-1-ol, l'alcool benzylique, le phénylacétaldéhyde, le bornéol, le  $\beta$ -caryophyllène, le trans-muurolo-4(15), 5-diène, l' $\alpha$ -humulène et le terpène oxygéné eudesma-4(15). 7-dien-1 $\beta$ -o, étaient les composés chimiques les plus abondants (Tava *et al.*, 2020). L'existence de l'hexahydrofarnesyl acétone y a également été notée.

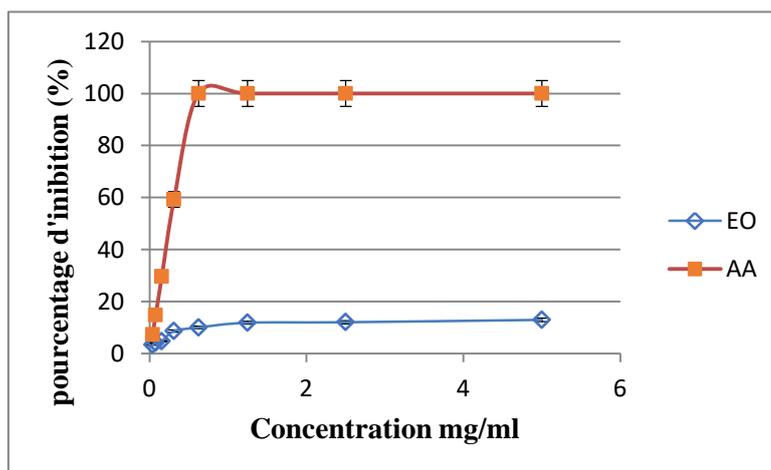
Sur la base de ces données, nous pouvons conclure que les espèces appartenant au genre *Rubia* ont certains composés similaires qui peuvent donc être considérés comme des marqueurs chimiques de ce genre. Cependant, aucune de ces études antérieures n'a signalé la présence de cyclohexanone. Par conséquent, nous pouvons dire que la cyclohexanone a été trouvée pour la première fois dans notre étude.

### V.10.2 Les activités antioxydantes

A notre connaissance, il n'existe aucun rapport sur l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Rubia tinctorum*. Dans cette étude, les méthodes DPPH, TAC, CUPRAC et FRAP ont été utilisées pour évaluer la capacité antioxydante de l'huile essentielle de *R. tinctorum*.

Le radical libre stable DPPH a été utilisé pour tester la capacité des huiles essentielles et du standard acide ascorbique à donner un atome d'hydrogène. La figure (38) montre le pourcentage d'inhibition du DPPH par les différentes concentrations de chaque HE et de l'AA. Une activité de piégeage dépendante de la concentration a été trouvée pour l'AA étudiée.

L'huile essentielle de *Rubia tinctorum* était capable de réduire le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en diphenylpicrylhydrazine jaune avec des degrés variables de capacités de piégeage. Le contrôle positif AA était l'antioxydant le plus fort avec une valeur IC<sub>50</sub> de  $0,084 \pm 0,08$  mg/ml. Tandis que, l'huile essentielle de la plante *Rubia tinctorum* a montré un effet faible avec l'IC<sub>50</sub> qu'est de  $25,70 \pm 0,02$  mg/ml, (tableau 20).

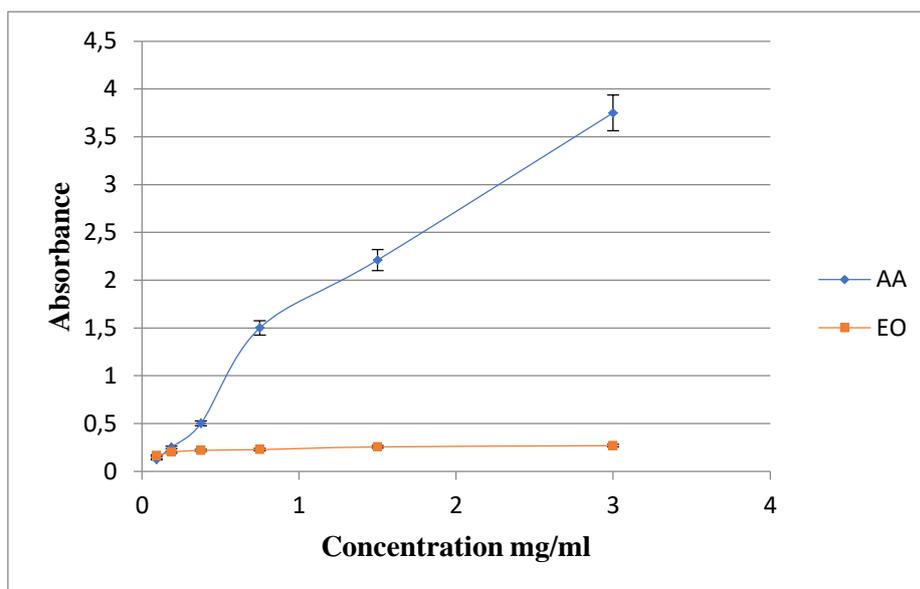


EO : huile essentielle ; AA acide ascorbique ; les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SD ; n=3.

**Figure 39** : Activité antioxydante de l'huile essentielle de *Rubia tinctorum* en utilisant le test du DPPH.

Les tests CUPRAC et FRAP ont été choisis dans ce travail pour l'évaluation du potentiel réducteur de l'huile de *Rubia tinctorum*. L'acide ascorbique a été utilisé comme un agent antioxydant standard.

La figure (39) montre la capacité de réduction ferrique obtenue en utilisant le test FRAP. Une capacité de réduction ferrique dépendante de la concentration a été trouvée pour l'HE étudié.



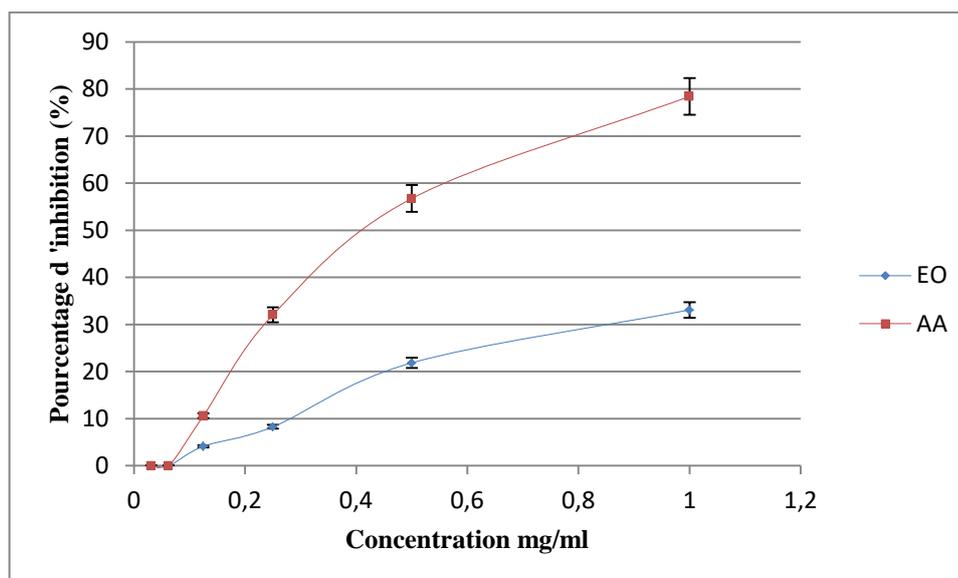
EO : huile essentielle ; AA acide ascorbique ; les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SD ; n=3.

**Figure 40** : Activité antioxydante de l'huile essentielle de *Rubia tinctorum* en utilisant le test du FRAP.

Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *R. tinctorum* a un faible pouvoir réducteur avec une absorbance de 0,270 à 3 mg/ml. En revanche, le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique est plus important avec une absorbance de 3,7 à 3 mg/ml.

Dans l'essai CUPRAC, une faible activité (TEAC= 201.9 mg/100ml) a été observée par rapport aux valeurs des standards de référence (TEAC= 522.6 mg/100ml), (tableau 20).

La méthode du phosphomolybdène est basée sur la réduction de Mo (VI) en Mo(V) par l'échantillon et la formation ultérieure d'un complexe phosphate vert /Mo(V) en milieu acide (Chekroun-Bechlaghem *et al.*, 2019). Les données rapportent une augmentation du pourcentage d'inhibition qui correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des huiles et du contrôle testé (Figure 40).



EO : Huile essentielle ; AA : Acide ascorbique ; EO : Huile essentielle ; les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SD ; n=3.

**Figure 41 :** Activité antioxydante de l'huile essentielle de *Rubia tinctorum* en utilisant le test Phosphomolybde.

**Tableau 20 :** IC 50 de DPPH et activité antioxydant totale de l'huile et acide ascorbique et capacité antioxydant réductrice du cupric.

|                   | IC <sub>50</sub> (DPPH)<br>(mg/ml) | IC <sub>50</sub> (TAC)<br>(mg/ml) | CUPRAC<br>(mg TEAC)/100 ml |
|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| Huile essentielle | 25.70 $\pm$ 0.02                   | 1.41 $\pm$ 0.05                   | 201.9 $\pm$ 0.06           |
| Acide ascorbique  | 0.084 $\pm$ 0.08                   | 0.57 $\pm$ 0,001                  | /                          |
| Quercetine        | /                                  | /                                 | 522.6 $\pm$ 0.04           |

IC50 : Concentration inhibitrice à 50% ; Capacité antioxydant réductrice du cupric est exprimée en mg de Trolox/100 ml d'échantillon ; les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SD ; n=3.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, l'huile essentielle possède une faible activité antioxydante. Ces résultats peuvent être expliqués par l'abondance de composés inefficaces. Ils peuvent également être expliqués par la dégradation des composés bioactifs lors de leur extraction par hydrodistillation. En effet, l'hydrodistillation peut entraîner la dégradation thermique, l'hydrolyse et la solubilisation des composés bioactifs dans l'eau, modifiant ainsi leur capacité antioxydante (Harkat-Madouri *et al.*, 2015). L'effet antagoniste entre les composants contribue également à ce résultats (Benites *et al.*, 2021).

Malgré que l'effet antioxydant de l'huile essentielle est faible, mais il existe. Cette existence peut probablement être attribuée à la présence de phytol. (P Costa *et al.*, 2016) mentionnent dans leur étude que le phytol est perçu comme un bon antioxydant. Ge *et al.*, (2019) ont défini le phytol comme un alcool terpénique acyclique qui a une capacité

antioxydante supérieure au trolox. Il peut éliminer les OH<sup>-</sup> et présenter une activité antioxydante capable d'inhiber les dommages cellulaires causés par ce radical.

De plus, le pouvoir antioxydant peut être attribué à la présence de sesquiterpènes (Hexahydrofarnesyl acetone). Ruberto and Baratta, (2000) a mentionné que les phénylpropanoïdes, les monoterpènes et les sesquiterpènes oxygénés sont capables d'inhiber l'oxydation. Plusieurs études ont attribué l'effet antioxydant à l'ester méthylique de l'acide hexadécanoïque, au 1-octadécène et à l'ester méthylique de l'acide 10-octadécénoïque (Abd-ElGawad *et al.*, 2020).

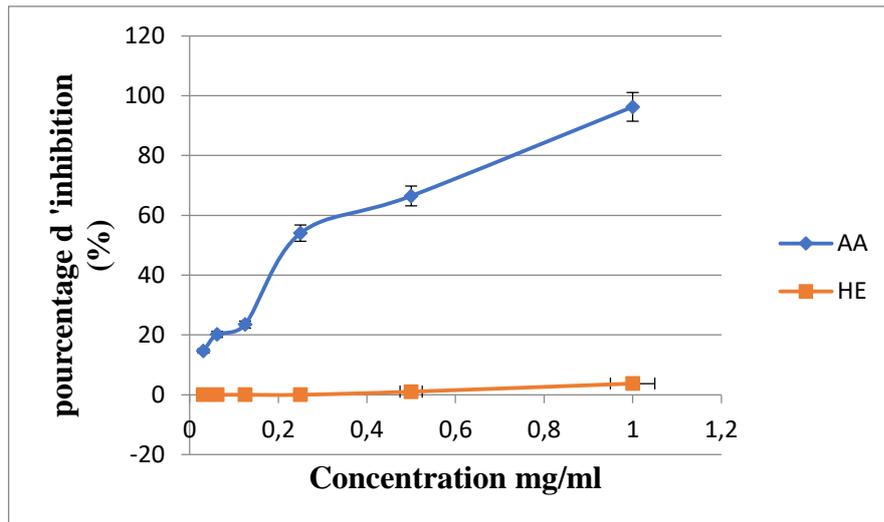
En général, l'efficacité antioxydante de l'huile essentielle dépend du nombre des composés phénoliques et de l'activité de réaction entre le phénol et les radicaux peroxydes porteurs de la chaîne. Elle dépend également de la stabilité du radical phénoxyde formé lors de la réaction (Ćavar *et al.*, 2012).

Le principal composé de l'huile essentielle de la plante *Rubia tinctorum* est la cyclohexanone (88,74 %). Généralement, un composé avec une telle quantité n'est pas trouvé dans les huiles essentielles. *Rubia tinctorum* devrait être considéré comme une source de cyclohexanone. Une technique chromatographique simple peut être appliquée pour isoler la cyclohexanone avec un rendement élevé.

La cyclohexanone ne contient pas des protons acides donnés au radical facilement. En outre, le mécanisme antioxydant est basé sur la capacité à donner des électrons au radical. Par conséquent, il n'est pas surprenant que le *Rubia tinctorum* ne montre pas une activité antioxydante.

### V.10.3 Activité anti-hémolytique des huiles essentielles

L'effet de l'huile essentielle sur les lésions de la membrane des GR peut être évalué en faisant une comparaison entre, le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges traités avec de l'huile essentielle et celui des globules rouges traités par le standard, dans des milieux isotoniques (0.9 %). La figure 41 montre l'évolution du taux d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges en présence de l'HE et l'acide d'ascorbique.



EO : Huile essentielle ; AA acide ascorbique ; les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SD ; n=3.

**Figure 42 :** Activité anti hémolytique de l'huile essentielle de *Rubia tinctorum*

L'acide ascorbique a montré l'effet antihémolytique le plus élevé de manière dose-dépendante (Figure 41) avec une valeur de concentration inhibitrice de l'hémolyse de 50% à  $0,37 \pm 0,87$  mg.ml<sup>-1</sup> ; (p<0.05). Cependant, les huiles essentielles ont montré un effet antihémolytique plus faible avec une valeur de 12,88mg. ml<sup>-1</sup> à 50%.

Selon la littérature, aucune étude anti-hémolytique n'a été réalisée sur les composants présents dans notre huile. Cependant, il a été mentionné que l'hexahydrofarnesyl acétone et le Methyl 10-octadecenoate ont un pouvoir antioxydant, ces derniers peuvent jouer un rôle dans l'effet anti-hémolytique de l'huile essentielle. Étant donné que leur présence est en faible quantité, leur l'effet est relatif.

#### V.10.4 Activité antibactérienne des huiles essentielles

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rubia tinctorum* est présentée dans le tableau (21).

**Tableau 21:** Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rubia tinctorum* par la méthode de diffusion en gélose.

| Micro organismes                            | Inhibition zones (mm)                 |                       |                       |                      |      |                     |                     |
|---|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|------|---------------------|---------------------|
|   | Concentration (mg. ml <sup>-1</sup> ) | 500                   | 250                   | 125                  | 62.5 | NA                  | VA                  |
| <i>Bacillus cereus</i><br>ATCC 6633         |                                       | 13.5±0.9 <sup>a</sup> | 11.0±0.2 <sup>a</sup> | 9.0±0.2 <sup>a</sup> | ND   | 29±1.2 <sup>d</sup> | 21±0.9 <sup>b</sup> |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923  |                                       | 12.0±0.7 <sup>b</sup> | 9.0±0.4 <sup>d</sup>  | 8.0±0.6 <sup>b</sup> | ND   | 30±0.9 <sup>c</sup> | 25±0.4 <sup>a</sup> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 |                                       | 11.0±0.4 <sup>c</sup> | 9.5±0.7 <sup>c</sup>  | 9.0±0.1 <sup>a</sup> | ND   | 35±1.4 <sup>a</sup> | 12±0.2 <sup>e</sup> |
| <i>Salmonella enteritidis</i><br>ATCC 13076 |                                       | 11.0±0.3 <sup>c</sup> | 9.0±0.9 <sup>d</sup>  | ND                   | ND   | 32±1.6 <sup>b</sup> | 15±0.6 <sup>d</sup> |
| <i>Shigella</i> ATCC 12022                  |                                       | 12.5±0.5 <sup>b</sup> | 10.5±0.3 <sup>b</sup> | 9.0±0.2 <sup>a</sup> | ND   | 30±1.3 <sup>c</sup> | 19±0.8 <sup>c</sup> |

ND : Non détecté, NA : acide nalidixique, VA : Acide voncomique. Les valeurs ont été analysées par le test non apparié de Tukey ; chaque valeur est exprimée en tant que moyenne ± SD (n = 3). Les valeurs dans la même colonne avec des exposants différents sont très significativement (P < 0,05) différentes.

Cette activité a été évaluée par la méthode de diffusion des disques contre des bactéries Gram-négatives et des bactéries Gram-positives. Les résultats ont prouvé que les huiles essentielles ont montré une activité antibactérienne avec des degrés variables, et des activités modérées par rapport à certains antibiotiques (tableau 33).

**Tableau 22 :** Détermination de CMI et CMB d'huile essentielle de *R. tinctorum*

| Microorganismes                             | CMI (mg /ml) | CMB (mg/ml) | CMB/CMI |
|---|--------------|-------------|---------|
| <i>Bacillus cereus</i><br>ATCC 6633         | 125          | 500         | 4       |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923  | 125          | 250         | 2       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | 125          | 500         | 4       |
| <i>Salmonella enteritidis</i><br>ATCC 13076 | 500          | >500        | 1       |
| <i>Shigella</i><br>ATCC 12022               | 125          | 250         | 2       |

CMI : concentration minimale inhibitrice ; CMB : concentration minimale bactéricide.

Les données ont montré que la zone d'inhibition variait de 11 à 13,50 mm. *B. subtilis*, était la souche la plus sensible aux huiles testées. L'HE affecte également les bactéries Gram-négatives mais avec moins d'intensité.

Ainsi, d'après nos résultats, les huiles essentielles de *R. tinctorum* possèdent une activité antibactérienne contre toutes les souches de bactéries. Cela est peut-être lié à ses composés, comme le phytol, les monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés (*Chrysargyris et*

al., 2017). Cette hypothèse est soutenue par les recherches qui indiquent que le phytol a un effet antibactérien contre *Staphylococcus aureus* (Inoue *et al.*, 2005). De plus, l'hexahydrofarnesylacétone (sesquiterpène oxygéné) a été signalé comme ayant un effet antibactérien contre de nombreuses souches bactériennes (He *et al.*, 2020).

Le potentiel inhibiteur des huiles essentielles a été confirmé par les tests de détermination de la CMI. Le tableau (22) montre les résultats des CMI et CMB des huiles essentielles de *R. tinctorum* contre les souches bactériennes. Les valeurs de CMI pour toutes les souches étaient de 125 mg/ml à l'exception de *Salmonella* qui avait une CMI de 500 mg/ml.

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Selon Marmonier, (1990) : si le rapport CMB/CMI  $\leq 4$ , la substance testée est bactéricide. - si le rapport CMB/CMI  $> 4$ , la substance testée est bactériostatique.

Les rapports CMB/CMI de l'huile de *R. tinctorum* sur *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* et *shigella* sont respectivement égaux à 4,2, 4, 1, et 2. Notre huile semble donc exercer une action bactéricide contre toutes les souches testées.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R. tinctorum* est probablement liée aux différents composants qui jouent un rôle dans la pénétration cellulaire, l'attraction et la fixation lipophile ou hydrophile sur les parois et les membranes cellulaires, la perturbation des systèmes enzymatiques, la compromission du matériel génétique, l'oxygénation des acides gras insaturés, la formation d'hydroperoxyde d'acide gras et la détérioration des protéines et des lipides (Alves-Silva *et al.*, 2013).

Plus précisément, l'effet antimicrobien est lié au groupe hydroxyle qui est considéré comme un agent important dans cette action. Il peut dilater et déstabiliser la membrane bactérienne. De plus, l'interaction entre les différents composants de l'huile essentielle (majeurs et mineurs) pourrait également contribuer aux propriétés antimicrobiennes (Naidoo *et al.*, 2014).

# Conclusion

**Conclusion**

Cette thèse visait à déterminer l'effet de la polarité du solvant et de la partie de la plante *Rubia tinctorum* sur la qualité des composants phytochimiques ainsi que son effet biologique qui correspond aux activités antimicrobiennes, antioxydantes, anti hémolytiques, toxiques et anti anémiques. De plus, d'étudier la composition chimique et les activités biologiques (in vitro) des huiles essentielles de la partie aérienne de cette plante.

Six extraits de différentes polarités ont été préparés par la méthode de macération en utilisant l'eau, le hydrométhanol (80%) et l'éthyle éther comme solvants. Les extraits aqueux et hydro-alcooliques ont montré les meilleurs rendements comparés aux extraits di éthyle éther. Le rendement d'extraction obtenu à partir des racines est toujours plus élevé pour les trois solvants.

Cette étude constitue une première analyse comparative qualitative et quantitative des composés phénoliques de la partie aérienne et de la partie racinaire de la plante *Rubia tinctorum*. De plus, elle rapporte pour la première fois le contenu en composés phytochimiques de la partie aérienne.

L'influence des différents solvants sur la qualité phytochimique des extraits a été évaluée par des tests chimiques. Les résultats ont révélé une richesse de notre plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des alcaloïdes, les flavonoïdes, les phénols et les tanins dans les six extraits étudiés. Tandis que, les coumarines, les glucosides, les protéines et les anthraquinones combinés n'ont été détectées que dans les extraits AF, MR et EER, respectivement. Les anthraquinones et les quinones libres n'ont été détectées que dans les extraits AR, MR et EER. Cependant, les cardiaques glucosides ne sont détectés que dans les extraits AF, EEF, MR et MF.

La teneur en composés phénoliques de nos extraits a été quantifiée par des méthodes spectrophotométriques et déterminée par LC-ESI-MS/MS. Par ailleurs, la composition chimique des huiles essentielles a été établie par GC-MS. L'estimation quantitative des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins dans les six extraits montre la richesse de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne en tannins, alors que l'extrait hydrométhanolique de la partie racine présente des valeurs plus élevées en flavonoïde et en teneur phénolique.

L'analyse quantitative par chromatographie a révélé des profils phénoliques similaires pour la partie aérienne et la partie racinaire. Les résultats ont montré la présence prédominante de l'acide trans-cinnamique, de l'acide protocatechuique, de l'acide trans-ferulique, du 4-hydroxybenzaldéhyde, de l'acide *p*-coumarique, de l'acide cafféique, de l'acide vanillique, de

l'epicatéchine, de la catéchine, de l'acide 4-hydroxybenzoïque, de l'acide chlorogénique, de l'acide fumarique, et de l'acide citrique. Cependant, les huiles essentielles sont marquées par la prédominance de cyclohexanone.

Nous avons testé l'activité antibactérienne de tous les extraits et de l'huile essentielle sur six souches ATCC (pour *Escherichia coli* ATCC 11230, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella* ATCC 12022). Les résultats ont montré que l'extrait d'éthyle éther de la partie racine (EER) et l'huile essentielle sont les seuls qui ont manifesté une action contre toutes les souches testées.

L'étude du pouvoir antioxydant de la plante *Rubia tinctorum* révèle que l'extrait MF a la plus grande activité de piégeage et de réduction du fer. En outre, l'extrait MR présente le potentiel le plus élevé pour le TAC, tandis que l'extrait AF démontre la meilleure capacité de réduction des ions cuivre. Cependant, les huiles essentielles présentent une faible activité antioxydante pour toutes les activités. Le pouvoir antioxydant est varié en fonction de l'extrait et le type de l'activité étudiée.

L'évaluation du pouvoir anti hémolytique des globules rouges des extraits et de l'huile essentielle de *R. tinctorum* contre le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a révélé que l'extrait MR présente le meilleur effet, tandis que l'extrait EER et l'huile essentielle ont enregistré les plus faibles effets inhibiteurs.

L'étude de la toxicité a révélé que les extraits aqueux et les hydrométhanoliques de *R. tinctorum* n'ont pas causé de mortalité ou d'autres signes de toxicité. Elle a suggéré que les extraits de la plante sont inoffensifs jusqu'à la dose de 2000mg/kg de poids corporel lorsqu'ils sont consommés par voie orale. Selon OCDE, ils sont considérés comme non toxiques. En revanche, les extraits apolaires ont provoqué un effet néfaste sur les paramètres hématologiques et biochimiques, en particulier l'extrait EER.

D'autre part, les extraits aqueux et les hydrométhanoliques de *Rubia tinctorum* ont montré une importante activité antianémique in vivo. L'extrait aqueux des racines a montré l'effet le plus élevé suivi par l'extrait MR. En outre, on peut suggérer que la racine de *Rubia tinctorum* a un effet anti-anémique, en inhibant l'hémolyse des globules rouges.

En général, le présent travail valide scientifiquement l'utilisation traditionnelle de cette plante et ouvre des perspectives et des axes de recherche tant au niveau des connaissances scientifiques, d'autres études pourraient alors être envisagées :

- 1- Analyser profondément les extraits de la plante *Rubia tinctorum* pour isoler les principes antibactériens et antioxydants qu'ils contiennent.
- 2- Rechercher l'efficacité des différents constituants de la partie aérienne de la plante *Rubia tinctorum* (fleurs, tige, et feuilles) séparément.
- 3- Déterminer l'activité des extraits de la plante *Rubia tinctorum* sur d'autres types d'anémie, tels que l'anémie causée par une carence en vitamines.
- 4- Explorer cliniquement le potentiel des extraits de la plante *Rubia tinctorum* dans le traitement de l'anémie.
- 5- Vérifier la sécurité de la présente plante quand elle administrée en association avec le fer pour traiter l'anémie.
- 6- Rechercher le (les) composés responsable(s) de l'activité antianémique de l'extrait aqueux de la partie racine de la présente plante.

Références

Bibliographiques

REFERENCES

A

ABD-ELGAWAD A., EL GENDY A. E. N., EL-AMIER Y., GAARA A., OMER E., AL-ROWAILY, S., ... & ELSHAMY A. Essential oil of *Bassia muricata*: Chemical characterization, antioxidant activity, and allelopathic effect on the weed *Chenopodium murale*. *Saudi journal of biological sciences*.2020 ; 27(7), 1900-1906.

ABODUNRIN T, UHUEGBU C, OLUGBUYIRO J. Phytochemical analysis of leaf-extracts from eight tropical trees: Prospects for environmentally-friendly dye compounds for smart windows. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 2015;6(3):682-698.

ABOUD AS. HPLC analysis of *Rubia tinctorum* and its effect of methanol and aqueous extract on bacteria isolated from burns infection. *Al-Nahrain Journal of Science*. 2010;13(4):166-175.

ADAMS M BERSET C, KESSLER M, HAMBURGER M. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders—a survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;121(3):343-359.

ADENEYE AA, CROOKS PA. Weight losing, antihyperlipidemic and cardioprotective effects of the alkaloid fraction of *Hunteria umbellata* seed extract on normal and triton-induced hyperlipidemic rats. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2015;5(5):387-394.

ADOU LMD, KONE MW, IPOU JI, N'GUESSAN EK. Ethnobotanique et analyse phytochimique qualitative de *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn (Dennstaedtiaceae), une Ptéridophyte utilisée comme plante médicinale en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2016;10(4):1783-1792.

AFNOR, 2000 : Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles 663 P

AFSAR T, RAZAK S, KHAN MR, MAWASH S, ALMAJWAL A, SHABIR M, *et al.* Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydaspica* R. Parker aerial parts. *BMC complementary and alternative medicine*. 2016;16(1):258.

AGARWAL K, VARMA R. Ethnobotanical study of antilithic plants of Bhopal district. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;174:17-24.

- AGNHAGE T, ZHOU Y, GUAN J, CHEN G, PERWUELZ A, BEHARY N, *et al.* Bioactive and multifunctional textile using plant-based madder dye: Characterization of UV protection ability and antibacterial activity. *Fibers and Polymers*. 2017;18(11):2170-2175.
- AHMED F, KHAN MR, SHAHEEN N, AHMED KMU, HASAN A, CHOWDHURY IA, *et al.* Anemia and iron deficiency in rural Bangladeshi pregnant women living in areas of high and low iron in groundwater. *Nutrition*. 2018;51:46-52.
- AHMED H. A phyto pharmacological review on a medicinal plant: *Holarrhena floribunda*. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2017;5(6):26-29.
- AKULA R, RAVISHANKAR GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*. 2011;6(11):1720-1731.
- AL-RUBAYE AF, HAMEED IH, KADHIM MJ. A review: uses of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique for analysis of bioactive natural compounds of some plants. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 2017;9(1):81-85.
- ALAM MN, BRISTI NJ, RAFIQUZZAMAN M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*. 2013;21(2):143-152.
- ALVES-SILVA JM, DOS SANTOS SMD, PINTADO ME, PÉREZ-ÁLVAREZ JA, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, VIUDA-MARTOS M. Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*. 2013;32(2):371-378.
- AMAROWICZ R, CARLE R, DONGOWSKI G, DURAZZO A, GALENSA R, KAMMERER D, *et al.* Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(S2):S151-S183.
- AMEZOUAR F, BADRI W, HSAINE M, BOURHIM N, FOUGRACH H. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Erica arborea* L. *Pathologie-biologie*. 2013;61(6):254-258.
- AMIRTEYMOURI E, KHEZRI A, TAHMASBI R, DAYANI O, MOHAMMADABADI M. Comparison of the nutritive value of Madder, *Rubia tinctorum* L. and Alfalfa, *Medicago sativa*. using in vitro and in situ measurements. *Journal of Livestock Science and Technologies*. 2015;3(2):27-32.
- ANDRÈS E, SERRAJ K, FEDERICI L, VOGEL T, CIOBANU E. Les anémies d'origine digestive du sujet âgé. *Médecine thérapeutique*. 2008;14(2):90-95.
- ANDRIANNE P. La gemmothérapie: passé, présent et avenir. *Phytothérapie*. 2008;6(1):29-32.

ANGELINI LG, PISTELLI L, BELLONI P, BERTOLI A, PANCONESI S. Rubia tinctorum a source of natural dyes: agronomic evaluation, quantitative analysis of alizarin and industrial assays. *Industrial crops and products*. 1997;6(3-4):303-311.

AOUACHRIA S, BOUMERFEG S, BENSLAMA A, BENBACHA F, GUEMMEZ T, KHENNOUF S, *et al.* Acute, sub-acute toxicity and antioxidant activities (in vitro and in vivo) of Reichardia picroide crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2017;208:105-116.

APAK R, GÜCLÜ K, ÖZYÜREK M, CELIK SE. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*. 2008;160(4):413-419.

API A, BELMONTE F, BELSITO D, BISERTA S, BOTELHO D, BRUZE M, *et al.* RIFM fragrance ingredient safety assessment, cyclohexanone, CAS Registry Number 108-94-1. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2020;138:111231.

ATSAFACK SS, KUIATE J-R, MOUOKEU RS, MOGTOMO MLK, TCHINDA AT, DE DIEU TJ, *et al.* Toxicological studies of stem bark extract from Schefflera barteri Harms (Araliaceae). *BMC complementary and alternative medicine*. 2015;15(1):1-9.

AUGUSTIN JM, KUZINA V, ANDERSEN SB, BAK S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*. 2011;72(6):435-457.

AYE MM, AUNG HT, SEIN MM, ARMIJOS C. A review on the phytochemistry, medicinal properties and pharmacological activities of 15 selected Myanmar medicinal plants. *Molecules*. 2019;24(2):293.

AZAB A., NASSAR A., & AZAB AN. Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules*. 2016; 21(10), 1321.

## B

BAKARI S, DAOUD A, FELHI S, SMAOUI S, GHARSALLAH N, KADRI A. Proximate analysis, mineral composition, phytochemical contents, antioxidant and antimicrobial activities and GC-MS investigation of various solvent extracts of cactus cladode. *Food Science and Technology*. 2017;37:286-293.

BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(2):446-475.

BALDERRAMA-CARMONA AP, SILVA-BELTRÁN NP, GÁLVEZ-RUIZ J-C, RUÍZ-CRUZ S, CHAIDEZ-QUIROZ C, MORÁN-PALACIO EF. Antiviral, antioxidant, and antihemolytic effect of annona muricata L. Leaves extracts. *Plants*. 2020;9(12):1650.

- BÁNYAI P, KUZOVKINA I, KURSINSZKI L, SZŐKE É. HPLC analysis of alizarin and purpurin produced by *Rubia tinctorum* L. hairy root cultures. *Chromatographia*. 2006;63(13):S111-S114.
- BARCHAN A, BAKKALI M, ARAKRAK A, PAGÁN R, LAGLAOUI A. The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014;3(11):399-412.
- BEGUM HA, HAMAYUN M, SHAD N, TABASSUMYASEEN FA. 3. Nutritional analysis of some selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Pure and Applied Biology (PAB)*. 2018;7(3):955-964.
- BELON J-P, FAURE S, PILLON F. Pathologies et thérapeutiques commentées: Enseignements spécifiques, intégrés et formation d'application. Elsevier Health Sciences; 2013.
- BENBOTT A, BAHRI L, BOUBENDIR A, YAHIA A. Study of the chemical components of *Peganum harmala* and evaluation of acute toxicity of alkaloids extracted in the Wistar albino mice. *Journal of Material and Environmental Science*. 2013;4:558-565.
- BENITES J., RIOS D., GUERRERO-CASTILLA A., ENRIQUEZ C., ZAVALA E., YBAÑEZ-JULCA R. O., ... & CALDERON P. B. Chemical Composition and Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Essential oil from *Clinopodium sericeum*, a Peruvian Medicinal Plant. *Records of Natural Products*. 2021. 15(3).
- BERREBI W. Diagnostics et thérapeutique de poche: Guide pratique du symptôme à la prescription. Armando Editore; 2009.
- BESBAS S MOUFFOUK S, HABA H MARCOURT L, WOLFENDER J-L, BENKHALED M. Chemical composition, antioxidant, antihemolytic and anti-inflammatory activities of *Ononis mitissima* L. *Phytochemistry Letters*. 2020;37:63-69.
- BESSAH R, BENYOUSSEF E-H. La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Journal of Renewable Energies*. 2015;18(3):513–528-513–528.
- BHALODIA NR, SHUKLA V. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* l. An ethnomedicinal plant. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2011;2(2):104.
- BHUVANESWARI S. Quantitative Analysis of Iron and Ascorbic acid contents in locally consumed Fruits and Vegetables. *Int. Res. J. Biological Sci*. 2015;4(7):42-47.
- BLETRY O, & MARROUN I. Hipotensión ortostática: mecanismos, etiología y principios de tratamiento. *EMC-Tratado de Medicina*, 18(2), 1-8. (2014).

- BOUAYED J, RAMMAL H, DICKO A, YOUNOS C, SOULIMANI R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the neurological sciences*. 2007;262(1-2):77-84.
- BOUAZIZ M FKI I, JEMAI H AYADI M, SAYADI S. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*. 2008;108(1):253-262.
- BOULEKBACHE-MAKHLOUF L, SLIMANI S, MADANI K. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial crops and products*. 2013;41:85-89.
- BOUKHOBZA F ET GOETZ P. *Phytothérapie en odontologie*. 2014. CDP: France.
- BOUKERIA S., KADI K., KALLEB R., BENBOTT A., BENDJEDOU, D., & YAHIA, A. Phytochemical and physicochemical characterization of *Allium sativum* L. and *Allium cepa* L. Essential oils. *J. Mater. Environ.2016. Sci*, 7(7), 2362-2368.
- BRIBI, N. Pharmacological activity of alkaloids: a review. *Asian Journal of Botany*.2018. 1(1),6.
- BREMNER J. M., & BREITENBECK G. A simple method for determination of ammonium in semimicro-Kjeldahl analysis of soils and plant materials using a block digester. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, (1983). 14(10), 905-913
- BROADWAY-DUREN JB, KLAASSEN H. Anemias. *Critical Care Nursing Clinics*. 2013;25(4):411-426.

## C

- CARTRON G. *Anémie en cancérologie*. John Libbey Eurotext; 2012.
- CASTAÑEDA-OVANDO A, DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ M, PÁEZ-HERNÁNDEZ ME, RODRÍGUEZ JA, GALÁN-VIDAL CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009;113(4):859-871.
- CASTRO-LÓPEZ C, VENTURA-SOBREVILLA JM, GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ MD, ROJAS R, ASCACIO-VALDÉS JA, AGUILAR CN, *et al*. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chemistry*. 2017;237:1139-1148.
- ĆAVAR S, MAKSIMOVIĆ M, VIDIC D, PARIĆ A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial crops and products*. 2012;37(1):479-485.

- ÇELIK SE, ÖZYÜREK M, GÜÇLÜ K, APAK R. Determination of antioxidants by a novel on-line HPLC-cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay with post-column detection. *Analytica Chimica Acta*. 2010;674(1):79-88.
- CELIS C, GARCÍA A, SEQUEDA G, MENDEZ G, TORRENEGRA R. Antimicrobial activity of extracts obtained from anacardium excelsum against some pathogenic microorganisms. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2011:249-257.
- CEMELI E, BAUMGARTNER A, ANDERSON D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2009;681(1):51-67.
- CEZAROTTO VS, GIACOMELLI SR, VENDRUSCOLO MH, VESTENA AS, CEZAROTTO CS, DA CRUZ RC, *et al*. Influence of harvest season and cultivar on the variation of phenolic compounds composition and antioxidant properties in *Vaccinium ashei* leaves. *Molecules*. 2017;22(10):1603.
- CHABRIER J-Y. *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie* UHP-Université Henri Poincaré; 2010.
- CHAKRABORTY D, SHAH B. Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of Piper betel leaf extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011;3(3):192-199.
- CHAPARRO CM, SUCHDEV PS. Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low-and middle-income countries. *Annals of the new York Academy of Sciences*. 2019;1450(1):15.
- CHAUDHURI S, BANERJEE A, BASU K, SENGUPTA B, SENGUPTA PK. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International journal of biological macromolecules*. 2007;41(1):42-48.
- CHAVAN B, GADEKAR A, MEHTA P, VAHWAL P, KOLSURE A, CHABUKSWAR A. Open Access Literati. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2016:02.
- CHEKROUN-BECHLAGHEM N, BELYAGOUBI-BENHAMMOU N, BELYAGOUBI L, GISMONDI A, NANNI V, DI MARCO G, *et al*. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Tamarix africana*, *Arthrocnemum macrostachyum* and *Suaeda fruticosa*, three halophyte species from Algeria. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 2019;153(6):843-852.
- CHEN D, DANIEL KG, KUHN DJ, KAZI A, BHUIYAN M, LI L, *et al*. Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Front Biosci*. 2004;9(2618).
- CHEN H, SUN J. Selective hydrogenation of phenol for cyclohexanone: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2020.

- CHOWDHURY FT, ISLAM MR, ISLAM MR, KHAN H. Diversity of Plant Endophytic Volatile Organic Compound (VOC) and Their Potential Applications. In: 2018.
- CHRYSARGYRIS A, XYLIA P, BOTSARIS G, TZORTZAKIS N. Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L.) affected by the potassium levels. *Industrial crops and products*. 2017;103:202-212.
- COLIN J, VIGNON G, MOTTAZ P, LABROUSSE J, CARRERE F, AUGEREAU P, *et al.* Démarche diagnostique devant une anémie «non hémolytique» sans étiologie apparente. *La Revue de Médecine Interne*. 2018;39(11):855-862.
- COSTA-SILVA J, LIMA C, SILVA E, ARAÚJO A, FRAGA M, E RIBEIRO AR, *et al.* Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*) seed oil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;116(3):495-500.
- COWAN MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(4):564-582.
- CRISTOFOLI NL, LIMA CAR, VIEIRA MMC, ANDRADE KS, FERREIRA SR. Antioxidant and antimicrobial potential of cajazeira leaves (*Spondias mombin*) extracts. *Separation Science and Technology*. 2019;54(4):580-590.
- CUOCO G, MATHE C, ARCHIER P, CHEMAT F, VIEILLES CAZES C. A multivariate study of the performance of an ultrasound-assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatography-photodiode array detection. *Ultrasonics sonochemistry*. 2009;16(1):75-82.

### D

- DHALIWAL G, CORNETT P. A, & TIERNEY JR L. M. Hemolytic anemia. *American family physician*. 2004. 69(11), 2599-2606.
- DATTA S, SINHA B, BHATTACHARJEE S, SEAL T. Nutritional composition, mineral content, antioxidant activity and quantitative estimation of water soluble vitamins and phenolics by RP-HPLC in some lesser used wild edible plants. *Heliyon*. 2019;5(3):e01431.
- DE MENEZES EPIFANIO NM, CAVALCANTI LRI, DOS SANTOS KF, DUARTE PSC, KACHLICKI P, OŻAROWSKI M, *et al.* Chemical characterization and in vivo antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) aqueous extract. *Food & function*. 2020;11(6):5346-5356.
- DE SMET PA. Herbal remedies. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(25):2046-2056.
- DEAN L. Blood groups and red cell antigens. NCBI Bethesda; 2005.

DEGANO I, RIBECHINI E, MODUGNO F, COLOMBINI MP. Analytical methods for the characterization of organic dyes in artworks and in historical textiles. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2009;44(5):363-410.

DEGRAFT-JOHNSON J, KOLODZIEJCZYK K, KROL M, NOWAK P, KROL B, NOWAK D. Ferric-reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2007;100(5):345-352.

DERKSEN GC, NIEDERLÄNDER HA, VAN BEEK TA. Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection. *Journal of chromatography A*. 2002;978(1-2):119-127.

DESAI A, SINGH R. The effects of water temperature and ration size on growth and body composition of fry of common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Thermal Biology*. 2009;34(6):276-280.

DEVI NN, PRABAKARAN JJ, WAHAB F. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2012;2(3):S1280-S1284.

DEY YN, OTA S, SRIKANTH N, JAMAL M, WANJARI M. A phytopharmacological review on an important medicinal plant-*Amorphophallus paeoniifolius*. *Ayu*. 2012;33(1):27.

DEYNO S, ABEBE A, TOLA MA, HYMETE A, BAZIRA J, MAKONNEN E, *et al*. Acute and sub-acute toxicity of *Echinops kebericho* decoction in rats. *BMC complementary medicine and therapies*. 2020;20(1):1-11. DONTA S. A review on antioxidant methods. *Asian J. Pharm. Clin. Res*. 2016;9(2):14-32.

DURAZZO A, LUCARINI M, SOUTO EB, CICALA C, CAIAZZO E, IZZO AA, *et al*. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy research*. 2019;33(9):2221-2243.

### E

EKWEOGU CN, UDE VC, NWANKPA P, EMMANUEL O, UGBOGU EA. Ameliorative effect of aqueous leaf extract of *Solanum aethiopicum* on phenylhydrazine-induced anaemia and toxicity in rats. *Toxicological Research*. 2020;36(3):227-238.

EL HAOUARI M, ROSADO JA. Medicinal plants with antiplatelet activity. *Phytotherapy research*. 2016;30(7):1059-1071.

- EL KABBAOUI M, CHDA A, EL-AKHAL J, AZDAD O, MEJRHIT N, AARAB L, *et al.* Acute and sub-chronic toxicity studies of the aqueous extract from leaves of *Cistus ladaniferus* L. in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2017;209:147-156.
- ELEKOFEHINTI OO. Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants—A review. *Pathophysiology*. 2015;22(2):95-103.
- ELTAMANY EE, NAFIE MS, KHODEER DM, EL-TANAHY AH, ABDEL-KADER MS, BADR JM, *et al.* *Rubia tinctorum* root extracts: chemical profile and management of type II diabetes mellitus. *RSC Advances*. 2020;10(41):24159-24168.
- ERKAN N, AKGONEN S, OVAT S, GOKSEL G, AYRANCI E. Phenolic compounds profile and antioxidant activity of *Dorystoechas hastata* L. Boiss et Heldr. *Food Research International*. 2011;44(9):3013-3020.
- ESSAIDI I, SNOUSSI A, KOUBAIER HBH, CASABIANCA H, BOUZOUITA N. Effect of acid hydrolysis on alizarin content, antioxidant and antimicrobial activities of *Rubia tinctorum* extracts. *Pigment & Resin Technology*. 2017.

### F

- FALCONE FERREYRA ML, RIUS S, CASATI P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*. 2012;3:222.
- FELHI S, DAOUD A, HAJLAOUI H, MNAFGUI K, GHARSALLAH N, KADRI A. Solvent extraction effects on phytochemical constituents profiles, antioxidant and antimicrobial activities and functional group analysis of *Ecballium elaterium* seeds and peels fruits. *Food Science and Technology*. 2017;37:483-492.

### G

- GARABETH F, BOUAOUN D, ELYAFI-ELZAHRI G. Étude quantitative des coumarines d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boissier. *Phytothérapie*. 2007;5(5):259-263.
- GARRETA R. Des simples à l'essentiel: de l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales. Presses Univ. du Mirail; 2007.
- GE L, LIN B, MO J, CHEN Q, SU L, LI Y, *et al.* Composition and antioxidant and antibacterial activities of essential oils from three yellow *Camellia* species. *Trees*. 2019;33(1):205-212.
- GHAFAARI R, MOUSLEMANIE N, NAYAL R. Antibacterial activity of *Rubia Tinctorum* Linn. root extracts. *International Journal Pharmaceutical Science and Research*. 2018;9(9):3914-3918.

- GHASEMZADEH A, GHASEMZADEH N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(31):6697-6703.
- GHEDIRA K. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 2005;3(4):162-169.
- GLENN A, ARMSTRONG CE. Physiology of red and white blood cells. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2019;20(3):170-174.
- GOUVA C, NIKOLOPOULOS P, IOANNIDIS JP, SIAMOPOULOS KC. Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. *Kidney international*. 2004;66(2):753-760.
- GRANATO D, SHAHIDI F, WROLSTAD R, KILMARTIN P, MELTON LD, HIDALGO FJ, *et al.* Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*. 2018;264:471-475.
- GUIDELINE O. Test No. 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. In: 2002.
- Guimarães, A. G., Serafini, M. R., & Quintans-Júnior, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 24(3), 243-265. (2014).
- GULLÓN B, LÚ-CHAU TA, MOREIRA MT, LEMA JM, EIBES G. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in food science & technology*. 2017;67:220-235.
- GUO J-J, GAO Z-P, XIA J-L, RITENOUR MA, LI G-Y, SHAN Y. Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. *Lwt*. 2018;97:825-839.
- HABIB A, BISWAS S, SIDDIQUE AH, MANIRUJJAMAN M, UDDIN B, HASAN S, *et al.* Nutritional and lipid composition analysis of pumpkin seed (*Cucurbita maxima* Linn.). *J Nutr Food Sci*. 2015;5(4):374.

## H

- HADDOUCHI F, CHAOUICHE T, HALLA N. Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*. 2016:1-9.
- HAMDI A, VIANE J, MAHJOUB MA, MAJOULI K, GAD MHH, KHARBACH M, *et al.* Polyphenolic contents, antioxidant activities and UPLC–ESI–MS analysis of *Haplophyllum tuberculatum* A. Juss leaves extracts. *International journal of biological macromolecules*. 2018;106:1071-1079.

- HANACHI P, ZARRINGHALAMI R, TAMIJANI RR. Investigation of antioxidant properties of Polygonatum orientale Desf and Tilia dasystyla extracts by different methods and solvents. Hormozgan Medical Journal. 2019;22(4):e86504-e86504.
- Handelman G J., & Levin N.W. Iron and anemia in human biology: a review of mechanisms. Heart failure reviews.2008; 13(4), 393-404.
- HARAOUI N, ALLEM R, CHAUCHE TM, BELOUAZNI A. In-vitro antioxidant and antimicrobial activities of some varieties citrus grown in Algeria. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine. 2019:1-12.
- HARKAT-MADOURI L, ASMA B, MADANI K, SAID ZB-OS, RIGOU P, GRENIER D, *et al.* Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of Eucalyptus globulus from Algeria. Industrial crops and products. 2015;78:148-153.
- HATZIDIMITRIOU E, NENADIS N, TSIMIDOU MZ. Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. Food Chemistry. 2007;105(4):1504-1511.
- HE Z. Q., SHEN X. Y, CHENG Z. Y, WANG R. L, LAI P. X, & XING X. Chemical composition, antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities of the essential oil of Dianella ensifolia. *Records of Natural Products*.2020. 14(2), 160-5.
- HELENO SA, MARTINS A, QUEIROZ MJR, FERREIRA IC. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. Food Chemistry. 2015;173:501-513.
- HELRICH K. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of official analytical chemists; 1990.
- HILL A, HILL QA. Autoimmune hemolytic anemia. Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book. 2018;2018(1):382-389.
- HOSEINZADEH A, SADEGHIPOUR Y, BEHBUDI G. Investigation Preliminary antimicrobial and anticancer properties: on Topic Rubia tinctorum plant by using Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS). Advances in Applied NanoBio-Technologies. 2020;1(1):10-19.
- HOSSAIN MA, AL-RAQMI KAS, AL-MIJIZY ZH, WELI AM, AL-RIYAMI Q. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown Thymus vulgaris. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2013;3(9):705-710.
- HOSSEINZADEH S, JAFARIKUKHDAN A, HOSSEINI A, ARMAND R. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of Thymus vulgaris. International Journal of Clinical Medicine. 2015;6(09):635.

HUSSEIN RA, EL-ANSSARY AA. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal medicine*. 2019;1:13.

HYNES MJ, O'COINCEANAINN MN. The kinetics and mechanisms of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *Journal of inorganic biochemistry*. 2004;98(8):1457-1464.

### I

IACOPINI P, BALDI M, STORCHI P, SEBASTIANI L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008;21(8):589-598.

IBRAHIM M. B., SOWEMIMO A. A., SOFIDIYA M. O., BADMOS K. B., FAGEYINBO, M. S., ABDULKAREEM F. B., & ODUKOYA, O. A. Sub-acute and chronic toxicity profiles of *Markhamia tomentosa* ethanolic leaf extract in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2016; 193, 68-75

IDRIS OA, WINTOLA OA, AFOLAYAN AJ. Phytochemical and antioxidant activities of *Rumex crispus* L. in treatment of gastrointestinal helminths in Eastern Cape Province, South Africa. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2017;7(12):1071-1078.

IGNAT I, VOLF I, POPA VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011;126(4):1821-1835.

IN YW, KIM JJ, KIM HJ, OH SW. Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against *S. higella* species. *Journal of Food Safety*. 2013;33(1):79-85.

INNIH SO, OMAGE SO, OMAGE K. Hematinic effects of *Spondias mombin* and its protective role against the spleenotoxic effect of phenylhydrazine. *Clinical Phytoscience*. 2020;6:1-9.

INOUE Y, HADA T, SHIRAISHI A, HIROSE K, HAMASHIMA H, KOBAYASHI S. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(5):1770-1774.

ISMAIL AM, MOHAMED EA, MARGHANY MR, ABDEL-MOTAAL FF, ABDEL-FARID IB, EL-SAYED MA. Preliminary phytochemical screening, plant growth inhibition and antimicrobial activity studies of *Faidherbia albida* legume extracts. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2016;15(2):112-117.

### J

JACOB F, PIGNAL M. Interactions levures-tanins. I-croissance et survie de diverses levures dans des solutions tannantes. *Mycopathologia et mycologia applicata*. 1972;48(2-3):121-142.

- JALILL R. GC-MS analysis of extract of *Rubia tinctorum* having anticancer properties. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 2017;9:286-292.
- JANEWAY CA, MURPHY K, TRAVERS P, WALPORT M. *Immunobiologie*. De Boeck Supérieur; 2009.
- JAGANNATHAN-BOGDAN, M., et ZON, L.I. Hematopoiesis. *Development*. 2013; 140(12), 2463-2467.
- JAIN C, KHATANA S, VIJAYVERGIA, R. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2019; 10(2), 494-498.
- JEAN B. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.). Lavoisier; 2009.
- JOSHI A, BHOBE M, SATTARKAR A. Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcos* Linn. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2013;5(7):80-87.
- JOST J-P, JOST-TSE Y-C. *Stratégie de défense des plantes contre les maladies et les parasites (et: quelques applications prat.* Editions Publibook; 2016.
- JOUAD H, HALOU M, RHIOUANI H, EL HILALY J, EDDOUKS M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;77(2-3):175-182.
- JURK K, KEHREL BE. Platelets: physiology and biochemistry. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis*. Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ..., 2005. p. 381-392.

### K

- KACZOROVÁ D, KARALIJA E, DAHIJA S, BEŠTA-GAJEVIĆ R, PARIĆ A, ČAVAR ZELJKOVIĆ S. Influence of Extraction Solvent on the Phenolic Profile and Bioactivity of Two *Achillea* Species. *Molecules*. 2021;26(6):1601.
- KADAM D, PALAMTHODI S, LELE S. LC–ESI–Q–TOF–MS/MS profiling and antioxidant activity of phenolics from *L. Sativum* seedcake. *Journal of food science and technology*. 2018;55(3):1154-1163.
- KALYONCU F, CETIN B, SAGLAM H. Antimicrobial activity of common madder (*Rubia tinctorum* L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2006;20(6):490-492.
- KHARCHOUFA L, BOUHRIM M, BENCHEIKH N, EL ASSRI S, AMIROU A, YAMANI A., ELACHOURI M. Acute and subacute toxicity studies of the aqueous extract from

- haloxylon scoparium pomel (hammada scoparia (pomel)) by oral administration in Rodents. *BioMed Research International*, 2020.
- KARIM A, MEKHFI H, ZIYYAT A, LEGSSYER A, BNOUHAM M, AMRANI S, *et al.* Anti-diarrhoeal activity of crude aqueous extract of *Rubia tinctorum* L. roots in rodents. *Journal of Smooth muscle research*. 2010;46(2):119-123.
- KARKANIS AC, FERNANDES Â, VAZ J, PETROPOULOS S, GEORGIU E, CIRIC A, *et al.* Chemical composition and bioactive properties of *Sanguisorba minor* Scop. under Mediterranean growing conditions. *Food & function*. 2019;10(3):1340-1351.
- KASSIM A, POETTE J, PATERSON A, ZAIT D, MCCALLUM S, WOODHEAD M, *et al.* Environmental and seasonal influences on red raspberry anthocyanin antioxidant contents and identification of quantitative traits loci (QTL). *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(5):625-634.
- Kato G. J, Steinberg M. H, & Gladwin M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *The Journal of clinical investigation*. 2017; 127(3), 750-760.
- KENNEDY DO. Polyphenols and the human brain: Plant “secondary metabolite” ecologic roles and endogenous signaling functions drive benefits. *Advances in Nutrition*. 2014;5(5):515-533.
- KHAN RA, KHAN MR, SAHREEN S, AHMED M. Assessment of flavonoids contents and in vitro antioxidant activity of *Launaea procumbens*. *Chemistry Central Journal*. 2012;6(1):1-11.
- KIFAYATULLAH M, MUSTAFA MS, SENGUPTA P, SARKER MMR, DAS A, DAS SK. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. *Journal of Acute Disease*. 2015;4(4):309-315.
- KOLAWOLE T, OLUWATAYO B, UMOREN E, ILOCHI O, DAPPER D, IGBOKWE U. Hematinic effect of locust bean (*Parkia biglobosa*) seeds on phenylhydrazine-induced anaemia in rats. *Journal of African Association of Physiological Sciences*. 2021;9(1):10-17.
- KONÉ M, ATINDEHOU K, TÉRE H, TRAORÉ D. Quelques plantes médicinales utilisées en pédiatrie traditionnelle dans la région de Ferkessédougou (Côte d’Ivoire). *Bioterre*. 2002;30:30-36.
- KORIEM KM, ARBID MS, GOMAA NE. The role of chlorogenic acid supplementation in anemia and mineral disturbances induced by 4-tert-octylphenol toxicity. *Journal of dietary supplements*. 2018;15(1):55-71.

KUMAR BARGAH R. Preliminary test of phytochemical screening of crude ethanolic and aqueous extract of *Moringa pterygosperma* Gaertn. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2015;4(1).

KUMAR M, PURI S, PUNDIR A, BANGAR SP, CHANGAN S, CHOUDHARY P, *et al.* Evaluation of nutritional, phytochemical, and mineral composition of selected medicinal plants for therapeutic uses from cold desert of Western Himalaya. *Plants*. 2021;10(7):1429.

### L

LAJKÓ E, BÁNYAI P, ZÁMBÓ Z, KURSINSZKI L, SZŐKE É, KŐHIDAI L. Targeted tumor therapy by *Rubia tinctorum* L.: analytical characterization of hydroxyanthraquinones and investigation of their selective cytotoxic, adhesion and migration modulator effects on melanoma cell lines (A2058 and HT168-M1). *Cancer cell international*. 2015;15(1):1-15.

LANGA-LOMBA N, SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ E, BUZÓN-DURÁN L, GONZÁLEZ-GARCÍA V, CASANOVA-GASCÓN J, MARTÍN-GIL J, *et al.* Activity of anthracenediones and flavoring phenols in hydromethanolic extracts of *Rubia tinctorum* against grapevine phytopathogenic fungi. *Plants*. 2021;10(8):1527.

LANGEMEIER J, ROGERS D. Rapid method for sugar analysis of doughs and baked products. *Cereal chemistry (USA)*. 1995.

LARAIB S, SHARIF S, BIBI Y, NISA S, AZIZ R, QAYYUM A. Phytochemical Analysis and Some Bioactivities of Leaves and Fruits of *Myrsine africana* Linn. *Arabian Journal for Science and Engineering*. 2021;46(1):53-63.

LARDRY J-M, HABERKORN V. L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*. 2007;7(61):14-17.

Lasch K. F, Evans C. J, & Schatell D. A qualitative analysis of patient-reported symptoms of anemia. *Nephrology Nursing Journal*, 2009, 36(6), 621

LI W-Q, QUAN M-P, LI Q. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil from Qiancao (*Rubia cordifolia* Linn.) Roots against Selected Foodborne Pathogens. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*. 2019;7(4).

Letsididi K S, Lou Z, Letsididi R, Mohammed K, & Maguy B. L. Antimicrobial and antibiofilm effects of trans-cinnamic acid nanoemulsion and its potential application on lettuce. *Lwt*. 2018; 94, 25-32

LICHTMAN MA, KAUSHANSKY K, KIPPS TJ, PRCHAL JT, LEVI MM. *Williams Manual of Hematology*. McGraw-Hill; 2011.

- LIJU VB, JEENA K, KUTTAN R. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). *Food and Chemical Toxicology*. 2013;53:52-61.
- LIMA N, FALCOSKI T, SILVEIRA R, RAMOS R, ANDRADE T, COSTA P, *et al.* Inga edulis fruits: a new source of bioactive anthocyanins. *Natural product research*. 2020;34(19):2832-2836.
- LIU H, ZHANG L, LU S. Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*. 2012;17(4):4281-4291.
- LONGO D.L. Autoimmune Hemolytic Anemias. 2021; *N Engl J Med*, 385, 1407-19.
- LÓPEZ A, RICO M, RIVERO A, DE TANGIL MS. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*. 2011;125(3):1104-1109.
- LORD M-C. Physiopathologie et traitement de l'anémie dans l'insuffisance cardiaque. *Pharmactuel*. 2008;41(4).
- LOUSTAU V, GUILLAUD C, GARCON L, GODEAU B, MICHEL M. Anémie hémolytique chez l'adulte: principales causes et démarche diagnostique. *La Presse Médicale*. 2011;40(5):470-485.

### M

- MACHEIX J-J, FLEURIET A, JAY-ALLEMAND C. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques; 2005.
- MAKUMBELO E, LUKOKI L, PAULUS J, LUYINDULA N. Stratégie de valorisation des espèces ressources des produits non ligneux de la savane des environs de Kinshasa: II. Enquête ethnobotanique (aspects médicaux). *Tropicultura*. 2008;26(3):129-134.
- MAREGESI SM, PIETERS L, NGASSAPA OD, APERS S, VINGERHOETS R, COS P, *et al.* Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;119(1):58-66.
- MARHOUME FZ, LAARADIA MA, ZAID Y, LAADRAOUI J, OUFQUIR S, ABOUFATIMA R, *et al.* Anti-aggregant effect of butanolic extract of *Rubia tinctorum* L on platelets in vitro and ex vivo. 2019.
- MARIA R, SHIRLEY M, XAVIER C, JAIME S, DAVID V, ROSA S, *et al.* Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University-Science*. 2018;30(4):500-505.

- MARIEB E, HOEHN K. Anatomie et physiologie humaines: Livre+ eText+ plateforme numérique MonLab-Licence étudiant 60 mois. Pearson Education France; 2014.
- MASEK A, CHRZESCIJANSKA E, LATOS M. Determination of antioxidant activity of caffeic acid and p-coumaric acid by using electrochemical and spectrophotometric assays. *Int J Electrochem Sci.* 2016;11(12):10644-10658.
- MAROUF A, & REYNAUD J. *La botanique de A à Z: 1 662 définitions.* Dunod.2007.
- MARMONIER AA. Technique de diffusion en gélose: Méthode des disques. In *Bactériologie Médicale, Techniques Usuelles.* Doin : Paris, France.1990; 227-244.
- MEANS RT. Iron deficiency anemia. *Hematology.* 2013;18(5):305-306.
- MEDINI F, FELLAH H, KSOURI R, ABDELLY C. Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for science.* 2014;8(3):216-224.
- MBULA J. P, KWEMBE J. T. K, TSHILANDA D. D, NGOBUA K. N, KABENA O. N., NSIMBA, S. M, ... & MPIANA P. T. Antisickling, antihemolytic and radical scavenging activities of essential oil from *Entandrophragma Cylindricum* (Sprague) Sprague (Meliaceae). *J Adv Med Life Sci.*2018; 6(2), 1-5.
- MEHRABIAN S, MAJD A, MAJD I. Antimicrobial effects of three plants (*Rubia tinctorum*, *Carthamus tinctorius* and *Juglans regia*) on some airborne microorganisms. *Aerobiologia.* 2000;16(3):455-458.
- Milcent R. et CHAU F. *Chimie organique hétérocyclique: structures fondamentales, chimie et biochimie des principaux composés naturels.* L'Editeur: EDP Sciences.2003.
- Monika P. M, Sharma K, & Yadav M. Antioxidant effect of some medicinal plants: A review. *Inventi Rapid: Planta Activa.*2016; 1(1), 1-8.
- MONTEIRO NE, QUEIRÓS LD, LOPES DB, PEDRO AO, MACEDO GA. Impact of microbiota on the use and effects of isoflavones in the relief of climacteric symptoms in menopausal women—A review. *Journal of functional foods.* 2018;41:100-111.
- MOULY A. Systématique de la tribu des Ixoreae A. Gray (Rubiaceae): phylogénie, biogéographie et taxinomie. *Acta Botanica Gallica.* 2008;155(3):457-464.
- MUKINDA JT, SYCE JA. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology.* 2007;112(1):138-144.
- Murawska N, Fabisiak A, & Fichna J. Anemia of chronic disease and iron deficiency anemia in inflammatory bowel diseases: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Inflammatory bowel diseases.*2016; 22(5), 1198-1208.

MUSYOKA T, DOROTHY N, WYCLIFFE A, JUMA K, NZIOKA M. In vivo antianaemic effect and safety of aqueous extracts of *Erythrina abyssinica* and *Zanthoxylum usambarensis* in mice models. *Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases*. 2016.

N'GUESSAN K, KOUASSI K, OUATTARA D. Plants used to treat anaemia, in traditional medicine, by Abbey and Krobou populations, in the South of Côte-d'Ivoire. *J Appl Sci Res*. 2010;6(8):1291-1297.

NAIDOO Y, SADASHIVA C, KASIM N, NICHOLAS A, NAIDOO G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum obovatum* E. Mey. Ex Benth.(Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2014;17(1):142-147.

NATHAN DG, OSKI FA. *Hematology of infancy and childhood*. 1987.

NAVAEI MN, MIRZA M, DINI M. Chemical composition of the essential oils of *Rubia tinctorum* L. aerial parts from Iran. *Flavour and fragrance journal*. 2006;21(3):519-520.

NAWAZ H, ASLAM M, MUNTAHA ST. Effect of solvent polarity and extraction method on phytochemical composition and antioxidant potential of corn silk. *Free Radicals and Antioxidants*. 2019;9(1):5-11.

### N

NIMSE S. B, & PAL D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*.2015; 5(35), 27986-28006.

Novidzro K. M, Wokpor K, Fagla B. A., Koudouvo K, Dotse K, Osseyi E, & Koumaglo, K. H. Etude de quelques paramètres physicochimiques et analyse des éléments minéraux, des pigments chlorophylliens et caroténoïdes de l'huile de graines de *Griffonia simplicifolia*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*.2019. 13(4), 2360-2373.

### O

OGBE R, ADOGA G, ABU A. Antianaemic potentials of some plant extracts on phenyl hydrazine-induced anaemia in rabbits. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(8):680-684.

OGIDI OI, ESIE NG, DIKE OG. Phytochemical, Proximate and Mineral compositions of *Bryophyllum pinnatum* (Never die) Medicinal plant. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2019;8(1):629-635.

- OHADOMA SC. Pharmacological Assessment of Anti-anaemic Activity of Aqueous Leaves Extracts of *Telfairia occidentalis* and *Spondias mombin* in Rats. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*. 2016;16(4):3.
- OHIKHENA FU, WINTOLA OA, AFOLAYAN AJ. Quantitative phytochemical constituents and antioxidant activities of the mistletoe, *phragmanthera capitata* (sprengel) balle extracted with different solvents. *Pharmacognosy Research*. 2018;10(1):16.
- OLAH N-K, RADU L, MOGOŞAN C, HANGANU D, GOCAN S. Phytochemical and pharmacological studies on *Orthosiphon stamineus* Benth.(Lamiaceae) hydroalcoholic extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003;33(1):117-123.
- ORGANIZATION WH. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO global database on anaemia. 2008.
- OUÉDRAOGO S, KOURA GK, ACCROMBESSI MM, BODEAU-LIVINEC F, MASSOUGBODJI A, COT M. Maternal anemia at first antenatal visit: prevalence and risk factors in a malaria-endemic area in Benin. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;87(3):418.
- OTA A, & ULRIH N. P. An overview of herbal products and secondary metabolites used for management of type two diabetes. *Frontiers in pharmacology*; 2017; 8, 436.
- ÖZKAN OE, ZENGİN G, AKÇA M, BALOĞLU MC, OLGUN Ç, ALTUNER EM, *et al.* DNA protection, antioxidant, antibacterial and enzyme inhibition activities of heartwood and sapwood extracts from juniper and olive woods. *RSC Advances*. 2015;5(89):72950-72958.

### P

- P COSTA J, ISLAM T, S SANTOS P, B FERREIRA P, LS OLIVEIRA G, VOB ALENCAR M, *et al.* Evaluation of antioxidant activity of phytol using non-and pre-clinical models. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2016;17(14):1278-1284.
- PAN S-Y, ZHOU S-F, GAO S-H, YU Z-L, ZHANG S-F, TANG M-K, *et al.* New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.
- PANCHE AN, DIWAN AD, CHANDRA SR. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*. 2016;5.
- PANDEY S, GANESHPURKAR A, BANSAL D, DUBEY N. Hematopoietic effect of *Amaranthus cruentus* extract on phenylhydrazine-induced toxicity in rats. *Journal of dietary supplements*. 2016;13(6):607-615.

- PAOLINI V, DORCHIES P, HOSTE H. Effets des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Revue Alter Agri*. 2003;61:17-19.
- PÁPAY ZE, ANTAL I. Study on the antioxidant activity during the formulation of biological active ingredient. 2014.
- PEI K, OU J, HUANG J, & OU S. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016 96(9), 2952-2962.
- PÉREZ-JIMÉNEZ J, NEVEU V, VOS F, SCALBERT A. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(8):4959-4969.
- PHARMACOGNOSIE BJ. phytochimie, plantes médicinales. Revue et Augmentée, Tec & Doc, Paris. 1999.
- PHATAK RS, HENDRE AS. Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014;2(5).
- PINTO M, SOUSA M, NASCIMENTO M. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Current medicinal chemistry*. 2005;12(21):2517-2538.

### R

- RAJEH MAB, KWAN YP, ZAKARIA Z, LATHA LY, JOTHY SL, SASIDHARAN S. Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. *Pharmacognosy Research*. 2012;4(3):170.
- RAMAIAH SK. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2011;31(1):161-172.
- RAMÍREZ SG, SEVILLA ÁFR, GÓMEZ MM. Anaemia in the elderly. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2017;149(11):496-503.
- RASHAN L, HAKKIM FL, FIEBIG HH, KELTER G, MERFORT I, AL-BULOSHI M, *et al*. In vitro Anti-Proliferative Activity of the *Rubia tinctorum* and *Alkanna tinctoria* Root Extracts in Panel of Human Tumor Cell Lines. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2018;11(5).
- RASHID RB, TOWSIF FN, BUSHRA FA, TAHIA F. Antioxidant, membrane stabilizing and cytotoxic activities of *Cissus adnata* (Roxb.). *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;15(1):69-71.

- REYNOSO-CAMACHO R, DE MEJÍA EG, LOARCA-PIÑA G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*. 2003;41(1):21-27.
- RIVIERE C, PAWLUS AD, MERILLON J-M. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural product reports*. 2012;29(11):1317-1333.
- ROLIM P, FIDELIS G, PADILHA C, SANTOS E, ROCHA H, MACEDO G. Phenolic profile and antioxidant activity from peels and seeds of melon (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*) and their antiproliferative effect in cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2018;51.
- ROMULO A, ZUHUD EA, RONDEVALDOVA J, KOKOSKA L. Screening of in vitro antimicrobial activity of plants used in traditional Indonesian medicine. *Pharmaceutical biology*. 2018;56(1):287-293.
- ROUMY V. Etude phytochimique de plantes amazoniennes d'activité antiplasmodiale, dont *Pseudoxandra cuspidata* Maas et *Tapirira guianensis* Aubl 2007.
- ROVČANIN BR, STEŠEVI D, KEKI D, RISTI M. Antibacterial effect of *Herniaria hirsuta*, *Prunus avium*, *Rubia tinctorum* and *Sempervivum tectorum* plant extracts on multiple antibiotic resistant *Escherichia coli*. *Bioscience Journal*. 2015;31(6).
- RUBERTO G, BARATTA MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. 2000;69(2):167-174.
- RUBIOLO P, SGORBINI B, LIBERTO E, CORDERO C, BICCHI C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour and fragrance journal*. 2010;25(5):282-290.

### S

- SABUNCUOĞLU S, ŞÖHRETOĞLU D. Evaluation of antihemolytic and antioxidant activities of *Geranium tuberosum* subsp. *tuberosum* with in vitro models. *Pharmaceutical biology*. 2012;50(11):1374-1379.
- SAFI F, HSAIRI M, JMAL M, ZRIBI M, REKIK N, GARGOURI L, *et al.* interest of recombinant activated factor vii in refractory immune thrombocytopenia interest du facteur vii active recombinant dans la thrombocytopenie. *journal de l'information médicale de sfax*. 2019;59.
- SALAH N, MILLER NJ, PAGANGA G, TIJBURG L, BOLWELL GP, RICEEVANS C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1995;322(2):339-346.

- SALEM MSE-D, MAHFOUZ AY, FATHY RM. The antibacterial and antihemolytic activities assessment of zinc oxide nanoparticles synthesized using plant extracts and gamma irradiation against the uro-pathogenic multidrug resistant *Proteus vulgaris*. *BioMetals*. 2021;34(1):175-196.
- SALOVAARA S, SANDBERG A-S, ANDLID T. Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(21):6233-6238.
- SAMANTA A, DAS G, DAS SK. Roles of flavonoids in plants. *Carbon*. 2011;100(6):12-35.
- SAMPAIO BL, EDRADA-EBEL R, DA COSTA FB. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-11.
- SANKARAN R. *L'esprit de l'homéopathie*. 2000.
- SANTOS UP, CAMPOS JF, TORQUATO HFV, PAREDES-GAMERO EJ, CAROLLO CA, ESTEVINHO LM, *et al.* Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. *PLoS One*. 2016;11(12):0167531.
- SANTOS-SANCHEZ, N. F., SALAS-CORONADO, R., VILLANUEVA-CAÑONGO, C., & HERNANDEZ-CARLOS, B. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism (pp. 1-28).2019. London, UK: IntechOpen.
- SARI DRT, CAIRNS JRK, SAFITRI A, FATCHIYAH F. Virtual Prediction of the Delphinidin-3-O-glucoside and Peonidin-3-O-glucoside as Anti-inflammatory of TNF- $\alpha$  Signaling. *Acta Informatica Medica*. 2019;27(3):152.
- SAVADI S, VAZIFEDOOST M, DIDAR Z, NEMATSHAHI MM, JAHED E. Phytochemical analysis and antimicrobial/antioxidant activity of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. rhizome methanolic extract. *Journal of Food Quality*. 2020;2020.
- SELL S. LEUKEMIA. *Stem cell reviews*. 2005;1(3):197-205.
- SENA D.M., JR.; RODRIGUES F.F.G.; PAULO T.C.F.; LIMA S.G.; COUTINHO H.D.M.; CARVAJAL J.C.L.; COSTA J.G.M. Physicochemical and spectroscopical investigation of pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) pulp oil. *Grasas y Aceites* 2010, 61, 191–196.
- SHARIFIFAR F, DEHGHN-NUDEH G, MIRTAJALDINI M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*. 2009;112(4):885-888.
- SHARIFZADEH M, EBADI N, MANAYI A, KAMALINEJAD M, REZAEIZADEH H, MIRABZADEH M, *et al.* Effect of *Rubia tinctorum* L. Extractson carrageenan-induced Paw Edema in rats. 2014.

- SHEN T, WANG X-N, LOU H-X. Natural stilbenes: an overview. *Natural product reports*. 2009;26(7):916-935.
- SHETH PA, PAWAR AT, MOTE CS, MORE C. Antianemic activity of polyherbal formulation, Raktavardhak Kadha, against phenylhydrazine-induced anemia in rats. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 2021;12(2):340-345.
- SHWETHA B, SIDDALINGAPRASAD H, SWAMY S, NAGALAKSHMI N, HARIPRASAD M. Mechanism of haematotoxicity induced by phenylhydrazine: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Research*. 2019;7(4):01-06.
- SILVA N C. C, FERNANDES JUNIOR A. J. J. O V A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2010 16(3), 402-413.
- SILVA MG, ARAGÃO TP, VASCONCELOS CF, FERREIRA PA, ANDRADE BA, COSTA IM, *et al*. Acute and subacute toxicity of *Cassia occidentalis* L. stem and leaf in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;136(2):341-346.
- SINGH AR, BAJAJ VK, SEKHAWAT PS, SINGH K. Phytochemical estimation and antimicrobial activity of aqueous and methanolic extract of *Ocimum sanctum* L. *J Nat Prod Plant Resour*. 2013;3(1):51-8.
- SIDDON A. J, & TORMEY C. A. The chemical and laboratory investigation of hemolysis. *Advances in Clinical Chemistry*. 2019.89, 215-258.
- SINGH B, & KAUR A. Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: a review. *Lwt*, (2018). 87, 93-101.
- SIVA R, PALACKAN MG, MAIMOON L, GEETHA T, BHAKTA D, BALAMURUGAN P, *et al*. Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant properties of some food dyes. *Food Science and Biotechnology*. 2011;20(1):7-13.
- SMERIGLIO A, BARRECA D, BELLOCCO E, TROMBETTA D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British journal of pharmacology*. 2017;174(11):1244-1262.
- SOFOFORA A. *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. KARTHALA Editions; 2010.
- STANDARDS NCFCL, BARRY AL. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline. National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne, PA; 1999.
- STEFANACHI A, LEONETTI F, PISANI L, CATTO M, CAROTTI A. Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. *Molecules*. 2018;23(2):250.

T

TANG X, LIU J, DONG W, LI P, LI L, LIN C, *et al.* The cardioprotective effects of citric acid and L-malic acid on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.

TAVA A, BIAZZI E, RONGA D, AVATO P. Identification of the volatile components of *Galium verum* L. and *Cruciata leavipes* opiz from the western Italian Alps. *Molecules*. 2020;25(10):2333.

TRIGUI M, HSOUNA AB, TOUNSI S, JAOUA S. Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial crops and products*. 2013;41:150-157.

TUREK C, STINTZING FC. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2013;12(1):40-53.

TÜRKMEN N, ÖZ A, SÖNMEZ A, EROL T, GÜLÜMSER D, YURDAKUL B, *et al.* Chemical composition of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. leaves. *Journal of New Results in Science*. 2014;3(6):27-31.

U

ULLAH A, MUNIR S, BADSHAH SL, KHAN N, GHANI L, POULSON BG, *et al.* Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*. 2020;25(22):5243.

V

VAINCHENKER W, & REIFFERS J. *Thérapie cellulaire*. John Libbey Eurotext ; 2005.

VINCKEN J-P, HENG L, DE GROOT A, GRUPPEN H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 2007;68(3):275-297.

W

WAKEEL A, JAN SA, ULLAH I, SHINWARI ZK, XU M. Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of *Isatis tinctoria*. *PeerJ*. 2019;7:e7857.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS M, SHERMA J. *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. CRC press; 2010.

WALKER HK, HALL WD, HURST JW. *Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations*. 1990.

WIDYAWATI PS, BUDIANTA TDW, KUSUMA FA, WIJAYA EL. Difference of solvent polarity to phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indica* less leaves

extracts. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2014;6(4):850-855.

WOOD J, YASMIN-KARIM S, MOREAU M, KUMAR R, AKWANWI J, DEREK A, *et al.* Characterization of isolated extracts from *Justicia* plant leaves used as remedy for anemia. *Molecules*. 2020;25(3):534.

WROLSTAD R. E, DURST R. W, & LEE J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 423-428. (2005).

### Y

YILMAZ M. A, ERTAS A, YENER I, AKDENIZ M, CAKIR O, ALTUN M, ... & TEMEL, H. A comprehensive LC–MS/MS method validation for the quantitative investigation of 37 fingerprint phytochemicals in *Achillea* species: A detailed examination of *A. coarctata* and *A. monocephala*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 154, 413-424. (2018).

YINYANG J, MPONDO EM, TCHATAT M, NDJIB R, OTTOU PM, DIBONG S. Les plantes à alcaloïdes utilisées par les populations de la ville de Douala (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*. 2014;78:6600-6619.

### Z

ZAMBRANO C, KEREKES EB, KOTOGÁN A, PAPP T, VÁGVÖLGYI C, KRISCH J, *et al.* Antimicrobial activity of grape, apple and pitahaya residue extracts after carbohydrase treatment against food-related bacteria. *Lwt*. 2019;100:416-425.

ZHANG J, CHEN J, LIANG Z, ZHAO C. New lignans and their biological activities. *Chemistry & biodiversity*. 2014;11(1):1-54.

ZHANG L, ZHANG P, XIA C, CHENG Y, GUO X, LI Y. Effects of malic acid and citric acid on growth performance, antioxidant capacity, haematology and immune response of *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture Research*. 2020;51(7):2766-2776.

# *Annexes*

## Annexes

### Annexe (1)

#### Tests phytochimiques

##### Détection des phénols

A 2 ml de chaque solution d'extrait, une goutte de solution alcoolique de  $\text{FeCl}_3$  à 2% a été ajoutée. La réaction positive s'exprimait par l'apparition d'une coloration verte ou bleu-noir (Adou *et al.*, 2016).

##### Détection des flavonoïdes

A 0,5 ml de chaque extrait, on a ajouté 10 gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques milligrammes de magnésium de tournesol. Les résultats positifs sont indiqués par une coloration rose-rouge ou jaune après trois minutes d'incubation (Haddouchi *et al.*, 2016).

##### Détection des tannins

De chaque extrait, 3 ml ont été prélevés et placés dans un tube à essai et dilués avec du chloroforme. 1 ml d'anhydride acétique a été ajouté. Puis, 1 ml d'acide sulfurique a été versé avec précaution. Une couleur verte a été obtenue, indiquant la présence de tanins (Hossain *et al.*, 2013).

##### Détection des saponines

La poudre sèche a été vigoureusement mélangée avec de l'eau. Un résultat positif était indiqué par l'apparition de mousse pendant plus de 5 minutes (Joshi *et al.*, 2013).

##### Détection des glycosides de coumarine

Quelques gouttes de solution alcoolique de  $\text{FeCl}_3$  ont été ajoutées à chaque extrait. La présence de coumarines est indiquée par l'apparition d'une coloration verte après l'ajout de  $\text{HNO}_3$  concentré (Joshi *et al.*, 2013).

##### Détection des anthraquinones

Anthraquinones libres : Environ 0,5g de l'extrait a été agité avec 5ml de chloroforme pendant dix minutes puis filtré. Le filtrat a été mélangé avec 5ml de solution ammoniacale. La présence d'une couleur rose dans la phase ammoniacale indique la présence d'anthraquinones libres.

Anthraquinones combinées : 1g d'extrait en poudre a été bouilli avec 5ml d'acide chlorhydrique 10% pendant cinq minutes. Le filtrat froid a été dilué avec du chloroforme. La

couche de chloroforme a ensuite été transférée dans un tube à essai. Un volume égal d'ammoniac à 10% a été ajouté à l'extrait chloroforme. La présence d'anthraquinones combinées était indiquée par une couleur rose, rouge ou violette (Abodunrin *et al.*, 2015).

#### **Détection des alcaloïdes**

0,5 g de l'extrait a été mélangé à 5 ml d'acide chlorhydrique aqueux à 1% dans un bain-marie. Quelques gouttes de réactif de Dragendorff ont été ajoutées à 1 ml du filtrat. La turbidité ou la précipitation a été considérée comme un résultat positif (Ismail *et al.*, 2016).

#### **Détection des stéroïdes**

2 ml d'anhydride acétique et 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ont été ajoutés à 5 ml de l'extrait. Le changement de couleur du violet au bleu a confirmé la présence de stéroïdes (kumar Bargah, 2015).

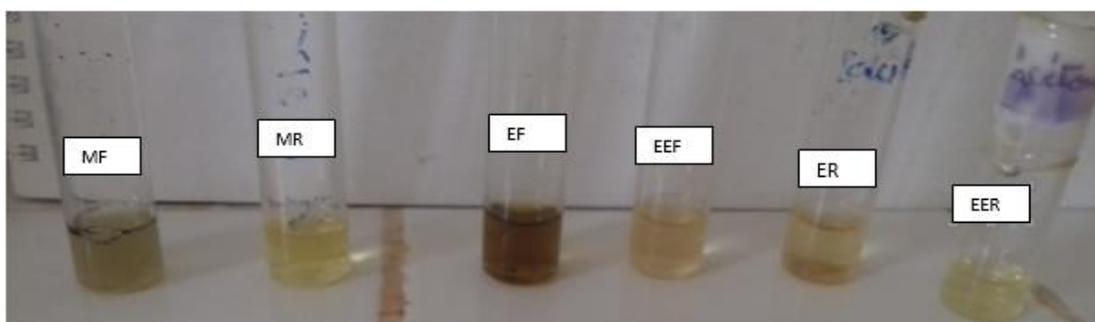
#### **Détection des protéines**

2 ml de NaOH (4%) et quelques gouttes de solution de CuSO<sub>4</sub> à 3% ont été mélangés à 2 ml d'extrait. La présence de protéines est indiquée par la formation d'une couleur violette ou rose (Maria *et al.*, 2018).

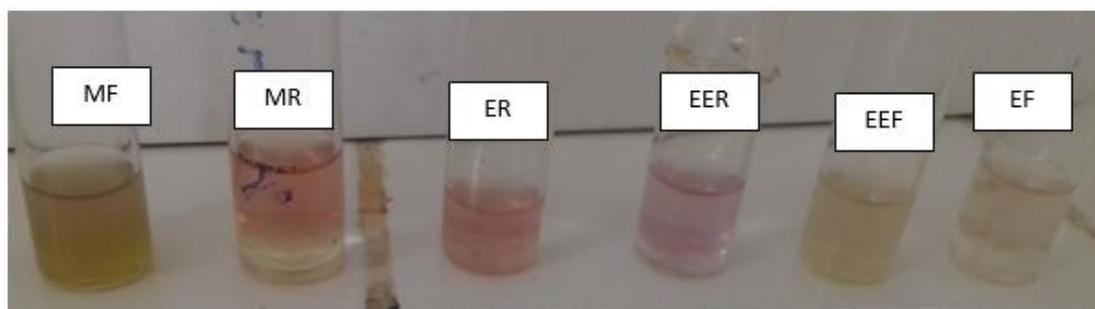
#### **Détection des quinones**

3 ml de chaque extrait ont été traités avec 3 ml de chloroforme, puis la couche de chloroforme a été séparée. Un volume d'hydroxyde de potassium (5%) a ensuite été ajouté à la couche de chloroforme. L'apparition d'une couleur rouge indique la présence de quinones (Amezouar *et al.*, 2013).

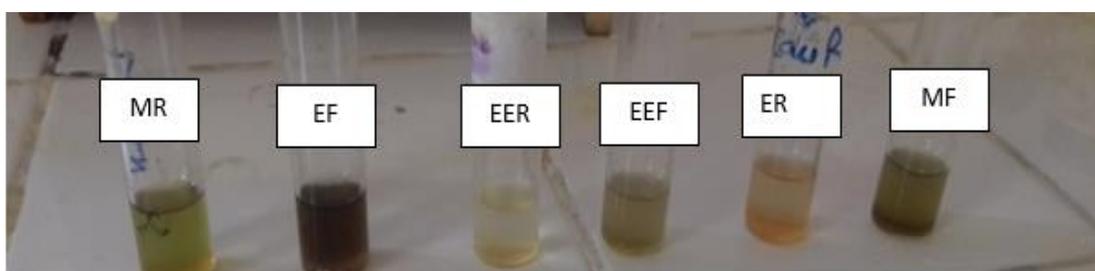
## ❖ Résultats de Screening phytochimique



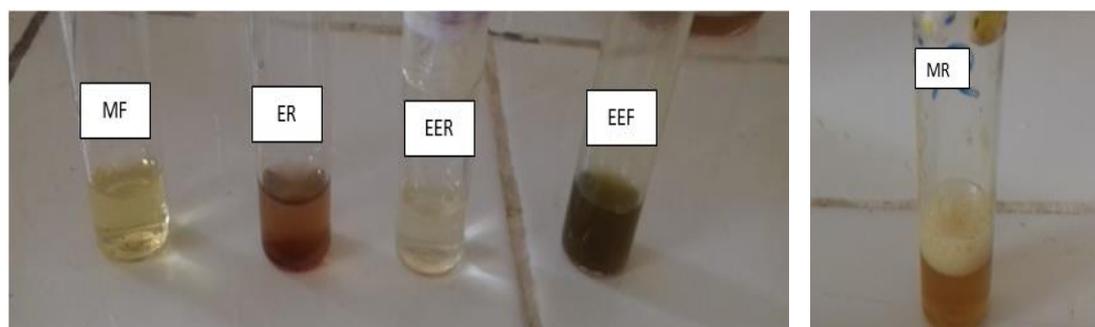
(a) : Coumarine



(b) : Poly phénols



(c) : Tannins



(d) : Saponine

(a): Coumarine, (b) : polyphenols, (c) : tannins , (d) : saponine. ER : Extrait aqueux de la partie racine ; EF : Extrait aqueux de la partie aérienne ; EEF : Extrait d'ethyl éther de la partie aérienne ; EER : Extrait d'ethyl éther de la partie Racine MR : Extrait hydrométhanolique de la partie racine. MF : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne.

## ❖ Réactifs

Réactif de Mayer (alcaloïdes) : (25 g Iodure de potassium (KI) +6.8 g chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>)) dans 1000 ml l'eau distillée.

PBS : 8g chlorure de sodium, 0.2 g chlorure de potassium, 1.15g phosphate disodique, 0.2g phosphate mono potassique, pH 7.3.

Ranger : 2.25g chlorure de sodium, 0.105g chlorure de potassium, 0.12g chlorure de calcium 6H<sub>2</sub>O, 0.05g bicarbonate de sodium, 500 ml eau distillée, pH 7.0.



**Figure (I)** : Résultat de l'analyse de pH des huiles essentielles de *Rubia tinctorum*.



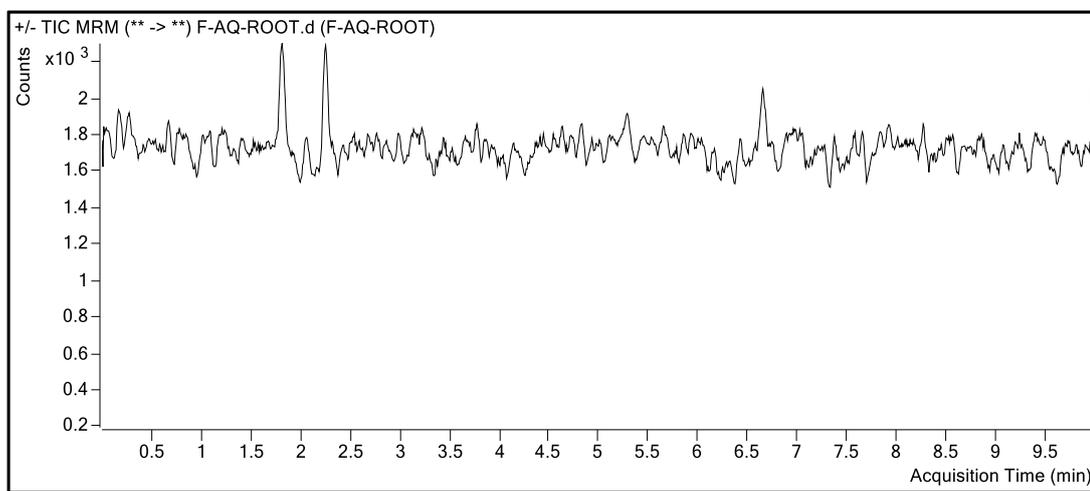
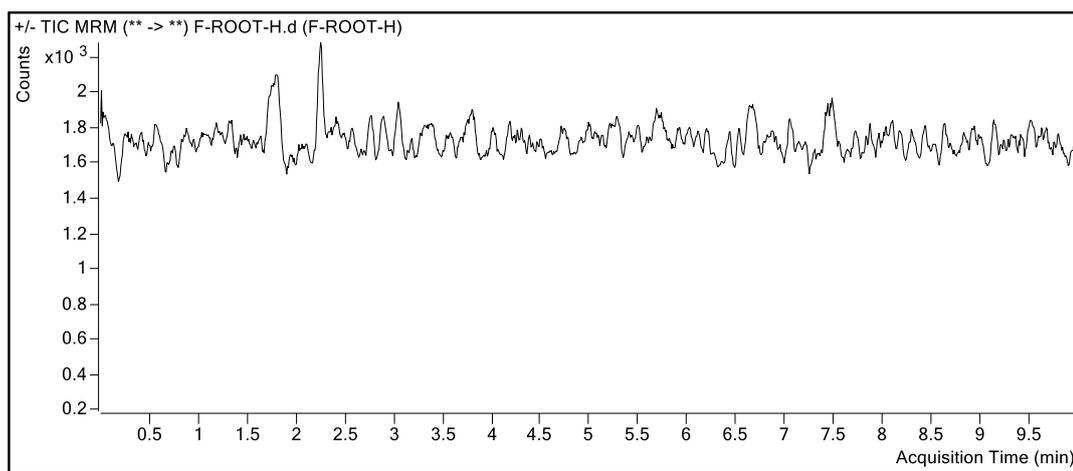
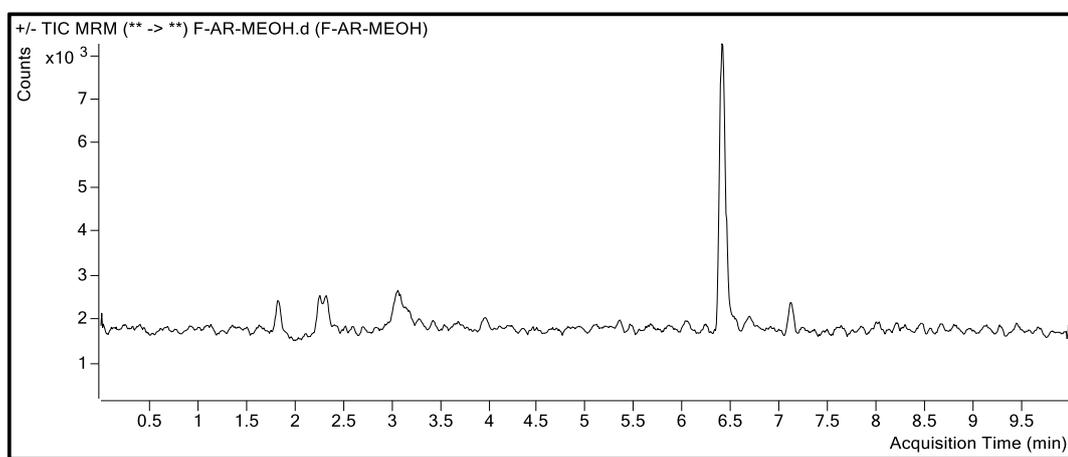
A : Avant l'ajout de KOH

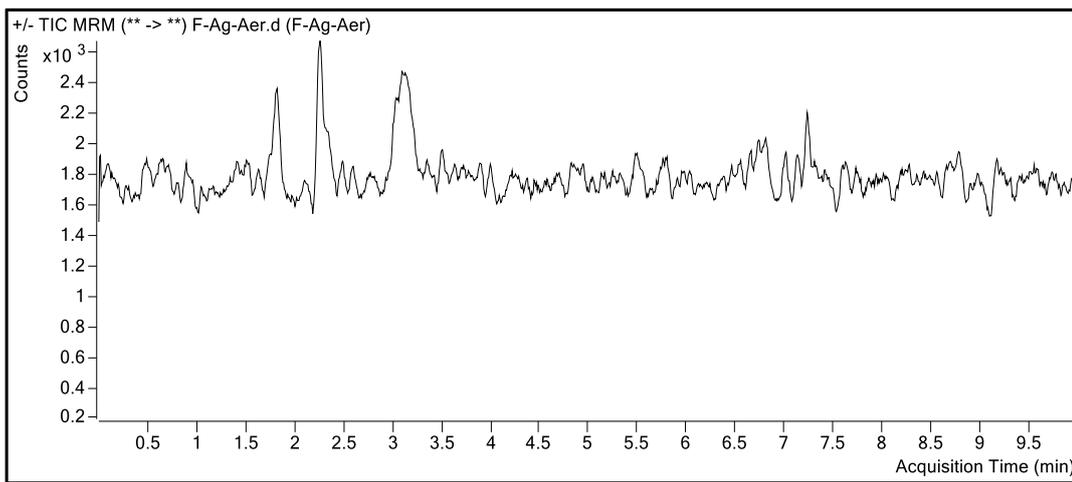


B : Après l'ajout de KOH

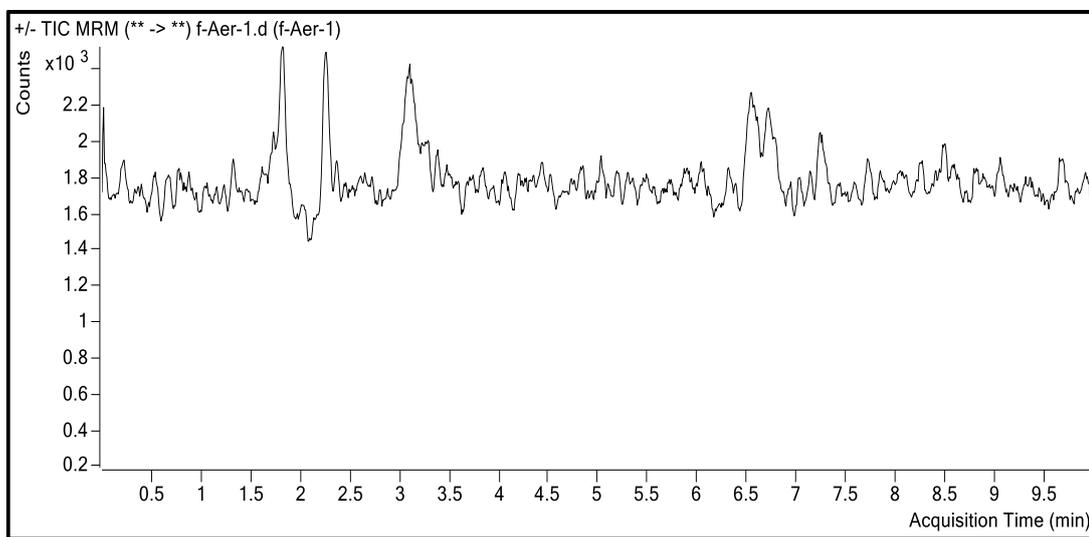
**Figure II** : Résultat de l'analyse de l'indice d'acide des huiles essentielles de *Rubia tinctorum*.

## Annexe 2

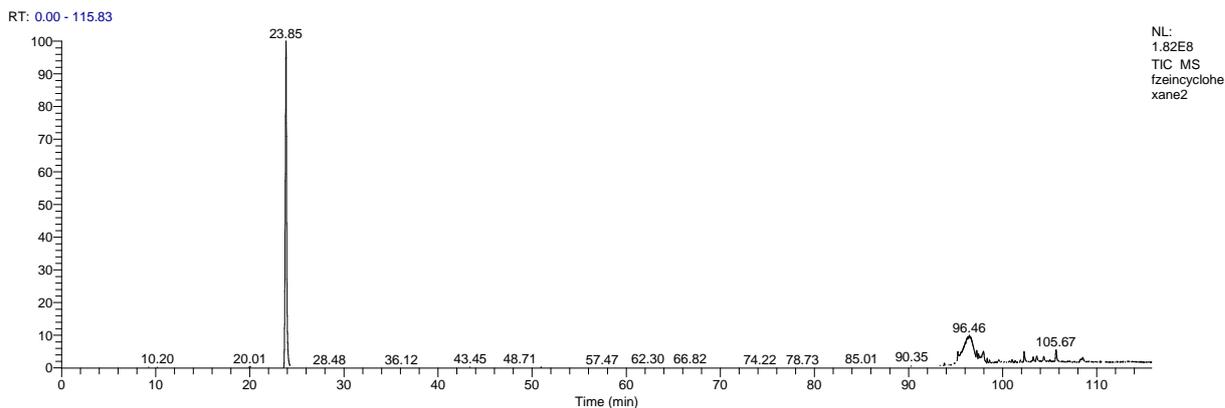
**❖ Profil chromatographique des extraits phénoliques de *Rubia tinctorum* obtenus par LC-ESI-MS/MS****A : Extrait aqueux de la partie racine****B : Extrait hydro méthanolique de la partie racine****C : Extrait hydrométhanolique de la partie aérienne**



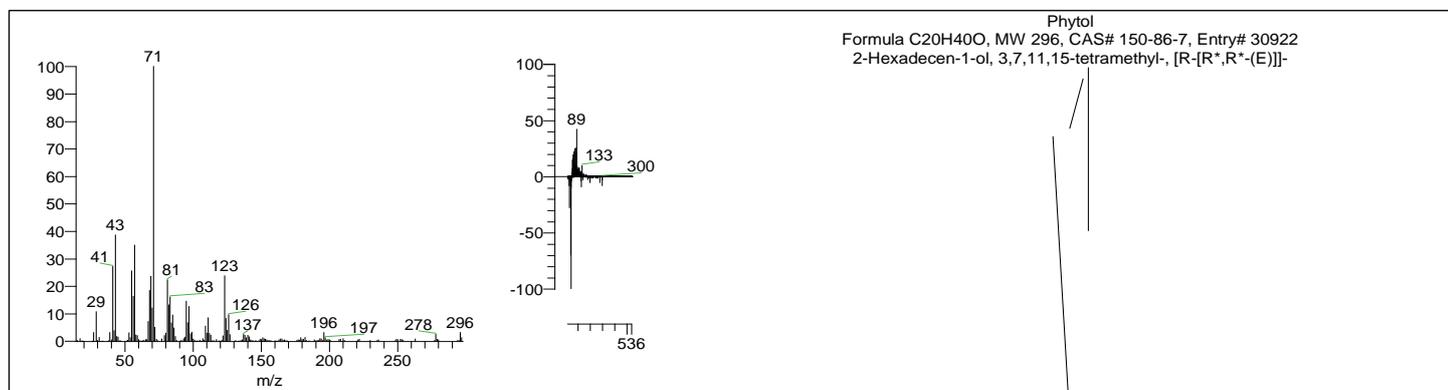
**D : Extrait aqueux de la partie aérienne**



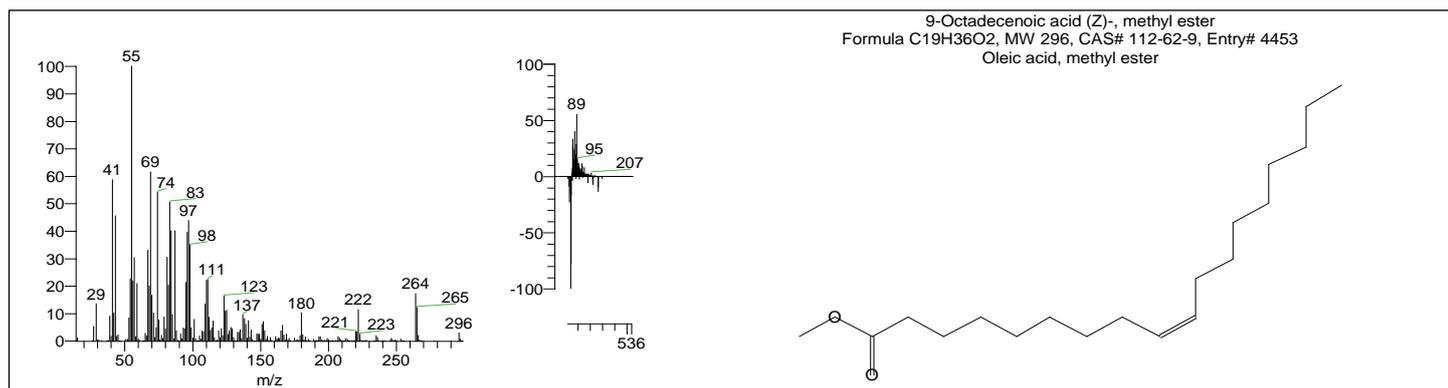
**E : Extrait di éthyle éther de la partie aérienne**

❖ Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Rubia tinctorum* par GC-MS

## Les spectres de masse de phytol et 9-Octadecenoic acid(z)



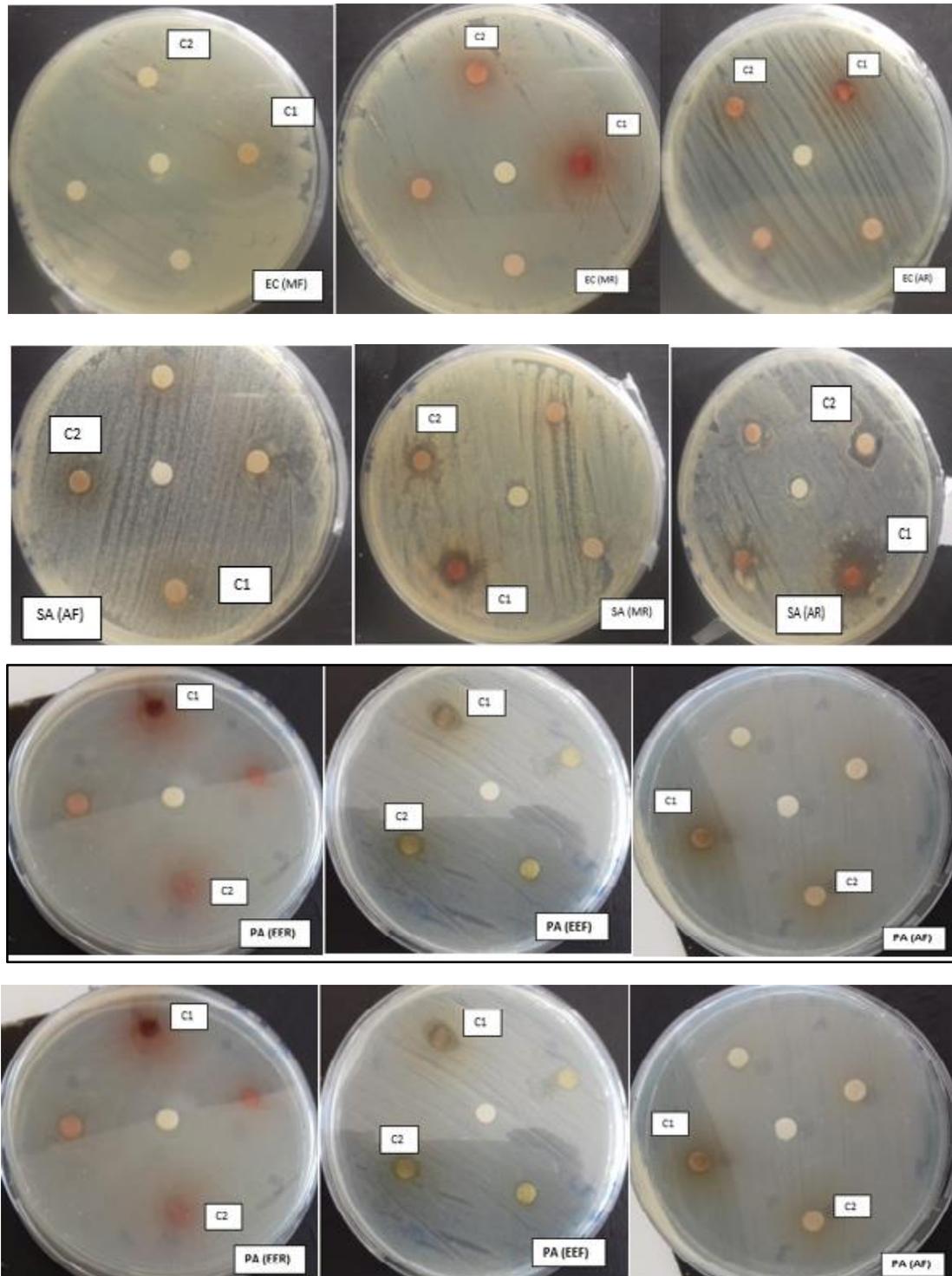
## A : Phytol



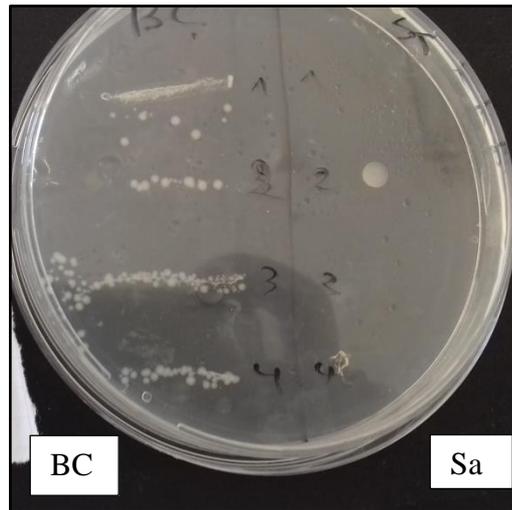
## B : 9-Octadecenoic acid(z)

## Annexe 3

## ❖ Résultats de l'activité antimicrobienne



**Figure III** : Exemples des zones d'inhibition des extraits de *Rubia tinctorum* sur les différentes souches bactériennes.



**Figure IV** : Exemple des concentrations minimale inhibitrice pour *staphylococcus aureus* (Sa) et *Bacillus cereus* (BC) pour l'extrait di éthyle éther de la partie racine.

Annexe 4

❖ L'élevage des rats



**LC-ESI-MS/MS analysis, toxicity and anti-anaemic activity of *Rubia tinctorum* L. aqueous extract**Fatima Zohra Houari<sup>1,✉</sup>, Ramazan Erenler<sup>2</sup>, Sena Bakir<sup>3,4</sup>, Esra Capanoglu<sup>3</sup>, Ahmed Hariri<sup>1</sup><sup>1</sup>Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety, Faculty of Sciences of Nature and Life, Mustapha Stambouli University of Mascara, Sidi Said 29000, Algeria<sup>2</sup>Plant Research Laboratories, Department of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Tokat Gaziosmanpaşa University, Tokat, Turkey<sup>3</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Istanbul Technical University, Maslak, Istanbul 34469, Turkey<sup>4</sup>Department of Gastronomy and Culinary Arts, Faculty of Tourism, Recep Tayyip Erdogan University, Ardesen, Rize 53400, Turkey✉ Corresponding author: [fz.houari@univ-mascara.dz](mailto:fz.houari@univ-mascara.dz)**Article info****Article history:**Received: 22<sup>nd</sup> May 2021Accepted: 8<sup>th</sup> October 2021**Keywords:**Antianaemic  
Phytochemical analysis  
Rubiaceae  
Toxic effect**Abstract**

The present study investigated the chemical profile, toxicity, and anti-anaemic activity of *Rubia tinctorum* root aqueous extract against phenylhydrazine induced hemolytic anaemia. Phenolic compounds were analyzed by LC-ESI-MS/MS; acute toxicity test was evaluated by administering a single dose of 2,000 mg.kg<sup>-1</sup> of the extract; anaemia was induced by administration of 40 mg phenylhydrazine by intraperitoneal injection for 2 days. Moreover, the anti-anaemic activity was evaluated by measuring the haematological parameters of rats treated with iron and aqueous extract for 15 days. The LC-ESI-MS/MS analysis results revealed the presence of 31 phytochemical compounds, among them, citric acid was found as the most abundant. No signs of toxicity or death were recorded, indicating that the LD50 of *R. tinctorum* root extract is higher than 2,000 mg.kg<sup>-1</sup>. Furthermore, the aqueous extract increased red blood cell levels by 69.82 and 71.67 % in the groups treated with 200 and 400 mg.kg<sup>-1</sup> of the extract, respectively. Besides, a significant increase in hemoglobin from 12.05 ± 0.15 to 12.9 ± 0.52 g.dL<sup>-1</sup> was noted in rats treated with 400 mg.kg<sup>-1</sup> of extract. Thus, the data indicate that the root extract could be considered a natural source for the treatment of anaemia.

© University of SS. Cyril and Methodius in Trnava

**Introduction**

Nowadays, many people suffer from anaemia. It is a global public health phenomenon affecting developed and developing countries via severe consequences for human health and economic and social development (WHO 2008). The most exposed are infants, children in intensive growth,

older adults, and pregnant women. It is thought to be responsible for 3.7 % to 12.8 % of maternal deaths during pregnancy and childbirth in Africa and South Asia (Khan *et al.* 2006). Several factors are responsible for the spread of anaemia: malnutrition, attacks by blood parasites such as trypanosomes, plasmodium, and helminths. It has also been reported that the high demand for the

Nova Biotechnol Chim (202x) xx(x): e978

developing fetus during pregnancy is a factor in anaemia.

There are many types of anaemia. One of them is hemolytic anaemia, the most frequent sort defined as the destruction or elimination of red blood cells (RBCs) from the circulation before their average life span of 120 days (Dhaliwal *et al.* 2004). It is caused by the abnormality of the constituents of RBC (hemoglobin, an enzyme of energy metabolism of RBC or constitutive protein of the membrane-extrinsic factor). Also by infectious agents, mechanical factors, toxins, etc. (Loustau *et al.* 2011).

Since ancient times, medicinal plants have been considered essential products for the health of communities and individuals. They contain bioactive substances used in traditional medicine and as precursors in the synthesis of valuable drugs at the industrial level.

Interestingly, many plants including *Phyllanthus emblica* L., *Moringa oleifera* L., *Boerhavia diffusa* L., *Hemidesmus indicus* L., *Centella asiatica* L., *Ageratum conyzoides* L., *Hemidesmus indicus* L., *Momordica charantia* L., *Phyllanthus amarus* L., *Punica granatum* L., *Ocimum tenuiflorum* L., *Solanum americanum* L., *Ichnocarpus frutescens* L. are used in the treatment of anaemia, as they are sources of iron and minerals (Silja *et al.* 2008).

*Rubia tinctorum* belongs to the Rubiaceae family, comprising 6,000 species (Sharifzadeh *et al.* 2014). It is also known as “El foua” (Ezzaki *et al.* 2021), growing in the northern regions of Africa, the Mediterranean regions of Spain, and some areas of Asia, and it is cultivated in the central and western regions of Iran (Sharifzadeh *et al.* 2014). *Rubia tinctorum* has been widely used as a source of red color with its variants for textile dyeing for thousands of years (Degano *et al.* 2009). In addition, several ethnobotanical studies have reported its use in the treatment of various diseases, such as diarrhea (El Haouari and Rosado 2016), rheumatism, cardiovascular diseases (Jouad *et al.* 2001), and kidney stones (Agarwal and Varma 2015). Moreover, it is really appreciated by Moroccan women as a purgative after childbirth (Ezzaki *et al.* 2021). Besides, there are numerous biological studies on *R. tinctorum* that have demonstrated its therapeutic potential as anti-platelet agent, antitumor, hepatoprotective,

antimicrobial, diuretic, and stones inhibitory activities (Sharifzadeh *et al.* 2014; Marhoume *et al.* 2019; Eltamany *et al.* 2020; Hoseinzadeh *et al.* 2020).

To the best of our knowledge, no studies have been performed on the anti-anaemic activity of *R. tinctorum* extract so far. Thus, this study aims to evaluate the anti-anaemic potential of *R. tinctorum* aqueous extract on an experimental model of phenylhydrazine-induced hemolytic anaemia and to identify its phytochemical compounds.

## Experimental

### Chemicals

Distilled water, ammonium formate, acetonitrile, formic acid, sulfuric acid (98 %), chloric acid, hydrochloric acid, ammonium thiocyanate, sodium chloride (9 %), phenylhydrazine, orofer plus (Bottle of 100 mL as a drinkable solution, iron III poly maltose hydroxide, 20 mg. mL<sup>-1</sup> of iron).

### Plant material

The *Rubia tinctorum* plant was gathered in June 2018 in Sidi Bel Abbes (North-West Algeria). It was identified by Dr. Righi K, Department of Botany, University of Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria. The plant material was shade-dried in a room for 15 days and pulverized using an electrical grinder. A voucher specimen plant has been deposited at the herbarium of the Sciences Faculty, Mustapha Stambouli University (HAM 02 74).

### Preparation of aqueous root extract

The aqueous extract of *Rubia tinctorum* L. was prepared by maceration, using 10 g of powders of the root soaked in 100 mL of distilled water for 2 days with constant stirring. The mixture was filtered through Whatman filter paper No. 1. thereafter the extract was freeze-dried. The obtained residue was maintained at 4 °C (Bruneton 1999).

#### LC-ESI-MS/MS analysis

The aqueous root extract of *Rubia tinctorum* was subjected to LC-ESI-MS/MS analysis. The compounds were separated on an Agilent Poroshell 120 EC-C18 column in reverse phase (100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm). The column temperature was fixed at 25 °C and the volume of injection was 5 μL. The mobile phase consisted of a linear gradient of acetonitrile -20 mM ammonium formate (pH 3.0) (15/100; v/v). The injection rate was 1 mL.min<sup>-1</sup>.

The elution gradient was eluent A (water + 5mM ammonium formate) and eluent B (acetonitrile + 0.1 % formic acid), the solvent flow rate was set to 0.250 mL.min<sup>-1</sup> and the gradient was as follows: 1 min 40 % A – 60 % B; 2 min 70 % A – 30 % B; 3 min 70 % A – 30 % B; 4 min 40 % A – 60 % B; 5 min 10 % A – 90 % B. The Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer system model tandem mass spectrometer and the electrospray ionization source (ESI) operating in negative and positive ionization modes were used. The conditions of the LC-ESI-MS/MS analysis were as follows: capillary temperature 350 °C, nebulizer N<sub>2</sub> gas flow rate 15 L.min<sup>-1</sup>, fragmentor voltage -4,400 V. The collision energies (CE) were optimized to generate optimal phytochemical fragmentation and maximum transmission of the desired product ions.

#### LC-MS/MS method validation analysis

To quantify 37 phytochemicals (17 flavonoids, 15 phenolic acids, 3 non-phenolic organic acids, 1 phenolic aldehyde, and 1 benzopyrene) in *Rubia tinctorum* extract, a comprehensive LC-MS/MS method was optimised and validated (Yilmaz *et al.* 2018). Spike and non-spike standard solutions were used to determine the performance characteristics of the method.

The developed method has been validated in terms of linearity, inter-day and intra-day precision (repeatability), accuracy (recovery), limits of detection and quantification (LOD/LOQ), and relative standard uncertainty (U % at 95 % confidence level (k = 2)). The parameters are listed in Table 1.

#### Determination of Na, Ca, K

In a glass flask, 3 g of plant powder (roots) was mixed with 8 mL of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %) and 2 mL of HClO<sub>3</sub> (60 %) for 24 h, all placed at a temperature of 80 °C using a sand bath until the digestion material became a white powder. After that, 8 mL of distilled water was added to the powder. Finally, the mineral elements were measured by a flame atomic absorption spectrophotometer (NV202 spectrophotometer) (Aboud 2010).

#### Determination of iron (Fe)

The iron was quantified spectrophotometrically by the thiocyanate method. For this, the sample was prepared using 5 g of the root powder, placed in a muffle furnace at 600 °C for 3 h until completely transformed into ashes. Ashes were mixed with 1 M hydrochloric acid and 5 mL of distilled water and then filtered.

Thiocyanate solution was prepared using 38 g of ammonium thiocyanate (NH<sub>4</sub>SCN), completed with distilled water to a final volume of 500 mL. For the standard curve, optical density was determined at 490 nm for five standard iron solutions (iron concentrations: 2, 4, 6, 8, 10 × 10<sup>-5</sup> M) mixed by vortexing with 10 mL of thiocyanate solution. Iron content in the root sample was determined using 10 mL of the sample placed in a dry test tube, then mixed with 10 mL of the prepared ammonium thiocyanate solution. The optical density of the mixture was read at 490 nm. Iron content was deduced from the standard curve. The results were expressed in mg iron.100 g<sup>-1</sup> of the sample (Bhuvaneswari *et al.* 2015).

#### Experimental animals

Healthy male rats (aged 8 weeks, weighing 162 – 233 g) were used for acute and anti-anaemic studies. They were obtained from the animal house unit of the University of Mustapha Stambouli, Mascara (Algeria), and kept in the experiment room under normal environmental conditions with a temperature of 22 ± 3 °C, relative humidity of 30 – 70 %, and 12 h light/dark cycle, with free access to a regular diet and water.

Nova Biotechnol Chim (202x) xx(x): e978

The experimental protocols were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Mascarian University, Mustapha Stambouli (ARECM) according to the Adelaide University Animal Ethics Committee (Ethics number M/76/98).

#### *Acute toxicity test*

To assess the acute oral toxicity of *Rubia tinctorum* aqueous extract, the protocol of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 2002; Kifayatullah *et al.* 2015) was used with slight modifications. The procedures were carried out in two stages. For each stage 3 Wistar rats were used. Twelve male rats weighing  $170 \pm 7.5$  and  $232 \pm 7.02$  g were randomly divided into two groups of 6 each. A single dose of aqueous extract was dissolved in distilled water at  $2,000 \text{ mg.kg}^{-1}$  body weight, and it was administered to the first group by oral gavage while the control group received only NaCl 9 %. All animals were submitted to overnight fasting. The animals were under surveillance for the first 4 h after administration, and no food was given during this time. After that, they were observed for 14 days once a day for physical and behavioural changes.

#### *Relative organ weight*

To determine the relative weight, on the 15<sup>th</sup> day of the experiment, the animals were sacrificed (anesthesia), the weights of the following organs were recorded in grams: liver, lungs, kidneys, heart, and spleen. Relative organ weight was calculated as follow (Eq. 1; Kifayatullah *et al.* 2015):

$$(\text{Organ weight/body weight of the rat (on the day of sacrifice)}) \times 100 \% \quad (1)$$

#### *The percentage change in body weight*

The percentage change in body weight of the experimental animals was calculated (Eq. 2; Desai and Singh 2009):

$$(\text{final body weight-initial body weight / final body weight}) \times 100 \quad (2)$$

#### *Analysis of hematological parameter for toxicity tests*

On the 15<sup>th</sup> day, all the animals were sacrificed by anesthesia. The blood was collected from each rat into an EDTA tube by an abdominal puncture. Blood parameters were assessed using an automatic counter (Abacus 380).

#### *Analysis of biochemical parameter*

Biochemical analyses were performed on their serum after the centrifugation of the blood. The biochemical parameters, including aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), glycemia, urea, and creatinine were determined for the control groups and treated groups. All analyses were performed using a clinical chemistry analyzer (Mindray BA-88A).

#### *Anaemia test*

It was carried out according to the approach used by (Pandey *et al.* 2016), with some modifications. Anaemia was induced in rats by intraperitoneal injection of phenylhydrazine (PHZ) at  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  for 2 days. Rats that presented anaemia with a hemoglobin concentration of less than  $13 \text{ g.L}^{-1}$  were used in the study (Diallo *et al.* 2008).

The anaemic rats were divided into five groups (6 animals per group) and treated daily for 15 days. All four groups of animals were treated with phenylhydrazine (PHZ) except Group (I). The first group (control group) received (NaCl (0.9);  $10 \text{ mL.kg}^{-1}$  body body weight). Group II (negative group) received (PHZ i.p.  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  body weight) once daily for 2 consecutive days + (NaCl (0.9);  $10 \text{ mL.kg}^{-1}$  body weight). Group III (positive control) received (PHZ i.p.  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  body weight) once daily for 2 consecutive days + Standard treatment (Orofer plus). Group IV received (PHZ i.p.  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  body weight) once daily for 2 consecutive days + Extract ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Group V received (PHZ i.p.  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  body weight) once daily for 2 consecutive days + Extract ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). All tested drugs were administered orally.

*Analysis of hematological parameters for LC-ESI-MS/MS analysis of antianaemic activity tests*

The blood was collected from each rat into an EDTA tube by ocular puncture before the induction of anaemia (day 1); during the test (day 3); and at the end of the test (day 15), were evaluated for blood parameters using an automatic counter (Abacus 380) (Pandey *et al.* 2016).

*Statistical analysis*

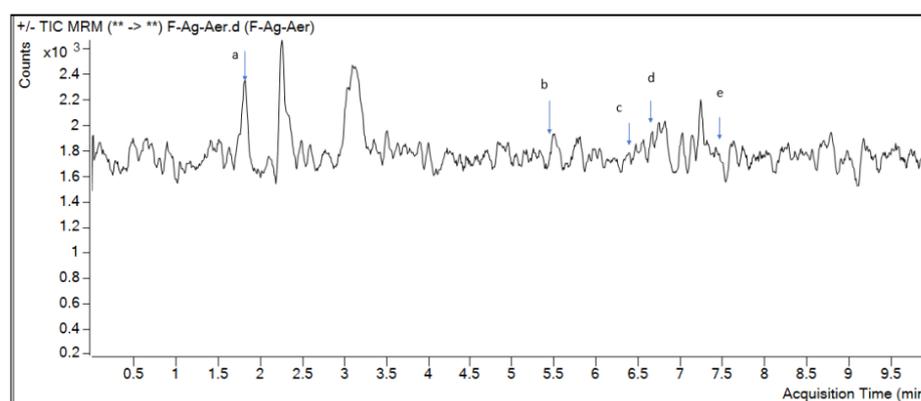
Data analysis was carried out using SPSS IBM 23 statistical package. Analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD tests and *t*-test were used. The data were presented as mean  $\pm$  standard error,  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**Results and Discussion**

In the present study, aqueous extracts of *Rubia tinctorum* roots were assessed for phytochemical composition, acute toxicity, and antianaemic activity thereof. The percentage extraction yield of the extracts was recorded as 18.8 %.

The phytochemical profile of *R. tinctorum* root aqueous extracts investigated by LC-ESI-MS/MS equipment report Fig. 1 and Table 1.

LC-ESI-MS/MS analysis of *Rubia tinctorum* aqueous extract revealed the presence of many phytochemical compounds. The highest amount was attributed to citric acid ( $165.80 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) followed by ascorbic acid ( $64.99 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), vanillic acid ( $52.88 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), epicatechin ( $50.78 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), and 4-hydroxybenzoic acid ( $49.93 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), and eleven other compounds with concentrations varying between  $1.028 - 47.42 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ .



**Fig. 1.** LC-ESI-MS/MS chromatogram of *Rubia tinctorum* aqueous extract. a – citric acid; b – 5-O-caffeoylquinic acid; c – 4-hydroxybenzoic acid; d – vanillic acid; e – trans-ferulic acid.

Although *Rubia tinctorum* roots are widely used in traditional medicine (Manojlovic *et al.* 2005), a few studies were found in the literature on the phytochemicals composition of aqueous extract thereof. According to the previous findings, a large variety of phenolic compounds were identified in the *Rubia tinctorum* root. A study by Aboud (2010) revealed the presence of anthocyanidins, chalcone, and kaempferol. Similarly, a previous investigation using LC-ESI-MS/MS reported the presence of further compounds that are munjistin,

pseudopurpurin, rubiadin, ruberythric acid, pseudopurpurin, lucidin, primeveroside, and nor-damnacanthal (Lajkó *et al.* 2015). Thus, comparing these results, the richness of *R. tinctorum* root in terms of phenolic compounds' diversity can be confirmed.

Nova Biotechnol Chim (202x) xx(x): e978

*Mineral composition of aqueous extract*

Table 2. shows the mineral content of *Rubia tinctorum* roots. The results revealed the macro mineral elements (sodium (Na), potassium (K), calcium (Ca), and micro mineral elements (iron (Fe)) at varying concentrations. These results are

consistent with those of Aboud (2010), who indicated that the concentrations of sodium (Na), potassium (K), and iron (Fe) in the root of *Rubia tinctorum* were higher, whereas calcium (Ca) was found to be at the lowest concentration.

**Table 2.** Mineral composition of *Rubia tinctorum* root.

| Mineral component | Na           | K           | Ca           | Fe          |
|-------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| Content. ppm      | 0.115 ± 0.01 | 1.68 ± 0.01 | 0.043 ± 0.02 | 3.32 ± 0.07 |

The data present the mean value of three replicates ± SD. ppm – parts per million; Na – sodium; K – potassium; Ca – calcium and Fe – iron.

*Study of acute toxicity*

In the present study, the acute toxicity of the extract was investigated using a single dose of 2000 mg/kg/body weight of the extract on 12 rats. The mortality or morbidity was determined after 14 days. Besides morbidity, behavioral changes such as respiration, temperature, convulsions, diarrhea, shaking, and itching were examined during the period of the test, as reported in Table 3. The administration of a single dose of aqueous extract did not cause any sign of toxicity (morbidity or mortality) in all animals. Similarly, no behavioral changes were observed in rats.

On the other hand, our data showed no significant change ( $P>0.05$ ) in the liver, kidney, heart, and pancreas weights in either treated or untreated rats after 15 days (Table 4).

Besides, macroscopic observations of the organs displayed neither morphological alterations nor changes in their color texture.

The effect of the aqueous extract of *Rubia tinctorum* on haematological parameters is summarized in Table 5. We observed an increase in the platelet count (PLT), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCH), mean corpuscular volume (MCV) in treated rats ( $P>0.05$ ). However, white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), hemoglobin (HB), and lymphocytes (LMY) were significantly decreased. Regarding the biochemical parameter levels, the results are shown in Table 6. Compared to the control group, no significant changes ( $P>0.05$ ) in creatinine (Crea), glutamate-pyruvate transaminase

(TGP), triglycerides (Triglyc) and cholesterol levels were observed. Moreover, a significant decrease in urea and cholesterol was detected ( $P<0.05$ ).

According to our results, DL50 is superior to 2,000 mg.kg<sup>-1</sup>. A single dose of 2,000 mg.kg<sup>-1</sup> did not produce any visible signs or symptoms of toxicity in all treated animals. In addition, we observed no changes in the rat's behavior, no toxic symptoms, no changes in hematological parameters, and no deaths. Therefore, based on the OCDE method of acute toxicity, the *Rubia tinctorum* aqueous extract can be considered a non-toxic substrate (OECD 2002).

**Table 3.** Clinical signs in acute oral toxicity study of *Rubia tinctorum* aqueous extract in Wistar rats exposed for a dose 2,000 mg.kg<sup>-1</sup>.

| Observation         | Control group | Treated group |
|---------------------|---------------|---------------|
| Temperature         | NR            | NR            |
| Food intake         | NR            | NR            |
| Rate of respiration | NR            | NR            |
| Change in skin      | NO            | NO            |
| Eye color           | NR            | NR            |
| Diarrhea            | NP            | NP            |
| General physique    | NR            | NR            |
| Coma                | NO            | NO            |
| Death               | NO            | NO            |
| Drowsiness          | NP            | NP            |

Notes: NR – normal; NO – not observed; NP – not present.

Table 1. *Rubia tinctorum* L. roots aqueous extracts LC-ESI-MS/MS analysis.

| Compound                | Rt    | Ion transitions<br>[m/z] | Ion.<br>mode | R2    | DW<br>[ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] | Linearity range<br>[ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ] | LOD<br>[ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ] | LOQ<br>[ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ] | Recovery<br>[%] |
|-------------------------|-------|--------------------------|--------------|-------|--|--|--|--|-----------------|
| Tartaric acid           | 1.696 | 149-87                   | Negative     | 0.999 | ND   | 62.5-2,000   | 12.309                                     | 37.3                                       | 100.7           |
| Citric acid             | 1.793 | 191.1-111                | Negative     | 0.999 | 165.8091                                   | 125-2,000  | 6.237                                      | 18.9                                       | 100.55          |
| Ascorbic acid           | 1.802 | 175.1-114.9              | Negative     | 0.999 | 64.9996                                    | 62.5-2,000   | 7.75                                       | 23.5                                       | 99.6            |
| Fumaric acid            | 1.821 | 115-71.1                 | Negative     | 0.999 | 16.0948                                    | 31.25-2,000  | 6.43                                       | 19.5                                       | 100.77          |
| Maleic acid             | 1.821 | 115-71.2                 | Negative     | 0.999 | ND   | 62.5-2,000   | 6  | 18.2                                       | 99.8            |
| Chicoric acid           | 1.989 | 472.8-310.5              | Negative     | 0.999 | 31.7746                                    | 250-2,000  | 50.16                                      | 152  | 89.1            |
| Gallic acid             | 2.605 | 169-125                  | Negative     | 0.998 | ND   | 62.5-2,000   | 9  | 54.6                                       | 98.9            |
| 5-O-caffeoylquinic acid | 5.526 | 353-191                  | Negative     | 0.999 | 47.4291                                    | 250-2,000  | 64.68                                      | 196  | 86.2            |
| 4-Hydroxybenzoic acid   | 6.531 | 137-93.1                 | Negative     | 0.999 | 49.9302                                    | 62.5-2,000   | 2.376                                      | 7.2  | 100.7           |
| Catechin                | 6.660 | 288.9-245.1              | Negative     | 0.999 | 31.4229                                    | 62.5-2,000   | 2.57                                       | 7.8  | 100             |
| Epicatechin             | 6.666 | 353-191                  | Positive     | 0.998 | 50.7805                                    | 62.5-2,000   | 2.9  | 8.8  | 100.6           |
| Hesperidin              | 6.674 | 611.3-357                | Positive     | 0.999 | ND   | 125-2,000  | 32.67                                      | 99   | 99.5            |
| Rutin                   | 6.675 | 608.9-299.4              | Negative     | 0.997 | ND   | 125-2,000  | 28.5                                       | 85   | 97.8            |
| Vanillic acid           | 6.687 | 167-151.8                | Negative     | 0.998 | 52.8816                                    | 62.5-2,000   | 2.54                                       | 7.7  | 100             |
| Syringic acid           | 6.703 | 197.1-181.8              | Negative     | 0.999 | ND   | 62.5-2,000   | 4.22                                       | 12.8                                       | 100.5           |
| Caffeic acid            | 6.703 | 178.9-135.1              | Negative     | 0.999 | 1.0283                                     | 125-2,000  | 25.74                                      | 78   | 99.7            |
| Luteolin -7-glucoside   | 6.740 | 449-286.9                | Positive     | 0.997 | ND   | 62.5-1,000   | 16.5                                       | 50   | 100.6           |
| Apigenin-7-O-glucoside  | 6.808 | 430.8-267.4              | Negative     | 0.998 | ND   | 125-1,000  | 18.24                                      | 55.3                                       | 100.8           |
| Quercetin-3-glucoside   | 6.816 | 432.7-299.5              | Negative     | 0.995 | ND   | 62.5-2,000   | 9.87                                       | 29.9                                       | 100.1           |
| Oleuropein              | 6.849 | 539.1-275.1              | Negative     | 0.999 | ND   | 62.5-2,000   | 17.35                                      | 52.6                                       | 101.9           |
| Rosmarinic acid         | 6.875 | 358.9-160.7              | Negative     | 0.998 | 27.9655                                    | 62.5-2,000   | 15.9                                       | 48.2                                       | 100.6           |
| p-coumaric acid         | 6.919 | 163-119                  | Negative     | 0.999 | 10.2367                                    | 62.5-2,000   | 3  | 9.1  | 100.3           |
| 4-Hydroxybenzaldehyd    | 6.929 | 121-92                   | Negative     | 0.999 | 10.79                                      | 31.25-2,000  | 1.91                                       | 5.7  | 99.9            |
| Trans-ferulic acid      | 6.968 | 193.1-133.9              | Negative     | 0.998 | 51.0571                                    | 31.25-2,000  | 7.26                                       | 22.3                                       | 100.3           |
| Gentisic acid           | 7.243 | 153-109                  | Negative     | 0.999 | 14.1623                                    | 250-2,000  | 44.55                                      | 135  | 99.9            |
| Protocatechuic acid     | 7.243 | 152.9-108.9              | Negative     | 0.999 | 30.2216                                    | 62.5-2,000   | 15.44                                      | 46.8                                       | 100.4           |
| Quercetin               | 7.306 | 300.7-150.9              | Negative     | 0.997 | ND   | 62.5-1,000   | 14.85                                      | 45   | 98.8            |
| Apigenin                | 7.555 | 269-117                  | Negative     | 0.999 | ND   | 125-2,000  | 17.82                                      | 54   | 101.2           |
| Naringenin              | 7.588 | 270.9-119.1              | Negative     | 0.999 | ND   | 125-2,000  | 24.37                                      | 73.8                                       | 101.2           |
| Trans-cinnamic acid     | 7.591 | 148.8-104.8              | Negative     | 0.999 | 26.1761                                    | 62.5-2,000   | 13.59                                      | 41.2                                       | 102             |
| Kaempferol              | 7.613 | 284.9-116.9              | Negative     | 0.998 | ND   | 62.5-2,000   | 12.39                                      | 37.5                                       | 101.1           |

Rt – retention time, FC – final concentration, ND – not detected, R2 – coefficient of determination, RSD – relative standard deviation, LOD/LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) – limit of detection/quantification, DW – dry weight.

**Table 4.** Effects of the aqueous extract of *Rubia tinctorum* on the relative weight of organs and relative body weight in rats during acute toxicity study.

| Group  | Relative organ weight [%] |              |             |              |              | Relative body weight [%] |
|--------|---------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------------------|
|        | Heart                     | Liver        | Spleen      | Kidney       | Lung         |                          |
| Temoin | 0.31 ± 0.02               | 3.16 ± 0.44  | 0.32 ± 0.03 | 0.63 ± 0.04  | 0.633 ± 0.03 | 4.88                     |
| ER     | 0.376 ± 0.04              | 3.606 ± 0.39 | 0.35 ± 0.06 | 0.608 ± 0.04 | 0.733 ± 0.12 | 13.16                    |

The data present the mean value of three replicates ± SD. Results were analysed by standard *t*-test, treated group were compared to the control group,  $P > 0.05$ . ER – group treated with aqueous extract of *Rubia tinctorum*.

These results are in agreement with those of Marhoume *et al.* (2019) who found that the butanolic extract had no toxic effects on treated rats. Moreover, it was consistent with the study of Karim *et al.* (2010), reporting that the tolerated dose of aqueous extract of *Rubia tinctorum* was up to 10 g.kg<sup>-1</sup> body weight in albino mice, and no mortality and toxic symptoms were observed.

**Table 5.** Effects of *Rubia tinctorum* aqueous extract on haematological parameter in rats during 14 d of oral acute toxicity study.

| Haematological parameters              | Control group  | Treated group (2,000 mg. mL <sup>-1</sup> ) |
|--|----------------|---|
| WBC /10 <sup>3</sup> μL <sup>-1</sup>  | 12.2466 ± 1.30 | 9.43 ± 1.09                                 |
| LYM /10 <sup>3</sup> μL <sup>-1</sup>  | 7.965 ± 0.47   | 6.3433 ± 1.62                               |
| RBC / 10 <sup>6</sup> μL <sup>-1</sup> | 9.263 ± 0.30   | 7.26 ± 0.68                                 |
| HB / g.dL <sup>-1</sup>                | 17.06 ± 1.19   | 14.166 ± 1.15                               |
| CCMH /g. dL <sup>-1</sup>              | 33.9 ± 0.78    | 33.9 ± 0.78                                 |
| PLT /10 <sup>3</sup> μL <sup>-1</sup>  | 625.33 ± 108.7 | 652 ± 37                                    |
| TCMH / pg                              | 18.433 ± 0.83  | 19.5 ± 0.26                                 |
| PCV / %                                | 54.33 ± 3.05   | 57.333 ± 0.57                               |

The data presents the mean value of three replicates ± SD. Results were analysed by standard *t*-test, the treated group was compared to the control group,  $P > 0.05$ . RBC – red blood cells; WBC – white blood cells; HB – hemoglobin; LMY – lymphocytes; PLT – platelet count; CCMH – mean corpuscular hemoglobin concentration in red blood cells; TCMH – mean corpuscular hemoglobin content in hematite; PCV – packed cell volume.

**Table 7.** Estimation of haematological parameter before induction of the anaemia.

| Hematological parameter               | GR(I)           | GR(II)          | GR(III)         | GR (IV)          | GR(V)           |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| RBC /10 <sup>3</sup> μL <sup>-1</sup> | 8.26 ± 0.3**    | 7 ± 0.03***     | 8.76 ± 0.25***  | 8.23 ± 0.078***  | 7.84 ± 0.03***  |
| HB / g.dL <sup>-1</sup>               | 17.6 ± 1.19**   | 15.7 ± 0.43***  | 17.9 ± 0.31     | 16.3 ± 0.11***   | 16.3 ± 0.06***  |
| HT / %                                | 45.83 ± 2.30*** | 43.28 ± 0.22*** | 50.96 ± 0.14*** | 47.99 ± 0.35***  | 46.38 ± 0.03    |
| CCMH /g. dL <sup>-1</sup>             | 34.3 ± 0.72***  | 33.8 ± 0.02***  | 35.2 ± 0.32***  | 33.8 ± 0.27***   | 35.1 ± 2.23***  |
| MCH /fl                               | 17.7 ± 0.64***  | 19.5 ± 0.02     | 35.2 ± 0.32***  | 33.8 ± 0.27***   | 35.1 ± 2.23***  |
| PCV / %                               | 40.59 ± 0.12*** | 43.28 ± 0.03*** | 50.96 ± 0.71    | 47.99 ± 0.001*** | 46.38 ± 0.04*** |

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , significantly different from the control group. Results were analyzed by ANOVA *test*. Values expressed are means ± SD (n = 3). RBC – red blood cells; HB – hemoglobin; PCV – packed cell volume; HT – haematocrit; CCMH – mean corpuscular hemoglobin concentration; MCH – mean corpuscular hemoglobin.

**Table 6.** Effects of *Rubia tinctorum* aqueous extract on biochemical parameter in rats during 14 d of oral acute toxicity study.

| Biochemical parameter | Control group | Treated group (2,000 mg. mL <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------|---------------|---|
| Uree                  | 0.56 ± 0.01   | 0.386 ± 0.03                                |
| Crea                  | 4.76 ± 0.30   | 4.7 ± 0.26                                  |
| TGO                   | 66.69 ± 20.81 | 54.58 ± 13.65                               |
| TGP                   | 32.3 ± 3.39   | 32.2 ± 6.89                                 |
| Cholesterol           | 0.66 ± 0.05   | 0.48 ± 0.10                                 |
| Triglyceride          | 0.4 ± 0.06    | 0.423 ± 0.14                                |

The data presents the mean value of three replicates ± SD. Results were analysed by standard *t*-test, treated group were compared to the control group;  $P > 0.05$ . Crea – creatinine; TGP – glutamate-pyruvate transaminase; TGO – aspartate-amino transferase.

#### Anti-anaemic activity

The effect of acute administration of root aqueous extract on haematological parameters is shown in Tables 7, 8, and 9. The haematological parameters were measured before the treatment (D0), after phenylhydrazine-induced anemia (D2), and up to 15 days.

As stated in Table 8, the treatment with phenylhydrazine decreased RBC, HB, HT, MCH, MCV levels and increased MCHC level compared to the control group.

**Table 8.** Estimation of haematological parameter after induction of anaemia.

| Hematological parameter               | GR(I)           | GR(II)          | GR(III)         | GR(IV)          | GR(V)           |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| RBC /10 <sup>3</sup> μL <sup>-1</sup> | 8.32 ± 0.51*    | 4.25 ± 0.035*** | 4.66 ± 0.04***  | 4.72 ± 0.21***  | 4.63 ± 0.02***  |
| Hb g.dL <sup>-1</sup>                 | 17.78 ± 0.26*   | 11.35 ± 0.35*** | 11.1 ± 0.21     | 12.05 ± 0.15*** | 12.85 ± 0.07*** |
| Ht / %                                | 45.88 ± 0.33*** | 35.98 ± 2.26*** | 38.01 ± 0.33*** | 36.58 ± 0.35    | 38.12 ± 0.02    |
| CCMH /g. dL <sup>-1</sup>             | 33.9 ± 0.47***  | 39.85 ± 0.49    | 40 ± 0.21***    | 52.8 ± 3.45***  | 37.35 ± 3.04*** |
| MCH /fl                               | 18.81 ± 0.51*** | 17.8 ± 1.41***  | 18.6 ± 0.49     | 17.4 ± 0.3***   | 18.15 ± 0.07    |
| PCV / %                               | 41.33 ± 2.4***  | 33.48 ± 5.79*** | 39.25 ± 2.16    | 32.03 ± 5.86*** | 42.62 ± 3.55    |

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , significantly different from the control group. Results were analyzed by ANOVA test. Values expressed are means ± SD (n = 3). RBC – red blood cells; HB – hemoglobin; PCV– packed cell volume; HT – haematocrit; CCMH – mean corpuscular hemoglobin concentration; MCH – mean corpuscular hemoglobin.

However, iron and root aqueous extract administration significantly raised the levels of RBC, HT, HB, MCH, and PCV ( $P < 0.001$ ) (Table 9). Indeed, iron treatment exhibited strong improvement in the RBC levels (from  $4.66 \pm 0.04 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$  to  $6.96 \pm 1.25 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ). Similarly, the aqueous extract enhanced RBC levels in a dose-dependent manner, by 69.82 and 71.67 % for GR IV and GR V, respectively. Moreover, an increase of hemoglobin (HB) and hematocrit (Ht) in treated groups (III, IV, and V) was noted as compared to the anemic rat group (GR II).

Our results revealed that MCHC increased considerably in all groups after treatment with phenylhydrazine. However, aqueous extract and iron resulted in a decrease of MCHC level from

$38.01 \pm 0.33$ ,  $32.09 \pm 1.88$ ,  $38.12 \pm 0.02 \text{ g. dL}^{-1}$  to  $30.55 \pm 2.89$ ,  $31.3 \pm 0.92$ ,  $32.86 \pm 0.65 \text{ g.dL}^{-1}$  in GR III, GR IV and GR V, respectively.

Our results are similar to those of Pandey *et al.* (2016) who reported a significant reduction in haematological parameters in PHZ-injected rats compared to a control group. This result is related to the toxicity of phenylhydrazine. Indeed, the administration of phenylhydrazine into the bloodstream causes oxidative stress in erythrocytes, membrane disruption, and embrittlement as well as hemolysis which triggers events such as premature ageing of erythrocytes, resulting in the lack of hemoglobin and circulating erythrocyte (Ogbe *et al.* 2010; Marhoume *et al.* 2019).

**Table 9.** Estimation of haematological parameter after treatment.

| Haematological parameter              | GR(I)           | GR(II)          | GR(III)         | GR (IV)         | GR(V)           |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| RBC /10 <sup>3</sup> μL <sup>-1</sup> | 8.66 ± 0.03*    | 6.07 ± 0.30***  | 6.96 ± 1.25***  | 6.76 ± 0.35***  | 6.46 ± 0.17***  |
| HB / g.dL <sup>-1</sup>               | 17.89 ± 0.41**  | 11.95 ± 0.21*** | 13.25 ± 0.77*   | 12.66 ± 0.69*** | 12.9 ± 0.52***  |
| HT / %                                | 46.02 ± 1.45**  | 35.28 ± 0.86*** | 39.6 ± 1.27*    | 32.09 ± 1.88*** | 38.13 ± 1.70*** |
| CCMH g.dL <sup>-1</sup>               | 33.97 ± 0.85*** | 32.2 ± 0.28***  | 30.55 ± 2.89*** | 31.3 ± 0.92**   | 32.86 ± 0.65    |
| MCH / fl <sup>-1</sup>                | 18.98 ± 0.10*** | 19.15 ± 0.07*   | 18.35 ± 1.90**  | 18.43 ± 0.61*** | 20.63 ± 2.08**  |
| PCV / %                               | 41.56 ± 0.78*** | 33.28 ± 0.86*** | 42.6 ± 1.27     | 34.09 ± 2.30*** | 43.13 ± 1.70**  |

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , significantly different from the control group. Results were analyzed by ANOVA test. Values expressed are means ± SD (n = 3). RBC – red blood cells; HB – hemoglobin; PCV– packed cell volume; HT – haematocrit; CCMH – mean corpuscular hemoglobin concentration; MCH – mean corpuscular hemoglobin.

As displayed in Table 9, the anaemia was restored by daily oral administration of *Rubia tinctorum* aqueous extract (200, 400 mg /kg/body weight) and iron for 15 days. To the best of our knowledge, this is the first study revealing the anti-anaemic activity of the *Rubia tinctorum* plant, thus rendering the comparison difficult.

There are several possible explanations for this finding. The first one is that it might be due to its

composition of polyphenols. As indicated in Table 2, most of the compounds detected and identified have been previously reported in the literature for their antioxidant and/or anti-inflammatory bioactivity. Ogbe *et al.* (2010) reported that secondary metabolites like flavonoids and alkaloids repair free radical damage to red blood cells and protect them from oxidative stress. Anthocyanins have been used in strengthening kidney function,

treating anaemia, promoting blood circulation, and eliminating blood stasis in traditional Chinese medicine (Sari *et al.* 2019). Moreover, Innih *et al.* (2020) reported that the aqueous leaf extract of *Spondias mombin* caused stimulation of the lymphoid follicle at different degrees, from mild to moderate and increased the number of red blood cells in the red pulp. Koriem *et al.* (2018) observed that oral administration of 5-O-caffeoylquinic acid for two-week protects against anaemia and mineral disturbances in 4-tert-octylphenol toxicity by enhancing oxidative stress and apoptosis in rats.

Furthermore, the return of haematological indices in the treated group to normal ranges are not necessarily related to the reported phytochemical constituents (Ohadoma 2016), which brings us to mineral elements. In fact, Musyoka *et al.* (2016) reported that copper and iron have synergetic effects promoting hematopoiesis. Moreover, Sheth *et al.* (2021) pointed out in their study that the anti-anaemic activity of Raktavardhak Kadha can be attributed to its iron content and it may prevent hemolytic anaemia induced by phenylhydrazine. Thus, it is not surprising to find a positive anti-anaemic effect in our study, as iron is the most abundant element in our plant.

Besides, the antianaemic effect of *Rubia tinctorum* could be due to the presence of vitamins such as ascorbic acid or organic acids. Many authors have demonstrated that vitamin B6, vitamin B12, vitamin C, vitamin E, and folic acid play an important role in the erythropoietic mechanism, especially in the presence of iron, copper, and other elements such as cobalt (Musyoka *et al.* 2016). A study performed by Zhang *et al.* (2020) on the effects of malic and citric acids on growth performance, antioxidant capacity, hematology, and immune response of *Carassius auratus gibelio* showed that the appropriate addition of citric acid and malic acid to the diet regulated hematological parameters and the expression of immune-related genes and improved the antioxidant capacity of *Carassius auratus gibelio* fish. Similarly, in a previous study (Salovaara *et al.* 2002), it was suggested that organic acids improve iron absorption. The researchers studied the effect of tartaric, malic, succinic, citric and oxalic, and fumaric acids on Fe (II) and Fe (III) uptake in the human epithelial cell line Caco-2. The results

showed that tartaric, malic, succinic, and fumaric acids increased the uptake of Fe (II) and Fe (III), and citric and oxalic acids increased the Fe (III) uptake. Based on these results, it can be stated that the presence of organic acids in our plant may be one of the factors that contributed to the anti-anaemic activity. Furthermore, Tang *et al.* (2013) found that citric acid and L-malic acid have protective effects on myocardial ischemia/reperfusion injury, which may be associated with their anti-inflammatory, antiplatelet aggregation, and direct protective effects on cardiomyocytes.

In summary, these findings showed remarkable antianaemic effects. It constitutes a scientific basis justifying the traditional use of *Rubia tinctorum* in anaemic disease.

On the other hand, in future studies, it will be better to measure also the ferritin and serum vitamin levels which are important markers in anaemia diagnostic.

## Conclusion

This is the first report on the antianaemic activity of the aqueous extract obtained from the roots of *Rubia tinctorum*. Based on these results, it can be concluded that the LD50 of the aqueous extract of *Rubia tinctorum* roots was much above 2,000 mg.kg<sup>-1</sup> and that oral administration of this extract up to 400 mg.kg<sup>-1</sup> is safe for nutritious and therapeutic uses. Furthermore, it can be suggested that the root of *Rubia tinctorum* L. has an anti-anaemic effect, inhibiting the hemolysis of red blood cells. The antianaemic activity may be due to the composition of the extract contents including polyphenols, iron, and other non-identified molecules. Therefore, *Rubia tinctorum* extract could be a promising treatment for anaemia. Further studies are required to understand the mechanism involved in the anti-anaemic action of *Rubia tinctorum* and to identify active constituents of the plant.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the University Mustapha Stambouli of Mascara (Department of Biology and Technology), Mr. Ahmed Belaoui, Mr. Yahia Khelef, Ms.

Faiza Fedoul, Ms. Sara Mechaala, Ms. Aicha Boutaleb for their help during this research.

### Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Reference

- Aboud AS (2010) HPLC analysis of *Rubia tinctorum* and its effect of methanol and aqueous extract on bacteria isolated from burns infection. *ANJS*. 13: 166-175.
- Agarwal K, Varma R (2015) Ethnobotanical study of antilithic plants of Bhopal district. *J. Ethnopharm.* 174: 17-24.
- Bluveneswari S, Joshi M, D'Souza A (2015) Quantitative analysis of iron and ascorbic acid contents in locally consumed fruits and vegetables. *Int. Res. J. Biological Sci.* 4: 42-47.
- Bruneton J (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Revue et Augmentée, 4<sup>th</sup> Ed., Tec & Doc., Paris, 1252 p.
- Degano I, Ribechini E, Modugno F, Colombini MP (2009) Analytical methods for the characterization of organic dyes in artworks and in historical textiles. *Appl. Spectrosc. Rev.* 44: 363-410.
- Desai A, Singh R (2009) The effects of water temperature and ration size on growth and body composition of fry of common carp, *Cyprinus carpio*. *J. Therm. Biol.* 34: 276-280.
- Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney Jr. LM (2004) Hemolytic anemia. *Am. Fam. Physician.* 69: 2599-2606.
- Diallo A, Gbeassou M, Vovor A, Eklu-Gadegbeku K, Aklikokou K, Agbonon A, Abena AA, de Souza C, Akpagana K (2008) Effect of *Tectona grandis* on phenylhydrazine-induced anaemia in rats. *Fitoterapia.* 79: 332-336.
- El Haouari M, Rosado JA (2016) Medicinal plants with antiplatelet activity. *Phytother. Res.* 30: 1059-1071.
- Eltamany EE, Nafie MS, Khodeer DM, El-Tanahy AH, Abdel-Kader MS, Badr JM, Abdelhameed RF, (2020) *Rubia tinctorum* root extracts: chemical profile and management of type II diabetes mellitus. *RSC Advances.* 10: 24159-24168.
- Ezzaki S, Failal I, Mtioui N, Khayat S, Zamed M, Medkouri G (2021) Acute renal failure induced by madder. *Clin. Case Rep. Int.* 5: 1227.
- Hoseinzadeh A, Sadeghipour Y, Behbudi G (2020) Investigation preliminary antimicrobial and anticancer properties: on topic *Rubia tinctorum* plant by using polydimethylsiloxane (CAR/PDMS). *Adv. Appl. NanoBio-Technol.* 1: 10-19.
- Innih SO, Omega SO, Omega K (2020) Hematinic effects of *Spondias mombin* and its protective role against the splenotoxic effect of phenylhydrazine. *Clin. Phytoscience.* 6: 1-9.
- Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M (2001) Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J. Ethnopharm.* 77: 175-182.
- Karim A, Mekhfi H, Ziyat A, Legssyer A, Bnouham M, Amrani S, Atmani F, Melhaoui A, Aziz M (2010) Anti-diarrhoeal activity of crude aqueous extract of *Rubia tinctorum* L. roots in rodents. *J. Smooth Muscle Res.* 46: 119-123.
- Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF (2006) WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *The Lancet.* 367: 1066-1074.
- Kifayatullah M, Mustafa MS, Sengupta P, Sarker MMR, Das A, Das SK (2015) Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. *J. Acute Dis.* 4: 309-315.
- Korim KM, Arbid MS, Gomaa, NE (2018) The role of chlorogenic acid supplementation in anemia and mineral disturbances induced by 4-tert-octylphenol toxicity. *J. Diet. Suppl.* 15: 55-71.
- Lajkó E, Bányai P, Zámbo Z, Kursinszki L, Szőke É, Köhidai L (2015) Targeted tumor therapy by *Rubia tinctorum* L.: analytical characterization of hydroxyanthraquinones and investigation of their selective cytotoxic, adhesion and migration modulator effects on melanoma cell lines (A2058 and HT168-M1). *Cancer Cell Int.* 15: 1-15.
- Loustau V, Guillaud C, Garçon L, Godeau B, Michel M (2011) Anémie hémolytique chez l'adulte: principales causes et démarche diagnostique. *La Presse Médicale.* 40: 470-485.
- Manojlovic NT, Solujic S, Sukdolak S, Milosev M (2005) Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. *Fitoterapia.* 76: 244-246.
- Marhoume FZ, Laaradia MA, Zaid Y, Laadraoui J, Oufquir S, Aboufatima R, Chait A, Bagri A (2019) Anti-aggregant effect of butanolic extract of *Rubia tinctorum* L. on platelets *in vitro* and *ex vivo*. 241: 111971.
- Musyoka T, Dorothy N, Wycliffe A, Juma K, Nzioka M (2016) *In vivo* antianaemic effect and safety of aqueous extracts of *Erythrina abyssinica* and *Zanthoxylum usambarense* in mice models. *J. Hematol. Thrombo. Dis.* 4: 1000242.
- OECD (2002) OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method.
- Ogbe RJ, Adoga GI, Abu A (2010). Antianaemic potentials of some plant extracts on phenyl hydrazine-induced anaemia in rabbits. *J. Med. Plant Res.* 4: 680-684.
- Ohadoma SC (2016) Pharmacological assessment of anti-anaemic activity of aqueous leaves extracts of *Telfairia occidentalis* and *Spondias mombin* in rats. *UK J. Pharm. Biosci.* 16: 3.
- Pandey S, Ganeshpurkar A, Bansal D, Dubey N (2016) Hematopoietic effect of *Amaranthus cruentus* extract on phenylhydrazine-induced toxicity in rats. *J. Diet. Suppl.* 13: 607-615.
- Salovaara S, Sandberg AS, Andlid T (2002) Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6233-6238.

## Nova Biotechnol Chim (202x) xx(x): e978

- Sari DRT, Cairns JRK, Safitri A, Fatchiyah F (2019) Virtual prediction of the delphinidin-3-O-glucoside and peonidin-3-O-glucoside as anti-inflammatory of TNF- $\alpha$  Signaling. *Acta Inform. Med.* 27: 152.
- Sharifzadeh M, Ebadi N, Manayi A, Kamalinejad M, Rezaeizadeh H, Mirabzadeh M, BONAKDAR YB, Khanavi M (2014) Effect of *Rubia tinctorum* L. extracts on carrageenan-induced Paw Edema in rats. *J. Med. Plants.* 3: 62-70
- Sheth PA, Pawar AT, Mote CS, More C (2021) Antianemic activity of polyherbal formulation. Raktavardhak Kadha, against phenylhydrazine-induced anemia in rats. *J. Ayurveda Integr. Med.* 12: 340-345.
- Silja V, Varma KS, Mohanan K (2008) Ethnomedicinal plant knowledge of the Mullu kuruma tribe of Wayanad district, Kerala. *Indian. J. Tradit. Knowl.* 7: 604-612.
- Tang X, Liu J, Dong W, Li P, Li L, Lin C, Zheng Y, Hou J, Li D (2013) The cardioprotective effects of citric acid and L-malic acid on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013: 820695.
- WHO (2008) Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO global database on anaemia, WHO, Geneva, Switzerland.
- Yilmaz MA, Ertas A, Yener I, Akdeniz M, Cakir O, Altun M, Temel H (2018). A comprehensive LC-MS/MS method validation for the quantitative investigation of 37 fingerprint phytochemicals in *Achillea* species: A detailed examination of *A. coarctata* and *A. monocephala*. *J. Pharm. Biomedical.* 154: 413-424.
- Zhang L, Zhang P, Xia C, Cheng Y, Guo X, Li Y (2020) Effects of malic acid and citric acid on growth performance, antioxidant capacity, haematology and immune response of *Carassius auratus gibelio*. *Aquacult. Res.* 51: 2766-2776.