

Résumé

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle Marocaine. Il s'agit d'une étude de quelques propriétés biologiques et pharmacologiques des extraits (éthanolique, butanolique, acétate d'éthyle et aqueux) des racines de *Rubia tinctorum* (RT). Notre travail s'articule autour de quatre axes à savoir : une enquête sur l'utilisation thérapeutique de RT auprès de la population locale de Marrakech, suivie d'une étude phytochimique, d'une étude de toxicité ainsi qu'une évaluation de quelques activités pharmacologiques (antioxydante, hépatoprotectrice, anti-lithiasique, antiagrégant plaquettaire, antinociceptive et antidépresseur).

Les résultats de notre enquête ont révélés que les femmes ont plus de connaissances sur l'effet thérapeutique (contre le syndrome anémique et l'atteinte hépatique) par rapport aux hommes. La deuxième partie est consacrée à l'extraction, au criblage phytochimique et à la caractérisation qualitative et quantitative de chaque extrait étudié de RT. Les résultats de l'étude phytochimique ont démontré que les extraits des racines de RT contiennent des molécules bioactives qui sont: la vanilline, l'acide rosmarinique, l'acide cinnamique, la quercétine, la catéchine, l'acide syringique, l'acide rétinique, l'acide férulique et la tyrosine. Les résultats portant sur l'étude de la toxicité aiguë et subaiguë de la plante chez les animaux ont montré que, l'extrait éthanolique total de RT ne cause aucun effet toxique chez les animaux ayant reçu oralement une dose maximale de 5 g/kg du poids corporel. En plus, nous n'avons enregistré aucun signe de toxicité chez les rats qui ont reçu oralement l'extrait éthanolique à différentes doses (0.5, 1, 2, 3.5g/kg. PC) quotidiennement pendant 14 jours.

La quatrième partie de ce travail a été consacré à l'évaluation de certaines activités biologiques et pharmacologiques de ces extraits, il s'agit de l'activité antioxydante, de l'activité hépatoprotectrice, de l'activité anti-lithiasique, de l'activité antiagrégant plaquettaire, de l'activité anti-nociceptive et de l'activité antidépressive. Les résultats obtenus ont montré que les extraits butanolique et éthanolique de RT ont exhibé un pouvoir antioxydant significativement plus important en comparaison avec les extraits aqueux et d'acétate d'éthyle. L'extrait éthanolique a montré qu'il exerce plusieurs effets bénéfiques tels que : l'activité anti-nociceptive, et antidépressive, antilithique et enfin hépatoprotectrice. D'autre part, la fraction aqueuse testée a montré qu'elle possède une action anti nociceptive et antidépressive intéressante. En parallèle, l'extrait butanolique de RT a inhibé l'agrégation plaquettaire *in vitro* induite par le collagène, de manière dose dépendante. De même, l'administration orale de cet extrait a réduit significativement l'agrégation plaquettaire et prolonge le Temps de Saignement *ex vivo*.

En conclusion, les résultats obtenus au cours de ce travail ont montré que cette plante est dotée d'activité biologique, pharmacologique et fonctionnelle très importante, ce qui confirme son utilisation accrue dans la médecine traditionnelle marocaine.

Mots Clés: *Rubia tinctorum*, enquête ethnopharmacologique, étude phytochimique, étude toxicologique, étude pharmacologique.

ملخص

يندرج هذا العمل ضمن تثمين النباتات الطبية المستخدمة في الطب المغربي التقليدي. إذ يهتم بشكل خاص بدراسة الخصائص البيولوجية والدوائية لمستخلص جذور *Rubia tinctorum* (الإيثانول، البوتانول، أسيتات الإيثيل والماء). و يدور عملنا حول أربعة محاور هي: دراسة استقصائية عن الاستخدام العلاجي لـ *RT* بين السكان المحليين بمراكش، تليها دراسة كيميائية نباتية، ودراسة سمية وكذلك تقييم لبعض الأنشطة، عامل مضاد للصفائح، مضاد للألم ومضاد للاكتئاب).

كشفت نتائج المسح الذي أجريناه أن لدى النساء معرفة أكثر عن التأثير العلاجي (ضد متلازمة فقر الدم وتلف الكبد) مقارنة بالرجال. الجزء الثاني مخصص للاستخراج والفحص الكيميائي النباتي والتوصيف النوعي والكمي لكل مستخلص مدروس من *RT*. أظهرت نتائج الدراسة الكيميائية النباتية أن مستخلصات جذور *RT* تحتوي على جزيئات نشطة بيولوجيًا وهي: الفانيلين، وحمض روزمارينيك، وحمض سيناميك، وكيرسيتين، وكاتشين، وحمض السرينجيك، وحمض الريتينيك، وحمض الفيروليك، والتيروزول. أظهرت النتائج المتعلقة بدراسة السمية الحادة وشبه الحادة للنبات أن المستخلص الإيثانولي الكلي لـ *RT* لا يسبب أي آثار سامة في الحيوانات التي تلقت عن طريق الفم جرعة قصوى تبلغ 5 جم / كجم من وزن الحيوان. بالإضافة إلى ذلك، لم نلاحظ أي علامات سمية في الفئران التي تلقت المستخلص الإيثانولي عن طريق الفم بجرعات مختلفة (0.5، 1، 2، 3.5 جم / كجم. وزن الجسم) يوميًا لمدة 14 يومًا.

تم تخصيص الجزء الرابع من هذا العمل لتقييم بعض الأنشطة البيولوجية والدوائية لهذه المستخلصات، وهي النشاط المضاد للأكسدة، والنشاط الوقائي للكبد، والنشاط المضاد للتخثر، والنشاط المضاد للصفائح، والنشاط المضاد للألم، والنشاط المضاد للاكتئاب. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلصي البوتانول والإيثانول من *RT* أظهروا قوة مضادة للأكسدة أكبر بكثير مقارنة بالمستخلصات المائية وخلات الإيثيل. لقد ثبت أن المستخلص الإيثانولي له العديد من التأثيرات المفيدة مثل: مضاد للألم، ومضاد للاكتئاب، ومضاد التخثر وأخيرًا وقائي للكبد. وزيادة على ذلك، أظهر المستخلص المائي الذي تم اختباره أن له تأثيرًا كمضاد للألم ومضاد للاكتئاب. ي موازاة ذلك، أدى مستخلص البوتانول من *RT* يحول دون تراكم الصفائح الدموية الناجم عن الكولاجين في المختبر بطريقة تعتمد على الجرعة. وبالمثل، فإن تناول هذا المستخلص عن طريق الفم قلل بشكل كبير من تراكم الصفائح الدموية ووقت النزيف لفترات طويلة في الجسم الحي. في الختام، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها خلال هذا العمل أن هذا النبات يتمتع بنشاط بيولوجي ودوائي ووظيفي مهم للغاية، مما يؤكد زيادة استخدامه في الطب المغربي التقليدي.

. **الكلمات المفتاح:** *Rubia tinctorum*، الاستطلاع اثونباتي، دراسة الكيميائية النباتية، دراسة السمية، دراسة الدوائية.

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en Biologie.

Formation Doctorale: Sciences et Techniques

Spécialité: Pharmacologie, Physiologie animale

Sous le thème

Contribution à la valorisation de *Rubia tinctorum* :
Evaluation phytochimique, toxicologique et pharmacologique

Présentée par :

MARHOUME Fatima Zahra

Soutenue le: 28/06/2021

A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat devant le jury composé de :

Pr. BENCHARKI Bouchaïb	PES	Faculté des Sciences et Techniques – Settat	Président
Pr. EL GANOUNI Soumaya	PES	Faculté des Sciences et Techniques – Settat	Rapporteur
Pr. SOKAR Zahra	PES	Faculté de Sciences Semlalia–Marrakech	Rapporteur
Pr. HAFID Jamal-Eddine	PES	Faculté des Sciences et Techniques–Marrakech	Rapporteur
Pr. MOUJAHID Abderrahmane	PES	Faculté des Sciences et Techniques – Settat	Examineur
Pr. OUDGHIRI Mounia	PES	Faculté des Sciences Ain Chok–Casablanca	Examineur
Pr. CHAIT Abderrahman	PES	Faculté de Sciences Semlalia–Marrakech	Co-Directeur de thèse
Pr. BAGRI Abdallah	PES	Faculté des Sciences et Techniques – Settat	Directeur de thèse

Année Universitaire: 2020/2021

AVANT-PROPOS

Nom et prénom de l'auteur: MARHOUME Fatima Zahra

Intitulé du travail : Contribution à la valorisation de *Rubia tinctorum*: Evaluation phytochimique, toxicologique et pharmacologique

Nom et prénom du Directeur de recherche: Pr BAGRI Abdallah,

Co-Encadrant : Pr CHAIT Abderrahman

Laboratoire où les travaux ont été réalisés :

- Laboratoire de Biochimie et de Neurosciences. Equipe des Neurosciences intégratives et computationnelles. Université Hassan Premier, Faculté des Sciences et Techniques - Settat
- Laboratoire de Pharmacologie, Neurobiologie Et Comportement. Université Cadi Ayyad - Faculté Des Sciences Semlalia – Marrakech
- Laboratoire d'hématologie, Unité d'hémostase spécialisée. Centre Hospitalier Universitaire Med VI, Hôpital ARRAZI – Marrakech

Date de commencement des travaux : 2014

PRINCIPALES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS :

Articles:

- **Marhoume Fatima zahra**, Aboufatima Rachida, Zaid Younes, Laadraoui Jawad, Belbachir Anas, Chait Abderahmane and Bagri Abdellah. Antioxidant and polyphenol-rich ethanolic extract of *Rubia tinctorum* prevent the formation of urolithiasis in the experimental ethylene glycol model in rats. *Molecules*, **2021**; 26 (4)- 1005.
- **Marhoume, F. Z.**, Laaradia, M. A., Zaid, Y., Laadraoui, J., Oufquir, S., Aboufatima, R., Chait, A., Bagri, A. Anti-aggregant effect of butanolic extract of *Rubia tinctorum* L on platelets *in vitro* and *ex vivo*. *Journal of ethnopharmacology* , **2019**; 15 (241)-111971
- **Marhoume, F.**, Zaid, Y., Boufous, H., Errafiy, N., Laaradia, M. A., Laadraoui, J., Bagri, A., Chait, A Hepatoprotective Activity of *Rubia tinctorum*'s Extract against CCl4 Induced Hepatic Injury in Rats. *European Journal of Medicinal Plants*, **2017**; 1-10

Autres publications:

- Younes Zaid, **Fatima zahra Marhoume**, Nezha Senhaji, Kevin Kojok, Hicham Boufous, Abdallah Naya, Mounia Oudghiri, Youssef Darif, Norddine Habti, Soukaina Zouine, Fekhaoui Mohamed, Abderahmane Chait and Abdellah Bagri. Paraphenylene diamine exacerbates platelet aggregation and thrombus formation in response to a low dose of collagen. *The Journal of Toxicological Sciences*, **2016**; 41; 123-124
- Boufous, H., **Marhoume, F.**, Chait, A., Bagri, A. Ethnopharmacological survey of medicinal plants with hallucinogenic effect and used against pain, inflammatory diseases, diabetes and urinary lithiasis in Zagora "Morocco". *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, **2017**; 6 (4); 242-250.
- Jawad, L., Aboufatima, R., Aicha, O., Bezza, K., El Gabbas, Z., Mehdi, A. L., **Marhoume FZ**, Chait, A. Behavioral and histological characterization of the effects

of cigarette smoke inhalation and withdrawal in rats. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **2019**; 101(1-2); 129-147.

- Mehdi Ait Laaradia, Sara Oufquir, Moulay Abdelmonaim El Hidan, **Fatima zahra Marhoume**, Jawad Laadraoui, Kenza Bezza, Zineb El Gabbas, Rachida Aboufatima, Ali Boumezzough & Abderrahman Chait. Assessment of the relationship between the amount of scorpion venom in the central nervous system and the severity of scorpion envenomation in rats. *Toxin Reviews*, **2019**; 1-10.
- Mehdi Ait Laaradia, Moulay Abdelmonaim El Hidan, **Fatima zahra Marhoume**, Btissam Bouimeja, Sara Oufquir, Zahra Sokar, Ali Boumezzough, Abderrahman Chait. *Buthus lienhardi* venom and pathophysiological effects at the histological, hematological, biochemical and motor skills levels. *Toxicon*, **2018**; 146; 106-113
- Laadraoui J, Bezza K, El Gabbas Z, **Marhoume F**, Wakrim E. M, Ferehan, H, Chait A. Intracerebroventricular administration of cigarette smoke condensate induced generalized seizures reduced by muscarinic receptor antagonist in rats. *Epilepsy & Behavior*. 2018; 79, 154-161.
- Jawad Laadraoui, Rachida Aboufatima, Zineb El Gabbas, Hind Ferehan, Kenza Bezza, Mehdi Ait Laaradia, **Fatimazahra Marhoume**, El Mehdi Wakrim, Abderrahman Chait. Effect of *Artemisia herba-alba* consumption during pregnancy on fertility, morphological and behaviors of mice offspring. *Journal of ethnopharmacology*, 2018; 226; 105-110.

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES :

Communications Orales :

- **Marhoume. F**, Boufous. H, Chait. A, Bagri. A. Evaluation de l'activité antiagrégant plaquettaire de l'extrait butanolique de *Rubia tinctorum* L *in vitro* et *ex vivo*. 5^{ème} Edition du Forum Africain de Santé. **14 Juin 2019, Rabat, Maroc**
- **Marhoume. F**, Zaid.Y, Boufous. H, Chait. A, Bagri. A. Antinociceptive properties of various extracts of *Rubia tinctorum* roots. *International symposium of junior neuroscience investigators*. **25-27 April 2019, Marrakech, Maroc**

- **Marhoume. F,** Zaid. Y, Boufous. H, Chait. A, Bagri. A. Ethnopharmacological survey of traditional use of *Rubia tinctorum* for treatment of liver damage, in Marrakesh. *6^{ème} Edition Journée Doctorant*. **2 Mai 2019, Settat, Maroc.**
- **Marhoume. F,** Zaid. Y, Boufous. H, Chait. A, Bagri. A. Antioxidant activities and determination of polyphenolic compound of *Rubia Tinctorum* extracts. *7^{ème} Edition of the International Congress on Medicinal and Aromatic Plants (CIPAM)*, **25- 28 June, 2018 Toulouse, France.**
- **Marhoume. F,** Zaid. Y, Boufous. H, Chait. A, Bagri. A. Protective effect of butanolic and ethyl acetate fractions of *Rubia Tinctorum* extract against calcium oxalate induced urolithiasis in rats. *6^{ème} Edition of International Conference on Pharmacognosy and Medicinal Plants*. **15-16 April, 2018 Amsterdam, Netherlands.**
- **Marhoume. F,** Zaid. Y, Boufous. H, Chait. A, Bagri. A. Assessment of antioxidant activities and determination of polyphenolic compounds of *Rubia tinctorum* extracts. *6^{ème} Edition Journée Doctorant*. **05 Avril 2016. Settat, Maroc.**

Communications Affichées:

- **Marhoume. F,** Zaid. Y, Boufous. H, Chait. A, Bagri. A. Ethnopharmacological survey of medicinal plant used for the treatment of liver damage, nephrolithiasis and cardiovascular disease in the south region of Morocco, Marrakech. *23rd International Conference on Pharmaceutical Biotechnology*. **10-11 December, 2018, Rome, Italy.**
- **Marhoume. F,** Boufous. H, Ait Laaradia. M, Chait. A, Bagri. A. Antiurolithiasic activity of ethanolic extract of *Rubia tinctorum* in rat. *7^{ème} Edition of the International Congress on Medicinal and Aromatic Plants (CIPAM)*. **25- 28 June 2018, Toulouse, France.**
- **Marhoume. F,** Zaid. Y, Boufous. H, Chait. A, Bagri. A. Antiaggregant Effect of *Rubia Tinctorum* Butanolic Extract on Human Platelets. *The XXVI Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting of The International Society Of Thrombosis And Haemostasis (ISTH)*. **8-13 July, 2017, Berlin, Germany.**

- **Marhoume. F**, Zaid. Y, Boufous. H, Chait. A, Bagri. A. Hepatoprotective activity of *Rubia Tinctorum*'s extract against CCL4 induced hepatic injury in rat. *Colloque International "Substance Naturelles: Stress et Metabolism Cellulaire*. **15-16 Novmenbre, 2016, Settata, Maroc**
- **Marhoume.F**, Zaid.Y, Boufous.H, Chait.A, Bagri.A. Toxicological evaluation of *Rubia tinctorum* ethanolic extract in mice. *6^{ème} Congrès International de Toxicologie*. **14-17 December 2016 Marrakech, Maroc**.
- **Marhoume. F**, Zaid. Y, Boufous. H, Chait. A, Bagri. A. Paraphenylene diamine exacerbates platelet aggregation and thrombus formation in response to a low dose of collagen. *4^{ème} Edition Journee Doctorant*. **20-21 Avril 2016, Settata, Maroc**.

Prix

Avril, 2018 → Obtention du Premier Prix de la Meilleure communication orale à la *6^{ème} édition de la journée du doctorat*. FST-UHP, **Settata-Maroc**

DEDICACE

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude

L'amour, le respect et la reconnaissance

Je dédie cette thèse :

A mes chers parents

A mes sœurs et frères

A mes nièces et neveux

A mes amis (es)

A tous ceux qui me sont chers

A la mémoire de mes regrettés grands-parents

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la collaboration et l'incalculable soutien de beaucoup de personnes qui m'ont soutenue et encouragée

Je remercie :

Mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Abdallah BAGRI,

Pour ses conseils et les efforts fournis pour la réalisation de ce travail. J'ai été très sensible à sa grande disponibilité. La grande expérience, les précieux conseils et encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail. Je suis fière d'avoir été une, de ses étudiants.

Monsieur le Professeur Abderrahmane CHAIT, le CO-encadrant

Pour avoir cru en moi en m'acceptant au sein de son laboratoire de Pharmacologie, Neurobiologie et Comportement, pour ses aides morales et matérielles, ses conseils et ses remarques pertinentes. Je lui suis très reconnaissante pour les efforts qu'il a déployés pour la réalisation de cette thèse. Pour son suivi et sa disponibilité durant tout le déroulement de la thèse.

A Monsieur le Professeur Younes ZAID

Pour son soutien et son intérêt manifeste pour l'avancement de mes travaux. Grand merci pour vos conseils, vos encouragements et votre implication morale et matérielle.

A Monsieur le Professeur Ahmed BENHARREF,

Pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles afin de réaliser la partie phytochimique. Merci de m'avoir guidé et suivi pas à pas pour la réalisation de cette étude.

A Monsieur le Professeur Khalil HAOUACH

Pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire d'hématologie-unité d'hémostase spécialisé-Hôpital ARRAZI CHU Med VI de Marrakech., et permis de réaliser les tests d'agrégation plaquettaire.

*Mes sincères remerciements également aux rapporteurs de cette thèse, à savoir Monsieur le Professeur **Jamal-Eddine HAFID**, Madame le Professeur **Zahra SOKAR** et Madame le Professeur **Soumaya EL GANOUNI**, pour le temps et le privilège qu'ils nous ont accordé en examinant ce travail,*

*Merci aussi à tous les membres de jury à savoir Monsieur le Professeur **Bouchaïb BENCHARKI**, Monsieur le Professeur **Abderrahmane MOUJAHID** et Madame le Professeur **Mounia OUDGHIRI** ce fût un plaisir d'avoir pu vous présenter mon travail.*

*Enfin, j'adresse mes chaleureux remerciements à Monsieur **Abderrazak REGRAGUI**, **homme** qui n'a pas manqué de répondre favorablement à toutes mes sollicitudes concernant mes demandes d'animaux. J'avoue que vos qualités humaines m'ont toujours impressionnée.*

Bien que ce travail soit fondamentalement individuel, je n'aurais pas pu le mené à bien sans l'aide de mes chers amis (Pr Asmae Lamrani Hanchi, Pr Raja Hazime, Dr Imane Harakaty, Dr Ayyoub Alioua, Dc Mehdi Ait Laaradia, Dr Jawad Laadraoui, Dc Sara Oufkir, Dr Zineb El gabbas, Dc Khalil Zizi, Dr Daoudi Mohamed, Dr Zakaria Tazart, Dr Rachida Makbal, Dr Hicham Boufouss, Dc Sabir Said,, Dc Karima Lafhal, Dr Aicha Ourhach, Dc Majda Baddaoui, Dc Chafik Terraf et Dr Aziz Kebbou) que je remercie de tout mon cœur.

Merci également à tous ceux que je n'ai pas pu citer et qui m'ont soutenu d'une manière ou d'une autre.

RESUME

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle Marocaine. Il s'agit d'une étude de quelques propriétés biologiques et pharmacologiques des extraits (éthanolique, butanolique, acétate d'éthyle et aqueux) des racines de *Rubia tinctorum* (RT). Notre travail s'articule autour de quatre axes à savoir : une enquête sur l'utilisation thérapeutique de RT auprès de la population locale de Marrakech et ses région, suivie d'une étude phytochimique, d'une étude de toxicité ainsi qu'une évaluation de quelques activités pharmacologiques (antioxydante, hépatoprotectrice, antilithiasique, antiagrégant plaquettaire, antinociceptive et antidépresseur).

Les résultats de notre enquête ont révélés que les femmes ont plus de connaissances sur l'effet thérapeutique (contre le syndrome anémique et l'atteinte hépatique) par rapport aux hommes. La deuxième partie est consacrée à l'extraction, au criblage phytochimique et à la caractérisation qualitative et quantitative de chaque extrait étudié de RT. Les résultats de l'étude phytochimique ont démontré que les extraits des racines de RT contiennent des molécules bioactives qui sont: la vanilline, l'acide rosmarinique, l'acide cinnamique, la quercétine, la catéchine, l'acide syringique, l'acide rétinique, l'acide férulique et la tyrosole. Les résultats portant sur l'étude de la toxicité aigüe et subaigüe de la plante chez les animaux ont montré que, l'extrait éthanolique total de RT ne cause aucun effet toxique chez les animaux ayant reçu oralement une dose maximale de 5 g/kg du poids corporel. En plus, nous n'avons enregistré aucun signe de toxicité chez les rats qui ont reçu oralement l'extrait éthanolique à différentes doses (0.5, 1, 2, 3.5g/kg. PC) quotidiennement pendant 16 jours.

La quatrième partie de ce travail a été consacré à l'évaluation de certaines activités biologiques et pharmacologiques de ces extraits, il s'agit de l'activité antioxydante, de l'activité hépatoprotectrice, de l'activité antilithiasique, de l'activité antiagrégant plaquettaire, de l'activité antinociceptive et de l'activité antidépressive. Les résultats obtenus ont montré que les extraits butanolique et éthanolique de RT ont exhibé un pouvoir antioxydant significativement plus important en comparaison avec les extraits aqueux et d'acétate d'éthyle. L'extrait éthanolique a montré qu'il exerce plusieurs effets bénéfiques tels que : l'activité antinociceptive, et antidépressive, antilithique et enfin hépatoprotectrice. D'autre part, la fraction aqueuse testée a montré qu'elle possède une action anti nociceptive et antidépressive intéressante. En parallèle, l'extrait butanolique de RT a inhibé l'agrégation plaquettaire *in vitro* induite par le collagène, de manière dose dépendante. De même, l'administration orale de cet extrait a réduit significativement l'agrégation plaquettaire et prolonge le Temps de Saignement *ex vivo*.

En conclusion, les résultats obtenus au cours de ce travail ont montré que cette plante est dotée d'activité biologique, pharmacologique et fonctionnelle très importante, ce qui confirme son utilisation accrue dans la médecine traditionnelle marocaine.

Mots Clés: *Rubia tinctorum*, enquête ethnopharmacologique, étude phytochimique, étude toxicologique, étude pharmacologique.

ABSTRACT

The present work is in the scope of the valorization of medicinal plants used in traditional Moroccan medicine. It is particularly interested in studying the biological and pharmacological properties of *Rubia tinctorum* roots extracts (ethanolic, butanolic, ethyl acetate and aqueous). Our research is focused on four axes: a survey on the therapeutic use of RT by the local population of Marrakech, followed by a phytochemical study, a toxicity study as well as an evaluation of some pharmacological activities (antioxidant, hepatoprotective, anti-lithiasic, antiplatelet aggregation, antinociceptive and antidepressant).

The results of our survey revealed that women have a higher knowledge of the therapeutic effect of RT (against anemic syndrome and liver damage) compared to men. The second part is devoted to the extraction, phytochemical screening and qualitative and quantitative characterization of each studied extract of RT. The results of the phytochemical study showed that the extracts of RT roots contain bioactive molecules which are: vanillin, rosmarinic acid, cinnamic acid, quercetin, catechin, syringic acid, retinic acid, ferulic acid and tyrosol. The results of the acute and sub-acute toxicity study of the plant in animals showed that, the total ethanolic extract of RT does not cause any toxic effect in the animals that received orally a maximum dose of 5 g/kg of body weight. Moreover, we did not record any sign of toxicity in rats that received orally the ethanolic extract at different doses (0.5, 1, 2, 3.5g/kg. BW) daily during 16 days.

The fourth part of this work was aimed to evaluate some biological and pharmacological activities of these extracts: antioxidant activity, hepatoprotective activity, antilithiasis activity, anti-platelet aggregation activity, anti-nociceptive activity and anti-depressive activity. The results obtained indicated that the butanolic and ethanolic extracts of RT exhibited significantly a higher antioxidant power compared to the aqueous and ethyl acetate extracts. The ethanolic extract has been shown to have several beneficial effects such as: anti-nociceptive, antidepressive, antilithic and finally hepato-protective activity. Moreover, the aqueous fraction tested showed that it has an interesting anti-nociceptive and anti-depressive action. In parallel, the butanolic extract of RT inhibited in vitro platelet aggregation induced by collagen, in dose-dependent manner. Similarly, oral administration of this extract significantly reduced platelet aggregation and prolonged bleeding time in vivo.

In conclusion, the results obtained during this work have proved that this plant is endowed with very important biological, pharmacological and functional activity, which confirms its increased use in the Moroccan traditional medicine.

Key Words: *Rubia tinctorum*, ethnopharmacological survey, phytochemical study, toxicological study, pharmacological study.

ملخص

يندرج هذا العمل ضمن تثمين النباتات الطبية المستخدمة في الطب المغربي التقليدي. إذ يهتم بشكل خاص بدراسة الخصائص البيولوجية والدوائية لمستخلص جذور *Rubia tinctorum* (الإيثانول ، البوتانول ، أسيتات الإيثيل والماء). و يدور عملنا حول أربعة محاور هي: دراسة استقصائية عن الاستخدام العلاجي لـ RT بين السكان المحليين بمراكش ، تليها دراسة كيميائية نباتية ، ودراسة سمية وكذلك تقييم لبعض الأنشطة ، عامل مضاد للصفائح ، مضاد للألم ومضاد للاكتئاب).

كشفت نتائج المسح الذي أجريناه أن لدى النساء معرفة أكثر عن التأثير العلاجي (ضد متلازمة فقر الدم وتلف الكبد) مقارنة بالرجال. الجزء الثاني مخصص للاستخراج والفحص الكيميائي النباتي والتوصيف النوعي والكمي لكل مستخلص مدروس من RT. أظهرت نتائج الدراسة الكيميائية النباتية أن مستخلصات جذور RT تحتوي على جزيئات نشطة بيولوجياً وهي: الفانيلين ، وحمض روزمارينيك ، وحمض سيناميك ، وكيرسيتين ، وكاتشين ، وحمض السرينجيك ، وحمض الريتينيك ، وحمض الفيروليك ، والتيروزول. أظهرت النتائج المتعلقة بدراسة السمية الحادة وشبه الحادة للنبذة أن المستخلص الإيثانولي الكلي لـ RT لا يسبب أي آثار سامة في الحيوانات التي تلقت عن طريق الفم جرعة قصوى تبلغ 5 جم / كجم من وزن الحيوان. بالإضافة إلى ذلك، لم نلاحظ أي علامات سمية في الفئران التي تلقت المستخلص الإيثانولي عن طريق الفم بجرعات مختلفة (0.5 ، 1 ، 2 ، 3.5 جم / كجم. وزن الجسم) يومياً لمدة 16 يوماً.

تم تخصيص الجزء الرابع من هذا العمل لتقييم بعض الأنشطة البيولوجية والدوائية لهذه المستخلصات، وهي النشاط المضاد للأكسدة، والنشاط الوقائي للكبد، والنشاط المضاد للتحصي، والنشاط المضاد للصفائح، والنشاط المضاد للألم، والنشاط المضاد للاكتئاب. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلصي البوتانول والإيثانول من RT أظهروا قوة مضادة للأكسدة أكبر بكثير مقارنة بالمستخلصات المائية وولات الإيثيل. لقد ثبت أن المستخلص الإيثانولي له العديد من التأثيرات المفيدة مثل: مضاد للألم، ومضاد للاكتئاب، ومضاد التحصي وأخيراً وقائي للكبد. وزيادة على ذلك، أظهر المستخلص المائي الذي تم اختياره أن له تأثيراً كمضاد للألم ومضاد للاكتئاب. ي موازاة ذلك، أدى مستخلص البوتانول من RT يحول دون تراكم الصفائح الدموية الناجم عن الكولاجين في المختبر بطريقة تعتمد على الجرعة. وبالمثل، فإن تناول هذا المستخلص عن طريق الفم قلل بشكل كبير من تراكم الصفائح الدموية ووقت النزيف لفترات طويلة في الجسم الحي.

في الختام ، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها خلال هذا العمل أن هذا النبات يتمتع بنشاط بيولوجي ودوائي ووظيفي مهم للغاية ، مما يؤكد زيادة استخدامه في الطب المغربي التقليدي.

. **الكلمات المفتاح:** *Rubia tinctorum*، الاستطلاع اثنونباتي، دراسة الكيميائية النباتية ، دراسة السمية ، دراسة الدوائية

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1</i> : Vue d'ensemble de la plante (<i>Rubia tinctorum</i>) avec ses tiges et racines.	9
<i>Figure 2</i> : Répartition géographique des différentes espèces de garance (Hovaneissian, 2005).	10
<i>Figure 3</i> : Structure du noyau anthraquinone (Burnett et Thomson, 1968).	12
<i>Figure 4</i> : Structures des principales anthraquinones aglycones rencontrées dans les racines de garance (Derksen et al., 1998).	13
<i>Figure 5</i> : Structures des principales anthraquinones majeures rencontrées dans les racines de l'espèce Marocain (RT).	14
<i>Figure 6</i> : Morphologie hépatique: vues diaphragmatique et inférieure. (D'après Castaing et Veilhan, 2006). ...	16
<i>Figure 7</i> : Structures internes du foie : le lobule hépatique. (D'après Marieb et Hoehn, 2014)	17
<i>Figure 8</i> : Coupe longitudinale du rein gauche vu par sa face postérieure (Cité par Leroy, 2004).	22
<i>Figure 9</i> : Schéma d'un néphron dans la zone du parenchyme rénal (Nielsen et al., 2012).	24
<i>Figure 10</i> : Les étapes de la lithogénèse (Hannache, 2014)	28
<i>Figure 11</i> : Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines (Daudon et al., 2008).	29
<i>Figure 12</i> : Schématisation (A) et image de microscopie électronique à transmission (B) d'une plaquette au repos en coupe longitudinale (Zaid, 2015).	31
<i>Figure 13</i> : Changements morphologiques des plaquettes au cours de leur activation en suspension par un agoniste soluble (ADP, 5 µM), ou après adhérence sur fibrinogène immobilisé. Images de microscopie électronique à balayage (Levin, 2013).	33
<i>Figure 14</i> : Schématisation des principales voies d'activation et d'inhibition des plaquettes (Levin, 2013).	34
<i>Figure 15</i> : Rôle des plaquettes dans la réponse inflammatoire vasculaire associée à l'athérosclérose (Fuentes et al., 2013).	36
<i>Figure 16</i> : Les différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif (D'après Meunier et al., 2004).	41
<i>Figure 17</i> : Théorie de la porte 'gate control' (D'après Payen et al., 2001)	42
<i>Figure 18</i> : Les stations concernées par l'enquête ethnopharmacologique à Marrakech (Prise de Google Maps) 52	52
<i>Figure 19</i> : Les stations concernées par l'enquête ethnopharmacologique aux régions de Marrakech (prise de Google Maps)	52
<i>Figure 20</i> : Répartition des données démographiques selon la localité et le sexe.	54
<i>Figure 21</i> : Répartition des données démographiques selon la profession	55
<i>Figure 22</i> : Répartition des données démographiques selon le niveau académique	55
<i>Figure 23</i> : Répartition d'utilisation de la plante	56
<i>Figure 24</i> : Répartition de plante en fonction des parties utilisées	56
<i>Figure 25</i> : Répartition des différents modes de préparation de RT	57
<i>Figure 26</i> : Répartition des données pharmacognosiques selon le mode d'emploi.	57
<i>Figure 27</i> : Répartition des différents modes d'administration de la plante selon la dose.	58
<i>Figure 28</i> : Répartition de la durée du traitement selon le nombre de prise par jour.	59
<i>Figure 29</i> : <i>Rubia tinctorum</i> (Marhoume, 2017).	65
<i>Figure 30</i> : Protocole expérimental d'extraction à chaud de la matière sèche.	66
<i>Figure 31</i> : Courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	72
<i>Figure 32</i> : Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.	73
<i>Figure 33</i> : Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des tanins condensés	74
<i>Figure 34</i> : Chromatogramme de l'extrait éthanolique de RT obtenu par chromatographie liquide à haute performance.	76
<i>Figure 35</i> : Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de RT obtenu par chromatographie liquide à haute performance.	76
<i>Figure 36</i> : Chromatogramme de l'extrait butanolique de RT obtenu par chromatographie liquide à haute performance.	76
<i>Figure 37</i> : Chromatogramme de l'extrait aqueux de RT obtenu par chromatographie liquide à haute performance.	77

<i>Figure 38: Effet de l'extrait éthanolique de RT sur l'évolution du poids corporel des souris après traitement oral.</i>	90
<i>Figure 39: Images microscopiques des coupes histologiques des reins des souris colorées à l'hématoxyline et à l'éosine observées au microscope optique (50×)</i>	93
<i>Figure 40: Images microscopiques des coupes histologiques des foies des souris colorées à l'hématoxyline et à l'éosine observées au microscope optique (50×)</i>	93
<i>Figure 41: Protocole expérimental de mesure de l'agrégation plaquettaire</i>	105
<i>Figure 42: Effet de l'extrait éthanolique des racines de RT sur les taux sériques des paramètres biochimiques</i>	109
<i>Figure 43: Coupes histologiques des modifications hépatiques chez les rats intoxiqués par le CCl₄ et traités par l'extrait éthanolique de RT (Grossissement 20× et 40×).</i>	110
<i>Figure 44: Variation du poids corporel des rats pendant les dix jours de l'expérience:</i>	113
<i>Figure 45: Cristaux typiques d'oxalate de calcium observés au microscope optique (Leica DMD 108) (50 x)</i>	114
<i>Figure 46: Coupes histologiques rénales des rats témoins et traités colorées à l'hématoxyline et à l'éosine observées au microscope optique (50 ×)</i>	117
<i>Figure 47: Effets des différents extraits organiques des racines de RT sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène</i>	118
<i>Figure 48: Tracés originaux de l'agrégation plaquettaire montrant l'effet des différents extraits organiques des racines RT à 500 µg/ml en présence du collagène (2µg/ml).</i>	119
<i>Figure 49: Tracés originaux de l'agrégation plaquettaire montrant l'effet des différents extraits organiques des racines RT à 250 µg/ml en présence du collagène (2µg/ml).</i>	119
<i>Figure 50: Tracés originaux montrant l'effet inhibiteur de l'extrait butanolique des racines de RT sur l'agrégation plaquettaire chez le rat, induite in vitro par: le collagène (2µg/ml)</i>	120
<i>Figure 51: Effet de l'extrait butanolique des racines de RT sur le temps de saignement chez le rat.</i>	121
<i>Figure 52: Effet de l'extrait butanolique des racines de RT sur le temps de saignement chez le rat.</i>	122
<i>Figure 53: Tracés originaux montrant l'effet de l'extrait butanolique de RT sur l'agrégation plaquettaire des plaquettes humaines en présence de l'ADP 50µM (A), acide arachidonique 15mM (B) et la thrombine 0.2U/ml (C)</i>	124
<i>Figure 54: Photo d'une souris présentant une réaction de contorsion après injection de l'acide acétique 0.6%.</i>	140
<i>Figure 55: Photo d'une souris exhibant une réaction de léchage de la patte postérieure après injection de 20 µl de formol à 2% dans la plante de la même patte</i>	142
<i>Figure 56: Dispositif expérimental utilisé dans le test de la nage forcée</i>	144
<i>Figure 57: Une souris suspendue par la queue.</i>	146
<i>Figure 58: Effet des extraits de RT sur le nombre de contorsions effectuées par la souris après injection de l'acide acétique au test de contorsions.</i>	148
<i>Figure 59: Effet des extraits de RT sur la sensibilité nociceptive au test au formol.</i>	151
<i>Figure 60: Effet de l'administration orale des extraits de RT sur la réponse Nociceptive de l'animal au test de la plaque chauffante.</i>	152
<i>Figure 61: Effet de l'administration orale des extraits de RT sur le temps d'immobilité au test de la nage forcée chez les souris.</i>	153
<i>Figure 62: Effet de l'administration orale des extraits de RT sur le temps d'immobilité au test de la suspension par la queue chez les souris.</i>	154

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Quelques activités biologiques de RT	15
Tableau 2 : Principales substances contenues dans les granules plaquettaires.....	32
Tableau 3: Profil d'âge de la population enquêtée	55
Tableau 4 : Répartition des différentes recettes réputées efficace contre certaines pathologies	58
Tableau 5: Pourcentages des différents extraits par rapport à la matière sèche et l'extrait éthanolique.....	70
Tableau 6: Criblage phytochimique	71
Tableau 7: Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits des racines de RT	72
Tableau 8: Teneurs en flavonoïdes des différents extraits des racines de RT	73
Tableau 9: Teneurs en tanins condensés des différents extraits des racines de RT	74
Tableau 10: Concentrations des principaux composés phénoliques identifiés dans les extraits des racines de RT exprimées en mg EAG/100g MS. (A: acide).....	75
Tableau 11: Evaluation de la toxicité aigüe de RT chez les souris femelles	88
Tableau 12: Evaluation de la toxicité aigüe de RT chez les souris males	89
Tableau 13: Effet de l'administration orale et répétée de l'extrait éthanolique de RT sur les paramètres biochimiques chez les souris.	91
Tableau 14 : Effet de l'administration orale et répétée de l'extrait éthanolique de RT sur les paramètres hématologiques chez les souris	91
Tableau 15: Activité antioxydante (test de DPPH) des extraits des racines de RT	108
Tableau 16: Taux sériques et urinaires des paramètres biochimiques chez les rats	112
Tableau 17: Changements histopathologiques dans les reins des rats traités par EG/AC	112
Tableau 18: Taux sériques des paramètres biochimiques chez les rats	115
Tableau 19: Dosage des paramètres biochimiques dans les urines	116
Tableau 20: Changements histopathologique des reins des rats avec ou sans traitement par	117
Tableau 21: Effet inhibiteur de l'extrait butanolique de RT sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène	120
Tableau 22: Inhibition de l'agrégation plaquettaire (%) par les différentes concentrations de l'extrait B-RT....	123
Tableau 23: Pourcentages d'inhibition de la réponse nociceptive au test de contorsions	149
Tableau 24: Effet des extraits de RT sur la sensibilité nociceptive au test au formol	150

LISTE DES ABREVIATIONS:

AAS: Acide Acétyle Salicylique

AC: Ammonium chloride

AC: Adénylate cyclase

ADH: Hormone antidiurétique

ALAT: Alanine-amino-transférase

AMPc: Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique

ANA: Anti-nuclear antibody

ANP: Atrial natriuretic peptide

ASAT: Aspartate-amino-transférase

AVC: Accidents vasculaires cérébraux

CCL₄: Tétrachlorure de carbone

CEF: Cellules étoilées du foie

CIDN: Contrôle Inhibiteur Diffus induit par la stimulation Nociceptive

CPTP: Cyclopentyl-triazolo-pyrimidines

DAG: Diacylglycérol

DL₅₀: Dose létale 50

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

EG: Ethylene glycol

EGF: Epidermal growth factor

EPO: Erythropoïétine

G R: Globules rouges

GABA: γ -Aminobutyric acid

GAE: Gallic acid equivalent

GB: Globules blancs

GCs: Guanylate cyclase soluble

GGT: Gamma-glutamyl-transférase

GMPc: Guanosine 3',5'- monophosphate cyclique

GP: Glycoprotéine

HAI: Hépatite auto-immun

Hgb: Hémoglobine

HPLC: High performance liquid chromatography

HTA: Hypertension artérielle
I.M.A.O: Inhibiteurs de la monoamine-oxydase
IL: Interleukines
IP3: Inositol 1, 4,5- trisphosphate
ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif.
LC1: Liver-cytosol type 1
LKM1: Anti-liver-kidney microsome
MAOa: Monoamine-oxydase de type a
MARS: Molecular absorbents recirculating system
MCV: Malaise cardiovasculaire
MEC: Matrice extracellulaire
NA: Noradrénaline
NO : Monoxyde d'azote
OMS: Organisation mondiale de la santé
PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1
PAL: Phosphatase-alcaline
PAM: Plantes aromatiques et médicinales
PAR: Protease-activated receptor
PDE: Phosphodiesterase
PDGF: Platelet-derived growth factor
PECAM-1: Platelet / endothelial cell adhesion molecule-1
PF4: Platelet factor 4
PGI₂: Prostacycline
PLA₂: Phospholipase A₂
PLC: Phospholipase C
PLQ: Plaquettes
POMC: Pro-opiomélanocortine
PPP: Plasma pauvre en plaquettes
PRP: Plasma riche en plaquette
PTH: Hormone parathyroïdienne
RCPG: Protéines G Hétérotrimériques
RIP3: Récepteurs de l'IP₃

RT: *Rubia tinctorum*

SCO: Système canaliculaire ouvert

SMA: Smooth muscle antibody

STD: système tubulaire dense

TGF β : Transforming growth factor β

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TP: Thromboxane/Prostaglandin receptor

TS: Temps de saignement

TSP-1: Thrombospondine-1

TxA₂: Thromboxane A₂

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique	5
I. Revue botanique de la plante étudiée : <i>Rubia tinctorum</i>	6
1. Introduction.....	6
2. Etude systématique	6
2.1 Historique	6
2.2 Position systématique	7
2.3 Description botanique	8
2.4 Distribution systématique	9
2. 5 Utilisations traditionnelles	10
3. Données phytochimiques	11
4. Données pharmacologiques	14
II. Données générales sur les fonctions et les comportements étudiés	16
1. Activité hépatoprotectrice	16
2. Activité anti-lithiasique.....	22
3. Activité antiagrégante plaquettaire.....	31
4. Activité nociceptive.....	37
5. Activité antidépressive.....	45
Chapitre II : Enquête ethnopharmacologique sur l'utilisation de <i>Rubia tinctorum</i> en médecine traditionnelle à Marrakech	48
I. Introduction.....	49
II- Matériels et méthodes.....	51
1. Zone de l'enquête.....	51
2. Période et déroulement de l'enquête.....	51
3. Outils de l'enquête	52
4. Technique d'échantillonnage	53
5 Traitement des données	53
III. Résultats	54
1. Données sociodémographiques.....	54
2. Données ethnopharmacologiques	55
3. Données pharmacologiques	58
4. Données toxicologiques	59
IV Discussion	60

Chapitre III : Etude phytochimique	63
I-Introduction	64
II Matériels et méthodes	65
1. Matériel végétal	65
2. Préparation des extraits	65
3. Criblage phytochimique.....	67
4. Caractérisation quantitative	68
4. 1 Dosage des polyphénols totaux.....	68
4. 2 Dosage des flavonoïdes totaux.....	68
4. 3 Dosage des tanins condensés:	69
5. Caractérisation quantitative par <i>HPLC</i>	69
III Résultats	70
1. Rendement de l'extraction	70
2. Criblage phytochimique.....	70
3 Caractérisation quantitative	71
3. 1 Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	71
3. 2 Détermination de la teneur en flavonoïdes	72
3.3 Détermination de la teneur en tanins condensés	73
4. Caractérisation qualitative par <i>HPLC</i>	74
IV Discussion	78
a- Caractérisation quantitative	78
b- Caractérisation qualitative par <i>HPLC</i>	79
Chapitre IV : Profil toxicologique	81
I- Introduction	82
II Matériels et méthodes	83
1 Matériel biologique Animaux	83
2 Matériel végétal	83
3. Toxicité aigue	83
3. 1 Principe :	83
3. 2 Méthodologie :	83
3. 3 Expérimentation :	84
3. 4 Détermination de la DL_{50}	84
4. Toxicité subaiguë.....	84

4. 1 Principe	84
4. 2 Méthodologie :	85
4. 3 Expérimentation.....	85
4. 4 Poids corporel, mortalité et signes cliniques :	85
4. 5 Analyses biochimiques:	86
4. 6 Analyses hématologiques :	86
4. 7 Examen anatomopathologique :.....	86
5 Analyse statistique	86
III Résultats	88
2. 1 Etude de la toxicité aigüe.....	88
2. 2 Etude de la toxicité subaigüe de l'extrait éthanolique de RT	89
IV Discussion	94
Chapitre V: Effets biologiques	98
I. Introduction.....	99
II Matériel et méthodes	100
1. Evaluation du potentiel antioxydant des extraits des racines de RT.....	100
1. 1 Piégeage du radical 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)	100
2. Matériel biologique Animaux	100
3. Test de l'activité hépatoprotectrice	100
3. 1 Protocole expérimental	101
4. Test de l'activité antilithiasique	102
4. 1 Protocole expérimental	102
5. Tests de l'activité antiagrégante plaquettaire.....	104
5. 1 Préparation des plaquettes lavées chez le rat	104
5. 2 Etude de l'effet antiplaquettaire des extraits de racines de RT chez l'Homme	106
6. Analyse statistique	106
III. Résultats	108
1. Evaluation du potentiel antioxydant des extraits des racines de RT par le test de DPPH	108
2. Evaluation de l'effet hépto-protecteur de l'extrait éthanolique des racines de RT	108
3. Evaluation de l'effet antilithiasique	111
4. Effet des extraits des racines de RT sur la fonction plaquettaire chez le rat.....	118
IV Discussion	125
a- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de RT par piégeage du radical libre DPPH. ...	125
b- Evaluation de l'effet hépto-protecteur de l'extrait éthanolique des racines de RT.....	125

c- Evaluation de l'effet antilithiasique des extraits éthanolique et acétate d'éthyle des racines de RT.	128
d- Effet des extraits des racines de RT sur la fonction plaquettaire chez le rat	133
Chapitre VI: Étude neuropharmacologique	138
I- Introduction	139
II Matériels et méthodes.....	140
1. Etude de l'activité antinociceptive des extraits de racines de RT.....	140
1. 1 Test de contorsion ('writhing test').....	140
1. 2 Test au Formol (Formalin test)	141
1.3 Test de la plaque chauffante	143
2. Etude de l'activité antidépressive des extraits de racines de RT	144
2. 1 Test de la nage forcée	144
2. 2 Test de suspension par la queue.....	145
3. Analyse statistique	146
III Résultats	148
1. Étude de l'activité antinociceptive des extraits de RT.....	148
2. Étude de l'activité antidépressive des extraits de RT	152
IV Discussion	155
Conclusion générale et perspectives	161
Références bibliographiques	164

Introduction générale

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales ont été utilisées pour leurs vertus médicinales. De nos jours encore, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que la médecine traditionnelle couvre les besoins en soins de santé primaires de 80% de la population mondiale (Fleurentin et Pelt, 1990).

Durant ces deux dernières décennies, la recherche en phytothérapie est devenue une des plus grandes préoccupations scientifiques (Niyah *et al.*, 2005). De ce fait, l'OMS a mis une stratégie pour la médecine traditionnelle dont le but est de maximiser les possibilités de cette forme de médecine en tant que source de soins de santé (OMS, 2002). Cette organisation recommande aux pays en voie de développement d'une part d'initier des programmes concernant l'identification, la préparation, la culture et la conservation des plantes médicinales et d'autre part, d'évaluer la qualité et l'efficacité de ces remèdes à l'aide des techniques modernes.

Dans le contexte socio-économique des pays en voie de développement, l'étude des plantes peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates et de faible prix, joignant à une efficacité scientifique prouvée et une acceptabilité culturelle optimale. La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes. Les mots clés, dans ce domaine, doivent être : sécurité, efficacité et qualité.

De part sa situation géographique particulière, le Maroc bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le pays compte un important potentiel en plantes aromatiques et médicinales (PAM) estimé à plus de 800 espèces (Hmamouchi, 1994 ; 2001) dont un grand nombre est endémique. L'exploitation de ces plantes est effectuée dans des conditions souvent artisanales et ignorant tous des modalités modernes de production, de commercialisation et de valorisation (Bellakhdar, 1997). Cette exploitation souffre d'un manque indiscutable d'encadrement technique, de connaissances précises de la matière végétale (chimie, biologie et écologie) et souvent même ses propriétés, ainsi que les usages auxquels elle est destinée. Au Maroc, il existe dans chaque région géographique une automédication familiale, basée sur les connaissances ancestrales et le savoir des tradipraticiens et herboristes dans la matière des plantes médicinales. Il faut noter l'importance, la complexité et la problématique de l'utilisation des plantes médicinales. Les

recettes prescrites par les herboristes et les tradipraticiens, n'obéissent à aucune norme de qualité, puisqu'il n'existe aucune formulation pour ces recettes traditionnelles marocaines. La plupart des herboristes n'indiquent pas les précautions pour leurs utilisations; ils ne connaissent pas non plus les effets secondaires et la toxicité des plantes utilisées. L'intoxication causée par l'utilisation de ces plantes médicinales est parmi les grands problèmes auxquels se heurte la santé publique au Maroc. Donc, des études scientifiques plus approfondies sur les avantages et les risques de ces plantes devraient permettre une meilleure utilisation en évitant de produire des effets négatifs sur la santé de la population.

Aucun contrôle n'existe sur la vente et l'utilisation des plantes, y compris certaines espèces dont la toxicité a été déjà mise en évidence expérimentalement. En cas d'intoxication, aucune information n'existe sur la nature chimique du complexe ingéré, l'origine des symptômes observés et les mesures à entreprendre pour faire face à la situation. A priori, toute plante doit être considérée comme produit à risque, elle peut avoir une action à court terme, et causer des lésions irréversibles comme elle peut avoir un effet à long terme, en étant toxique par prises répétées à petites doses.

La valorisation et le contrôle de la pharmacopée traditionnelle deviennent une nécessité au sein de la société marocaine. Il s'agit d'un travail complexe qui demande une méthodologie rigoureuse et qui suscite une définition précise des objectifs à réaliser. Un tel programme commencera par donner une vision scientifique à cet usage traditionnel. Cette vision va tenter de réintroduire la phytothérapie dans un cadre d'une analyse physiologique et pharmacologique complète et rigoureuse. En plus, une bonne sensibilisation, une information ainsi qu'une formation complémentaire en faveur des herboristes et tradipraticiens, permettrait une utilisation raisonnée, efficace et sûre des plantes médicinales. Pour cela, des études multidisciplinaires portant sur la botanique, la chimie, la toxicologie et la pharmacologie des plantes doivent être réalisées.

Ces raisons sont suffisantes pour considérer comme travail pressant et indispensable, la valorisation de ce savoir, qui vise à maîtriser scientifiquement la médication par les plantes. Dans ce contexte, nous avons choisi comme plante d'étude *Rubia tinctorum* (RT), communément connu sous le nom de «*El Foua ou Tourabiya ou taroubya*». Ce choix est basé sur la réputation concernant ses innombrables vertus thérapeutiques et dont l'usage traditionnel n'a jamais cessé d'augmenter. En effet, cette plante est largement utilisée dans la cuisine et en

médecine traditionnelle marocaines. Ses racines séchées et broyées sont utilisées à de nombreuses fins thérapeutiques, notamment contre l'anémie, l'ictère, la lithiase urinaire, et la constipation. Elles possèdent aussi des vertus antiseptiques et antiagrégant plaquettaire (Bellakhdar, 1997).

Cependant, malgré le rôle important qu'elle occupe dans la phytothérapie traditionnelle locale, RT n'a été le sujet que de peu d'essais pharmacologiques.

Notre travail de recherche constitue une contribution à l'étude de certaines propriétés pharmacologiques biologiques et fonctionnelles des extraits de racines de RT à l'aide de modèles expérimentaux chez l'animal.

Le présent travail a pour objectif l'évaluation de quelques effets pharmacologiques, biologiques, comportementaux et fonctionnels des extraits (éthanolique, acétate d'éthyle, butanolique et aqueux de RT. Le choix de ces fonctions et activités étudiées repose sur les faits rapportés par la médication traditionnelle.

- La réalisation d'une enquête auprès de la population locale de Marrakech avait pour objectif de rassembler les informations relatives à l'utilisation culinaire et thérapeutique des racines de RT, dans cette région.
- L'étude de l'activité hépatoprotectrice repose sur le fait que les racines de cette plante sont préconisées dans le traitement des ictères et jaunisse en médecine traditionnelle Marocaine.
- Le choix de l'activité anti lithiasique est dicté par le fait que les racines de cette plante sont également conseillées dans les traitements des lithiases urinaires.
- Le choix de l'étude de l'effet antiagrégant plaquettaire des extraits des racines de cette plante, nous est dicté par la réputation que possède cette plante dans le traitement de l'hypertension artérielle et l'anémie au sein des populations marocaines.
- L'étude de l'activité antalgique nous a été dictée par l'utilisation, par la population, des racines de cette plante dans le soulagement de certaines douleurs en particulier d'origines viscérales.
- L'étude de l'activité anti dépressive repose sur des informations rapportées par certains enquêtés, à savoir que les racines de cette plante pourraient induire de la somnolence en plus d'un ralentissement psychomoteur chez les personnes ayant utilisées ces racines.

- Toutes ces activités et fonctions ont été précédées par des études sur la composition chimique des différents extraits afin de rechercher les différents composants des racines et qui seraient impliqués dans les différentes activités biologiques, fonctionnelles et pharmacologiques attribuées à cette plante.
- Des études sur la toxicité ont été réalisées dans l'objectif de rechercher si ces racines pourraient être toxiques et nuire à la santé de la population, vues qu'elles sont largement utilisées surtout dans certaines atteintes hépatiques.

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I. Revue botanique de la plante étudiée : *Rubia tinctorum*

1. Introduction

Rubia tinctorum ou la garance de teinture (*El foua*) est une plante très utilisée depuis des millénaires comme source de couleur rouge avec ses variantes pour la teinture des textiles, comme additif dans les aliments et aussi en tant que drogue aux nombreuses vertus thérapeutiques. Elle est très répandue dans le monde et particulièrement en Europe, en Asie et en Afrique du Nord (Cardon, 2001).

Au Maroc RT est utilisé à des fins thérapeutiques. En effet, elle est très utilisée par les femmes marocaines, comme purgatif, après l'accouchement pour augmenter le volume sanguin et améliorer le teint. Réputée aphrodisiaque, elle est souvent incorporée au pain dont elle colore la mie en rouge. Sa décoction est administrée aux nourrissons comme anti-diarrhéique (Bellakhdar, 1997 ; Karim *et al.*, 2010).

La garance des teintures est une plante aux nombreuses vertus. Malgré que les propriétés pharmaceutiques aient donné lieu à de nombreux travaux, cette plante continue à susciter toujours autant de curiosité. Pour cela, avant d'entamer l'étude pharmacologique, nous avons jugé indispensable de réaliser au préalable une identification rigoureuse du matériel végétal étudié. A travers cette revue botanique, nous nous sommes intéressés à donner un inventaire botanique de la plante étudié. Après un aperçu systématique, nous avons relaté les différentes utilisations traditionnelles ainsi que les propriétés pharmacologiques de RT. L'ensemble de ces informations va nous servir de base pour nous guider dans le choix du profil pharmacologique que nous allons étudier.

2. Etude systématique

2.1 Historique

La garance (RT) est l'une des plantes tinctoriales dont les utilisations comptent parmi les plus anciennes que ce soit sur des étoffes de coton retrouvées à Mohenjo-Daro, en Inde (3250 à 2750 av. J-C), ou sur du lin dans des tombes de la vallée du Nil (1350 av. J.-C.). Sa culture était très répandue en Syrie ainsi qu'en Mésopotamie mais les deux principales régions exportatrices étaient l'Arménie et l'Asie centrale. Jusqu'au début du XVIII^{ème} siècle, l'Inde détenait la suprématie dans le domaine de la teinture sur coton (Cardon, 2001).

En Europe, c'est la Hollande qui a détenu le monopole de la culture de la garance durant de nombreuses décennies. La culture de la garance, qui présentait un grand intérêt économique, avait été encouragée sous le règne de Louis XIV (Cardon, 2001).

En Afrique, l'usage et la description de cette plante est moins éloquente car RT est surtout considérée comme l'espèce européenne. Celle que l'on retrouve beaucoup plus en Afrique est *Rubia cordifolia* dont l'usage tinctorial s'avère moins important mais s'apparente tout aussi à celui de RT. Les principales données disponibles sur cet usage viennent d'Afrique du sud où ses racines sont utilisées pour teindre la laine, et de l'Ethiopie où elles servent aussi à teindre la laine mais en plus les paniers à pain en diverses teintes rouge, rose, violet ou marron. En Tanzanie, on utilise la cendre des tiges et des feuilles brûlées comme sel végétal pour attendrir les légumes lors de la cuisson (Jansen and Cardon, 2005).

Pour ce qui est du Maroc, on trouve RT chez tous les droguistes. La plante est utilisée en général en médecine et dans le nord du pays elle sert pour la teinture (Bellakhder, 2003). Elle est aussi utilisée pour colorer les tapis, les couvertures et les peintures murales. Pour cela on utilise la laine, le coton ou encore les poils de chèvres ou de dromadaires (Bellakhder, 2003).

Dénomination internationales

Arabe et berbère : El foua, Tarubia, Tigmit, Lhamri (Bellakhder, 1997)

Français: Garance des teintures (Debuigne, 1974).

Anglais: Dyer's Madder, Madder (Gilbert and Cooke, 2001)

Allemand : Färber-Krapp, Färberröte (Prince, 2014).

Espagnol : Granza, Rubia de tintoreros, Rojatintòria (Molas, 1994).

2.2 Position systématique

La situation botanique de l'espèce *Rubia tinctorum* Linné est la suivantes (Derksen, 2001) :

Règne végétal: Plantae

Sous règne: Trachéophytes

Embranchement : Spermaphytes

Ss embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ss classe : Astérides

Ordre : Rubiales

Famille : Rubiaceae

Genre : Rubia

Espèce : *Rubia tinctorum* Linné

2.3 Description botanique

Les différentes espèces de garance (genre *Rubia*) appartiennent à la vaste famille des *Rubiaceae* qui comprend plus de 637 genres et 10000 espèces. Elle se compose d'arbres, d'arbustes, de lianes et de plantes herbacées répandues dans les régions tempérées, tropicales et subtropicales. Le genre *Rubia*, comme *Galium* et *Asperula* appartient à la tribu Rubiaceae de la sous-famille des Rubioideae (Mongrand *et al.*, 2005; Derksen, 2001).

- **Caractères principaux** (Cardon, 2001).

Les feuilles sont opposées-décussées, simples, stipulées avec des stipules parfois aussi développées que les feuilles pouvant former des pseudo-verticilles. Dans un verticille de 6 éléments, 2 seulement sont des feuilles proprement dites tandis que les 4 autres (deux par feuille) ne sont que des stipules très développées.

Les inflorescences sont très diverses: cymes, racèmes, panicules; moins souvent les fleurs sont solitaires.

Les fleurs sont régulières, hermaphrodites, tétra-cycliques, tétra ou pentamères, ont différentes couleurs et sont généralement adaptées à la pollinisation par les insectes. Le calice est généralement ouvert, parfois accrescent, mais souvent très réduit ; les sépales sont libres ou soudés. La corolle est formée de 4 à 10 pétales plus ou moins soudées.

Le fruit est un schizocarpe, une capsule, une baie, ou une drupe.

Les graines sont généralement albuminées et rarement ailées, parfois exalbuminées et l'embryon généralement droit, parfois courbe.

L'androcée est constitué de 4 à 5 étamines toutes fertiles, oppositisépales; les filets sont soudés au tube de la corolle ; les anthères sont introrsées à déhiscence longitudinale ou parfois porcidé.

Le gynécée est formé de 2 à 9 carpelles soudés; l'ovaire est infère; on note 1-*n* ovules anatropes dans chaque loge en placentation pariétale ou axile; un style à sommet divisé suivant le nombre de carpelles.

La garance des teinturiers (RT) est une plante vivace, rampante, à tige sous-ligneuses à la base, grimpantes, atteignant plus de 1m de hauteur, quadrangulaires et portant des épines sur les angles, feuilles en verticilles de 4-6, ovales, 15 à 60 mm de long, rigides, coriaces brillantes

en dessus, à bords dentés-scabres, fleurs jaune-verdâtre en grappes terminales ou axillaires, corolle de 5 mm, avec des lobes aigus, fruit noir de 4-6 mm ; floraison en Avril-Juillet (Aafi, 2002)(Figure 1).



Figure 1: Vue d'ensemble de la plante (*Rubia tinctorum*) avec ses tiges et racines (Marhoume, 2018).

2.4 Distribution systématique

Les Rubiacées vivent dans tous les biotopes, même dans les déserts. Elles sont nombreuses dans les forêts tropicales, aussi bien humides que sèches où elles vivent surtout dans le sous-bois. Les savanes sont moins riches en Rubiacées et ce sont surtout les formes herbacées qui y sont présentes (Cardon, 2003).

Les différentes espèces de garance se localisent dans trois principales zones. L'Europe occidentale, le pourtour du Bassin Méditerranéen ainsi qu'une grande partie de l'Asie pour la garance des teinturiers (*R. tinctorum* L.) et la garance des voyageurs (*R. peregrina* L.). Les garances dites indiennes poussent et plus précisément sur les pentes de l'Himalaya: la garance du Munjeet (*R. cordifolia* L.) et la garance du Sikkim (*R. sikkimensis* K.). Enfin, une espèce est endémique au Japon (*R. akane* N.) (Cardon, 2003) (Figure 2).

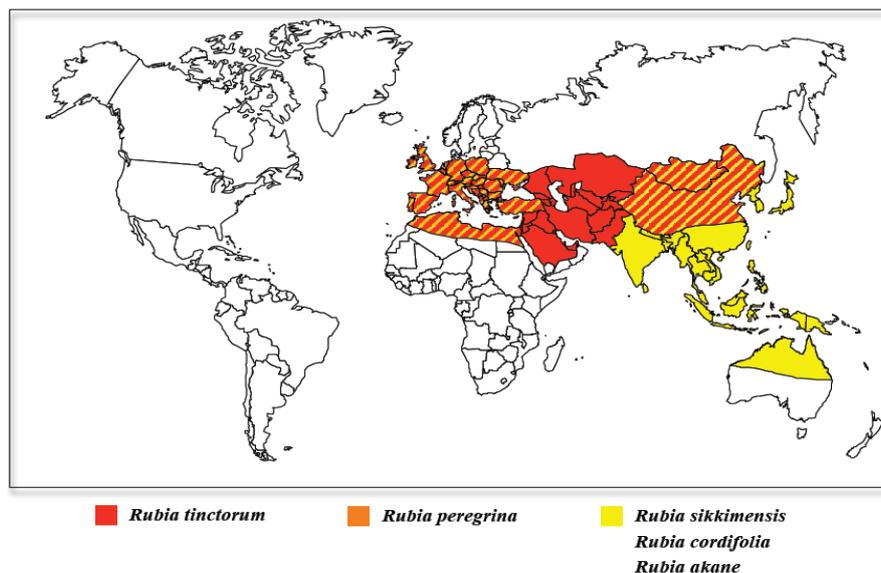


Figure 2 : Répartition géographique des différentes espèces de garance (Hovaneissian, 2005).

Au Maroc La garance habite les forêts et les broussailles de la plaine et des montagnes du Rif, du Moyen Atlas, du Haut Atlas, des Béni Snassen, des montagnes de Debdou, du Maroc central et occidental jusque vers 2000 m d'altitude. C'est une espèce à large répartition géographique (Aafi, 2002).

2. 5 Utilisations traditionnelles

RT est une plante utilisée depuis des milliers d'années. Ses applications sont donc très diverses et varient selon les régions et les populations qui les utilisent. Les activités thérapeutiques les plus citées dans la littérature pour cette plante sont (Hindorf et Omondi, 2011 ; Jain et Bhardwaj, 1982):

- ✓ L'activité diurétique et surtout en tant qu'hypotenseur
- ✓ L'activité emménagogue
- ✓ L'activité dans les obstructions de la rate
- ✓ L'activité purgative/laxative
- ✓ L'activité cholagogue.

A celles-ci s'ajoutent des actions diverses telles, celles citées par Pierre Joseph Garidel : la garance "comme débouchant les obstructions du foie, de la rate et de la matrice" (Garidel, 1715).

La garance est aussi recommandée contre la jaunisse, l'anémie et les dartres (Debuigne, 1974). Leclerc confirmait les propriétés diurétiques, pour lesquelles les pays arabes l'emploient encore (Leclerc, 1933). Certains principes actifs auraient des propriétés dissolvantes entraînant la formation de complexes solubles calciques et magnésiens et seraient donc cités dans la prévention de la formation des calculs (Debuigne, 1974).

Selon Culpeper, (2006) elle a été utilisée dans le traitement de l'ictère, l'obstruction de la rate, la mélancolie, la paralysie, les hémorroïdes, la sciatique et les ecchymoses: les racines doivent être bouillies dans du vin et du sucre ou du miel ajouté. La graine de la garance gorgée de vinaigre et de miel est utilisée pour le gonflement de la rate, les feuilles et les tiges sont utilisées en cas de retard dans les menstruations ou encore les feuilles et les racines sont écrasées et appliquées sur des tâches de rousseur et d'autres colorations de la peau (Jain et Bhardwoj, 1982).

Elle a aussi des propriétés purgatives et cholérétiques par les feuilles. En herboristerie, la garance est connue pour être cholagogue, antilithiasique, astringente et laxative. En usage traditionnel la décoction de racine est hypotensive et utilisée dans les infections de l'arbre urinaire, les diarrhées et la stérilité (Derksen, 2002).

Au Maroc, cette plante est largement utilisée en pharmacopée traditionnelle (Bellakhdar, 1997). Elle est utilisée comme plante apéritive pour faire grossir, mais aussi en cas de convalescence où elle a la réputation de permettre la remise en forme. Son usage est beaucoup plus important en cas d'anémie ou encore pour faciliter l'accouchement chez les femmes et même après. En effet, la décoction de la plante entière est prescrite dans les anémies et toutes les maladies du sang. Sa prise quotidienne est conseillée pour augmenter le volume sanguin et améliorer le teint. Réputée aphrodisiaque, elle est souvent incorporée au pain dont elle colore la mie en rouge. Sa décoction est administrée aux nourrissons comme anti-diarrhéique. Elle est écrasée sous sa forme fraîche et introduite lors de la confection du pain ou encore comme condiment dans la cuisson des plats (Bellakhdar, 1978).

Dans la région de Marrakech, les racines de RT, sont utilisées en décoction buvable comme anti-ictérique. Dans le même but, on peut aussi faire cuire un œuf dans cette décoction et manger ensuite l'œuf dur (Benchaabane et Abbad, 1994).

3. Données phytochimiques

Les travaux antérieurs réalisés pour la caractérisation chimique du genre RT ont permis l'isolement et l'identification des composés les plus abondants dans le parenchyme des racines

et qui possèdent une origine biosynthétique commune. Ils sont constitués d'une structure chimique de base correspondant au noyau anthracène-9,10-dione ou anthraquinone (*Figure 3*).

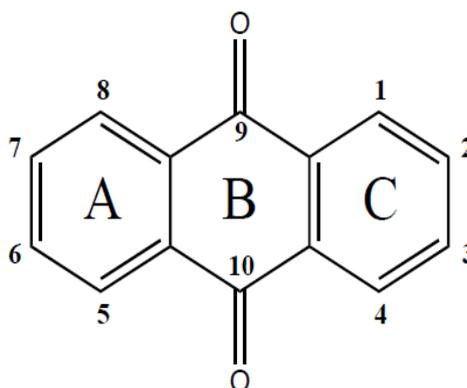


Figure 3 : Structure du noyau anthraquinone (Burnett et Thomson, 1968).

La biosynthèse des anthraquinones chez les *Rubiaceae* est réalisée selon deux principaux schémas : celui de l'acide shikimique, formant les noyau A et B, ainsi que celui dit «terpénique» via l'acide mévalonique (Leistner et Zenk, 1967; Burnett et Thomson, 1968; Han *et al.*, 2002). Les structures anthraquinoniques dites «aglycones», présentes dans la garance, diffèrent selon la nature et le positionnement des substituants sur le noyau C de la structure de base. La plante biosynthétise principalement l'alizarine (1,2-dihydroxyanthraquinone), la lucidine (1,3-dihydroxy-2-hydroxyméthylanthraquinone), la purpurine (1, 2,4-trihydroxyanthraquinone) et la rubiadine (1,3-dihydroxy-2-méthylanthraquinone). D'autres anthraquinones ont été identifiées comme l'antragallol (1, 2,3-trihydroxyanthraquinone), lamunjistine (2-carboxy-1,3-dihydroxyanthraquinone), le nordamnacanthal (2-formyl-1,3-dihydroxyanthraquinone), la pseudopurpurine (3-carboxy-1, 2,4-trihydroxyanthraquinone), la quinizarine (1,4-dihydroxyanthraquinone) et la xanthopurpurine ou purpuroxanthine (1,3-dihydroxyanthraquinone) (Schweppe, 1992; Derksen *et al.*, 1998 ; Novotná *et al.*, 1999; DeSantis et Moresi, 2007). Les structures chimiques de ces anthraquinones sont détaillées dans la *Figure 4*.

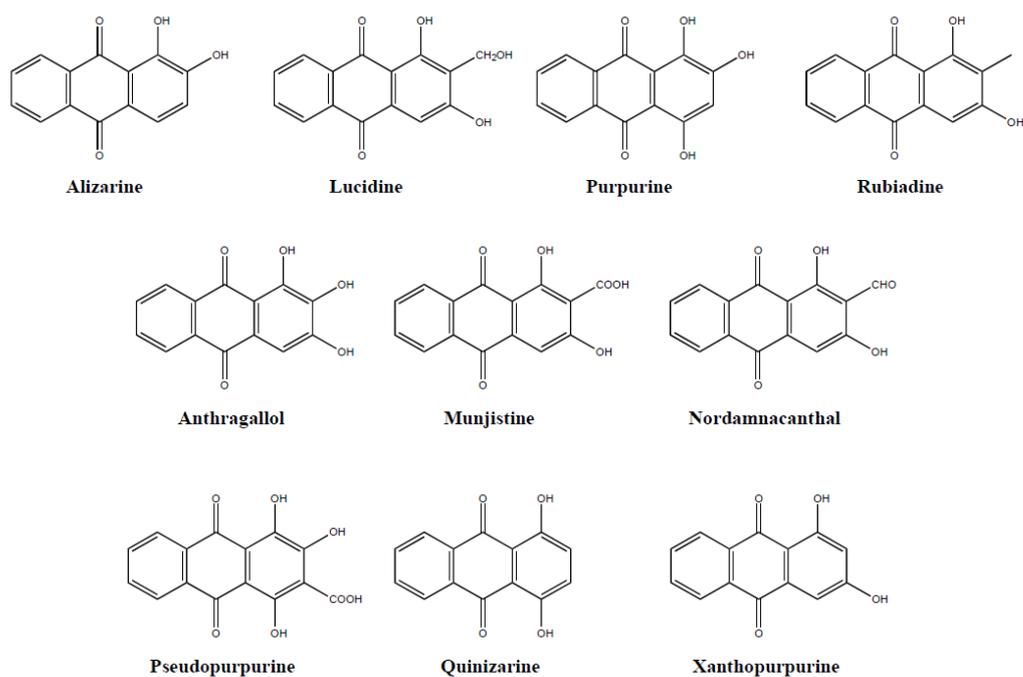


Figure 4 : Structures des principales anthraquinones aglycones rencontrées dans les racines de garance (Derksen *et al.*, 1998).

Concernant l'espèce marocaine, une analyse phytochimique menée par Odounga, (2011) sur les extraits chloroformique et méthanolique de racines de RT a révélé la présence des anthraquinones majeures qui ont été caractérisées par chromatographie (CCM et HPLC), et par spectrométries UV-Visible et de masse. Il s'agit de la lucidine (**1**) et de deux de ses dérivés hétérosidiques : la lucidine-3-O- primeveroside (**2**) et la lucidine-3-O-glucoside (**3**), de la rubiadine (**4**), de l'acide rubérythrique (**5**); en plus de l'alizarine (**6**), de la purpurine (**7**), et le nordamnacanthal (**8**) (Figure 5).

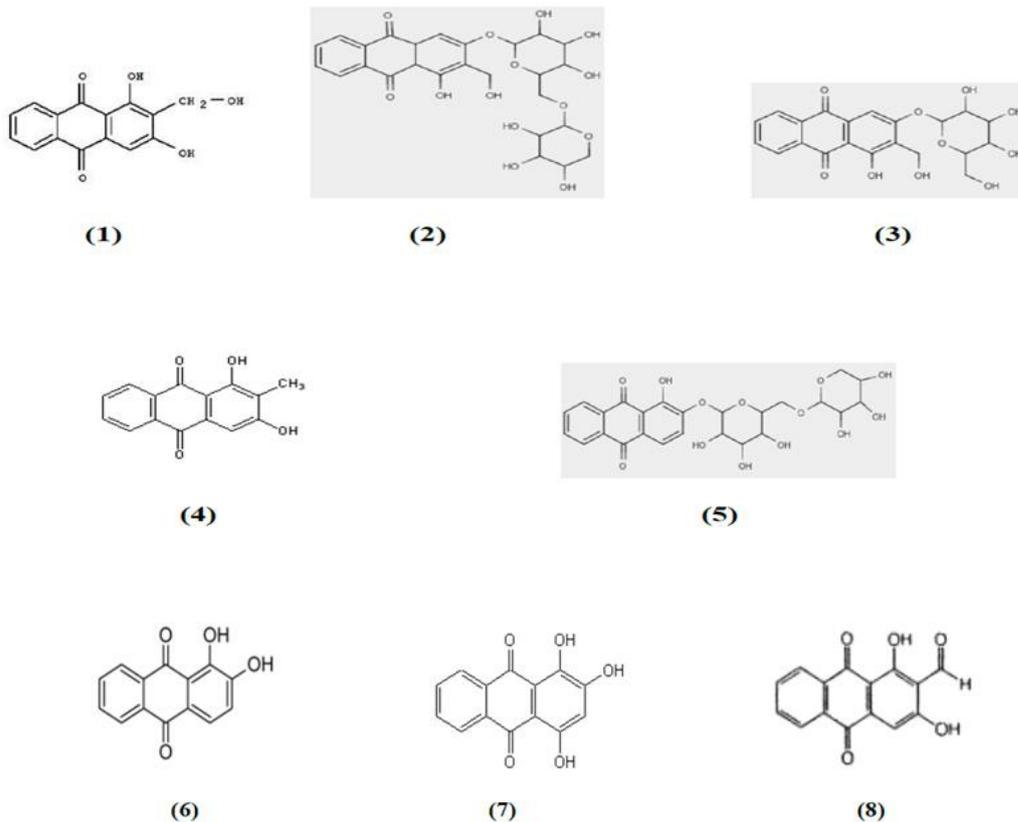


Figure 5 : Structures des principales anthraquinones majeures rencontrées dans les racines de l'espèce Marocain (RT) (Odounga, 2011).

4. Données pharmacologiques

De nombreux travaux ont rapporté que cette plante possède plusieurs activités biologiques telle que les activités anti cancéreuse, antimicrobienne, antioxydante, anti inflammatoire (tableau, 1) qui justifient certaines utilisations traditionnelles (Park *et al.*, 2009 ; Sharifzadeh *et al.*, 2014 ; Alsarhan, 2013). Les principes actifs anthraquinoniques comme l'alizarine, purpurine et l'acide rubérythrique présents dans les racines de RT possèdent des propriétés thérapeutiques antibactériennes et antifongiques. L'activité antimicrobienne des extraits de RT a été mise en évidence sur les bactéries, les levures et les champignons. Il a été démontré que les extraits de racines ont une activité antibactérienne supérieure à celle des extraits de la partie aérienne (Kalyoncu *et al.*, 2006). De même Mehrabian *et al.*, (2000) ont démontré une activité antibactérienne des extraits méthanoliques, chloroformiques et aqueux de RT sur des microorganismes aéroportés. Cette plante est aussi utilisée par les dermatologues pour la détection du calcium dermique dans les troubles tels que le pseudo-xanthome élastique (Norton *et al.*, 1998). Les extraits des racines de RT ont également fait l'objet de recherches de l'activité

anti-inflammatoire. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux présente un effet anti-inflammatoire puissant attribué aux composés polaires qui sont extraits dans l'eau (Sharifzadeh *et al.*, 2014).

Lajkó, et ses collaborateurs (2015) ont démontré l'activité inhibitrice efficace et sélective de la purpurine sur les cellules de mélanome et son utilisation possible comme agent anticancéreux ciblé (Lajkó *et al.*, 2015). Tandis que l'étude réalisée par karim *et al* (2010) a révélé l'effet antidiarrhéique de l'extrait aqueux de RT chez des rats rendus diarrhéiques avec l'huile de ricin, par un effet antispasmodique qui a réduit les contractions intestinales et a donc permis une plus grande durée d'absorption de l'eau (Karim *et al.*, 2010).

Les études réalisées en 1986 par Wijnsma et Verpoorte ont rapporté que les anthraquinones de RT sont dotées d'activités diurétiques et inhibitrices de calculs (Wijnsma et Verpoorte, 1986). D'autres activités biologiques et pharmacologiques des extraits de RT ont été mis en évidence à travers plusieurs publications internationale sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 1: Quelques activités biologiques de RT

Activité	Support de l'activité	Références
Activité anti-diarrhéique	Extrait aqueux	Karim <i>et al.</i> , 2010.
Activité anti-inflammatoire	Extraits éthanolique et aqueux	Sharifzadeh <i>et al.</i> , 2014
Activité Anti-urolithiasique	Extrait méthanolique	Prasad <i>et al.</i> , 2007
Activité antibactérienne	Extrait méthanolique et chloroformique	Mehrabian <i>et al.</i> , 2000
Activité antifongique	Extraits éthanolique, aqueux méthanolique, acetate d'ethyle	Kalyoncu <i>et al.</i> , 2006
Activité anti-tumorale	Extrait aqueux	Lajkó <i>et al.</i> , 2015
Activité Antiplaquettaire	Anthraquinone (Chrysophanol-8-O-glucoside)	Seo <i>et al.</i> , 2012

II. Données générales sur les fonctions et les comportements étudiés

1. Activité hépatoprotectrice

1. 1 Rappel anatomo-histologique du foie

Le foie est le plus volumineux organe dans le corps humain, il représente presque le 1/40^{ème} du poids corporel et occupe le quadrant droit au-dessous du diaphragme (D'après Castaing et Veilhan, 2006). Il est constitué de 4 lobes : le gauche, le droit et en bas du côté viscéral, le lobe carré et le lobe caudé (*Figure 6*). Entre les deux petits lobes (carré et caudé), pénètrent l'artère hépatique, la veine porte, ainsi que les vaisseaux lymphatiques et les fibres nerveuses du système nerveux autonome.

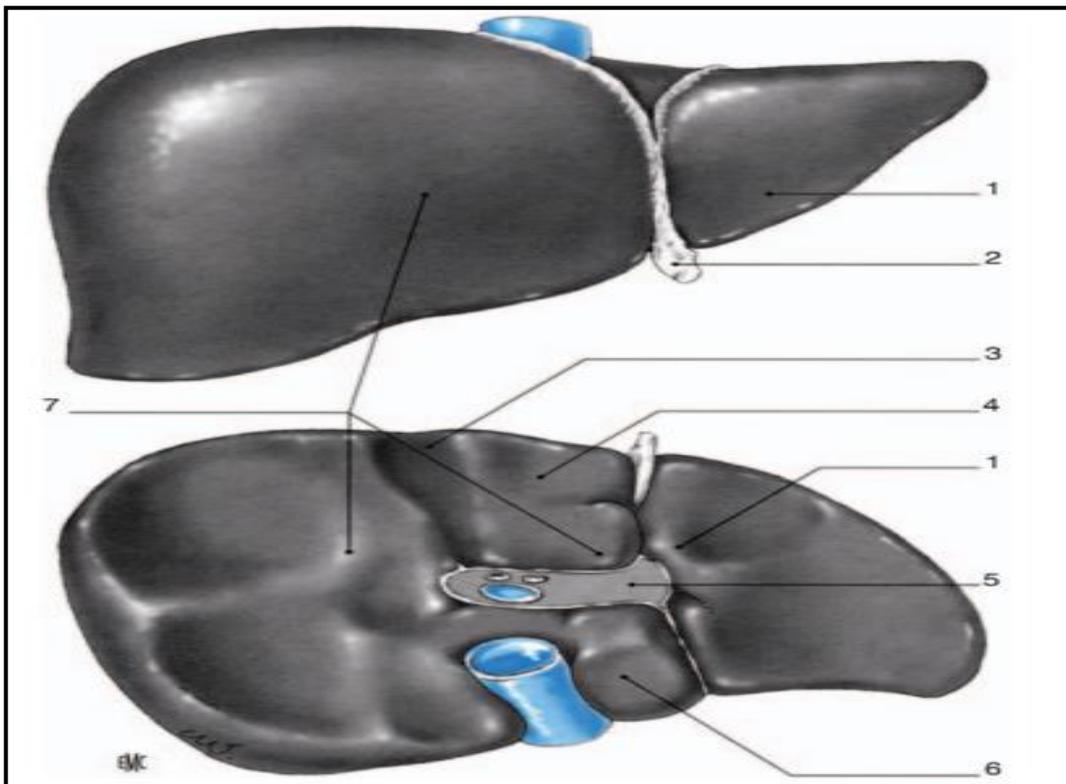


Figure 6 : Morphologie hépatique: vues diaphragmatique et inférieure. **1.** Lobe gauche; **2.** Ligament rond; **3.** Lit vésiculaire; **4.** Lobe carré; **5.** Hile; **6.** Lobe de Spiegel; **7.** Lobe droit (D'après Castaing et Veilhan, 2006).

Les conduits hépatiques droits et gauches se réunissent en un conduit hépatique commun. Celui-ci s'unit au conduit cystique pour former le canal cholédoque commun (*Figure 6*). 75% du sang que le foie contient, vient de la veine porte (plus d'un litre/min), contenant des aliments absorbés dans l'intestin grêle et les produits de dégradation venant de la rate, les hormones du pancréas et les substances réabsorbées en partie par la muqueuse gastrique. Les 25 % restants

viennent de l'artère hépatique responsable de l'irrigation du foie et de sa survie (Moore et Dalley, 2001).

Structure interne du foie

Le foie contient un nombre géant de petits lobules de forme hexagonale et d'une grandeur de 2 mm. Au centre de chaque lobule, se trouve la veine Centro-lobulaire, aux coins du lobule se trouvent des branches de la veine porte, une branche de l'artère hépatique et un petit canalicule biliaire (triade de Glisson) (*Figure 7*) (Marieb et Hoehn, 2014).

Les hépatocytes forment des travées qui cheminent en direction de la veine centrale. Le sang circule dans l'espace entre les travées précisément dans les sinusoides hépatiques (capillaires hépatiques dilatés). Ainsi, les hépatocytes sont mis en contact avec différents métabolites. Dans les sinusoides, se logent les cellules étoilées de Kupffer appartenant au système des macrophages monocytes, qui purifient le sang et détruisent les vieux érythrocytes (Thiele, 2010).

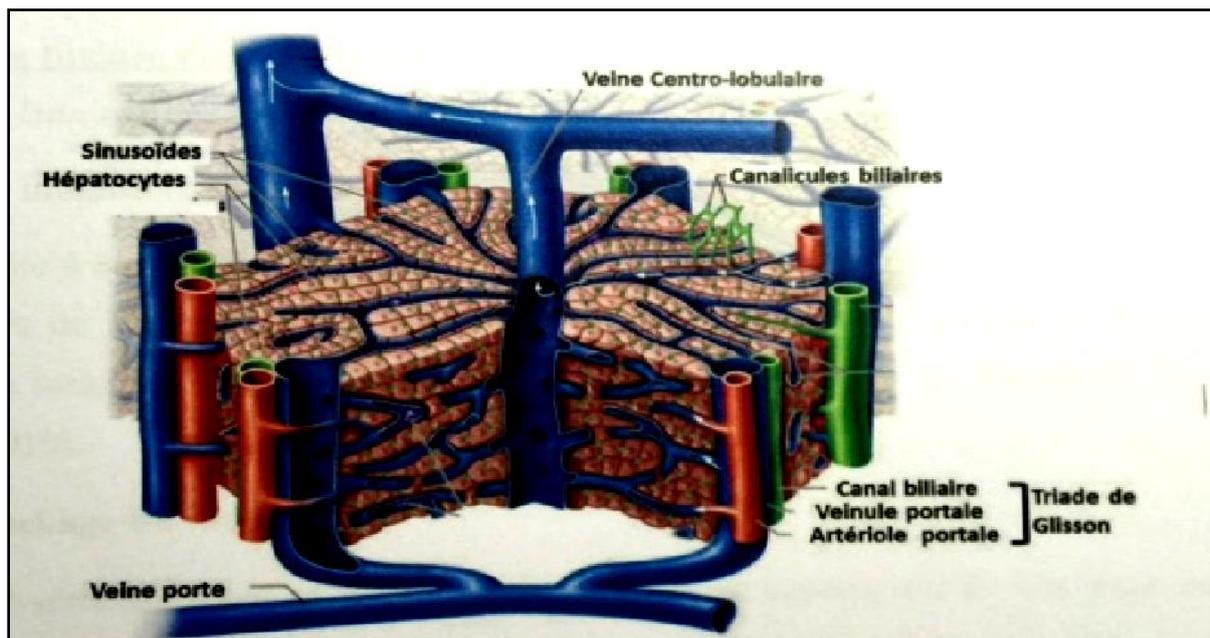


Figure 7 : Structures internes du foie : le lobule hépatique. (D'après Marieb et Hoehn, 2014)

1. 2 Physiologie et fonction hépatique

1 2. 1 Métabolisme des protéines, graisses et hydrates de carbone

Le foie joue un rôle primordial dans le métabolisme des protéines, des hydrates de carbone et des graisses.

Les protéines: 95% de toutes les protéines sanguines (albumine, globuline, prothrombine, fibrinogène, transferrine, plasminogène) sont produites dans le foie (Thiele, 2010)

Les hydrates de carbone: le glucose est un élément essentiel au fonctionnement cellulaire. Pour maintenir une glycémie normale, le foie intervient en stockant sous forme de glycogène et en le libérant en cas de besoin, sous l'action d'hormones hypo et hypoglycémiantes respectivement comme l'insuline et le glucagon (Thiele, 2010).

Les graisses: sont aussi métabolisées en grande partie dans le foie pour produire le cholestérol nécessaire à la formation de la bile, qui facilite l'absorption intestinale des graisses et des vitamines liposoluble (Thiele, 2010).

1. 2. 2 La détoxification

Les toxines endogènes : l'ammoniaque issue du catabolisme des protéines est transformée dans le foie en urée, de même pour les hormones comme les œstrogènes qui sont dégradées aussi dans cet organe (Thiele, 2010).

Les toxines exogènes : comme les médicaments, les additifs de l'industrie alimentaire sont aussi dans cet organe (Thiele, 2010).

1. 2. 3 Le métabolisme du fer

Suite à la dégradation des vieux érythrocytes par les cellules étoilées du foie qui sont les cellules de kuppfer, le fer est stocké dans le foie et libéré en cas de besoin dans la circulation sanguine, pour rentrer de nouveau dans la formation de l'hème des érythrocytes (Thiele, 2010).

1. 2. 4 Stockage du sang

Par rétrécissement et dilatation des vaisseaux hépatiques, le foie peut modifier la quantité de sang qui le traverse et ainsi s'adapter aux changements du corps (Thiele, 2010).

1. 2. 5 L'hématopoïèse

Jusqu'au 5^{ème} mois de la vie fœtale, le foie contribue à l'hématopoïèse, même à l'âge adulte, il peut reprendre cette fonction suite à des cas pathologiques comme la perturbation de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse (ex. leucémie) (Thiele, 2010).

1. 2. 6 La bilirubine

C'est le produit de dégradation de l'hème des hémoglobines, chaque jour 300 mg de bilirubine sont formés. Elle est couplée à l'albumine et transportée au foie (car elle est insoluble dans l'eau) où peut y être libre (bilirubine non conjuguée). Puis, couplée à un acide glucuronique qui la rend soluble dans l'eau: c'est la bilirubine conjuguée qui sera éliminée dans les intestins par voie biliaires (Thiele, 2010).

Dans le gros intestin, elle sera transformée en stercobilines et urobilinogènes. Les stercobilines (80%) seront éliminés dans les selles, et les urobilinogènes (20%) retournent au foie par voie entéro-hépatique puis sont éliminées par les reins ou par le foie sous forme de bile (Thiele, 2010).

1. 3 Physiopathologie des atteintes hépatiques

Le foie assure des fonctions nombreuses et vitales à l'organisme. Ses atteintes sont multiples et perturbent parfois gravement la santé du corps humain. Il existe une large gamme de trouble hépatiques, entre autre, la cirrhose et la fibrose hépatique, l'hépatite médicamenteuse, les hépatites auto-immunes et les tumeurs hépatiques,

1. 3. 1 Pathogenèse de la cirrhose hépatique

La cirrhose hépatique est le stade majeur de développement de la fibrose hépatique qui découle souvent des maladies chroniques hépatiques d'ordre environnemental telles que : l'alcool, les hépatites virales chroniques B et C, les hépatopathies médicamenteuses (Ex : méthotrexate), et génétique telles que : l'hémochromatose génétique, les hépatopathies auto-immunes, hépatopathies métaboliques dont la maladie de Wilson (maladies génétique conduisant à une surcharge en cuivre) (Sawadogo, 2007). La cirrhose est caractérisée par la présence de trouble de l'architecture du parenchyme hépatique, avec entourant des nodules hépatocytaires appelés aussi de régénération (Friedman, 2003). Cette complication est souvent suivie d'autre atteintes potentiellement graves, telles que : l'hypertension portale donnant lieu à une hémorragie par rupture des varices œsogastriques, l'infection du liquide d'ascite, le syndrome hépatorénal, le carcinome hépatocellulaire et enfin une encéphalopathie hépatique (Sawadogo, 2007).

La physiopathologie de la cirrhose hépatique comporte plusieurs étapes et fait intervenir plusieurs mécanisme et type cellulaires à savoir :

1. 3. 2 La fibrose hépatique

Elle suit généralement toute hépatopathie chronique manifestée par une atteinte hépatobiliaire et/ou inflammation. Il s'agit d'une réponse cicatrisante excessive suite à une altération des hépatocytes et augmentation des constituants de la matrice extracellulaire (MEC), dû à un déséquilibre entre la synthèse, le dépôt et la dégradation de ses constituants de la MEC qui provient de l'assemblage de macromolécules appartenant à plusieurs familles : les collagènes, les glycoprotéines, l'élastine, les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes (Sawadago, 2007).

Plusieurs rôles sont attribués à la MEC à savoir : la communication intercellulaire, l'adhésion des cellules, leur migration, leur différenciation, leur croissance et la régulation de leurs gènes. Normalement il existe un équilibre entre la fibrolyse. Ainsi, une fibrose pathologique survient dans la MEC, ce qui donne une désorganisation de l'architecture hépatique touchant aussi bien l'aspect anatomique que fonctionnel (Sawadago, 2007).

Le stade le plus avancé de la fibrose hépatique est la cirrhose. Au cours des hépatopathies virales et biliaires, la fibrose hépatique est à point de départ portal, tandis qu'elle est centrolobulaire au cours des hépatopathies alcooliques (Bataller et Brenner, 2005).

1. 3. 3 Rôle des cellules étoilées du foie (CEF)

Les lésions hépatocytaires et biliaires provoqueraient une libération de médiateurs qui activent les CEF (Friedman, 2003). Ces cellules prolifèrent et subissent une transformation en myofibroblastes contractiles (Friedman, 2003). Par la suite, elles prolifèrent et commencent à produire du collagène fibrillaire caractéristique de la fibrose et de la cirrhose (Bataller et Brenner, 2005).

1. 3. 4 Hépatites auto-immunes

L'hépatite auto-immune (HAI) est une maladie d'étiologie inconnue où l'infiltration du foie par des lymphocytes auto-réactifs mène à la destruction progressive du parenchyme hépatique (Gueguen *et al.*, 1991). En absence de traitement, elle progresse vers la cirrhose et le temps de survie médian est alors de 3.3 ans (Yamamoto *et al.*, 1993). Les différentes observations cliniques et l'étude de la pathogenèse de l'HAI ont amené les chercheurs à émettre

l'hypothèse que cette maladie, comme la majorité des maladies auto-immunes, serait multifactorielle.

L'HAI se classe en deux types selon les auto-anticorps présent dans le sérum du patient (Manns *et al.*, 1989).

- L'HAI de type 1 est définie par la présence d'auto-anticorps anti-muscles lisses (SMA pour smooth muscle antibody) et/ou anti-nucléaire (ANA pour anti-nuclear antibody).
- Le type 2 est quant à lui défini par la présence d'auto-anticorps dirigés contre le cytochrome P450 2D6 (LKM1 pour anti-liver-kidney microsome type 1 antibody) et/ou contre la formiminotransférase-cyclodéaminase (LC1 pour liver-cytosol type 1 antibody)

1. 3. 5 Hépatotoxicité médicamenteuse

L'hépatotoxicité est définie comme le pouvoir qu'a une substance (comme les médicaments) de provoquer des dommages au foie. La toxicité au foie se manifeste sous forme d'inflammation (on parlera d'hépatite) ou encore de nécrose (mort des cellules du foie), dans les cas plus sévères. Les principaux mécanismes d'hépatotoxicité sont exposés. Le premier mécanisme est la formation de métabolites réactifs par l'intermédiaire de la biotransformation du médicament par un (ou plusieurs) cytochromes P450. Ces métabolites peuvent subséquemment entraîner un stress oxydant, une peroxydation des lipides et des altérations la perméabilité des membranes mitochondriales qui introduiront la mort cellulaire par nécrose, ou apoptose (Fromenty, 2010).

Le médicament (ou l'un de ces métabolites) peut également altérer les fonctions mitochondriales en inhibant directement l'oxydation mitochondriale des acides gras, ou indirectement par inhibition de la chaîne respiratoire. Dans ce cas, le médicament induit une accumulation de triglycérides (stéatose) qui, à long terme, peut évoluer en stéato-hépatite, une atteinte hépatique caractérisée par de la nécro-inflammation et de la fibrose (Fromenty, 2010).

Le médicament peut aussi perturber le métabolisme des lipides par d'autres mécanismes, ou la sécrétion des acides biliaires. Il est à noter que les hépatocytes ne sont pas les seules cellules qui peuvent être impliquées dans l'hépatotoxicité des médicaments. Par exemple, les macrophages résidents du foie (cellules de Kupffer) et les cellules étoilées peuvent jouer un rôle important dans certains cas, en particulier dans les formes chroniques d'hépatotoxicité. Enfin, il est important de souligner qu'il existe de nombreux facteurs génétiques, physiologiques,

métaboliques et nutritionnels qui semblent augmenter le risque d'hépto-toxicité de certains médicaments (Fromenty, 2010).

2. Activité anti-lithiasique

Le rein est un organe vital, responsable de multiples fonctions de régulation, d'élimination et de synthèse endogène. Il élimine une variété de déchets métaboliques tels que l'urée, l'acide urique et la créatinine. Il contrôle aussi la qualité d'eau et d'électrolytes nécessaire au maintien de l'équilibre osmotique des cellules. Finalement, il joue un rôle majeur dans la régulation du pH sanguin. Plus de 900 L de plasma passent par les reins en 24 heures. De ce volume, environ 20% (180 L/jour), est filtré au niveau des glomérules. Les tubules rénaux en réabsorbent presque la totalité, soit près de 99,5% (Dantzler, 1992).

2. 1 Rappel anatomique du rein

L'appareil urinaire est formé de deux reins, de deux uretères, d'une vessie et d'un urètre. Chaque élément joue un rôle crucial dans l'élimination des déchets sous forme d'urine.

Le rein est un organe pair richement vascularisé, situé à l'arrière de l'abdomen, de part et d'autre de la colonne vertébrale. Il est essentiel au fonctionnement de nombreux autres organes. Il comporte 2 régions bien distinctes: le cortex et la médullaire (Wallace, 1998) (Figure 8).

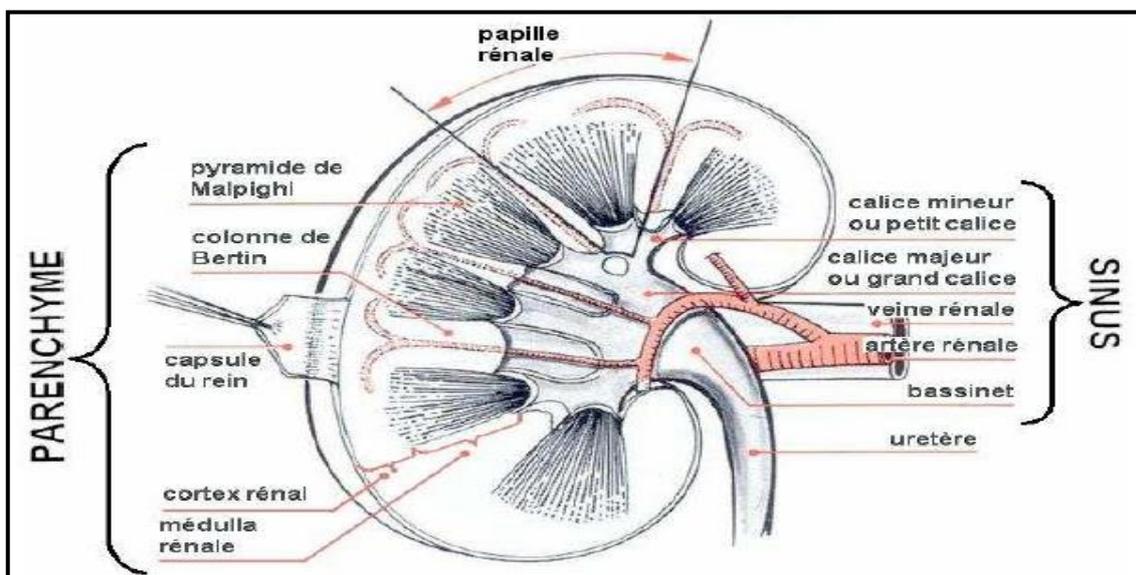


Figure 8 : Coupe longitudinale du rein gauche vu par sa face postérieure (Cité par Ieroy, 2004)

Chaque rein contient environ 1million d'unités fonctionnelles appelées néphrons (*Figure 9*). Les reins sont indépendants l'un de l'autre, si l'un est lésé ou ne fonctionne plus, l'autre peut tout de même fonctionner normalement (Nielsen *et al.*, 2012).

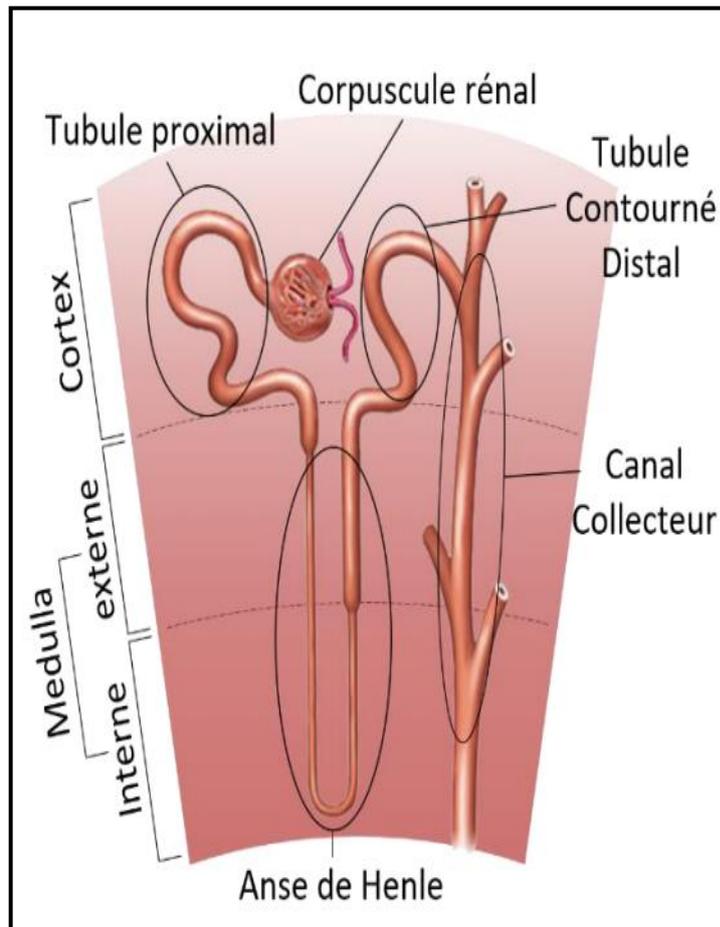


Figure 9 : Schéma d'un néphron dans la zone du parenchyme rénal (Nielsen *et al.*, 2012).

Les néphrons sont situés à la fois dans le cortex et la médulla, bien que leur plus grande partie soit située dans le cortex. Ils comportent deux parties principales, le corpuscule rénal ou corpuscule de Malpighi et le tubule rénal (Nielsen *et al.*, 2012).

Le Corpuscule rénal résulte de l'association de la capsule de Bowman qui représente l'extrémité invaginée du tube urinaire et un bouquet de capillaires émanant d'une artériole afférente (issue d'une artère inter-lobulaire) et convergeant vers une artériole efférente. Ce réseau de capillaire est appelé glomérule (Nielsen *et al.*, 2012).

Le tubule rénal s'étend de la capsule de Bowman jusqu'à sa jonction avec un tube collecteur. Ce tubule est formé du tube proximal, c'est la partie la plus longue et la plus contournée du tubule. L'anse de Henlé est le tube en forme de U responsable du transport de l'urine hors du néphron vers les calices. Elle est bordée par les tubes contournés proximal et distal et se caractérise par une branche descendante et une branche ascendante formant le U. Le tube contourné distal débouche vers le tube collecteur ou tube de Bellini à l'aide d'un canal d'union achevant ainsi la structure du néphron (Nielsen *et al.*, 2012).

Les tubules collecteurs convergent vers le sommet des pyramides appelé papille rénale et se déversent dans les petits calices, lesquels à leur tour débouchent dans les calices majeurs qui s'ouvrent directement dans le bassin rénal en forme d'entonnoir plus volumineux d'où les urines sont conduites à la vessie par l'uretère (Brunner *et al.*, 2006).

2. 2 Physiologie et fonction rénale

- **Formation de l'urine:**

L'urine se forme dans les néphrons par un processus complexe comportant trois étapes : la filtration glomérulaire du plasma des capillaires glomérulaires vers la lumière tubulaire; la réabsorption tubulaire du liquide tubulaire vers la lumière des capillaires péri-tubulaires; la sécrétion tubulaire du plasma des capillaires péri-tubulaires vers la lumière tubulaire (Brunner *et al.*, 2006; Gougoux, 2005).

En effet, Le sang passe par les capillaires glomérulaires, vaisseaux sanguins au début du néphron. À cet endroit, tout ce qui peut passer à travers la paroi des capillaires se retrouve dans les néphrons, soit l'eau, l'urée, les sels minéraux et le glucose; c'est la **filtration**. Par la suite, ce filtrat passe dans le tube contourné proximal, l'anse et le tube contourné distal. À ces endroits, "l'urine" subit une **réabsorption**, c'est-à-dire que l'eau, le glucose et les sels minéraux retournent dans le sang par les capillaires péri-tubulaires. Il y a aussi **sécrétion**, c'est-à-dire que le sang se débarrasse d'autres déchets, comme les ions acides H⁺, et les envoie dans le filtrat final (Brunner *et al.*, 2006; Gougoux, 2005).

Le liquide se rend ensuite dans le tube collecteur, puis vers le calice et le bassinnet du rein. Cette urine est transportée hors des reins par les uretères et amenée dans la vessie, avant d'être excrétée hors de l'organisme par l'uretère (Wallace., 1998). L'urine contient principalement de l'eau, de l'urée, de l'acide urique, de l'ammoniaque, des électrolytes ainsi que des toxines exogènes. Sa production est d'environ 1,5 litres/24 heures chez une personne normale.

Elle ne contient pas de protéines, ni de glucides ou de lipides. La présence de ces substances dans l'urine témoignerait de l'existence d'une pathologie (Touhami, 2008).

- **Fonctions des reins:**

La fonction la plus importante des reins est de maintenir constants le volume, la tonicité et la composition des liquides corporels (homéostasie). Cette fonction essentielle des reins requiert la filtration continue, au niveau du glomérule, de grandes quantités de liquide plasmatique qui est ensuite presque complètement réabsorbé par le tubule. Les reins corrigent les changements du contenu d'eau et d'électrolytes dans l'organisme en adaptant rapidement leur excrétion urinaire et en maintenant ainsi leur bilan externe constant (Gougoux., 2005).

Cette fonction des reins qui consiste à épurer les liquides corporels des produits de déchets endogènes et exogènes est bien connue. D'abord, les reins excrètent les déchets métaboliques azotés, tels que l'urée et la créatinine, dont l'accumulation dans les liquides corporels devient nuisible durant l'insuffisance rénale aiguë ou chronique.

Les reins éliminent aussi de l'organisme de nombreuses substances exogènes anioniques ou cationiques, qu'elles soient ingérées accidentellement ou prises comme médicaments (Gougoux, 2005). De plus, les reins accomplissent plusieurs autres fonctions, comme la conservation ou l'élimination des substances organiques et la sécrétion de diverses hormones contribuant à la régulation de la pression artérielle systémique, à la production des globules rouges par la moelle osseuse et à la minéralisation de l'os (Gougoux, 2005).

Le rein est à la fois l'organe effecteur de nombreux système hormonaux et un véritable organe endocrine capable de réguler le métabolisme des petites hormones polypeptidiques mais aussi de fabriquer des hormones ou des médiateurs d'action locale (Hannedouch, 2007):

- **Catabolisme rénal des hormones polypeptidiques :**

Le rein assure la dégradation et le catabolisme des hormones peptidiques tels que l'insuline, le glucagon, parathormone, la calcitonine, l'hormone de croissance, de façon générale le catabolisme des protéines de petit poids moléculaire, chaînes légères d'immunoglobuline, bêta 2 micro-globuline; tous ces petits polypeptides sont librement filtrés par le glomérule, réabsorbés au niveau du tube proximal où ils sont dégradés. Il s'agit d'un important mécanisme de régulation de l'activité hormonale à court terme puisque toute élévation de la concentration circulante d'une hormone polypeptidique augmente la charge filtrée et donc l'élimination rénale (Hannedouch, 2007).

- **Hormones agissant sur le rein :**

- * L'hormone antidiurétique (ADH ou arginine vasopressine) est un peptide libéré par la posthypophyse. Elle provoque la réabsorption d'eau dans les tubes collecteurs.

- * L'aldostérone est une hormone stéroïdienne produite par le cortex surrénal qui stimule la réabsorption de sodium dans le tube collecteur.

- * Le peptide atrial natriurétique (ANP) est produit par les cellules cardiaques et stimule l'excrétion de sodium dans les tubes collecteurs.

- * L'hormone parathyroïdienne (PTH) est une hormone polypeptidique produite par la glande parathyroïde qui stimule l'excrétion rénale de phosphate, la réabsorption de calcium et la production de vitamine D (Hannedouch, 2007).

- **Hormones synthétisée par le rein**

- La rénine est une protéine libérée par l'appareil juxta-glomérulaire. La rénine stimule la formation d'angiotensine II. L'angiotensine II est un puissant vasoconstricteur et stimule la réabsorption de sodium soit directement, soit via la production d'aldostérone.
- La vitamine D est une hormone stéroïdienne métabolisée par le rein sous sa forme active, 1,25 dihydroxycholécalférol ou calcitriol qui stimule l'absorption intestinale de calcium et de phosphate.
- L'érythropoïétine (EPO) est une hormone glycopeptidique produite dans le rein qui stimule la formation des globules rouges dans la moelle osseuse. L'érythropoïétine est la principale hormone régulant la masse globulaire.
- Les prostaglandines sont produites par le rein, elles ont de nombreux effets notamment sur la vascularisation rénale et la natriurèse.

L'IGF1 et l'EGF (*epidermal growth factor*) sont des hormones polypeptidiques qui interviennent localement dans la croissance ou la régénération des cellules tubulaires rénales (Hannedouch, 2007).

2. 3 Aperçu sur la lithogénèse

Le terme de lithogénèse regroupe l'ensemble des processus qui conduisent au développement d'un calcul dans les voies urinaires. Le calcul est une agglomération de cristaux liés par une matrice organique (Khan *et al.*, 1993; Ryall *et al.*, 2005). Le processus de la lithogénèse peut être décomposé en sept étapes qui se succèdent ou s'entremêlent au cours de la formation d'un calcul. Ces étapes sont les suivantes :

- la sursaturation des urines ;
- la germination cristalline ;
- la croissance des cristaux ;
- l'agrégation des cristaux ;
- l'agglomération cristalline ;
- la rétention des particules cristallisées ;
- la croissance du calcul.

La figure 10 rassemble les principales étapes de la lithogénèse. Cette figure montre la complexité des processus physicochimiques associés ainsi que différents mécanismes biochimiques mis en action par l'organisme afin d'éviter la formation de calcul: variation du pH urinaire, dilution des urines, complexation de certains ions pour limiter la formation d'espèces moléculaires peu solubles, blocage des sites de croissance cristalline par des ions ou des macromolécules (inhibiteurs), protection de l'épithélium urinaire contre l'adhérence cristalline, etc. De ce fait, les principales causes biochimiques de sursaturation des urines, liées à une concentration excessive de calcium, d'oxalate, d'acide urique ou à une concentration insuffisante de citrate, sont contrebalancées par la présence d'autres substances qui vont exercer des effets sur les cristaux eux-mêmes (inhibition de croissance ou d'agrégation) ou leur interaction potentielle avec l'épithélium (Daudon *et al.*, 2008).

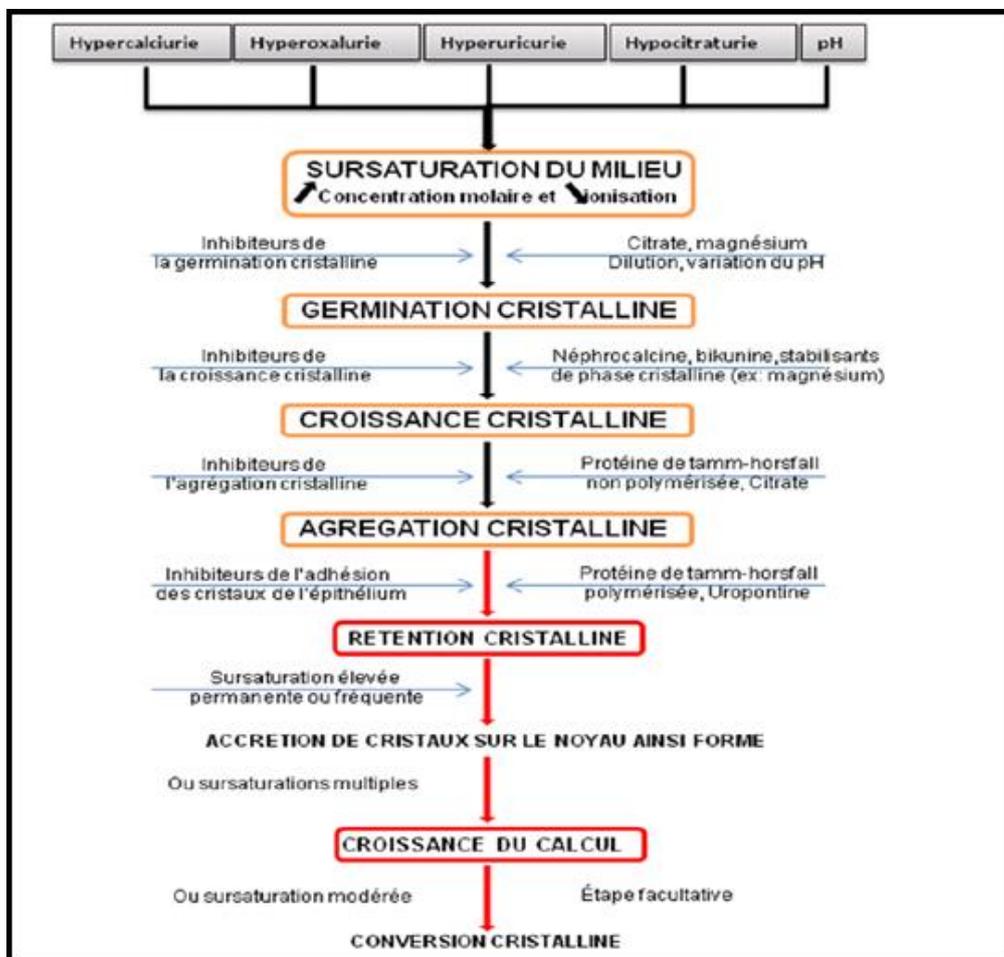


Figure 10 : Les étapes de la lithogénèse (Hannache, 2014)

Il existe normalement, dans les urines, un équilibre entre promoteurs et inhibiteurs de cristallisation. Cet équilibre peut être rompu soit par un excès des promoteurs, soit par un déficit des inhibiteurs (*Figure 11*). Les ions qui participent à la formation des espèces insolubles sont appelés promoteurs de la cristallisation. Au nombre d'une dizaine, les promoteurs de la cristallisation peuvent agir conjointement ou isolément. Le plus souvent, 2 ou 3 composés sont mis en œuvre pour aboutir à la formation de ces espèces moléculaires peu solubles qui peuvent alors précipiter sous différentes formes cristallines. Ces dernières se forment dans des environnements biologiques différents dont elles témoignent, d'où l'intérêt de les prendre en considération pour identifier les facteurs étiologiques d'une maladie lithiasique (Daudon *et al.*, 2008 ; Hennequin *et al.*, 1993).

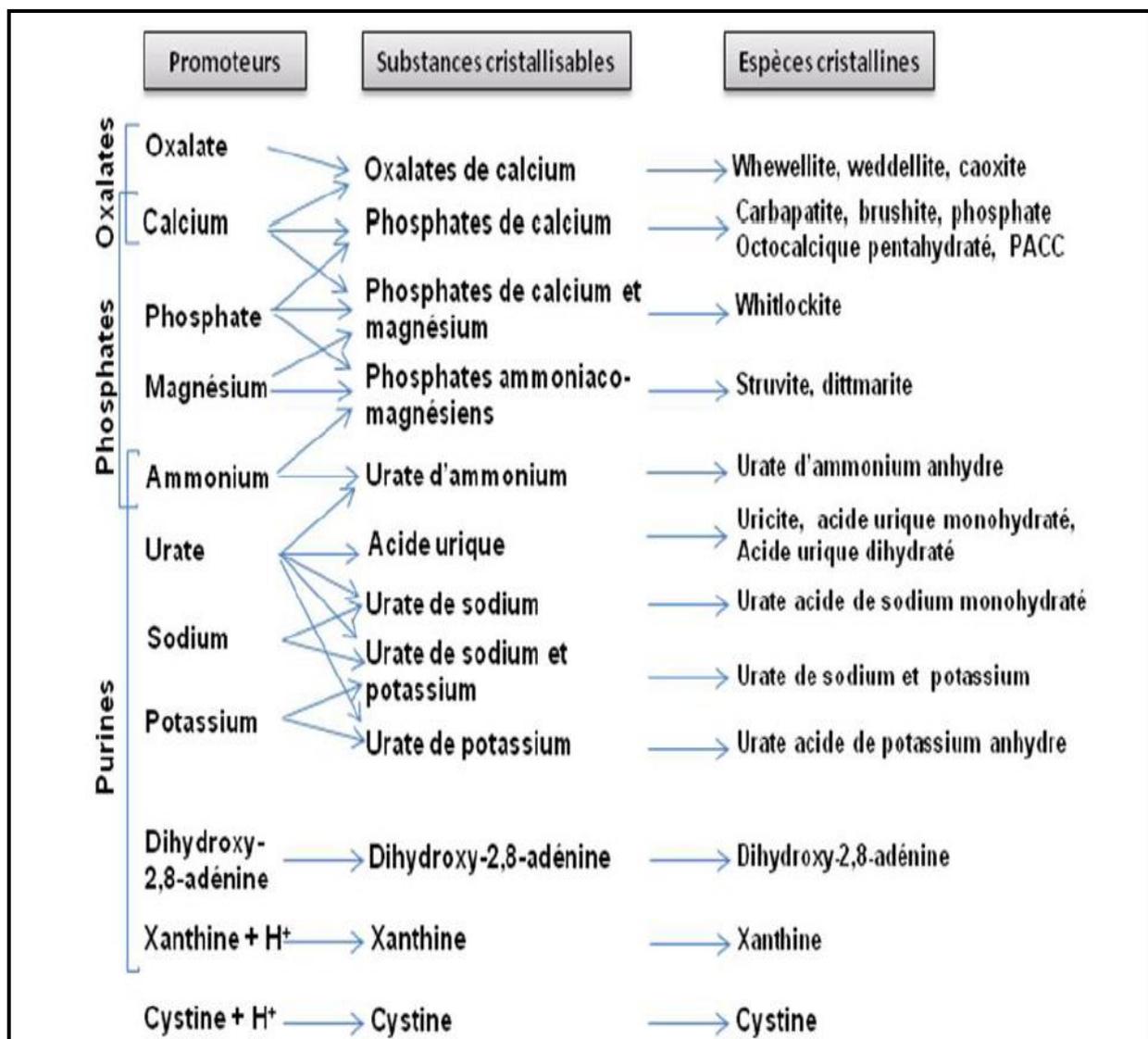


Figure 11 : Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines (Daudon *et al.*, 2008)

2. 4 Les différents types de calculs

L'analyse chimique des calculs a été remplacée par une analyse morpho-constitutionnelle fondée sur une description précise à l'échelle macroscopique complétée par une technique de caractérisation par spectroscopie vibrationnelle et plus précisément par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Daudon *et al.*, 1993 ; Daudon, 1993).

A l'échelle macroscopique, il s'agit de préciser la forme, la taille, l'aspect de la surface, la texture, la forme et l'aspect des cristaux, la couleur, la dureté, l'organisation et les principales caractéristiques de la section et, chaque fois que cela est possible, d'identifier le noyau qui a servi de point de départ à la formation du calcul. La spectrophotométrie infrarouge est devenue la méthode de référence en raison de sa polyvalence, de sa rapidité, de sa mise en œuvre aisée et de sa capacité à identifier simultanément les espèces cristallines et non cristallisées, les composants minéraux et organiques, les espèces métaboliques et médicamenteuses (plus de 70 molécules différentes). En revanche, la spectrophotométrie infrarouge ne peut pas identifier un nouveau corps, non encore décrit dans les calculs, comme un nouveau médicament par exemple, même si elle est capable de le détecter. D'autres techniques d'analyse sont alors nécessaires, comme la diffraction X pour identifier plus précisément la nouvelle substance détectée par l'analyse infrarouge. La spectrophotométrie infrarouge ne permet pas non plus de mettre en évidence la présence d'éléments traces (Le bail *et al.*, 2009). Les calculs urinaires peuvent être rassemblés au sein d'une classification comportant 6 types et 21 sous types, qui permet de classer plus de 95% des calculs de l'arbre urinaire :

- Les oxalates de calcium constituent la classe I pour la whewellite et la classe II pour la weddellite (Khan, 1991; Daudon *et al.*, 2009).
- Les calculs d'acide urique et les urates forment la classe III (Shirley and Sutor, 1968 ; Normand, 2013).
- Les phosphates calciques et magnésiens, soit carbapatite, struvite, brushite, sont rassemblés dans la classe IV whitlockite (Klee et Brito, 1991; Williams *et al.*, 2012)
- Les calculs de cystine (Classe V) sont liés à la cystinurie. Il s'agit d'une anomalie génétique qui entraîne l'excrétion d'une quantité excessive de cystine par les reins. Ce type de calcul peut survenir dès l'enfance (Barbey *et al.*, 2000 ; Letavernier *et al.*, 2012).
- Les calculs constitués de protéines sont rassemblés dans la Classe VI.

Notons l'existence de calculs de l'arbre urinaire d'autre nature comme les calculs d'origine médicamenteuse (Zanetta *et al.*, 2013 ; Bollée *et al.*, 2010) ou les calculs constitués de purines rares liées à des maladies génétiques (Bollée *et al.*, 2010).

3. Activité antiagrégante plaquettaire

3. 1 Plaquettes: Rappel anatomique et fonctionnel

3. 1. 1 Thrombopoïèse

La thrombopoïèse ou la mégacaryocytopoïèse et la plaquettogénèse sont les processus physiologiques qui aboutissent à la production des plaquettes sanguines. Les plaquettes sont produites à partir des mégacaryocytes, de grosses cellules multi-nucléées formées dans la moelle rouge de certains os (sternum, côtes, vertèbres, iliaques) (Boneu et Cazenave, 1997). Au repos, les plaquettes ont une forme discoïde et un diamètre de 2 μm pour un volume d'environ 8 μm^3 . Les deux tiers de la population plaquettaire circulent à une concentration comprise entre 150000 et 40000 plaquettes / μl , le reste étant séquestré dans la rate (Boneu et Cazenave, 1997). La durée de vie moyenne est de 8 à 10 jours, après elles sont phagocytées par les macrophage de la rate et du foie (Mason *et al.*, 2007). Les plaquettes ont une ultra structure complexe organisée autour de trois ensembles : la membrane plasmique, les organites et le cytosquelette (Figure 12).

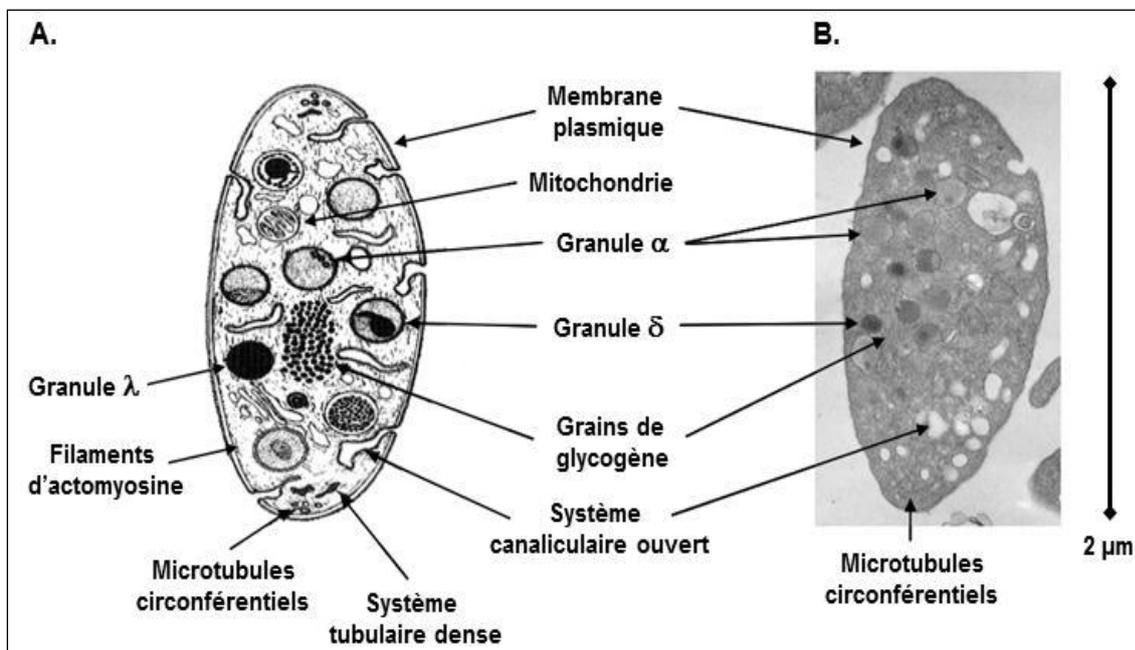


Figure 12 : Schématisation (A) et image de microscopie électronique à transmission (B) d'une plaquette au repos en coupe longitudinale (Zaid, 2015).

La membrane plasmique est une bicouche asymétrique composée de phospholipides, de cholestérol, de glycolipides, de protéoglycanes et de glycoprotéines. Des invaginations tortueuses constituent le système canaliculaire ouvert (SCO), qui démultiplie les contacts avec l'environnement et forme une réserve de membrane mobilisable lors du changement de forme (Boneu et Cazenave, 1997).

Les organites comprennent des mitochondries, des grains de glycogène, le système tubulaire dense (STD), qui correspond au réticulum endoplasmique et séquestre le Ca^{2+} , et des granules de stockage dont le contenu est sécrété lors de l'activation (Tableau 2) (Boneu et Cazenave, 1997; Ruiz *et al.*, 2004). Ces derniers sont 3 types : Les granules α sont les plus abondants et contiennent notamment des glycoprotéines adhésives, des facteurs de coagulation et des facteurs de croissance. Les granules denses ou δ renferment de fortes concentrations de substances pro-agrégantes et pro-coagulantes comme l'ADP, l'ATP, le Ca^{2+} et les polyphosphates.

Enfin, les granules λ sont analogues aux lysosomes et contiennent de nombreuses protéases (Boneu et Cazenave, 1997; Ruiz *et al.*, 2004). Il existe de rares cas de patients avec un déficit quantitatif ou qualitatif en granules α (Ex. syndrome des plaquettes grises) ou δ (Ex. maladie du « pool vide »), responsable d'hémorragies de sévérité variable (Nurden et Nurden, 2011).

Tableau 2 : Principales substances contenues dans les granules plaquettaires

Granules α	Granules denses (δ)	Granules λ
Glycoprotéines adhésives (Ex. fibrinogène, FW, TSP-1, fibronectine, vitronectine)	ADP (~650 mM) ATP (~440 mM) Sérotonine (~65 mM)	Hydrolases acides (Ex. cathepsines)
Facteurs de coagulation (Ex. facteurs V, XI, XIII, facteur tissulaire, kininogène de haut poids moléculaire)	Pyrophosphate (~330 mM) Polyphosphates (~1 mM) Ca^{2+} (~2 M)	Métalloprotéases (Ex. collagénases)
Inhibiteurs de la fibrinolyse (Ex. α_2 -antiplasmine, PAI-1)		
Facteurs de croissance et chimiokines (Ex. PDGF, TGF β , EGF, VEGF, PF4)		
P-sélectine		
Albumine		

EGF, *epidermal growth factor* ; PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1* ; PDGF, *platelet-derived growth factor* ; PF4, *platelet factor 4* ; TGF β , *transforming growth factor β* ; TSP-1, *thrombospondine-1* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor* (d'après Boneu et Cazenave, 1997; Mackman, 2004; Ruiz *et al.*, 2004).

Cytosquelette comprend un réseau circonférentiel de microtubules sous la membrane plasmique, qui maintiennent la forme discoïde de repos, et des filaments contractiles

d'actomyosine localisés d'une part dans la région sous-membranaire et d'autre part dans le cytosol (Boneu et Cazenave, 1997; Hartwig et De Sisto, 1991). L'activation plaquettaire entraîne des remaniements du cytosquelette à l'origine d'un changement de forme et de la sécrétion du contenu des granules. Selon le mode et l'intensité de stimulation, les changements morphologiques peuvent varier. Des plaquettes en suspension activées par un agoniste deviennent sphériques, se contractent et émettent des filopodes (*Figure 13*) (Cazenave *et al.*, 2004). Lorsque les plaquettes sont mises à adhérer sur une surface comme le fibrinogène ou le FW, elles adoptent également une conformation sphérique, se contractent et émettent des filopodes, avant d'étendre des lamellipodes et de s'étaler avec un aspect d'« œuf au plat » (*Figure 13*) (Goncalves *et al.*, 2003; Lanza *et al.*, 2008).

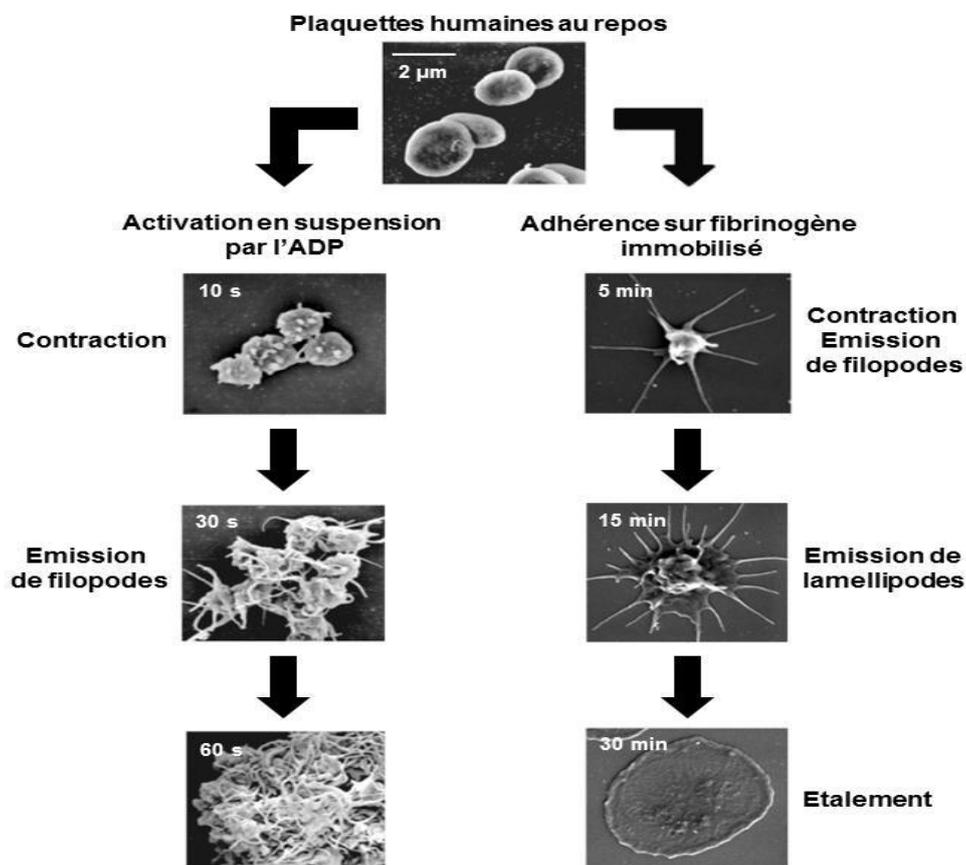


Figure 13 : Changements morphologiques des plaquettes au cours de leur activation en suspension par un agoniste soluble (ADP, 5 μM), ou après adhérence sur fibrinogène immobilisé. Images de microscopie électronique à balayage (Levin, 2013).

3. 1. 2 La fonction plaquettaire

Trois grandes fonctions contribuent aux propriétés hémostatiques des plaquettes : leur capacité à **adhérer** à la surface d'un vaisseau lésé, à **s'activer** en réponse aux protéines

matricielles et à des agonistes solubles, et à **agrég**er entre elles pour former le clou plaquettaire (Jackson, 2011; Ruggeri, 2002). Ces fonctions sont régulées par de nombreux récepteurs exprimés à la surface de la membrane plasmique (*Figure 14*).

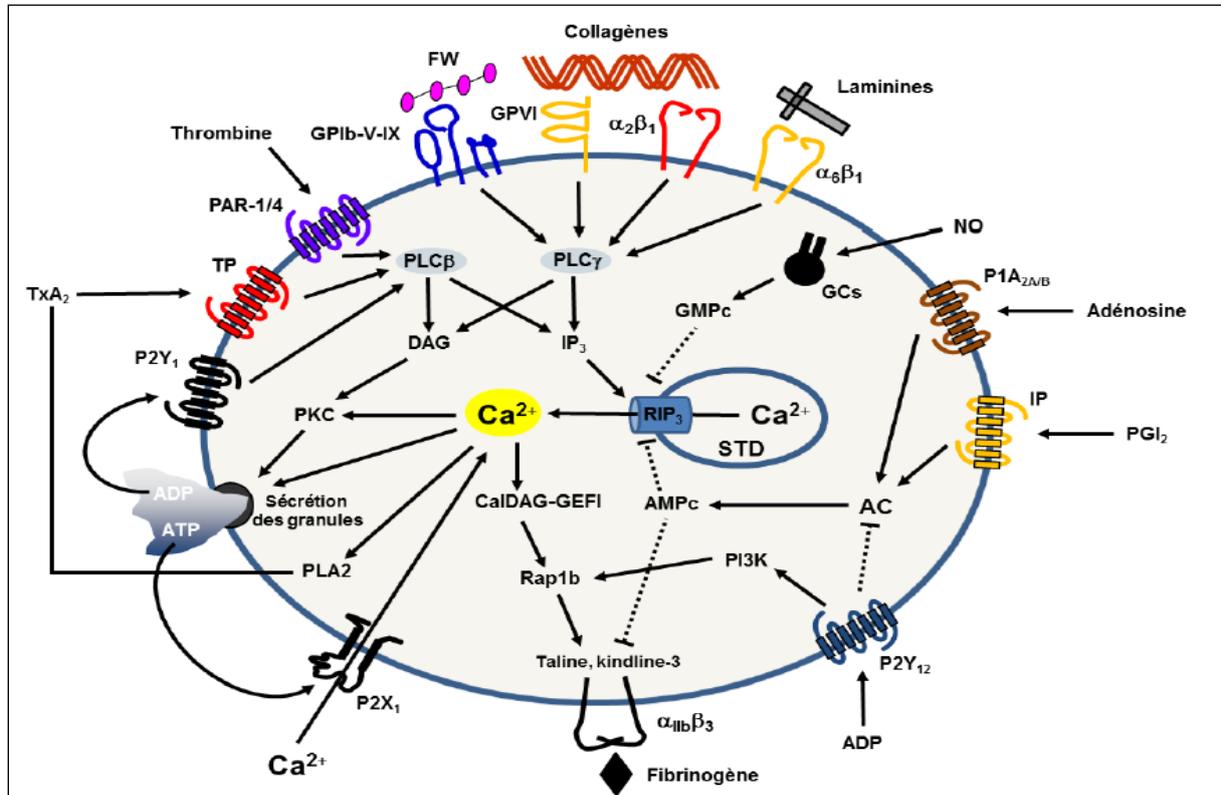


Figure 14: Schématisation des principales voies d'activation et d'inhibition des plaquettes. AC, adénylate cyclase ; AMPc, adénosine 3',5'-monophosphate cyclique ; CalDAG-GEFI, *Ca²⁺ and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor I* ; DAG, diacylglycérol ; GCS, guanylate cyclase soluble ; GMPc, guanosine 3',5'- monophosphate cyclique ; GP, glycoprotéine ; IP, *prostacyclin receptor* ; IP₃, inositol 1,4,5- trisphosphate ; NO, monoxyde d'azote ; PAR, *protease-activated receptor* ; PGI₂, prostacycline ; PLA2, phospholipase A2 ; PLC, phospholipase C ; RIP₃, récepteurs de l'IP₃ ; STD, système tubulaire dense ; TP, *thromboxane/prostaglandin receptor* (Levin, 2013).

L'adhérence et l'agrégation sont assurées par des intégrines et d'autres glycoprotéines comme le complexe GPIb-V-IX et la GPVI. Ces récepteurs déclenchent des cascades de signalisation intracellulaires mettant notamment en jeu des tyrosine kinase et menant à l'activation des plaquettes (Ruggeri, 2002; Varga-Szabo *et al.*, 2008).

L'activation est amplifiée par des agonistes solubles, dont les plus importants sont l'ADP, l'ATP, le TxA₂ (thromboxane A₂) et la thrombine, qui mobilisent des récepteurs canaux ou

appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG) (Jackson, 2011; Ruggeri, 2002).

Enfin, certains récepteurs inhibent les fonctions plaquettaires. Il s'agit de la guanylate cyclase soluble (GCs), stimulée par le monoxyde d'azote (NO) (Landry et Gies, 2006), de RCPG activés par la prostacycline (PGI₂) (Gleim *et al.*, 2009) ou l'adénosine (Johnston-Cox *et al.*, 2011), et d'immunorécepteurs contenant des domaines ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) comme PECAM-1 (*Platelet / endothelial cell adhesion molecule-1*) (Falati *et al.*, 2006). Cette partie s'intéresse aux principaux récepteurs des protéines adhésives et des activateurs solubles, à la signalisation qui leur est associée, ainsi qu'à la régulation de leur activité par le mécanisme de désensibilisation.

3. 2 Les troubles de la fonction plaquettaire (athéro-thrombose)

L'athérosclérose constitue la première étape des complications athéro-thrombotiques. Il s'agit d'une maladie inflammatoire systémique chronique de la paroi des vaisseaux qui se développe particulièrement dans les artères de gros et moyen calibre (aorte, artères carotides, artères coronaires et artères des membres inférieurs) sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux (Lindemann *et al.*, 2007). Bien que les monocytes soient impliqués dans l'athérosclérose, il est maintenant clair que les plaquettes participent activement à toutes les facettes de cette pathologie, soit l'initiation, la progression et la stabilité de la plaque d'athérome (Ross, 1999 ; Huo et Ley, 2004 ; Weber, 2005 ; Nieswandt *et al.*, 2005). L'adhésion des plaquettes à la paroi des vaisseaux coïncide avec l'expression de plusieurs molécules d'interaction à la surface des cellules endothéliales activées, notamment ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine ou P-sélectine, ainsi qu'avec une sécrétion de chémokines comme MCP-1 et IL-8, favorisant ainsi la réaction inflammatoire à l'origine du développement de la plaque d'athérome (Gawaz *et al.*, 2000). Suite à leur adhésion, les plaquettes sécrètent, à leur tour, plusieurs substances inflammatoires pro-athérogéniques comme IL-1 β , CD40L, P-sélectine, PF4 et RANTES qui vont participer également dans la formation de la plaque athérosclérotique (Fuentes *et al.*, 2015) (*Figure 26*).

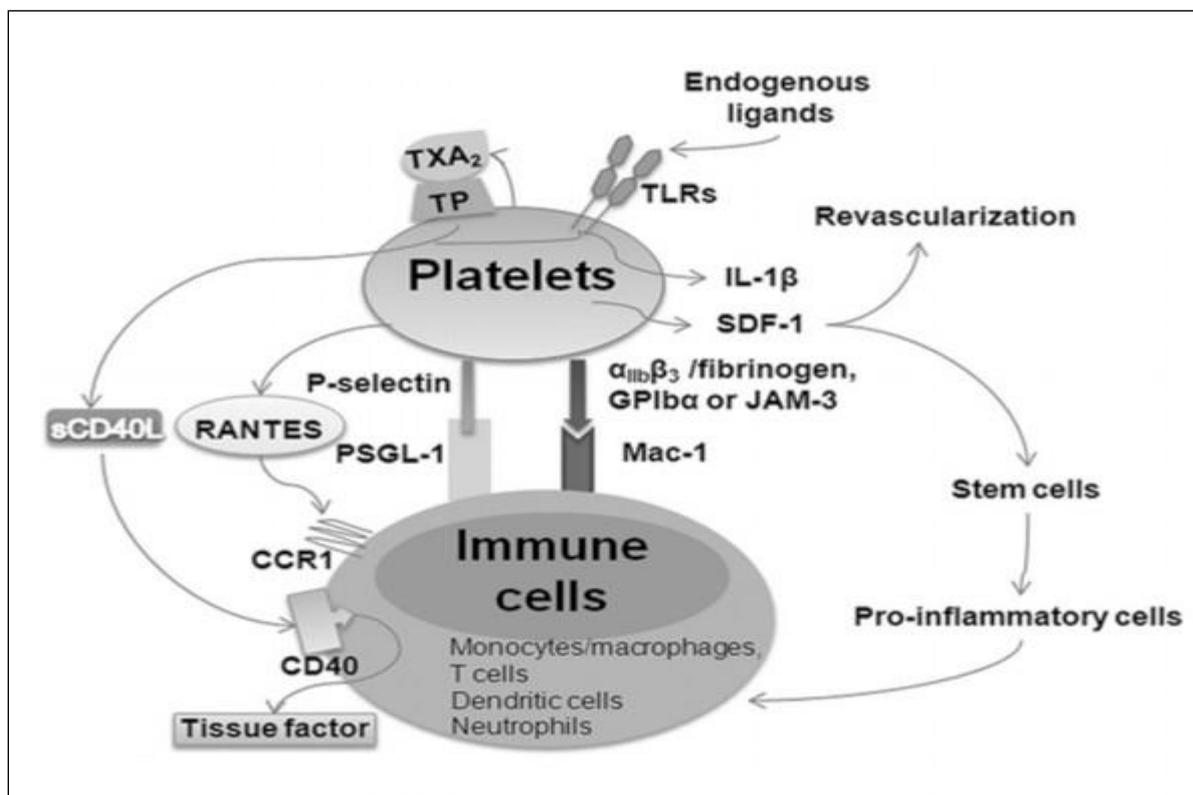


Figure 15 : Rôle des plaquettes dans la réponse inflammatoire vasculaire associée à l'athérosclérose (Fuentes *et al.*, 2013).

Les plaquettes, par l'intermédiaire de leur récepteur GPIIb α , sont également capables d'interagir avec l'intégrine leucocytaire α M β 2 (Mac-1) aux sites athérosclérotiques (Simon *et al.*, 2000 ; Weber, 2005), avec comme conséquence la relâche de facteurs autocrines et paracrines qui contribuent à la progression d'événements inflammatoires (May *et al.*, 2008). Les interactions plaquette-leucocytes se font par une reconnaissance P-sélectine plaquettaire /PSGL-1 exprimé sur le leucocyte, entraînant une activation leucocytaire (Manka *et al.*, 2004). Il fut démontré d'ailleurs que le recrutement des leucocytes aux sites athérosclérotiques est largement supérieur en présence de plaquettes adhérentes à l'endothélium qu'en absence de celles-ci (Huo *et al.*, 2003). Finalement, les plaquettes interviennent pleinement, après la rupture de la plaque, dans la thrombose vasculaire suite à l'exposition du collagène de la matrice sous-endothéliale, donnant ainsi naissance au SCA.

La survenue de ces complications athéro-thrombotiques pourrait généralement constituer une source d'embolies vasculaires. En effet, à peu près 80% des accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont dus à une ischémie cérébrale vasculaire (type ischémique), suite à une occlusion artérielle, alors que seulement 20% des AVCs proviennent d'une hémorragie intracérébrale (type hémorragique) (Feigin *et al.*, 2003).

Puisque la grande majorité des AVCs sont secondaires à une occlusion artérielle, les plaquettes occupent un rôle central dans la physiopathologie de cette complication. Plusieurs observations expérimentales et cliniques pointent vers l'importance des plaquettes dans la pathogénèse des AVCs. Une présence de plaquettes activées et d'agrégats composés principalement de plaquettes et de leucocytes dans la zone ischémique des ganglions de la base dans un modèle d'ischémie/ reperfusion chez le singe a été enregistrée (Okada *et al.*, 1994). Par ailleurs, il a été dénoté une augmentation des concentrations plasmatiques de nombreux composants plaquettaires, notamment le PF4 et la thrombospondine (Zeller *et al.*, 1999). De plus, une forte cumulation d'agrégats plaquettaires dans les artères qui irriguent le cerveau, telles que les carotides ont été observée (Steinman *et al.*, 2000). En outre, l'efficacité des agents anti-plaquettaires, tels que l'aspirine et le clopidogrel dans le traitement et la prévention des AVCs ne laisse aucun doute quant au rôle déterminant des plaquettes dans les AVCs (Stoll *et al.*, 2008).

4. Activité nociceptive

4. 1 La douleur

4. 1. 1 Définition

La fonction de la douleur est un processus physiologique dont le but d'assurer la détection des stimulations susceptibles de menacer l'intégrité physique. Cette fonction de signal d'alarme utile à la protection de l'organisme, est assurée par le système neurophysiologique décrit sous le nom de nociception (Hirszowski, 2001). Mais à cette simple transmission du message nociceptif de la périphérie vers les centres corticaux somato-sensibles s'ajoute une composante émotionnelle et comportementale. D'où le caractère complexe et multifactoriel de la douleur.

La définition actuelle de la notion de la douleur a été rendue officielle par l'I.A.S.P. : « la douleur est l'expression d'une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en terme d'une telle lésion » (Merskey et Bogduk, 1994). Cette définition met en évidence des mécanismes anatomophysiologiques mais aussi d'ordre psychologique. Ainsi, il est classique de distinguer dans la notion de la douleur trois niveaux distincts:

- **La composante sensori- discriminative** liée à la capacité d'analyser la nature, la localisation, la durée et l'intensité de la stimulation nociceptive. La participation des

structures corticales dans l'élaboration de cette composante et notamment le cortex sensoriel primaire S1 a été rapportée (Schnitzler et Ploner, 2000; Almeida *et al.*, 2004).

➤ **La composante affective**, qui confère à cette sensibilité son caractère désagréable. La diffusion de l'information nociceptive dans des régions corticales notamment préfrontales et limbiques en serait responsable (Dallel *et al.*, 2003).

➤ **La composante cognitive**, à l'origine de phénomènes comportementaux référés à l'expérience antérieure mémorisée (réactions d'attention, d'anticipation, de fuites...). Le rôle du système limbique est ici évoqué (Dallel *et al.*, 2003).

4. 1. 2 Physiologie de la douleur

Les premières considérations envisageaient la douleur comme un message sensoriel de très forte intensité provoqué par la sur-stimulation des récepteurs qui, normalement stimulés, donnent lieu à des sensations qui ont une qualité sensorielle bien définie. Cependant, lorsque les circuits spécifiques de la nociception et les systèmes de contrôle qui modulent en permanence le transfert de l'information aux différents niveaux du circuit de la douleur ont été caractérisés, on a commencé à envisager le message nociceptif comme étant distinct du message sensoriel classique. Il est également nécessaire de rappeler que la douleur représente une modalité sensorielle complexe accompagnée de plusieurs aspects : affectifs et cognitifs et aussi associée à des réponses neurovégétatives (Almeida *et al.*, 2004); d'où la complexité des différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif. Dans ce paragraphe, nous avons décrit les différents systèmes neuro-anatomiques impliqués dans la réception, le traitement et la transmission du message nociceptif afférent; ce qui constitue des éléments fondamentaux pour la perception de la douleur (*Figure 16*).

• Les voies périphériques

Le message nociceptif prend naissance à la périphérie. Il est généralement admis qu'il n'y a pas de structure spécifique, histologiquement bien individualisée, pouvant être qualifiée de récepteur nociceptif. Le message nociceptif résulte de la mise en jeu de terminaisons libres amyéliniques constituant des arborisations plexiformes dans les tissus cutanés, musculaires, articulaires, ainsi que dans les parois des viscères. Les fibres qui véhiculent ce message sont à conduction lente, et en général elles appartiennent aux deux groupes :

- Fibres A δ : faiblement myélinisées (diamètre de 1 à 5 microns). Ces fibres sont responsables de la perception de la douleur rapide, bien localisée de type piquûre.

- Fibres C : non myélinisées (diamètre de 0,3 à 1.5 microns), responsables de la douleur tardive, plus diffuse de type brûlure. Les corps cellulaires des fibres afférentes primaires forment les ganglions des racines dorsales (ganglions rachidiens) (Purves *et al.*, 2000).

• La moelle épinière

Les fibres afférentes primaires rejoignent la moelle épinière par les racines postérieures. Les fibres A-delta et C se séparent des grosses fibres tactiles pour se terminer dans les couches superficielles (couches I-II) et profondes (couches V-VI) de la corne dorsale (Almeida *et al.*, 2004).

Le relais médullaire se fait alors avec deux types de neurones : les neurones nociceptifs spécifiques ne véhiculent que des stimuli nociceptifs. Ils sont plus localisés dans les couches superficielles (I et II). Les neurones nociceptifs non spécifiques, appelés aussi ‘neurones convergents’, peuvent véhiculer à la fois des stimuli nocifs ou non. Ils sont localisés dans les couches profondes (V) (Purves *et al.*, 2000). Ces neurones transportent les informations venant d’un champ récepteur cutané, viscéral, et/ou musculaire. Ceci est à l’origine des douleurs projetées.

• Les Voies ascendantes

Les messages nociceptifs gagnent les centres cérébraux par la voie antérolatérale croisée (Purves *et al.*, 2000). Deux voies ascendantes sont impliquées dans la transmission du message nociceptif à l’étage supra-spinal :

• Le faisceau spino-thalamique (FST)

Chemine au niveau du cordon antéro-latéral de la moelle. Les fibres du FST sont des fibres A-delta, et se projettent dans le thalamus latéral, puis dans le cortex sensitif (voie de la sensation).

• Le faisceau spino-réticulo-thalamique (FSRT)

Chemine aussi au niveau du cordon antérolatéral de la moelle. D’autres faisceaux ont été également caractérisés. Citons le **faisceau spino-réticulaire** qui envoie les informations de façon contralatérale mais également ipsi-latérale en direction des noyaux gégonto-cellulaires et réticulaires latéral du tronc cérébral. Le **faisceau spinoponto-mésencéphalique** projette essentiellement sur la substance grise périaqueducule et l’aire parabrachiale. Enfin, un **faisceau**

spino-hypothalamique qui projette directement sur l'hypothalamus a été récemment décrit (Brooks et Tracey, 2005).

- **Les centres supérieurs** Il n'existe pas dans le cerveau qu'un seul site spécialisé dans la douleur. Les trois principales cibles des messages nociceptifs sont la formation réticulée bulbaire, le mésencéphale et le thalamus latéral (Willis et Wislund, 1997).

- **La formation réticulée bulbaire** est la plaque tournante de multiples systèmes : nociception, vigilance, régulation cardiovasculaire et respiratoire, motricité ; c'est aussi le site d'origine de faisceaux descendants bulbospinaux qui modulent la transmission spinale des messages nociceptifs (Guirimand et Le Bars, 1996).

- **L'aire parabrachiale et la substance grise** périaqueducale reçoivent des informations nociceptives qui sont ensuite transmises vers l'amygdale et l'hypothalamus ; ceci peut être en rapport avec l'émotion, la peur et le stress liés à la douleur (Guirimand et Le Bars, 1996). En effet, des études ont démontré que le noyau central de l'amygdale est impliqué dans le comportement associé à la peur et aux réponses somatomotrices provoquées par le stimulus nocif. De même, plusieurs noyaux hypothalamiques sont également impliqués dans ces réponses comportementales (Aboufatima *et al.*, 2002 ; Price, 2002).

- **Le thalamus** reçoit directement ou indirectement les messages nociceptifs intégrés à l'étage spinal. C'est principalement dans le noyau ventro-postéro-latéral du thalamus que sont projetées les afférences nociceptives et de là vers le cortex somato-sensoriel primaire et secondaire (S1 et S2). Ces derniers représentent un site critique pour la composante sensori-discriminative de la douleur (Price, 2002).

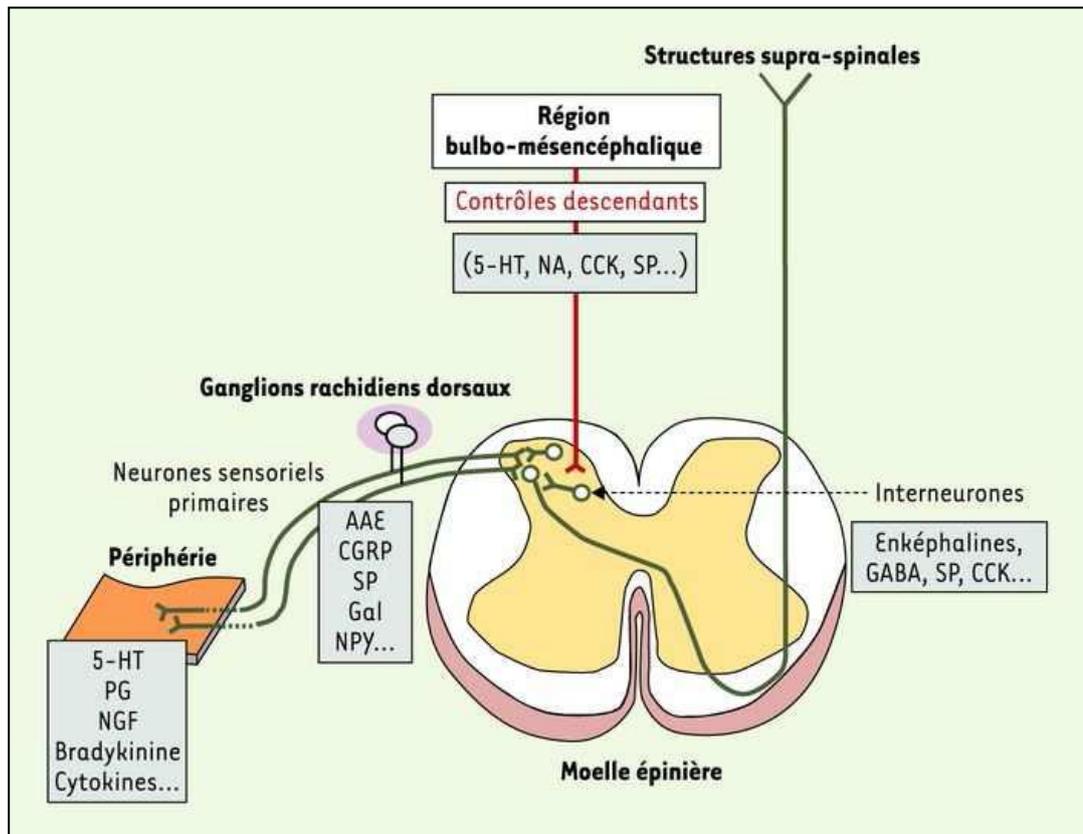


Figure 16 : Les différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif (D'après Meunier *et al.*, 2004).

4. 1. 3 Systèmes de contrôle de la douleur

Les voies nociceptives afférentes, relativement spécifiques, sont en permanence modulées par des systèmes régulateurs, essentiellement inhibiteurs, au niveau de leurs divers relais du système nerveux central (corne dorsale spinale, tronc cérébral, thalamus...). Cette modulation s'exerce par l'intermédiaire des informations sensorielles non douloureuses et des structures supra spinale. Divers contrôles excitateur et inhibiteurs modulent la transmission des messages nociceptifs.

On distingue :

- *Contrôle segmentaire: contrôle de la porte (Théorie de Melzack et Wall)*

Le 1er niveau d'intégration s'effectue au niveau de la corne dorsale de la moelle qui représente un siège important de la modulation du message nociceptif. Elle réalise un véritable filtre où convergent de nombreux mécanismes modulateurs sur l'entrée des afférences nociceptives dans la moelle spinale.

Il existe une interaction segmentaire entre les fibres périphériques de gros calibres A β qui véhiculent des messages tactiles et les fibres amyéliniques C chargées des messages nociceptifs (Guirimand et Le Bars, 1996). Cette théorie appelée 'gate control' montre que l'activation des fibres sensibles cutanées de gros diamètre est responsable de l'inhibition de la transmission des fibres nociceptives de la corne postérieure (Queneau et Ostermann, 2004) (Figure 17). Ainsi s'explique le soulagement induit par stimulation tactile après une douleur dans le même territoire cutané.

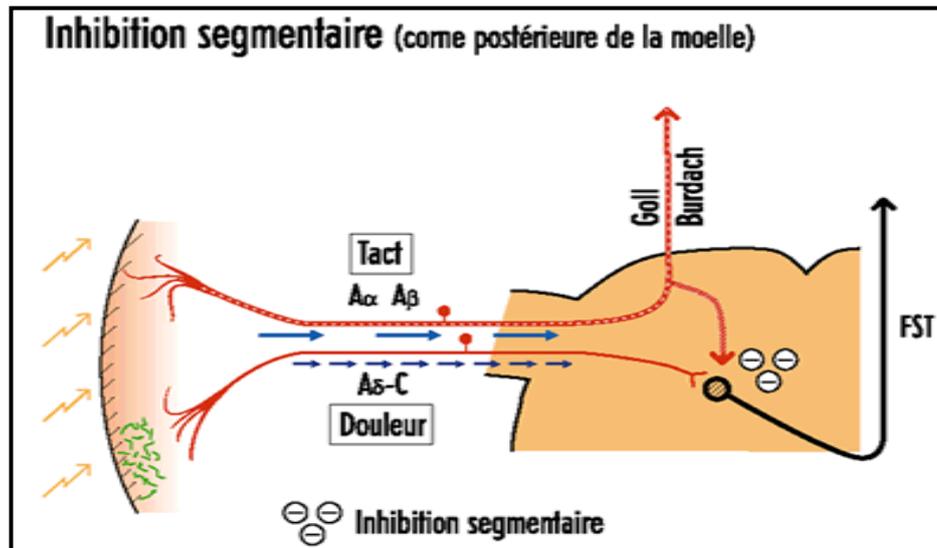


Figure 17 : Théorie de la porte 'gate control' (D'après Payen *et al.*, 2001)

- *Les contrôles d'origine supraspinale*

Le contrôle de la douleur s'exerce au niveau du tronc cérébral par des voies descendantes qui inhibent la transmission spinale des messages nociceptifs. La substance grise péri-aqueducule (SGPA), le noyau du raphé magnus (NRM), l'aire parabrachiale, le locus coeruleus et l'hypothalamus y sont impliqués locus coeruleus et l'hypothalamus y sont impliqués (Brooks et Tracey, 2005). La sérotonine et la noradrénaline jouent un rôle prépondérant dans ces contrôles. Ils mettent aussi en jeu des opioïdes endogènes (ou endomorphines) qui se fixent aux récepteurs opioïdes. Un autre système de contrôle a été décrit. Ce mécanisme, appelé Contrôle Inhibiteur Diffus induit par la stimulation Nociceptive (CIDN) pourrait avoir comme rôle celui d'un filtre chargé de détecter le caractère nociceptif des messages en inhibant l'ensemble des activités de base des neurones spinaux faisant ainsi ressortir le signal nociceptif par rapport au bruit de fond. Ainsi, la survenue d'un message nociceptif entraîne l'inhibition des autres neurones à convergence de la moelle via l'activation d'une boucle spino-bulbo-spinale passant

par le noyau sub réticularis dorsalis et les cordons dorsaux (Danziger *et al.*, 1999). Les CIDN permettent aussi d'expliquer que de deux douleurs, la plus forte inhibe la plus faible.

4. 1. 4 Contrôles neurochimiques de la douleur

La transmission, la modulation, la perception du message nociceptif sont la résultante de la libération de nombreuses substances biochimiques, les unes excitatrices, les autres inhibitrices (Collège Enseignants Neurologie, 2005).

Au niveau périphérique, la lésion tissulaire provoque la synthèse des médiateurs inflammatoires eux même algogènes. Ces médiateurs sont multiples (bradykinine, sérotonine, histamine, ions potassium et hydrogène) et regroupés sous le vocable de "soupe inflammatoire". Ils modifient la perméabilité aux ions des canaux membranaires des récepteurs nociceptifs et abaissent leur seuil de déclenchement par des mécanismes de transduction (hyperalgésie primaire) (Queneau et Ostermann, 1998). Ainsi, la sensibilisation des nocicepteurs traduite par l'hyperalgie périphérique correspond à un seuil d'activation plus bas, une latence diminuée, des réponses aux stimuli non nociceptif 'allodynie' voire une activité spontanée des nocicepteurs.

De leur part, les terminaisons libres des nocicepteurs libèrent des agents vasodilatateurs capables d'augmenter la perméabilité vasculaire et, par conséquent, la fuite plasmatique. Après stimulation nociceptive, l'influx nerveux se propage non seulement vers la moelle mais aussi de façon antidromique, vers les autres terminaisons libres de la même fibre qui vont à leur tour libérer des peptides dont la substance P ou le CGRP. Il en résulte une dégranulation mastocytaire et une libération d'histamine et de sérotonine responsables de l'inflammation neurogène (Besson, 1997). D'un autre côté, l'importance des cytokines pro-inflammatoires dans la genèse et la persistance de la douleur ne cesse de s'affirmer. Ainsi, des travaux ont montré que la libération de nombreux médiateurs 'hyperalgiques' est secondaire à la mise en jeu de cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines 1, 6 et 8 (IL-1 α et β , IL-6, IL-8) et le TNF α (Tumor Necrosis Factor) (Meunier *et al.*, 2004).

La corne dorsale de la moelle doit être considérée non seulement comme une plaque tournante des informations mais également comme une véritable usine biochimique, caractérisée par une concentration importante de substances excitatrices et inhibitrices, intervenant dans les processus de transmission et de filtrage de l'information nociceptive. Au niveau spinal, les principaux neurotransmetteurs qui véhiculent les informations entre les afférences nociceptives et les neurones nociceptifs sont les acides aminés excitateurs (aspartate, glutamate) et les neuropeptides (substance P, CGRP, VIP...).

La substance P et le glutamate semblent jouer un rôle primordial dans la transmission du message nociceptif jusqu'aux couches profondes, point de départ du faisceau spinothalamique (Fundytus, 2001; Riedel et Neeck, 2001 ; Herpfer et Lieb, 2003).

En plus de leur rôle de transmission, ces neuromédiateurs provoquent une sensibilisation des neurones convergents responsables de l'hyperalgie secondaire.

Ainsi, les antagonistes des acides aminés excitateurs ont des propriétés anti-hyperalgésiantes, c'est le cas du paracétamol, sulfate de magnésium, le dextrometorphan et la ketamine. De même, une nouvelle approche thérapeutique tente d'employer des antagonistes synthétiques des récepteurs de la bradykinine, substance P et NMDA dans le traitement de la douleur (Besson, 1997).

D'un autre côté, les contrôles inhibiteurs descendants agissent sur les neurones convergents en libérant des amines biogènes dont la sérotonine, noradrénaline et dopamine. De ce fait, les antidépresseurs tricycliques exercent leur effet antalgique en augmentant la quantité de ces amines biogènes présentes dans ces synapses. Enfin, on trouve dans la corne postérieure de grandes quantités d'enképhalines et de dynorphines, qui font partie des opioïdes endogènes (Toll *et al.*, 1994). Le système opioïde a fait l'objet de très nombreuses études depuis la découverte des récepteurs opioïdes. Les opiacés comme les opioïdes endogènes sont des agonistes des récepteurs opioïdiques. Il existe au moins trois sous types bien connus de ces récepteurs : mu, delta et kappa dans le système nerveux des mammifères (Reisine et Bell, 1993).

Ces récepteurs sont localisés aussi bien au niveau périphérique (terminaisons des fibres afférentes primaires) qu'au niveau spinal (corne postérieure de la moelle) et supra spinal (tronc cérébral, thalamus, système limbique). Ils appartiennent à la famille des récepteurs qui sont ancrés dans la membrane plasmique par sept segments hydrophobes et sont couplés à la protéine G (Charles et Hales, 2004). Leur activation induit une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase et donc une réduction de la concentration intracellulaire du second messager (AMP cyclique), une modulation de la conductance de certains canaux ioniques (Ca^{2+} , K^{+}) dont la perméabilité règle la polarisation des cellules et une régulation de la libération de divers neurotransmetteurs (substance P). Les peptides opioïdes endogènes sont divisés en trois catégories lesquelles sont issues de trois molécules précurseurs bien différentes. Citons en premier les enképhalines qui sont des peptides constitués de cinq acides aminés et qui sont synthétisés à partir d'une molécule précurseur appelée la proenkephaline A. En second lieu, il y a les endorphines, lesquelles pour leur part tiennent leur origine de la pro-opiomélanocortine (POMC).

La troisième catégorie de peptides opiacés est représentée par la dynorphine qui est issue de la molécule pro-dynorphine (pro-DYN). Les enképhalines se lient de façon préférentielle aux récepteurs opiacés de type δ mais possèdent également une affinité appréciable pour les récepteurs opiacés de type μ (Vion-Dury et Cupo, 1988). Quant aux endorphines, leur distribution dans le SNC s'avère moins importante que celle des enképhalines.

Les endorphines se lient avec une très grande affinité aux récepteurs opiacés de type μ , mais possèdent également une bonne affinité pour les récepteurs opiacés de type δ (Cox, 1982). Les molécules de dynorphines, pour leur part, peuvent se lier aux trois types de récepteurs opiacés, mais avec une affinité beaucoup plus grande pour les récepteurs opiacés de type κ (Cox, 1982).

5. Activité antidépressive

5.1 Données générale sur la dépression

De très nombreux liens unissent les concepts de dépression et d'affectivité. En tant que symptôme, la dépression représente en effet un trouble affectif ou, plus précisément, selon la définition de Pichot « une modification pathologique de la variété normale de l'humeur qui est la tristesse ». En tant que syndrome et/ou en tant que maladie, la dépression est habituellement liée à l'existence d'un trouble de l'humeur (Féline *et al.*, 1991).

Le mot « dépression » est utilisé également pour qualifier un grand nombre d'états de l'humeur qui peuvent être soit normales, soit pathologiques. Ainsi, la dépression peut constituer une humeur ou sentiment normal, un symptôme dans le cas où la dépression est une forme de réaction au stress ou une réaction secondaire des patients avec des problèmes organiques ou psychiatriques et enfin un trouble psychopathologique ou syndrome, comme par exemple le trouble dépressif majeur, le trouble dysthymique ou les troubles bipolaires, qui se classent aussi bien selon la CIM-10 (World Health organization, 1993) que selon le DSMIV (American Psychiatric Associations, 1994) dans des troubles de l'humeur. Par le terme « Troubles de l'humeur » ou jadis « Troubles Affectifs » on se réfère à un nombre de situations clinique dont la caractéristique principale est le trouble de l'humeur qui est suivi par des difficultés cognitives, psychomotrices, psychophysiologiques et interpersonnelles (Kleftaras, 2004).

Bien que la dépression soit un phénomène relativement fréquent, sa définition n'est pas facile. Même les spécialistes ne sont pas d'accord sur sa nature, c'est à dire s'il s'agit d'un phénomène biologique ou psychologique. Néanmoins, il y a unanimité sur un point : la

dépression se présente comme une caractéristique de la nature humaine, depuis la tristesse passagère jusqu'à la dépression profonde. En général, la dépression pourrait se définir comme une situation de tristesse pathologique qui est accompagnée par une baisse considérable du sentiment de valeur personnelle et par la douloureuse prise de conscience du ralentissement des opérations mentales psychomotrices et organiques. Faute d'une définition générale acceptable et fonctionnelle, la dépression se définit surtout par ses manifestations psychologiques, comportementales, cognitives et biologiques (Kleftaras, 2004). Dans la dépression, il y a une inhibition du désir, inintérêt pour agir, la vie devient monotone et grisâtre d'où résulte le repli sur soi. A côté de cette altération de l'humeur, on rencontre aussi des symptômes sur le plan somatique.

Parmi, ces derniers, les troubles psychomoteurs qui ont été abordé par de nombreuses études (Dantchev et Widlocher, 1998; Lemke et Hess, 1998; Schrijvers *et al.*, 2008). Selon Schrijvers et ses collaborateurs (2008), le ralentissement psychomoteur est un symptôme constant et constitue probablement le symptôme central de la dépression. Des troubles de la prise alimentaire se traduisant généralement par anorexie associée à une perte de poids et des troubles du sommeil (insomnie) sont fréquemment décrits chez les déprimés au point même de constituer des éléments de diagnostic clinique (Kupfer et Thase, 1983 ; Spitzer *et al.*, 1985). A côté de ces troubles majeurs, on a aussi noté une élévation des seuils nociceptifs (hyperalgésie) (Davis *et al.*, 1979; Becker et al.,2007 ; André *et al.*, 2008) et un ralentissement du transit intestinal (constipation) chez les déprimés. Malgré de nombreuses données laissant à penser que la plainte douloureuse est accrue chez des patients anxieux ou dépressifs, les mécanismes sous-jacents aux liens entre douleur et dépression ou anxiété ont été, jusqu'à présent, très peu étudiés (André *et al.*, 2008). De nombreux travaux ont montré également que certaines fonctions cognitives sont altérées précocement et parfois de manière importante dans la dépression, entraînant une baisse de l'efficacité intellectuelle (Watts *et al.*, 1988, 1990; Golinkoff et Sweeney, 1989; Watts, 1993; 1995; Fossati et Allilaire, 2001; Peretti et Ferreri, 2006). En effet, Fossati et Allilaire (2001) avaient rapporté que les déprimés souffrent fréquemment, sinon constamment d'une perturbation des processus mnésiques. Lemelin et Baruch, (1998) ont rapporté l'existence d'un déficit de vigilance chez les déprimés.

L'impossibilité pour un sujet déprimé d'effectuer correctement une tâche requérant un effort cognitif, résulterait de la faiblesse des ressources cognitives mobilisables dans la dépression et du manque de motivation générale prévalant (Watts et al. 1990 ; Austin *et al.*, 2001). Sur le plan endocrinien, plusieurs anomalies ont été décrites. En effet, une hyperactivité

du système hypothalamo-hypophyso-surrénalien au cours des syndromes dépressifs semble objectivée par plusieurs études (Carroll, 1978 ; Zerssen et Doerr, 1980). Cette hyperactivité s'exprime par une augmentation des corticostéroïdes et du cortisol plasmatique (Steiger et Holsboer, 1997), par une élévation du taux du cortisol dans le liquide céphalo-rachidien ainsi par l'altération du rythme circadien du cortisol (Shopsin et Gershon, 1971; Sachar *et al.*, 1973 ; Gold *et al.*, 1980). On note également une perturbation du système hypothalamo-hypophyso-thyroïdien se traduisant par une diminution de la réponse de la T.S.H. (Thyroïd-stimulating-hormone) à l'administration de T.R.H. qui pourrait être reliée aux taux de cortisol chez les déprimés (Carroll, 1978). Des troubles de sécrétion de la prolactine (Halbreich *et al.*, 1979), de l'hormone de croissance (GH) (Garver *et al.*, 1975) et de l'hormone lutéotrope (LH) (Brambilla *et al.*, 1978) ont également été noté chez les malades déprimés. Une diminution des métabolites des amines a été signalée par plusieurs auteurs. Dans l'ensemble, les altérations endocriniennes mises en évidence ne semblent pas résulter d'un mauvais fonctionnement hypophysaire mais des anomalies fonctionnelles hypothalamiques, avec une dépendance possible des monoamines cérébrales. Fuller, (1990) avait montré l'implication de la sérotonine dans la régulation de la sécrétion des hormones endocriniennes. Ces données sont en faveur d'une implication des neurones aminèrgiques dans la dépression.

En effet, plusieurs études ont montré que, chez certains déprimés, il y a une réduction des métabolites des amines, traduisant un hypofonctionnement des neurones aminèrgiques. Van Praag et Korf, (1971) ; Asberg *et al.*, (1976) ont montré que la concentration de la 5HIAA dans le liquide céphalo-rachidien (L.C.R.) est abaissée chez certains déprimés et que son accumulation dans le L.C.R. sous probénécide, est diminuée. Selon Asberg et ses collaborateurs (1976) il y a une corrélation inverse entre le taux de 5 HIAA et la gravité clinique. En d'autre terme, les sujets avec les taux les plus bas ont les taux de suicides les plus marqués. Cependant, ces résultats restent équivoques dans certains cas, ou on n'a pas constaté d'abaissement notable des métabolites de la sérotonine chez les déprimés suicidaire.

**Chapitre II : Enquête
ethnopharmacologique sur l'utilisation de
Rubia tinctorum en médecine traditionnelle
à Marrakech et ses régions**

I. Introduction

Les médicaments à base de plantes occupent une place très importante dans la culture et les traditions des peuples en générales et des africains en particulier. Les pratiques de la médecine traditionnelle varient grandement d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre. Elles sont influencées par des facteurs connus: la culture, l'histoire et les philosophies personnelles (Mander, 1998). Selon l'OMS, près de 80% des populations des pays en voie de développement de la région d'Afrique ont recours à la médecine traditionnelle (OMS, 2000). En effet, le recours à la médecine traditionnelle, alternative ou complémentaire est dû à diverses raisons telles que :

- le coût relativement faible des plantes médicinales par rapport aux médicaments conventionnels,
- la disponibilité mais aussi l'accessibilité de ces plantes surtout dans les régions les plus éloignées et au sein des populations les moins favorisées,
- la résistance aux médicaments et la méfiance envers les produits de synthèse et leurs effets secondaires indésirables,
- l'envie de consommer « bio » et de profiter des effets bénéfiques sur la santé,
- l'existence de maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement pharmaceutique efficace (Bentahar, 2016).

Au Maroc, les plantes médicinales restent largement employées quoique de manière empirique; la médecine traditionnelle marocaine trouve ses racines dans la médecine arabo-berbère classique, à laquelle se sont ajoutées des innovations apportées par les populations locales (Bellakhdar, 2006). Le savoir thérapeutique traditionnel marocain est ainsi organiquement arabo-berbère dans sa constitution, avec également une contribution africaine et andalouse (Bellakhdar, 2006). Par ailleurs, le Maroc, étant un carrefour géographique où coexistent plusieurs types de bioclimats et où les niveaux de la pluviométrie sont très variables, connaît le développement d'une flore diversifiée avec un taux d'endémisme végétal assez élevé à l'échelle de la région méditerranéenne (Bellakhdar, 2006). De plus, le climat tempéré qui règne au pays a permis l'acclimatation de nombreuses plantes allochtones (Rhafouri *et al.*, 2014). Aujourd'hui, on compte environ 42000 espèces et sous espèces végétales au Maroc, dont 800 sont à usage médicinal (Bellakhdar, 2006). En outre, le Maroc a toujours été un carrefour humain, accueillant des populations d'origines diverses, venues avec leurs traditions et leurs savoirs ethnobotaniques (Scherrer *et al.*, 2005).

L'usage de la médecine traditionnelle pour résoudre les problèmes de santé, est largement répandu, mais la plupart du temps la prescription et l'utilisation de cette dernière n'est pas réglementée (Pharmacopée Marocaine : en cours d'élaboration DMP), de sorte qu'il y a toujours le danger de mauvaises prescriptions ou utilisations excessive des plantes (Fennell *et al.*, 2004).

RT, communément appelée (*El Foua où Taroubya*) est une plante très utilisée par la population marocaine pour le traitement de diverses pathologies en outre l'ictère et l'anémie (Eddouki *et al.*, 2002 ; Ziyat *et al.*, 1997 ; Bellakhdar, 2006).

A Marrakech et ses régions, le recours à cette plante est largement répandu, et plusieurs remèdes à base des racines de *RT*, utilisés individuellement ou en combinaison sont très recommandés par les herboristes et les tradi-thérapeutes pour soigner les atteintes hépatiques et le syndrome anémique.

A la lumière de ces données, nous avons mené une enquête sur les utilisations traditionnelles de *RT* par la population locale de Marrakech afin de :

- Rassembler les informations relatives à l'utilisation culinaire et thérapeutique des racines de *RT*, dans cette région.
- Approfondir les connaissances sur son usage pour le traitement des affections hépatiques et autres pathologies.
- Faire des études expérimentales en vue d'apporter la preuve scientifique aux allégations culturelles.

II- Matériels et méthodes

1. Zone de l'enquête

Notre enquête s'est déroulée dans la Wilaya de Marrakech-Safi et El Haouz. Cette ville compte environ 1 209 000 habitants (recensement de 2014) répartis sur une superficie de 230 km². La densité de la population atteint les 5257 habitants/Km².

Marrakech bénéficie d'un climat semi-aride. Elle est située loin du littoral et ne bénéficie pas de ce fait de l'influence modératrice de l'océan. Les températures sont caractérisées par un important écart thermique entre le jour et la nuit.

En été, les après-midi sont torrides avec des températures avoisinant souvent les 40°C à l'ombre; alors qu'en hiver, les nuits sont souvent froides. En fin d'été, la ville peut être sujette à de violents orages. Le climat de la zone, caractérisé par son irrégularité, est semi-aride, avec une pluviométrie relativement faible. La moyenne des précipitations est de 281 mm par an, la température moyenne annuelle est de 20 °C et l'ensoleillement annuel y est d'environ 280 jours (Choukrani *et al.*, 2018).

2. Période et déroulement de l'enquête

L'enquête a été réalisée du mois de Mars à Juin 2015. Elle a été menée auprès de professionnels des plantes médicinales (thérapeutes traditionnels, herboristes) et auprès de simples utilisateurs. L'enquête a été accomplie dans la préfecture de Marrakech et de la province d'AL Haouz, mais particulièrement dans les souks de l'ancienne médina, dévolus à la vente des plantes médicinales.

Cette étude a été réalisée au niveau:

- 8 stations à Marrakech: Rehba lakdima, Mellah, Bab el khémis, Bab doukkala, M'hamid, Massira, Daoudiat, Sidi Yousef Ben Ali (*Figure 18*).
- AL Haouz: Aït-Ourir, Ourika, Tahnaoute, Amez Miz (*Figure 19*).



Figure 18 : Les stations concernées par l'enquête ethnopharmacologique à Marrakech (Prise de Google Maps)

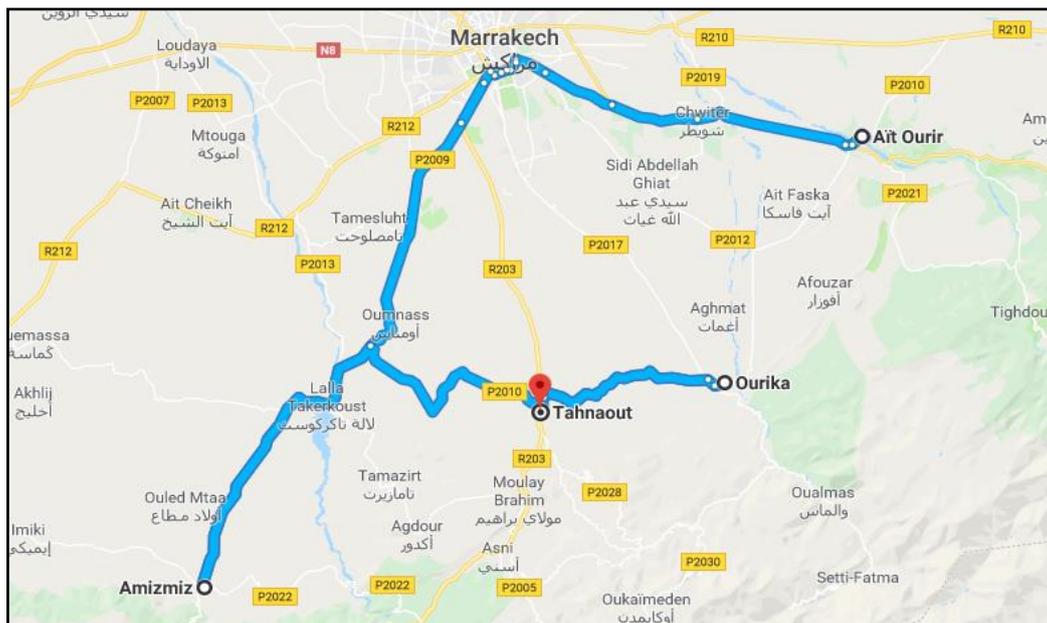


Figure 19 : Les stations concernées par l'enquête ethnopharmacologique aux régions de Marrakech (prise de Google Maps)

3. Outils de l'enquête

Les informations sur l'usage thérapeutique de RTont été collectées à l'aide d'un questionnaire à travers des conversations avec les herboristes, des femmes au foyer ainsi que des simples utilisateurs en utilisant le dialecte marocain (darija). Chaque répondant a été

interrogé individuellement. Le questionnaire de cette enquête a été voulu volontairement simple et court afin qu'il soit réalisable en temps réel, tout en restant fidèle aux objectifs de l'étude. Un questionnaire trop long découragerait immédiatement le potentiel sujet, qui y associe directement une perte importante de son temps.

La fiche du questionnaire (Annexe 1) comportait une partie concernant la personne interrogée (sexe, âge, profession / utilisation, etc) et une partie relative aux informations sur la plante. La fiche du questionnaire est aussi divisée en 4 parties permettant de récolter des informations sociodémographiques, ethnopharmacologiques, pharmacologiques et toxicologiques de la plante.

4. Technique d'échantillonnage

Nous avons interrogé 116 praticiens. Lors de l'interview, des précisions ont été recherchées sur la connaissance des affections hépatiques, l'identification de la plante, les parties utilisées, les modes de préparation, les voies d'administration, la durée du traitement. La posologie et les effets secondaires.

5 Traitement des données

Les données enregistrées sur les fiches d'enquêtes ont été ensuite traitées et saisies sur le logiciel Excel. Des analyses univariées ont été effectuées sur toutes les variables qualitatives citées dans le questionnaire. Ainsi, les variables sont décrites en utilisant les effectifs et les pourcentages. Les informations ethnopharmacologiques rassemblées ont été reportées sur des fiches questionnaires et traitée pour obtenir des données suivantes:

- Données sociodémographiques,
- Données ethnopharmacologiques,
- Données pharmacologique,
- Données toxicologique.

III. Résultats

1. Données sociodémographiques

L'enquête ethnopharmacologique sur RT a été menée sur le terrain auprès de 116 personnes dont 32 hommes et 84 femmes (ratio H/F = 0,38). La population majoritaire (n=83) est issue de la zone urbaine, contre (n=34) issues de la zone rurale (*Figure 20*).

L'âge de la population enquêtée supérieure à 41 ans détient un pourcentage de 54.4% contre 29.3% pour ceux qui font partis de la tranche d'âge comprise entre 31 et 40 ans. La population jeune (inf. à 30 ans) occupe la troisième position avec un pourcentage de 16.3% (Tableau 2).

Parmi les personnes interviewées, il y avait 28% des herboristes, 54% de femmes au foyer qui étaient à la fois prescriptrices et consommatrices et 18% étaient des utilisateurs (*Figure 21*).

Concernant le niveau académiques, 42% de la population n'était pas scolarisée, les 37% restant se répartissaient entre une scolarisation primaire et secondaire et seulement 20% de la population enquêtée avaient des études supérieures (*Figure 22*).

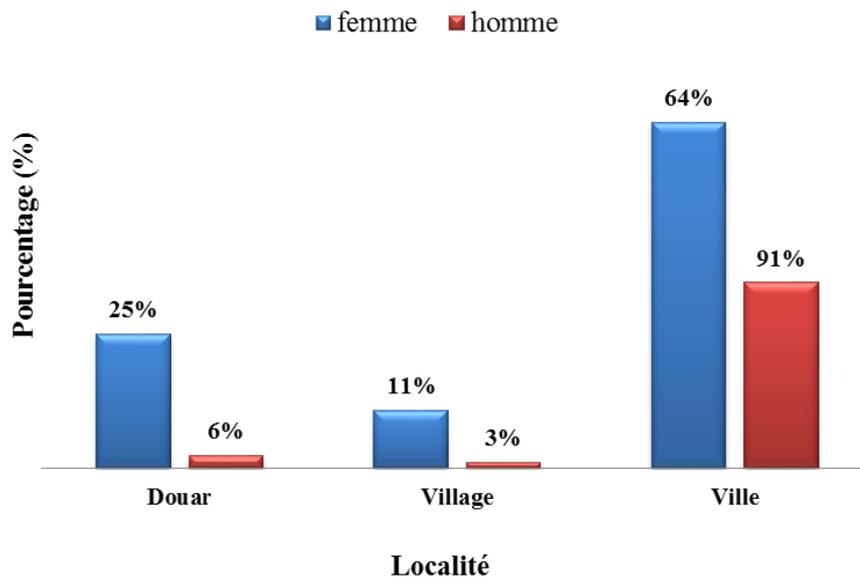


Figure 20 : Répartition des données démographiques selon la localité et le sexe

Tableau 3: Profile d'âge de la population enquêtée

Profile d'âge	Pourcentage
- Inf. à 30 ans	16.3%
- 31 – 40 ans	29.3%
- Sup à 41 ans	54.4%

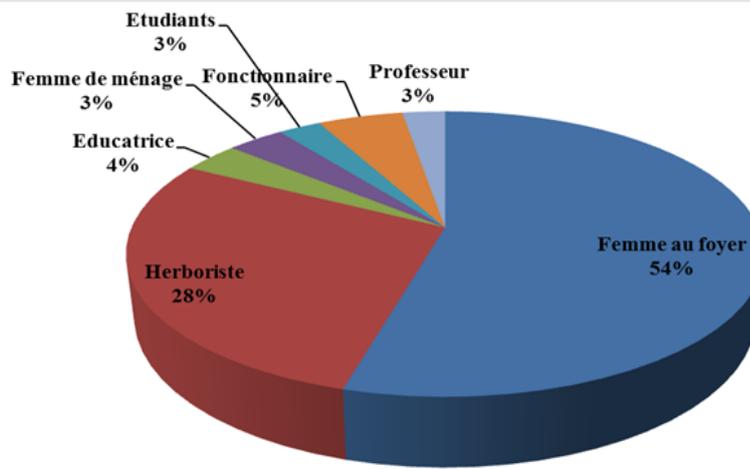


Figure 21 : Répartition des données démographiques selon la profession

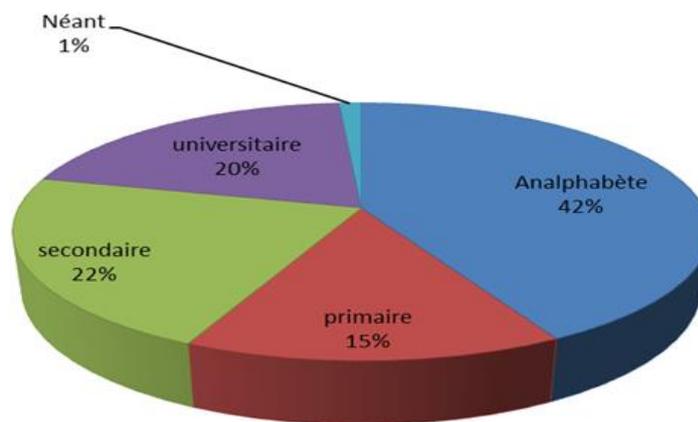


Figure 22 : Répartition des données démographiques selon le niveau académique

2. Données ethnopharmacologiques

Les résultats ethnopharmacologiques ont montré que 67% de la population enquêtées utilisent RT seule tandis que 33% la combiné avec d'autre plantes (*Figure 23*).

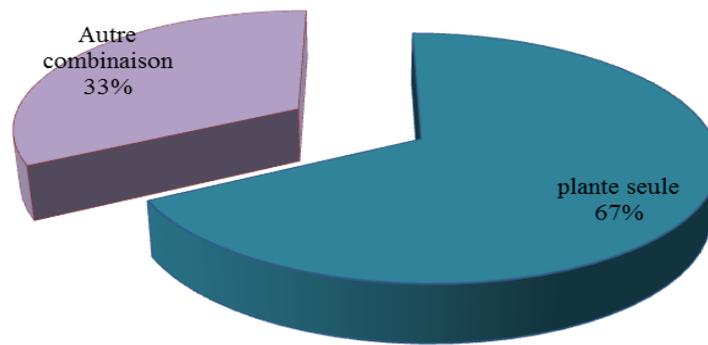


Figure 23:Répartition d'utilisation de la plante

La racine est la partie la plus utilisée à raison de 54% pour le traitement des atteintes hépatique ainsi le syndrome anémique, suivies des feuilles et fleurs (10%). Les autres organes de la plante à savoir tige, graines, écorce et fruit sont relativement moins utilisées (*Figure 24*).

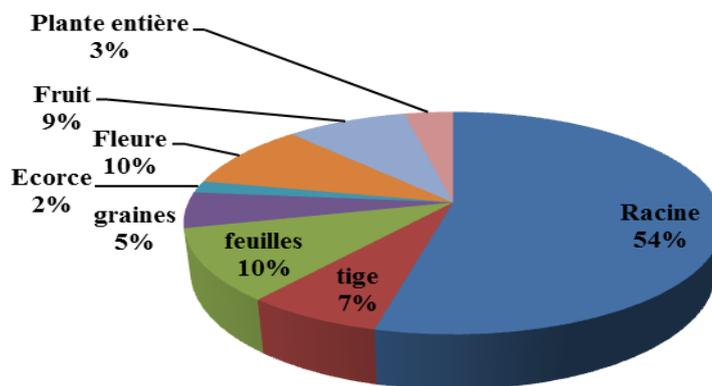


Figure 24 : Répartition de plante en fonction des parties utilisées

Le mode de préparation le plus recommandé, la plante est souvent préparée sous son état cru 78%. La décoction et la cuisson viennent en seconde lieu (7%).Concernant les autres modes (macération et infusion) sont rarement sollicités (3 et 5%) (*Figure 25*).

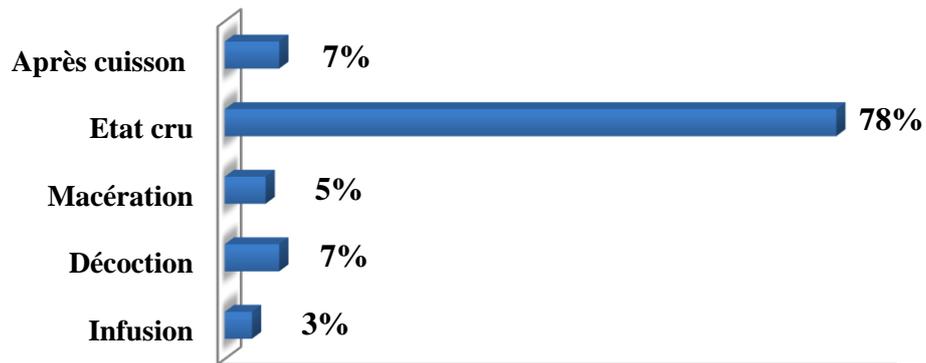


Figure 25 : Répartition des différents modes de préparation de RT

RT est avalée sous forme de poudre (87%) mélangées soit avec la soupe blanche ou bien pétrit avec le pain (*Figure 26*). Plusieurs recettes de préparation ont été recensées, le tableau 3 présente les recettes les plus utilisés (Tableau 4).

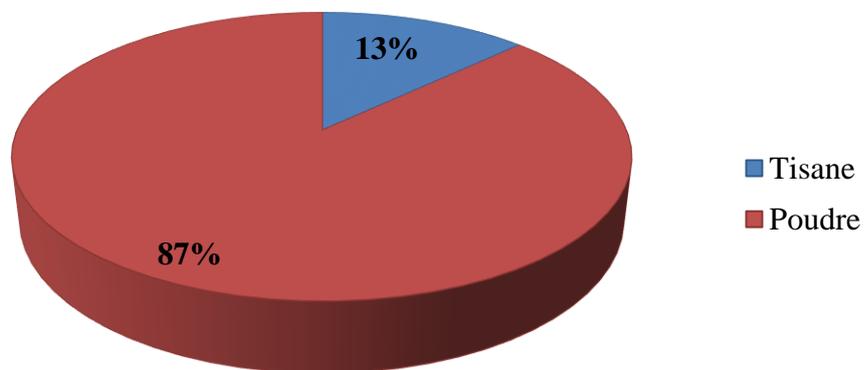


Figure 26 : Répartition des données pharmacognosiques selon le mode d'emploi

Tableau4 : Répartition des différentes recettes réputées efficace contre certaines pathologies

Mode de préparation	Affection	Parties utilisées	Mode administration	Nombre de recettes
Etat cru	Ictère	Racine	Avec la soupe	1
Etat cru	Problème de foie	Racine	Avec la soupe	1
Etat cru	Anémie	Racine	Avec la soupe Avec le pain	2
Etat cru	constipation	Racine	Boisson	1
Etat cru	Epigastralgie	Plante entière	Boisson	1
Etat cru	Calculs rénaux	Racine	Avec la soupe Boisson	2

3. Données pharmacologiques

D'après la population enquêtée, les doses utilisées sont généralement exprimées en cuillère, en poignée ou en pincées. Une cuillère à peu près (5 à 15g) (97%) c'est la dose la plus administrée par voie orale (*Figure 27*).

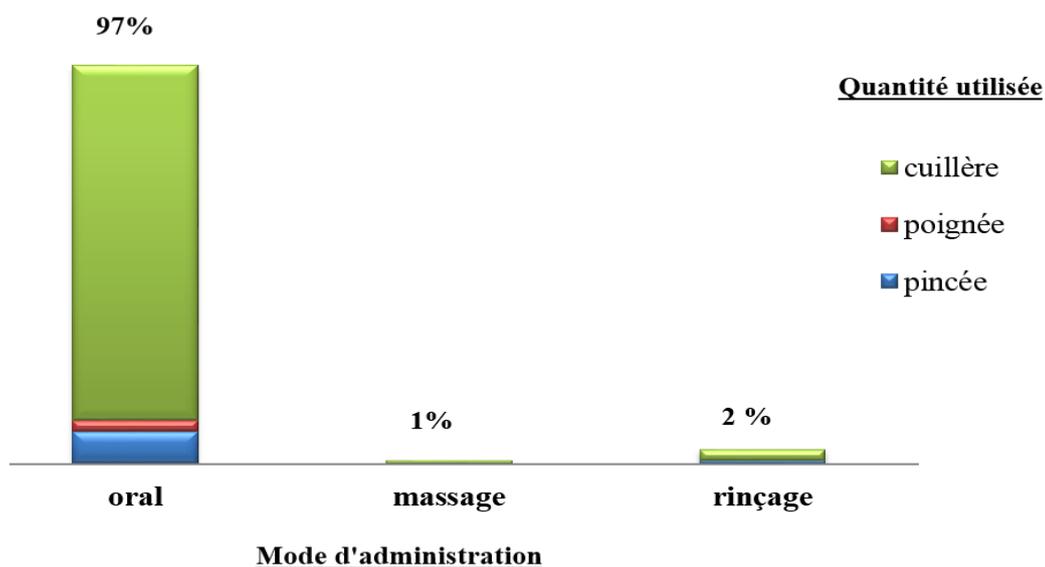


Figure 27 : Répartition des différents modes d'administration de la plante selon la dose.

La durée du traitement est généralement jusqu' à la guérison (56,90 %), c'est-à-dire jusqu'à la disparition des symptômes. Le nombre de prise par jour le plus recommandé c'est 1 fois /jour (Figure 28).

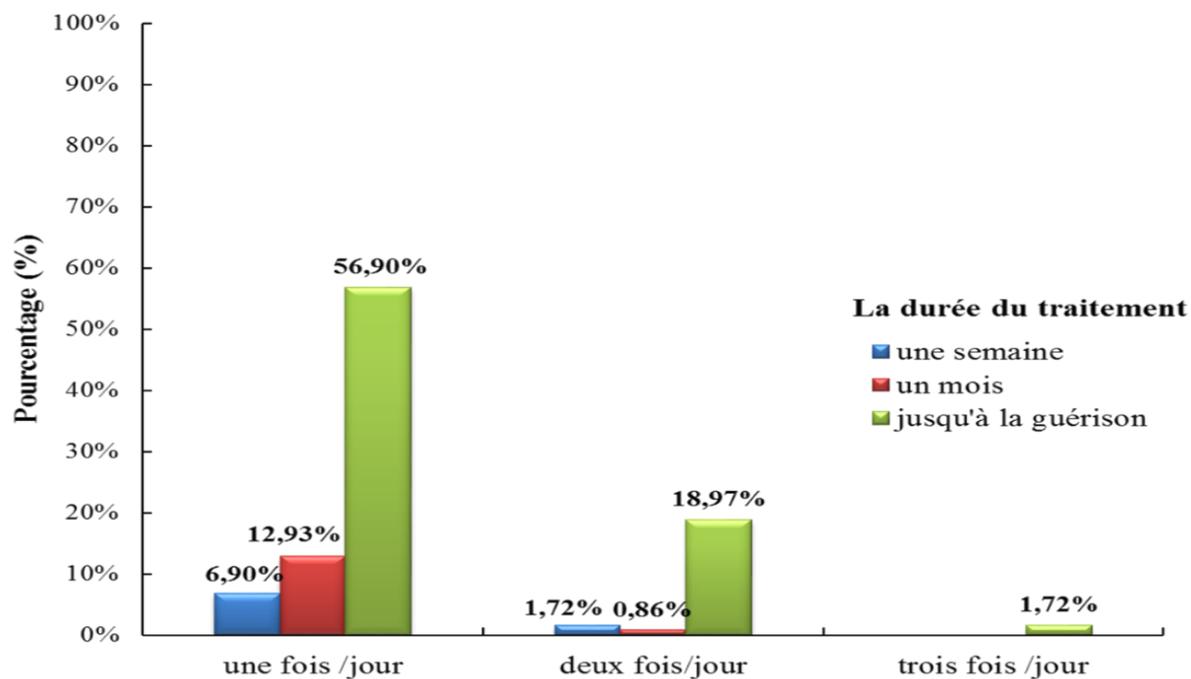


Figure 28 : Répartition de la durée du traitement selon le nombre de prise par jour.

4. Données toxicologiques

96% de la population enquêtée en rapporté que la plante n'est pas toxique contre 4%.

IV Discussion

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle Marocaine. Il s'intéresse en particulier à l'étude des propriétés pharmacologiques, toxicologiques et biologiques des racines de *Rubia tinctorum* (RT) afin de lui attribuer un caractère scientifique et d'en faire un usage rationnel en médecine moderne.

Parmi les objectifs de notre travail, nous nous sommes fixés au début sur une évaluation qualitative et quantitative de la composition phytochimique des extraits éthanolique, acétate d'éthyle et butanolique des racines de RT. Par la suite, une étude toxicologique a été réalisée dans le but de définir le seuil toxique ainsi que mettre en évidence l'impact de la consommation de la plante sur l'organisme à court et à long terme. Finalement les travaux pharmacologiques ont été réalisés afin d'élucider les activités antioxydante, hépatoprotectrice, anti-lithiasique, antiagrégant plaquettaire, antinociceptive et antidépressive de certains extraits de RT.

La connaissance des usages des plantes médicinales et leurs propriétés est généralement acquise suite à une longue expérience, accumulée et transmise d'une génération à l'autre (Mehdioui *et kahouadji*, 2007). RT ou (*El Foua*) est une plante très utilisée par la population marocaine et particulièrement la population locale de Marrakech pour le traitement de divers pathologies entre autre l'ictère et l'anémie (Eddouki *et al.*, 2002 ; Ziyat *et al.*, 1997 ; Bellakhdar, 2006).

Notre enquête ethnopharmacologique a révélé que les hommes et les femmes sont concernés par la médecine traditionnelle. Cependant, les femmes utilisatrices ont un peu plus de connaissances sur l'effet thérapeutique par rapport aux hommes (73% versus 27%). D'une part ceci pourrait être traduit par une faible pratique des hommes de la médecine traditionnelle. D'autre part, les femmes semblent détentrices du savoir thérapeutique traditionnel (Mehdioui *et kahouadji*, 2007).

En ce qui concerne l'âge de la population, les personnes dont l'âge est supérieur à 41 ans qui détiennent des connaissances endogènes (54.4%) sont nombreuses par rapport à la population jeune (16.3%). Wang *et al.*, (2015) et Mpondo *et al.*, (2012) ont rapporté des résultats similaires que le savoir ancestrale est détenu par les personnes âgées de 50 ans et plus. Cette inégale répartition des connaissances suivant le sexe et l'âge pourrait conduire à une érosion des connaissances en matière de la sauvegarde et de la conservation des valeurs endogènes surtout que ce n'est qu'une frange de la population qui la détient.

Le taux d'analphabétisme, relativement élevé 42%, peut constituer un autre obstacle au développement de la pratique de la médecine traditionnelle. C'est pourquoi, le fait de constater un pourcentage des praticiens ayant un niveau universitaire égal à 20% est très positif car cela pourrait faire évoluer ce domaine et faire en sorte qu'il y ait un jour au Maroc, une médecine traditionnelle à l'image d'autres modèles tel celui de la médecine traditionnelle chinoise. Certes, cela demande aussi l'implication d'autres compétences, pharmaciens, médecins et pouvoirs publics pour arriver à la mise en valeur de cette richesse ancestrale qui, malheureusement, encourt le risque de pulvérisation.

Les résultats pharmacognosique ont révélé que 67% de la population enquêtée utilisent RT seule tandis que 33% la combinent avec d'autres plantes. La racine c'est l'organe qui est fortement exploitée (54%) vu son prix intéressant sur le marché et aussi sa disponibilité tout au long de l'année. Ces résultats sont proches de celui de Okello *et al.*, (2010) qui ont trouvé que 47% des recettes thérapeutiques à base des plantes médicinales en Kenya utilisent les racines vu sa richesse en principes actifs.

Le recours à l'utilisation des racines séchées sous l'état cru (78%) est le mode d'emploi le plus recommandé par la population enquêtée. Elle est généralement consommée en deux recettes soit la poudre mélangée avec la soupe blanche (87%) ou bien pétrie avec le pain. Ce mode de préparation pourrait être le mode le plus efficace, vu que la plante est utilisée sous son état cru ce qui préserve les principes actifs contenus dans cet organe. Benlamdini *et al.* (2014) ont montré que la décoction des plantes dans l'eau, le lait ou le thé pendant 15 à 20 minutes pourrait détruire certains principes actifs des espèces utilisées, tandis que Daoudi *et al.* (2016) ont rapporté que ce mode de préparation est plus efficace, il permet l'extraction et l'assimilation des principes actifs tout en réchauffant le corps et en désinfectant la plante.

D'après notre étude, le mode d'administration le plus utilisé est effectuée par voie orale avec généralement une dose exprimée en cuillère à café ou à soupe (97%) une fois par jour. La durée du traitement est généralement jusqu'à la guérison (disparition des signes cliniques). Ces résultats présentent quelques similitudes avec certains travaux antérieurs Belkader *et al.*, (2006) qui avaient aussi mentionné que la voie d'administration la plus fréquemment utilisée c'est la voie orale, car c'est la plus pratique et la moins coûteuse.

Par ailleurs, et d'après les informations recueillies, 96% de la population enquêtée ont rapportés que la plante n'est pas toxique (Toxicité aigüe). C'est-à-dire aucun effet indésirable (diarrhée, hémorragie, troubles du rythme cardiaque) n'a été déclarée.

Les résultats obtenus constituent une source d'information très importante à exploiter pour l'élaboration d'une pharmacopée nationale des plantes médicinales Marocaine. Des études phytochimique, toxicologique et pharmacologique sur cette plante seront réalisées au cours de ce travail dans le but d'une validation scientifique des usages traditionnels de RT.

Chapitre III : Etude phytochimique

I-Introduction

RT est une plante utilisée, depuis des millénaires comme source de couleur rouge pour la teinture des textiles, en cosmétologie, dans les aliments comme additifs et aussi en tant que drogue dans de nombreuses vertus thérapeutiques. Elle est très répandue dans le monde et particulièrement en Europe, en Asie et en Afrique du nord (Derksen et Van Beek, 2002). *RT* a fait l'objet de nombreux travaux (Karim *et al.*, 2010 ; Sharifzadeh *et al.*, 2014 ; Prasad *et al.*, 2007 ; Mehrabian *et al.*, 2000 ; Kalyoncu *et al.*, 2006 ; Lajkó *et al.*, 2015) visant la caractérisation de ses constituants phytochimiques. Ces études ont mis en évidence sa richesse en dérivé anthraquinoniques comme l'alizarine, lucidine et l'acide ruberythric (Derksen, 2001). Toutefois, la caractérisation quantitative et qualitative des polyphénols des extraits des racines de *RT* demeurent une tâche très intéressante et utile. C'est pour cela que nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique des extraits des racines de *RT*.

Notre étude phytochimique il a pour objectif:

- l'extraction par des solvants organiques de la matière séchée des racines de *RT*,
- le criblage (screening) phytochimique, afin d'avoir une idée sur la nature des composés qui sont présents dans les extraits,
- la caractérisation quantitative (Détermination des concentrations des polyphénols (flavonoïdes totaux et tanins condensés) dans les extraits des racines de *RT*,
- la caractérisation qualitative (analyse par *HPLC*) des extraits des racines de *RT*.

L'étude phytochimique a été portée sur les quatre extraits des racines de *RT*, qui sont : l'extrait éthanolique, acétate d'éthyle, butanolique et aqueux.

II Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

La collecte des racines de (RT) (*Figure 29*) dont le nom local est El Foua a été effectuée au mois de juin 2017 dans la province d'Azilal, village Ouaouizarte, Tensift de coordonnées géographiques (32°1143.5 "N, 6°6132.4 "W) au Maroc. L'identité botanique du spécimen végétal a été confirmée par Monsieur Ouhammou Ahmed, Professeur à la faculté des Sciences Semlalia. Un spécimen de bon (voucher number) (référence 9825) a été déposé dans l'herbier de la Faculté des sciences Semlalia de l'Université Cadi Ayyad, Marrakech. La partie racinaire de la plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec. Les racines séchées ont été ensuite broyées en poudre fine grâce à un broyeur électrique puis conservées dans des sachets en papiers à l'obscurité pour les tests ultérieurs.



Figure 29 : Rubia tinctorum (Marhoume, 2017)

2. Préparation des extraits

Dans le but d'extraire les différents groupes de métabolites secondaires, nous avons utilisé différents solvants organiques, en procédant à la technique d'extraction à chaud au soxhlet. La matière végétale séchée et pulvérisée est mise dans le soxhlet et extraite par l'éthanol pendant 24 heures. Le choix de l'éthanol est dicté par le fait qu'il est capable d'extraire le maximum de métabolites secondaires contenus dans la plante. Après évaporation de l'éthanol sous pression réduite à l'aide du rotavapeur, le résidu éthanolique obtenu est solubilisé dans de l'eau distillée bouillante. La solution ainsi obtenue est épuisée successivement par des solvants de polarité

croissante : l'hexane, l'acétate d'éthyle et le butanol (*Figure 30*). Les quatre extraits obtenus ont été concentrés sous vide au rotavapeur, ce qui a permis d'obtenir les quatre résidus (résidu hexanique, acétate d'éthyle, butanolique et aqueux).

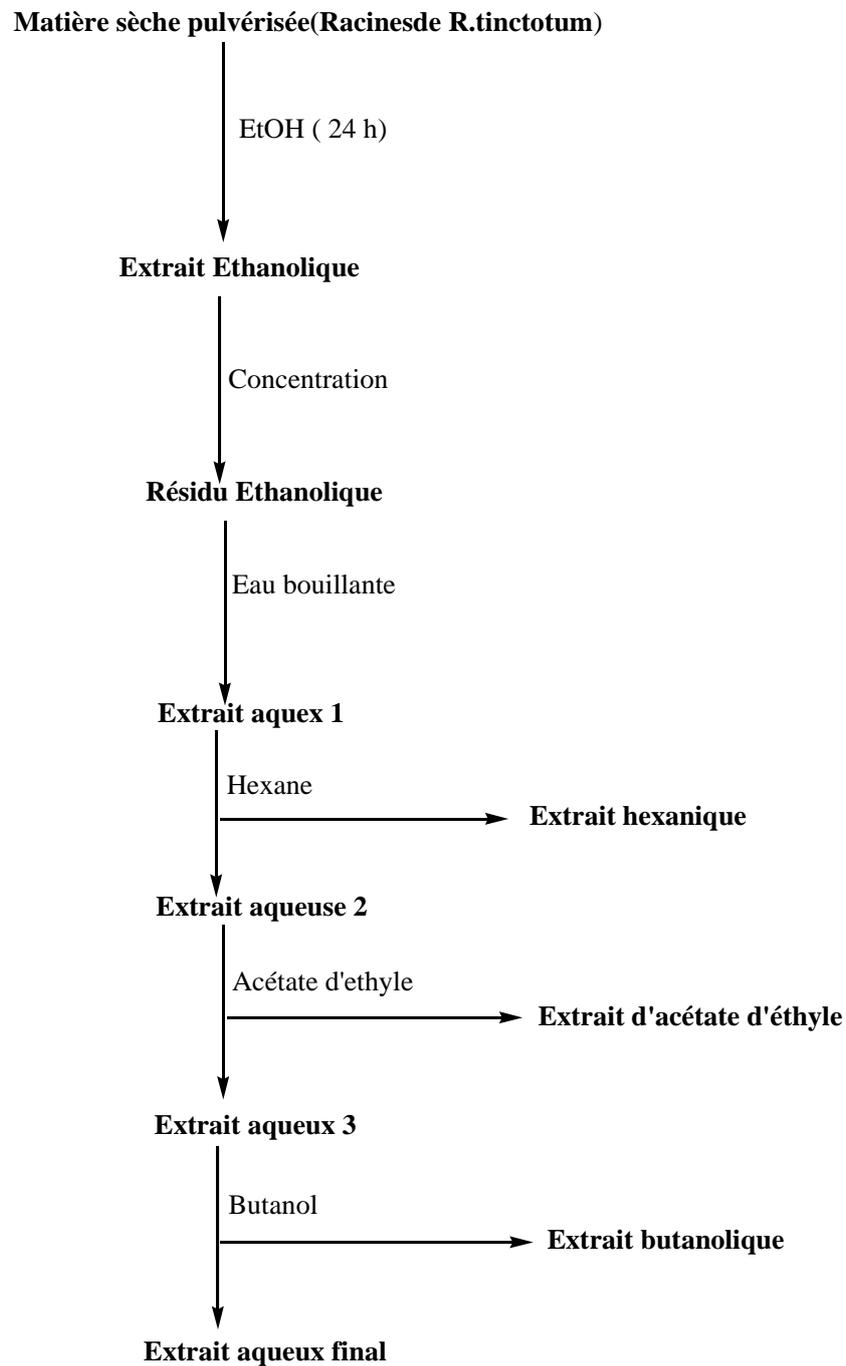


Figure 30: Protocole expérimental d'extraction à chaud de la matière sèche

3. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est une technique qui nous permettra d'identifier la nature des métabolites secondaires contenus dans les différents extraits. Il sert à donner une idée sur la nature chimique des composés actifs responsables des activités pharmacologiques étudiées.

➤ **Recherche des flavonoïdes :**

4 g de la plante pulvérisée sont extraits par 20 ml d'éthanol pendant 15 min. Le mélange a été ensuite filtré afin d'obtenir un filtrat. 1 ml du filtrat a été ajouté à 5 ml d'alcool d'éthanol à 50 %, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une couleur rouge indique la présence des flavonoïdes (Hosseinzadeh et Younesi, 2002).

➤ **Recherche des tanins**

L'addition de quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 9 % sur 1ml d'extrait éthanolique donne en présence des tanins une coloration bleue (tanins galliques) ou vert foncé (tanins catéchiques) (Okpo *et al.*, 2001). Afin de mettre en évidence la présence de tanins dans l'extrait éthanolique de RT, nous avons ajouté quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 9 % à 1ml d'extrait éthanolique filtré. L'apparition d'une coloration bleue est la confirmation de la présence des tanins galliques, tandis que la couleur vert foncé montre la présence des tanins catéchiques (Okpo *et al.*, 2001).

➤ **Recherche des anthocyanes**

1 ml de l'extrait éthanolique a été ajouté à une solution de l'acide chlorhydrique concentré à 10 %. La coloration rouge est l'affirmation de la présence des anthocyanes (Pichon, 1972).

➤ **Recherche des saponines**

Un décocté d'une solution de l'extrait de RT (20%) a été préparé. Le décocté est ensuite filtré puis a été agité vigoureusement. La réaction est dite positive lorsque la mousse formée reste stable pendant 10 minutes (Paris et Moyse, 1965).

➤ **Recherche des alcaloïdes**

10 g de la plante pulvérisée ont été ajoutés à 50 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄ ; 0.1 N) pendant 15 min. La solution obtenue après filtration est alcalinisée avec 5 ml de solution d'ammoniaque (25 %) puis diluée avec 50 ml d'eau distillée. Après, l'extraction des alcaloïdes ont été réalisés avec le dichlorométhane qui a été ensuite évaporé à sec sous vide. Le résidu obtenu a été repris avec une solution d'acide sulfurique (10 %). La présence des alcaloïdes se traduit par l'apparition d'un précipité après addition du réactif de Dragendorff (Okpo *et al.*, 2001).

➤ **Recherche des quinones**

2g de RT pulvérisée ont été humectée avec 2 ml d'HCl (0.1 N). 2 ml de chloroforme ont été ajoutés à ce mélange. 2 h après, la mixture a été agitée avec 5ml d'ammoniaque à 0,5 ½ à partir d'une solution à 25 %. La réaction est dite positive (présence de quinones), si une coloration rose, rouge ou violacée se développe (Finar, 1956).

➤ **Recherche des catéchols :**

Les extraits de RT ont été par un volume égal d'alcool chlorhydrique: éthanol-HCl (50 : 50). Après quelques minutes au bain-marie bouillant, on note une coloration brune indiquant, la présence des catéchols (Passama *et al.*, 1973).

4. Caractérisation quantitative

4. 1 Dosage des polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux d'extraits des racines de RT a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Burits *et al.*, 2001). Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène, possédant une absorption maximale à 760nm.

Un volume de 100 µl d'échantillon adéquatement dilué est mélangé avec 3,9 ml d'eau distillée, suivi d'addition de 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min, 1 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 20% (p/v) est ajouté. Les tubes sont agités et incubés pendant 1 heure à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 760 nm contre un blanc.

La courbe d'étalonnage est élaborée avec l'acide gallique dans les mêmes conditions. Le contenu phénolique a été calculé sous forme d'acide gallique (1- 0,062 mg/ml, Y= 0,981 x+ 0,003, R²=0,9999). Toutes les déterminations ont été réalisées en trois exemplaires.

4. 2 Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) (Zhishen *et al.*, 1999). Ainsi, 200 µl d'extrait adéquatement dilué sont mélangés avec 800 µl d'eau distillée, suivi d'addition de 60 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 %. Après 5 min, 40 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10% (m/v) sont rajoutés au mélange. Après 6 min d'incubation à température ambiante, 400 µl de carbonate de sodium (1M) et 500 µl d'eau distillée sont additionnés au milieu réactionnel. Immédiatement, le mélange est agité afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510

nm. Une courbe d'étalonnage est élaborée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme étalon. La teneur en flavonoïdes totaux d'extraits étudiés est exprimée en mg d'équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (mg CAE/g MS).

4. 3 Dosage des tanins condensés:

La quantité des tannins condensés est déterminée en utilisant la méthode dite à la vanilline en milieu acide (Xu et Chang, 2007). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les molécules des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré qui a un maximum d'absorption à 500 nm. Un volume de 200 µl de l'extrait est introduit dans deux tubes à essai séparés (un pour l'échantillon et l'autre pour le témoin). Ensuite, 2 ml de la solution vanilline/éthanol à 4 % (m/v) sont ajoutés puis mélangés à l'aide d'un vortex. Après, 1 ml de l'acide chlorhydrique concentré (Hcl) est additionné et le mélange obtenu est laissé réagir à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc de chaque échantillon à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible. La courbe d'étalonnage est élaborée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (mg CAE/g MS).

5. Caractérisation quantitative par HPLC

Les extraits des racines de RT ont été normalisés pour leur teneur en composés polyphénoliques et flavonoïdiques par la méthode HPLC. Les séparations chromatographiques ont été effectuées sur une colonne à phase inversée (RP-18), Agilent Technologies (250 mm × 4,6 mm, 5,0 µm), protégée par une pré-colonne RP-18 (10 mm × 4,6 mm) d'Agilent Technologies. Les deux colonnes ont été placées dans un four à colonne réglé à 25°C.

Le système HPLC est composé d'un système de pompage Shimadzu SCL-10A, d'un injecteur automatique SIL-10AD et d'un détecteur UV/Vis Shimadzu SPD 10A (portée de balayage en longueur d'onde 200 ~ 700 nm). La collecte et l'analyse des données ont été effectuées à l'aide du logiciel SHIAMDU Lab Solutions. Deux solvants (A et B) ont été utilisés avec un débit constant de 1 ml/min et le volume d'échantillon injecté était de 10µl. Le solvant A était composé de 5 % d'acétonitrile et de 95 % d'eau. Le solvant B est un tampon phosphate dissous dans l'eau (pH 2,6). Tous les solvants utilisés étaient de qualité HPLC. L'analyse HPLC a été effectuée avec les étalons suivi par les extraits RT, puis les paramètres des échantillons sont comparés aux étalons.

III Résultats

1. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction à chaud par soxhlet avec l'éthanol de la matière sèche des racines de RT était de 12,73%. Plus que la moitié des composés contenus dans cet extrait éthanolique sont entraînés par l'eau (41.40%) et l'hexane (32.40%). Par ailleurs, il n'y a que 15.83% des composés de l'extrait éthanolique qui sont entraînés par le butanol et seulement 10.35% entraînés par l'acétate d'éthyle (*Tableau 5*).

Tableau 5: Pourcentages des différents extraits par rapport à la matière sèche et l'extrait éthanolique

Extraits		
	p/r à la matière sèche (%)	p/r à l'extrait éthanolique (%)
Extrait éthanolique	12.73	100
Extrait hexanique	4.12	32.40
Extrait acétate d'éthyle	1.31	10.35
Extrait butanolique	2.01	15.83
Extrait aqueux	5.27	41.40

2. Criblage phytochimique

Les résultats du criblage phytochimique réalisé sur les extraits des racines de RT sont résumés dans le tableau 6. Ce criblage a révélé la présence des métabolites secondaires chimiques suivants:

- **Flavonoïdes** : Ils sont présents en grande quantité dans l'extrait éthanolique et butanolique et en quantité moindre dans les extraits acétate d'éthyle, et aqueux.

- **Tanins** : Ces composés sont présents dans l'extrait éthanolique, butanolique et acétate d'éthyle et aqueux. Ils sont absents dans l'extrait hexanique.

- **Saponines** : Ces composés sont absents dans tous les extraits.

- **Alcaloïdes**: Ils ont donné des réactions négatives dans tous les extraits par les techniques de caractérisations que nous avons utilisées.

- **Anthocyanes** : Ces constituants sont absents dans tous les extraits à part ceux du butanol et d'éthanol.

- **Quinones** : Ils sont présents dans les extraits éthanolique, hexanique et acétate d'éthyle, et ils sont absent dans l'extrait butanolique et aqueux.

- **Catéchols** : Ils sont présents en faible quantité dans l'extrait éthanolique et dans l'extrait acétate d'éthyle.

Tableau 6: Criblage phytochimique

Métabolites secondaires	Extrait Ethanolique	Extrait Hexanique	Extrait acétate d'éthyle	Extrait Butanolique	Extrait Aqueux
Flavonoïdes	+++	-	+++	+	+
Tanins	++	-	++	+	+
Saponines	-	-	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	-	-	-
Anthocyanes	++	-	-	++	-
Quinones	+++	++	++	-	-
Catéchols	+	-	+	-	-

(-) Absence

(+) Présent en petite concentration

(++) Présent en moyenne concentration

(+++) Présent en grande concentration

3 Caractérisation quantitative

3.1 Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard (*Figure 31*). Les valeurs obtenues ont été exprimées en mg EAG/g MS (Tableau 7). Les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits varient entre 0.7 et 3.8 mg EAG/g MS. La concentration la plus élevée des polyphénols a été trouvée dans l'extrait éthanolique, avec un taux de 3.8 mg EAG/g MS par rapport aux extraits acétate d'éthyle et aqueux où nous avons enregistré des teneurs de l'ordre 1.5 et 1.1 mg EAG/g MS respectivement. La teneur la plus faible a été mesurée dans l'extrait butanolique.

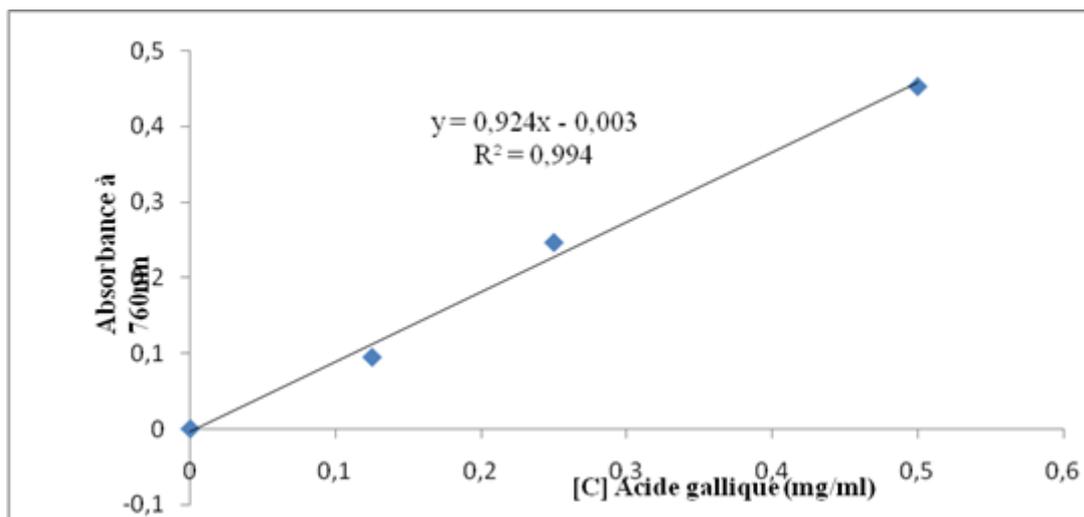


Figure 31: Courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Tableau 7: Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits des racines de RT

Extraits	Polyphénols totaux mg EAG /g MS*
Extrait éthanolique	3.8±0.15
Extrait acétate d'éthyle	1.5±0.10
Extrait butanolique	0.7±0.04
Extrait aqueux	1.1±0.04

* mg Eq GAC /gMS : mg équivalent acide gallique / g de matière sèche.

3. 2 Détermination de la teneur en flavonoïdes

Les taux des flavonoïdes des extraits ont été calculés à partir de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant la catéchine comme standard (*Figure 32*). Ils ont été exprimés en termes de mg ECAT /g MS. Les résultats présentés dans le (Tableau 8) montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits. L'extrait éthanolique contient un maximum de flavonoïdes 2.4 mg ECAT /g MS, suivi par l'extrait butanolique qui renferme des teneurs d'ordre 1.4 mg ECAT /g MS. Tandis que la plus faible concentration des flavonoïdes a été mesurée dans l'extrait aqueux et acétate d'éthyle qui contiennent respectivement 0.3 et 0.7 mg ECAT /g M.

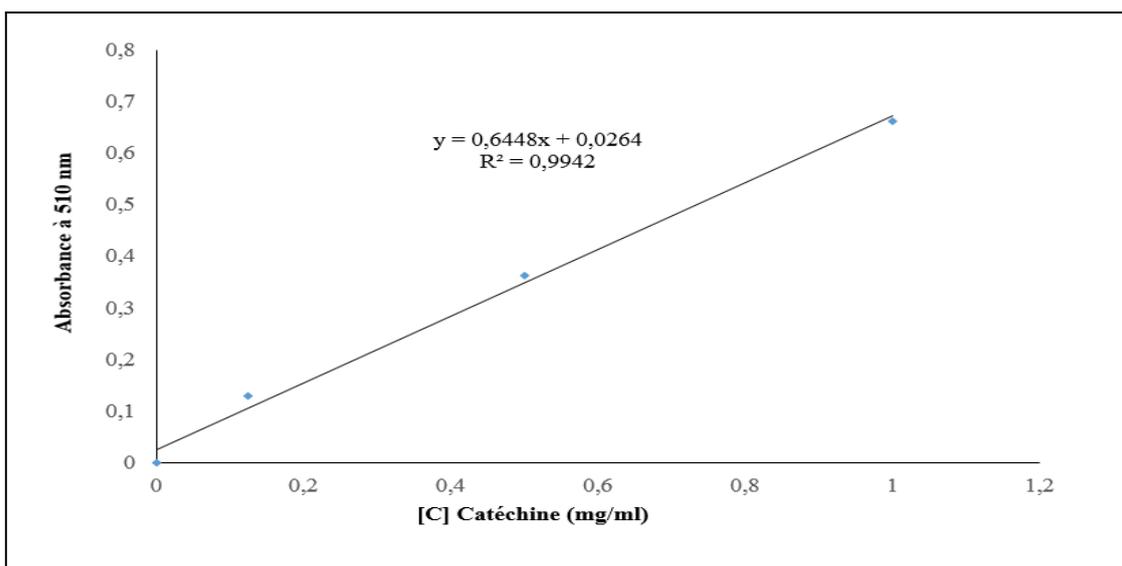


Figure 32: Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

Tableau 8: Teneurs en flavonoïdes des différents extraits des racines de RT

Extraits	Flavonoïdes mg ECAT /g MS*
Extrait éthanolique	2.4±0.16
Extrait acétate d'éthyle	0.7±0.05
Extrait butanolique	1.4±0.04
Extrait aqueux	0.3±0.05

*mg Eq CAT /g MS : mg équivalent catéchine / g de matière sèche.

3.3 Détermination de la teneur en tanins condensés

La teneur en tanins condensés a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant la catéchine comme standard. Les résultats ont été déterminés à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage (*Figure 33*) et ont été exprimés en mg EC/g Ms (Tableau 9). Ce dosage a révélé que la fraction éthanolique renferme les plus importantes teneurs en tanins condensés, avec une valeur de 2 mg ECAT/g MS. En revanche, les extraits aqueux, butanolique et acétate d'éthyle ont enregistré des teneurs plus faibles, avec des concentrations respectives de 0.6, 0.5 et 0.7 mg ECAT/g MS.

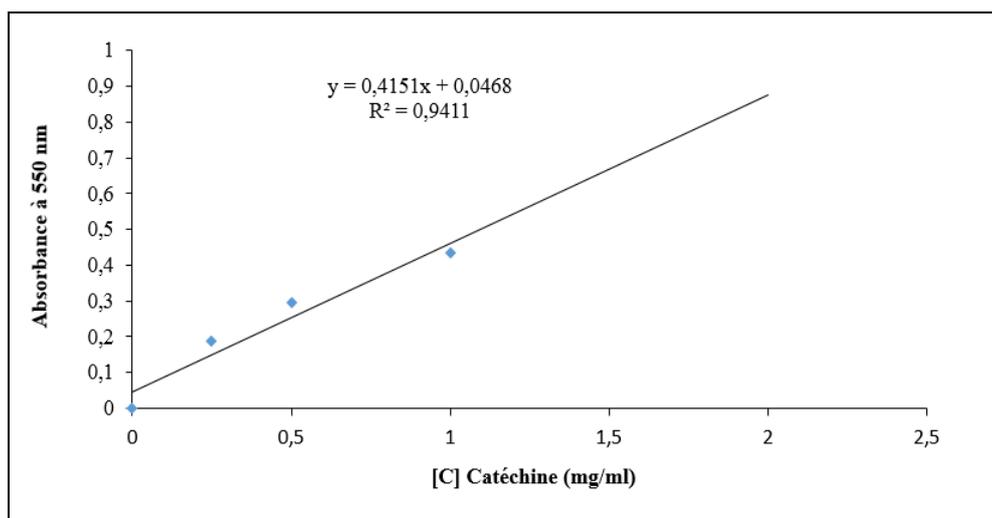


Figure 33: Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

Tableau 9: Teneurs en tanins condensés des différents extraits des racines de RT

Extraits	Tanins condensés mg ECAT /g MS*
Extrait éthanolique	2.0±0.10
Extrait acétate d'éthyle	0.7±0.03
Extrait butanolique	0.5±0.01
Extrait aqueux	0.6±0.03

* mg Eq CAT /g MS : mg équivalent catéchine / g de matière sèche.

4. Caractérisation qualitative par HPLC

L'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) a permis d'identifier et quantifier les polyphénols des 4 extraits des racines de RT. Les résultats qualitatifs et quantitatifs ont été présentés dans le tableau 10. Les chromatogrammes sont illustrés dans les figures (34, 35, 36, 37).

En se basant sur le temps de rétention, neuf composés ont été identifiés dans les extraits des racines de RT: la vanilline, l'acide rosmarinique, l'acide cinnamique, la quercétine, la catéchine, l'acide syringique, l'acide rétinique, l'acide férulique et la tyrosole.

L'analyse de ces résultats a montré que dans l'extrait éthanolique, la vanilline (26.74 mg EAG/100 g MS), l'acide rosmarinique (15.61 mg EAG/100 g MS), la quercétine (14.90 mg EAG/100 g MS) et la catéchine (14.19 mg EAG/100 g MS) sont majoritaires tandis que dans

l'extrait d'acétate d'éthyle c'est la quercetine (15.81 mg EAG/100 g MS) et l'acide cinnamique (12.43 mg EAG/100 g MS) qui sont les plus représentées. Nous avons remarqué que la vanilline (22.61 mg EAG/100 g MS) et l'acide rosmarinique (13.21 mg EAG/100 g MS) sont majoritaires dans l'extrait butanolique. Le tyrosole (mg EAG/100 g MS) et la quercetine (mg EAG/100 g MS) sont les composés majoritaires identifiés dans l'extrait aqueux. (Tableau 10).

Tableau 10: Concentrations des principaux composés phénoliques identifiés dans les extraits des racines de RT exprimées en mg EAG/100g MS. (A: acide)

Composés phénoliques	Concentration (mg EAG/100g MS)			
	Extrait éthanolique	Extrait acétate d'éthyle	Extrait butanolique	Extrait aqueux
Vanilline	26,74	12.32	22.61	-
A. rosmarinique	15,61	-	13.21	-
A. syringique	13.79	-	-	-
A. cinnamique	13.78	12.43	13.04	-
Catechine	14.19	-	-	-
Quercetine	14, 90	15.81	12.39	13.14
A. rétinique	-	12.32	-	-
A. férulique	-	12.14	-	-
Tyrosole	-	-	-	12.52

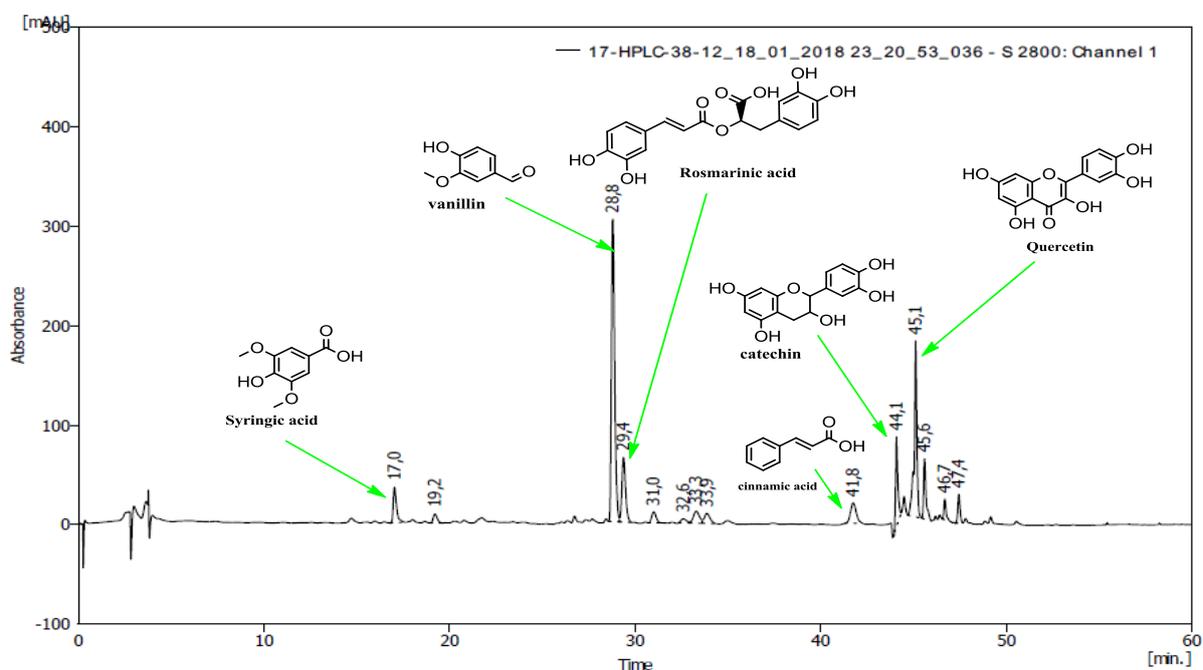


Figure 34: Chromatogramme de l'extrait éthanolique de RT obtenu par chromatographie liquide à haute performance

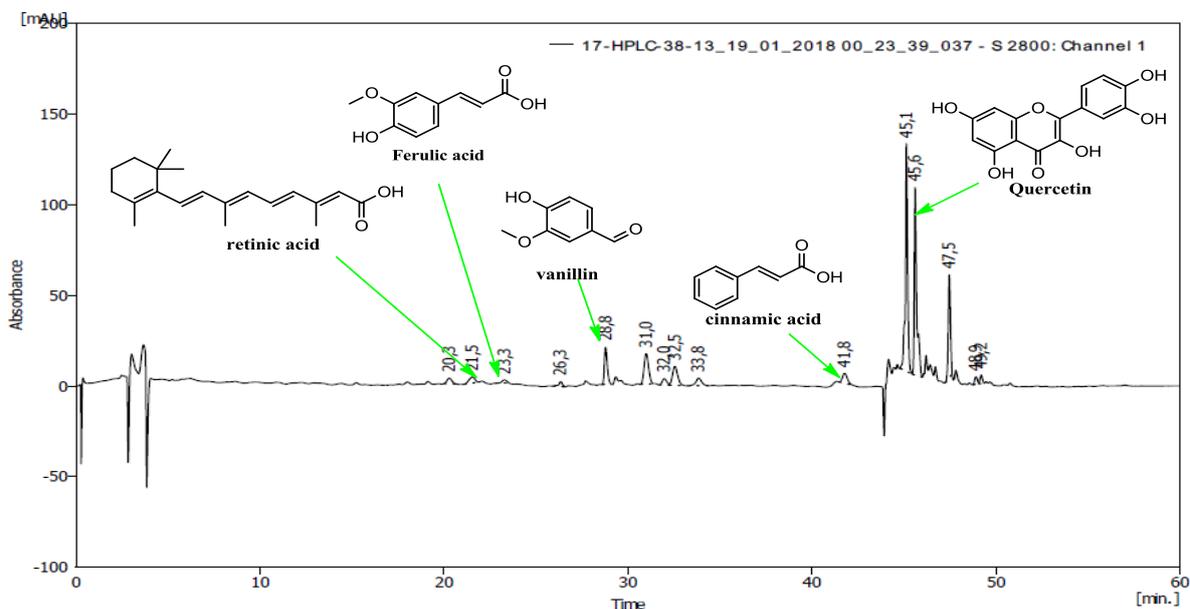


Figure 35: Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de RT obtenu par chromatographie liquide à haute performance

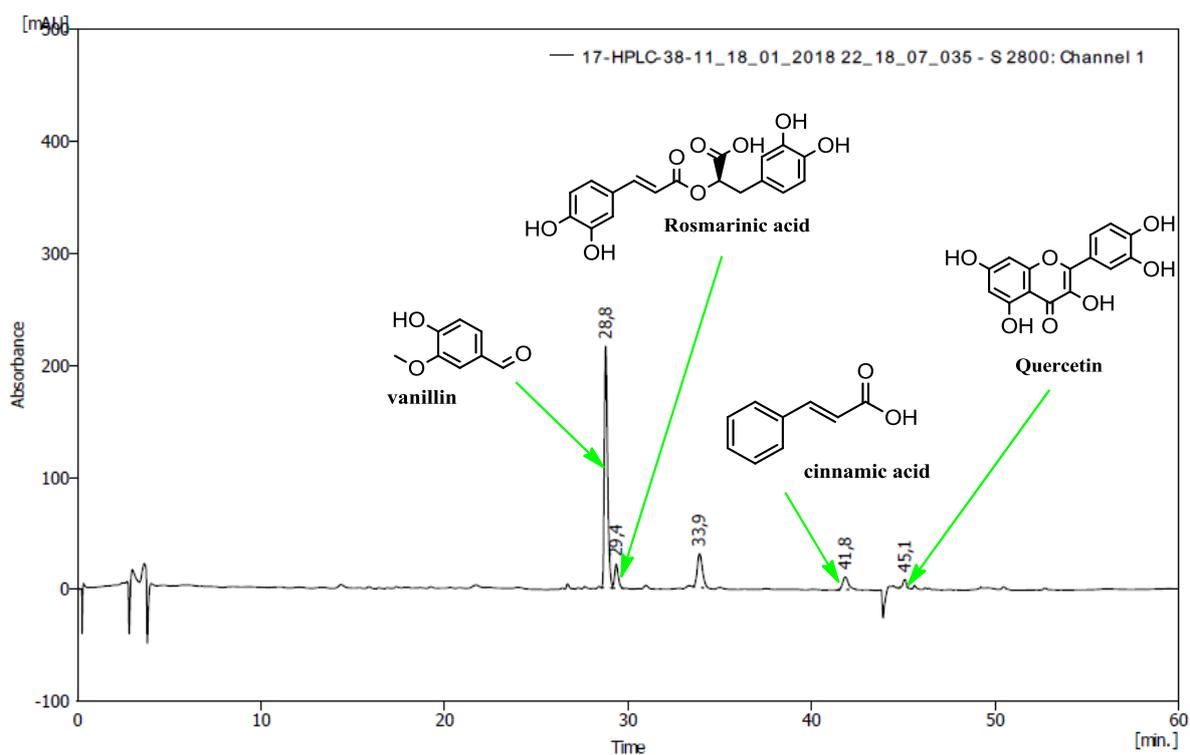


Figure 36: Chromatogramme de l'extrait butanolique de RT obtenu par chromatographie liquide à haute performance

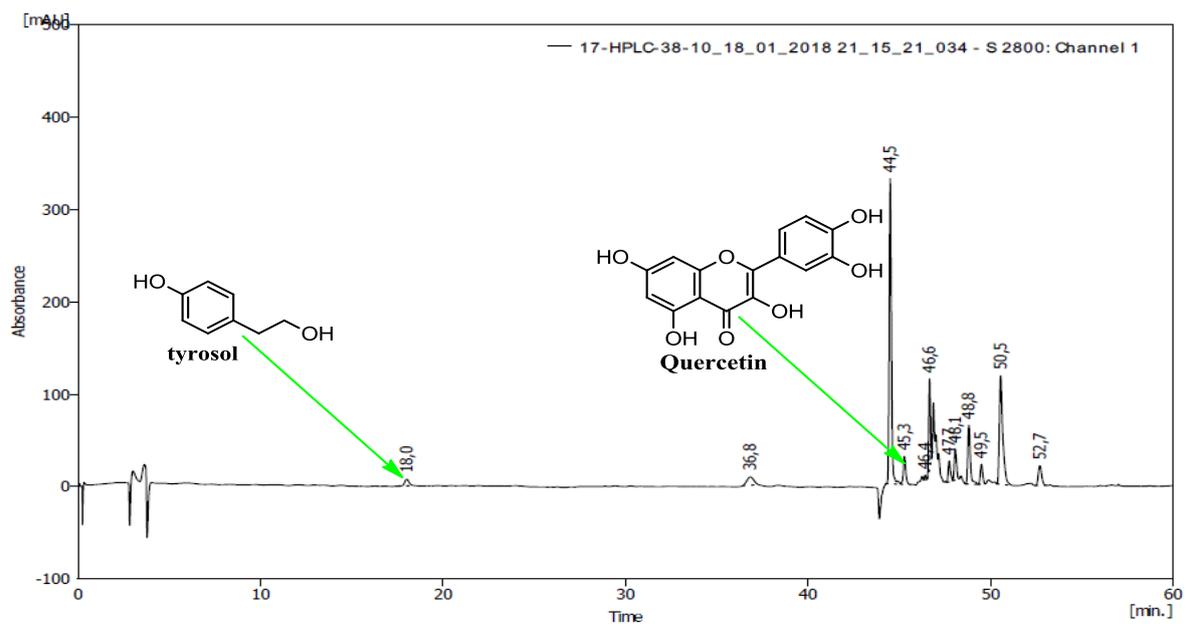


Figure 37: Chromatogramme de l'extrait aqueux de RT obtenu par chromatographie liquide à haute performance

IV Discussion

Le processus général de caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir de matrices complexes, telles que les plantes, fait intervenir différentes étapes, dont les trois principales sont l'extraction, l'isolement, et l'identification des métabolites secondaires, toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques (Hostettmann et Wolfender, 2004).

a- Caractérisation quantitative

La caractérisation quantitative a montré que les racines de *RT* sont très riches en métabolites secondaires. Le rendement de l'extraction par l'éthanol est de 12,73%. La majorité des composés contenus dans la matière sèche sont solubles dans l'éthanol et le butanol. Ils sont moyennement solubles dans l'acétate d'éthyle et l'eau, et une faible solubilité dans l'hexane. Ceci nous confirme que les racines de *Rubia tinctorum* sont pauvres en lipides.

Au cours de cette investigation, le criblage phytochimique a révélé les principaux composés chimiques mise en évidence dans les différents extraits et qui sont : les flavonoïdes, les quinones, les tanins, les anthocyanes, et les catéchols, Par ailleurs, c'est l'extrait éthanolique qui contient toutes les familles des métabolites secondaires en abondances, excepte les alcaloïdes et les saponines qui sont absents dans tous les extraits. Ce résultat est pour autant normal puisque ce solvant entraîne la majorité des composés contenus dans la matière sèche de la plante. Les deux extraits : butanolique et acétate d'éthyle sont aussi riches en flavonoïdes, tanins, quinones et anthocyanes mais pauvres en catéchols.

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des différents extraits a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques. Ceci a été confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés. Ces dosages révèlent que la fraction éthanolique referme les plus importantes teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés par rapport aux autres extraits. Tandis que l'extrait butanolique contient une concentration assez importante en flavonoïdes et tanins para rapport à ceux d'acétate d'éthyle et aqueux.

Les polyphénols sont des produits naturels de grande valeur (Balasundram *et al.*, 2006) et dotés de nombreuses propriétés physiologiques qui les rends capables de protéger les cellules contre dommages causés par les radicaux libres (Zheng *et al.*, 2010 ; Sies *et al.*, 2010). Les polyphénols peuvent aussi prévenir les maladies dégénératives (Del Rio *et al.*, 2010) et ils sont dotés d'autres propriétés antioxydantes (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006; Muanda *et al.*, 2011).

Les flavonoïdes sont des substances répandues chez les végétaux sous forme d'hétérosides (Guigniard, 1996). Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs (Guigniard, 1996). Les flavonoïdes sont maintenant considérés comme des composants indispensables dans une variété d'applications pharmaceutiques, médicinales et cosmétiques. Ceci est attribué à leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimutagènes et anti-cancérigènes, ainsi qu'à leur capacité à moduler la fonction enzymatique cellulaire clé (Panche *et al.*, 2016).

Les tanins sont des antioxydants, ils sont également reconnus pour leur pouvoir de fixation aux protéines avec une tendance à l'imperméabilité des couches externes et la protection des couches sous-jacentes, leurs effets antiseptiques et leurs propriétés de renouvellement des tissus (Bruneton, 1993).

Les quinones sont des composés oxygénés qui résultent de l'oxydation de dérivés aromatiques. Les principales quinones reconnues sont les benzoquinones, les naphthoquinones et les anthraquinones. Les quinones trouveraient leur importance pharmacologique (action antibactérienne, antispasmodique) dans leur grand pouvoir énergétique et leur rôle de vecteur des vitamines liposolubles (Vitamine A, D, E, K) (Thomson, 2012).

Nos résultats de caractérisation qualitative montrent que les racines *Rubia tinctorum* sont très riches en polyphénols, tandis que dans des travaux antérieurs (Guinot *et al.*, 2006), ils ont mis en évidence la richesse de la plante principalement en anthraquinones. Cette diversité dans la composition phytochimique pourrait être attribuée à plusieurs facteurs :

- Climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, type de sol (aride ou semi-aride), agressions, maladies, altitude, température, précipitation et exposition solaire.
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (Miliauskas *et al.*, 2004)
- La méthode de quantification peut également influencer l'estimation de la teneur en composés phytochimiques (Lee *et al.*, 2003).

b- Caractérisation qualitative par HPLC

L'analyse des chromatogrammes des extraits des racines de *Rubia tinctorum* en comparant avec les temps de rétention des différents standards, nous a permis d'identifier neuf (9) composés phénoliques : la vanilline, l'acide rosmarinique, l'acide cinnamique, la quercétine, la catéchine, l'acide syringique, l'acide rétinique, l'acide férulique et la tyrosol.

Quatre molécules majoritaires ont été identifiées dans l'extrait éthanolique : la vanille, l'acide rosmarinique, la quercétine et la catéchine, de même pour l'extrait d'acétate d'éthyle c'est la quercétine et l'acide cinnamique qui sont majoritaires. Par ailleurs, les principaux composés identifiés dans les extraits (butanolique et aqueux) sont la vanilline et l'acide rosmarinique, tyrosol et quercétine respectivement. Quant aux autres composés sont minoritaires.

L'étude déjà réalisée par Bener *et al.*, (2010) sur la caractérisation chimique des extraits de *R. tinctorum* a mis en évidence une extraordinaire diversité dans la composition chimique de cette plante. Cette étude a révélé des résultats plus au moins comparables à la nôtre et surtout concernant la nature des composés contenus dans les racines de *Rubia tinctorum*, comme par exemple la catéchine et la quercétine. Par ailleurs nos résultats diffèrent beaucoup de ceux déjà obtenus par Derksen, (2001) qui a montré que la plante renferme d'autres molécules polyphénoliques majoritaires comme : lucidine primeveroside, l'acide ruberythrique, pseudopurpurine, munjistine, alizarine, purpurine. Ces variations dans la composition chimique des racines de *Rubia tinctorum* pourraient s'expliquer entre autres par les facteurs climatiques, édaphiques et selon aussi la saison et le temps de la récolte.

Les analyses phytochimiques réalisées sur les racines de RT, nous ont permis de quantifier leur richesse en molécules bioactives et par conséquent d'approuver scientifiquement leur usage parmi les plantes médicinales.

Chapitre IV : Profil toxicologique

I- Introduction

D'après les résultats de l'enquête, aucun signe de toxicité suite à la consommation des racines de *RT* apparent n'a été rapporté, d'autant plus, leur vente, prescription et usage ne sont pas à ce jour réglementés. En conséquence, il y a toujours des risques d'intoxication par abus d'utilisation, confusion entre les différentes espèces de plantes ou par interaction avec des médicaments pris simultanément. Nous avons voulu à travers la présente étude de vérifier cet adage.

En effet, l'étude toxique d'une substance peut être réalisée soit par l'étude de la toxicité aiguë après administration d'une dose unique ou bien par l'étude de la toxicité subaiguë après administration répétée de la dose.

La toxicité aiguë est définie comme étant l'ensemble des effets toxiques d'une substance administrée à forte dose, qui entraînent des troubles organiques évoluant rapidement et pouvant engendrer la mort (Ruckebusch, 1981). La DL 50 est la quantité d'une substance, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai. Les essais toxiques peuvent être réalisés sur plusieurs sortes d'animaux, mais ce sont les rongeurs en particulier les rats et les souris qui sont le plus souvent utilisés (Olivier, 1986).

La toxicité subaiguë concerne les effets nocifs dus à la répétition de doses qui ne produisent pas d'effets toxiques immédiats. Des effets tardifs peuvent survenir à cause de l'accumulation du produit dans les tissus ou à cause d'autres mécanismes (OCDE, 1979). La substance à tester est administrée quotidiennement à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux. De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés (OCDE, 2008).

Concernant *RT*, malgré son large usage par la population marocaine, il n'y a aucune information dans la littérature scientifique marocaine sur son profil toxicologique. Dans le but de vérifier si la plante n'est pas dotée d'une certaine toxicité qui s'oppose à son exploitation dans le domaine de la phytothérapie, notre travail a porté sur l'étude de sa toxicité à court (toxicité aiguë) et à long terme (toxicité subaiguë) à fin de cerner ces potentialités toxiques, surtout qu'elles sont largement utilisées par la population locale de Marrakech.

II Matériels et méthodes

1 Matériel biologique Animaux

Les animaux utilisés dans nos expériences sont des souris *Swiss Albinos* mâles et femelles pesant entre 25 et 35 g et des rats *Sprague Dawley* pesant entre 160 à 220g. Lors des expériences, les animaux étaient placés dans des cages transparentes dans une animalerie soumise à une photopériode de 12 h de lumière (7 à 19 h) et 12 h d'obscurité (19 à 7 h). La nourriture et l'eau ont été fournies à volonté.

2 Matériel végétal

Dans cet essai, nous nous sommes intéressés à étudier la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait éthanolique des racines de *RT*. L'extrait est solubilisé dans l'eau distillé.

3. Toxicité aiguë

3. 1 Principe :

Pour la détermination de la toxicité aiguë, le protocole expérimental utilisé est celui décrit par les directives de « l'ajustement de la dose », ligne 425 de l'OCDE (OCDE, 2008a). L'essai consiste à administrer aux animaux, en une seule prise, de fortes doses de la substance testée et noter ensuite l'ensemble des signes toxiques qui surviennent après le traitement. En cas de doses létales, un pourcentage de mortalité et la DL₅₀ (dose provoquant 50 % de mortalité) sont calculés.

3. 2 Méthodologie :

La toxicité aiguë de l'extrait a été testée sur des souris (mâle et femelle) en leur administrant, en une seule prise, des doses croissantes (0.5, 1, 2, 3.5 et 5g/kg) de l'extrait éthanolique. Les animaux ont été laissés à jeun pendant 18 heures avant le traitement, et ils ont été répartis selon le traitement en des lots de 4 souris. Immédiatement après le traitement et durant les heures suivantes, les animaux ont été observés pour noter toute anomalie ou changement du comportement normal. De même, un suivi de sept jours a été assuré pour chaque lot et durant lequel étaient notés les paramètres suivants :

- Le comportement de l'animal et les signes de toxicité (piloérection, activité motrice, crampes,..).
- Le nombre des décès dans chaque lot, en précisant le moment du décès, pour déterminer le pourcentage de mortalité et calculer par la suite la DL₅₀.

3. 3 Expérimentation :

Le but de cette expérience est d'étudier la toxicité aiguë de l'extrait éthanolique de RT. L'extrait a été administré, en une seule prise, par voie orale. Les animaux ont été répartis selon le traitement comme suit :

Groupe 1 Souris femelles

- Lot 1 : Témoins ayant reçu du sérum physiologique (9 ‰, po)
- Lot 2 : Traitées par l'extrait éthanolique (0.5 g/kg, po).
- Lot 3 : Traitées par l'extrait éthanolique (1 g/kg, po).
- Lot 4 : Traitées par l'extrait éthanolique (2 g/kg, po).
- Lot 5 : Traitées par l'extrait éthanolique (3.5 g/kg, po).
- Lot 6 : Traitées par l'extrait éthanolique (5g/kg, po).

Groupe 2 : Souris mâles

- Lot 1 : Témoins ayant reçu du sérum physiologique (9 ‰, po)
- Lot 2 : Traitées par l'extrait éthanolique (0.5 g/kg, po).
- Lot 3 : Traitées par l'extrait éthanolique (1 g/kg, po).
- Lot 4 : Traitées par l'extrait éthanolique (2 g/kg, po).
- Lot 5 : Traitées par l'extrait éthanolique (3.5 g/kg, po).
- Lot 6 : Traitées par l'extrait éthanolique (5g/kg, po).

3. 4 Détermination de la DL₅₀

Pour la détermination de la toxicité aiguë, le protocole expérimental utilisé est celui décrit par les directives de « l'ajustement de la dose », ligne 425 de l'OCDE (OCDE, 2008a). L'essai consiste à administrer aux animaux, en une seule prise, de fortes doses de la substance testée et noter ensuite l'ensemble des signes toxiques qui surviennent après le traitement. En cas de doses létales, un pourcentage de mortalité et la DL₅₀ (dose provoquant 50 % de mortalité) sont calculés.

4. Toxicité subaiguë

4. 1 Principe

Pour la détermination de la toxicité subaiguë, le protocole expérimental utilisé est celui décrit par les directives 407 d'OCDE (OCDE, 2008 b). La substance à tester a été administrée quotidiennement par voie orale, à différents niveaux de dose, à plusieurs groupes de souris, à raison d'un niveau de dose par groupe pendant une période ≤ 1 mois. Chaque jour au cours de cette période, les souris ont été examinées soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité.

Les souris qui meurent et même les survivantes ont été autopsiées. Une étude d'une période \leq 1 mois fournit des informations sur les effets d'une exposition répétée par voie orale.

4. 2 Méthodologie :

La durée de ce test de toxicité est de 16 jours. Séparées en 5 lots, les souris ont été mises à jeun pendant la nuit (Moura *et al.*, 2005). Chaque matin, et durant les 16 jours du traitement, chaque souris a été pesée. Elle a reçu ensuite par voie orale le volume adéquat du produit à tester; le volume administré étant de 1 ml /100 g de poids corporel.

4 .3 Expérimentation

➤ **Lot témoin:**

Ce premier gde souris a servis de lot témoin. Chaque souris a reçu quotidiennement, à l'aide de la sonde stomacale, une dose d'eau distillée équivalente à 1 ml/100 g de poids corporel. L'administration a été ininterrompue tout au long des 16 jours de traitement. L'eau distillée a été utilisée puisqu'elle sert de véhicule pour l'extrait.

➤ **Les lots traités:**

Les 5 autres lots sont les lots d'animaux traités avec l'extrait éthanolique des racines de RT aux doses de 0.5, 1, 2, 3.5g/kg de poids corporel / jour, pendant 16 jours. A la fin du test, après l'administration de la dernière dose, les rats ont été mis à jeun toute la nuit.

Elles ont été anesthésiées (au 16^{ème} jour) par injection intra-péritonéale avec l'hydrate de chloral (10 mg/kg). Le sang a été prélevé et mis dans deux sortes de tubes: l'un contenant l'E.D.T.A pour l'analyse hématologique et l'autre tube sec sans anticoagulant. Ce dernier tube a été centrifugé à 3000 tours à 4°C pendant 10 min pour obtenir le sérum pour les analyses biochimiques. Les souris ont été ensuite, sacrifiées par exsanguination. Elles ont été soumises à une autopsie et leurs organes prélevés pour l'étude histopathologique.

4. 4 Poids corporel, mortalité et signes cliniques :

Tout au long de la période des 16 jours, tous les animaux sont quotidiennement pesés et observés pour noter les signes cliniques tels les convulsions, l'excitation, les anomalies de posture, l'apparition d'une piloérection, les problèmes de respiration, la sédation, l'anorexie, les hémorragies, et les décès. Les observations sont faites immédiatement avant le gavage et jusqu'à 4 heures après le gavage.

4. 5 Analyses biochimiques:

L'étude biochimique des échantillons de sérum a été réalisée grâce à un automate (Cobac 311). Les paramètres biochimiques dosés concernent:

- **Le bilan rénal:** Dosage de l'urée et la créatinine selon la réaction de Jaffé qui est une réaction colorimétrique. L'acide urique selon la technique enzymatique qui utilise l'urate oxydase.
- **Le bilan hépatique:** Les enzymes étudiées sont : l'aspartate-amino-transférase (ASAT), l'alanine-amino-transférase (ALAT), la phosphatase-alcaline (PAL) et la gamma- glutamyl-transférase (GGT) selon la méthode colorimétrique.

4. 6 Analyses hématologiques :

L'analyse des constantes hématologiques sanguines a été réalisée grâce à un automate Sysmex Kx 21. Cet analyseur utilise l'impédance combinée à la technique de focalisation hydrodynamique pour la numération des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes.

4. 7 Examen anatomopathologique :

Après les 16 jours de traitement, les souris ont été sacrifiées et soumises à une autopsie. La présence de toute anomalie à savoir présence d'œdème, d'ascites, d'hémorragie ou d'hypertrophie d'organe a été notée. Les organes tels le foie et les reins ont été immédiatement prélevés, examinés et fixés dans une solution de formaldéhyde tamponnée à 10 %, déshydratées par des solutions d'éthanol en série, par la suite diaphanéisées avec de l'éthanol-benzène et incluses dans de la paraffine. Des coupes de 20 μm ont été coupées en tranches à l'aide d'un microtome avant d'être colorées à l'hématoxyline-éosine et examinées sous un microscope optique.

5 Analyse statistique

Le traitement statistique des données a été effectué par un logiciel spécialisé dans l'analyse statistique Sigma Plot 12.5. Les résultats ont été analysés par l'ANOVA à une voie (one way ANOVA). La comparaison des groupes a été réalisée en utilisant le test-T. Les données ont été exprimées en moyennes plus au moins écart types (S.E.) ou plus au moins les erreurs standard moyenne (S.E.M.) selon le test. Le degré de significativité a été représenté sur chaque graphique par des étoiles quand la comparaison a été effectuée avec le lot témoin.

*** $P < 0.001$ (très significatif)

** $P < 0.01$ (significatif)

* $P < 0.05$ (légèrement significatif)

ns : non significatif

III Résultats

2. 1 Etude de la toxicité aigüe

L'administration de l'extrait éthanolique de RT par voie orale à des doses de 0.5, 1, 2 g/kg n'a provoqué aucun signe de toxicité chez les souris traitées mâles et femelles. Leur comportement est resté normal et comparable à celui des témoins. A forte dose (3.5 et 5 g/kg), les souris ont restées immobiles pendant 10 min, ensuite elles ont repris leur activité normale. Seulement, il a été observé une miction et une défécation abondantes par rapport aux témoins (Tableaux 12 et 13). Durant les 14 jours d'observation aucun décès n'a été enregistré chez les souris qui continuaient à mener une vie apparemment normale. Ce qui confirme que la DL₅₀ est supérieur à 5 g/kg.

Tableau 11: Evaluation de la toxicité aigüe de RT chez les souris femelles

Symptômes	Doses en mg/kg					
	0 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	3500 mg/kg	5000 mg/kg
<i>hyperactivité</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Redressement de poile (piloérection)</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Toilettage</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Miction/ défécation</i>	-	-	+	++	++	+++
<i>L'exploration de mouvement</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Accélération du rythme respiratoire</i>	-	-	-	-	-	-
<i>contorsion</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Somnolence/ perte de l'équilibre</i>	-	-	-	-	-	-

(-) Absent ; (+) Faible ; (++) Moyen ; (+++) Abondant

Tableau 12: Evaluation de la toxicité aigüe de RT chez les souris males

Symptômes	Doses en mg/kg					
	0 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	3500 mg/kg	5000 mg/kg
<i>hyperactivité</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Redressement de poile (piloérection)</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Toilettage</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Miction/ défécation</i>	-	-	+	++	+++	+++
<i>L'exploration de mouvement</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Accélération du rythme respiratoire</i>	-	-	-	-	-	-
<i>contorsion</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Somnolence/ perte de l'équilibre</i>	-	-	-	-	-	-

(-) Absent ; (+) Faible ;(++) Moyen ;(+++) Abondant

2. 2 Etude de la toxicité subaigüe de l'extrait éthanolique de RT

Les résultats de la toxicité subaigüe de l'extrait éthanolique de RT sont:

- Comportement des animaux et signes cliniques de toxicité
- Evolution du poids corporel des animaux
- Analyse des données hématologiques et biochimiques du sang
- Examen anatomopathologique des organes des animaux sacrifiés.

a- Observation générale et comportement des animaux

Durant toute la période du traitement (16 jrs) aucune mortalité n'a été enregistrée ni dans le groupe témoins ni dans les groupes des souris traitées. L'observation du comportement tout le long de la période d'étude a permis de constater que, quel que soit la dose de l'extrait administrée, aucun changement comportemental n'est observé. Les seuls signes cliniques notés pour les souris traitées avec les doses 2 et 3.5 g/kg, sont principalement les défécations (selles pâteuses est coloré en rouge) et mictions abondantes (urine coloré en rouge) juste après le gavage.

b- Évaluation du poids corporel :

Le poids corporel des souris traitées a légèrement diminué au deuxième jour de l'expérience. Après les animaux ont récupéré leur poids plus vite à partir du 4^{ème} jour. Les animaux traités par 0.5 g/kg ont montré un gain normal du poids comparable à celui du témoin. Par ailleurs une augmentation du poids corporel relatifs a été plus importante chez les souris ayant reçu l'extrait à des doses de 1 et 3.5 g/kg. Les souris traitées par la dose de 2 g/kg ont montré une augmentation pondérale statistiquement significative par rapport aux groupes témoins (*Figure 38*).

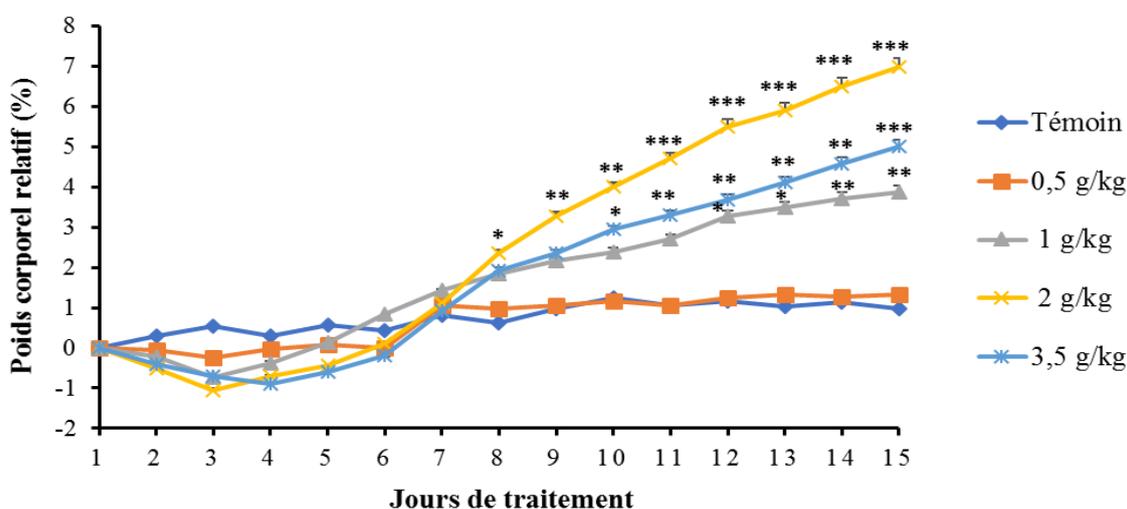


Figure 38: Effet de l'extrait éthanolique de RT sur l'évolution du poids corporel des souris après traitement oral. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type. Les valeurs sont significativement différentes comparées au témoin; (***) $P < 0.001$, (**), $P < 0.01$, (*), $P < 0.05$.

c. Evaluation des paramètres biochimiques et hématologiques

L'analyse des paramètres biochimiques n'a montré aucune différence significative chez les animaux traités par les doses (0.5, 1 et 2 g/kg) par rapport aux témoins. Toutefois, une augmentation significative ($P < 0.05$) de l'ASAT, l'acide urique, l'urée et la créatinine a été remarqué chez le groupe traité par la dose 3.5g/kg (Tableau 13).

Tableau 13: Effet de l'administration orale et répétée de l'extrait éthanolique de RT sur les paramètres biochimiques chez les souris.

	Témoin	0,5 g/kg	1 g/kg	2 g/kg	3,5 g/kg
Créatinine (mg/l)	2,3±0,11	2,7±0,18	2,6±0,25	2,7±0,15	3,2±0,2*
Urée (g/l)	0,25±0,01	0,28±0,02	0,27±0,01	0,28±0,02	0,33±0,04*
Acide urique (mg/l)	17,33±1,66	20,1±0,57	20,66±0,88	21,66±0,33	28,05±0,57*
ASAT (U/l)	125,01±2,88	134,3±9,73	124,13±11,24	132,33±5,6	144,04±6,08*
ALAT (U/l)	50,1±0,66	50,13±1,61	43,9±1,98	44,1±1,15	49,63±1,56

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type, * : différence significative à $P < 0,05$ vs Témoin.

Les paramètres hématologiques analysés (Tableau 14) n'ont montrés aucune différence significative chez tous les groupes par rapport aux témoins. Seulement une diminution significative de l'hémoglobine (Hgb) a été remarquée chez les groupes traités par les doses 0.5 et 2 g/kg).

Tableau 14 : Effet de l'administration orale et répétée de l'extrait éthanolique de RT sur les paramètres hématologiques chez les souris

	Témoin	0,5 g/kg	1 g/kg	2 g/kg	3,5 g/kg
GB ($10^3/\text{mm}^3$)	4,93±0,14	4,74±0,09	3,95±0,36 ^{ns}	3,97±0,24	4,34±0,05
GR ($10^6/\text{mm}^3$)	8,63±0,21	8,63±0,21	8,12±0,13	8,39±0,11	7,93±0,37 ^{ns}
Hgb (g/dl)	14,53±0,2	13,80±0,23*	14,66±0,12	13,76±0,17*	14,58±0,2
PLQ ($10^3/\text{mm}^3$)	873±11,15	860,66±10,89	809,66±15,49	824±15,1	873±23,79

(GB) : Globule blanche ; (GR) : Globule rouge ; (Hgb) : Hémoglobine ; (PLQ) : plaquette.

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type

* : différence significative à $P < 0,05$ vs Témoin.

d. Analyse histopathologique

- *Analyse macroscopique*

L'observation macroscopique des organes (les poumons, le cœur, le foie, les reins et la rate) n'a révélé aucune anomalie morphologique et/ou présence d'hémorragie qui pourrait être due à l'administration de l'extrait éthanolique de RT.

- *Analyse microscopique*

Les résultats de l'examen histopathologique sont indiqués dans les figures 39 et 40. D'après ces résultats, on a remarqué que les reins des souris témoins (*Figure 39*) montrent des glomérules et des tubules normaux. Le même aspect a été observé chez les souris traitées par l'extrait éthanolique de RT. Aucun signe de congestions, nécrose ou abcès rénaux n'a été remarqué. Le foie des souris témoins (*Figure 40*) présente une architecture du tissu hépatique normale avec des petits amas de polynucléaires et absence de vésicule de lipides autour des veines centrolobulaires. Le même aspect a été observé chez les souris traitées par les différentes doses de l'extrait éthanolique de RT.

L'analyse microscopique des coupes histologique des reins et du foie a montré une architecture normale semblable à celle du groupe témoin, suggérant qu'aucun changement dommageable ou des perturbations morphologiques n'ont été causés par l'administration orale réitérée de l'extrait éthanolique de RT.

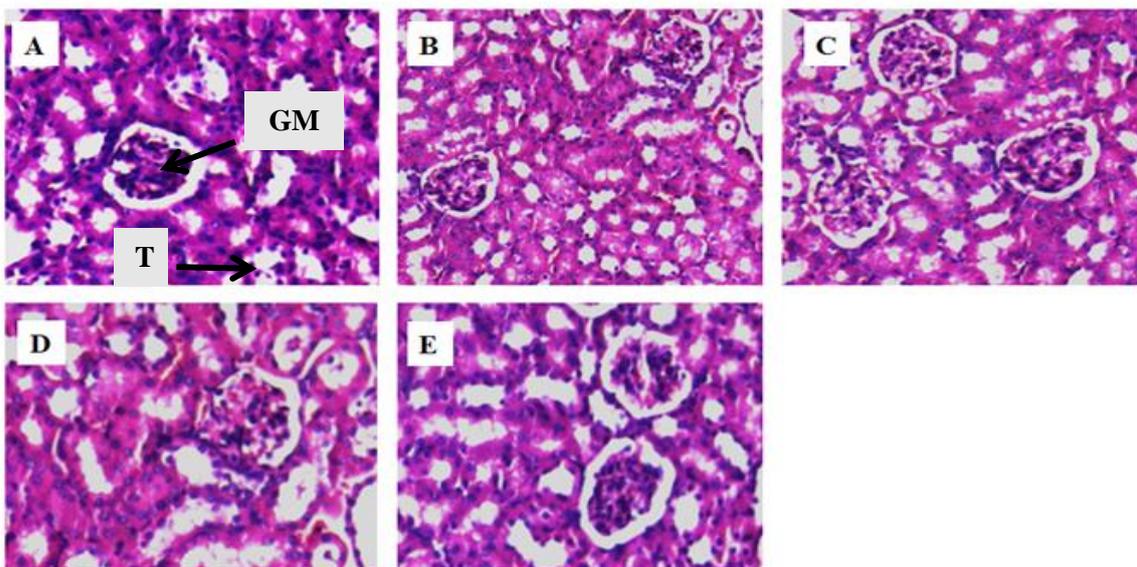


Figure 39: Images microscopiques des coupes histologiques des reins des souris colorées à l'hématoxyline et à l'éosine observées au microscope optique (50×) : (A) Témoins, (B) ; traitement par 0,5g/kg de E-RT; (C) 1 g/kg (D) ; 2 g/kg ; (E) 3,5g/kg. GM : glomérule

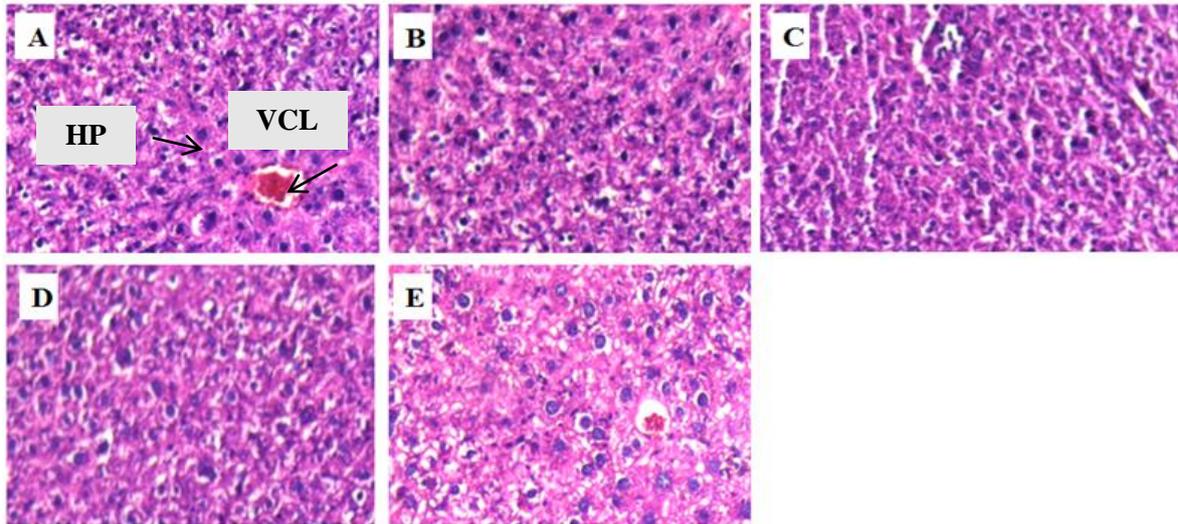


Figure 40: Images microscopiques des coupes histologiques des foies des souris colorées à l'hématoxyline et à l'éosine observées au microscope optique (50×) : (A) Témoins, (B) ; traitement par la dose 0,5g/kg de E-RT; (C) 1 g/kg (D) ; 2 g/kg ; (E) 3,5g/kg. **HP** : hépatocyte ; **VCL** : Veine Centro-lobulaire.

IV Discussion

Les racines de RT sont très utilisées par la population de Marrakech sans qu'aucun signe toxique apparent ne soit rapporté lors de notre enquête ethnopharmacologique (chapitre 2). L'évaluation scientifique requière l'étude de l'impact de la plante sur l'organisme à court et à long terme. D'où l'étude entreprise de la toxicité aiguë et subaiguë.

Dans cette partie, on s'est intéressé à étudier la toxicité aiguë et subaiguë par voie orale de l'extrait éthanolique des racines de RT. Nous avons choisi la voie orale car c'est la voie usuelle impliquée dans les conditions normales pour l'Homme. Quant au choix de la dose, Le protocole du test de la dose limite (un des tests de toxicité recommandés par la FDA (1988), est le protocole qui a été suivi au début de l'expérimentation, ceci en testant la dose de 5 g/kg. Les résultats obtenus n'ont révélé aucun signe particulier de toxicité ni de décès chez les souris traité par la dose maximale de 5g/kg de l'extrait éthanolique de RT donc la DL_{50} est supérieur à 5g/kg du poids corporel. Il en résulte que l'extrait de la plante appartient à la classe 5 dans le système mondiale de classification des substances chimique (The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), 2007).

Par ailleurs, l'étude de la toxicité aiguë de l'extrait éthanolique chez les souris aux doses de 0.5, 1, 2, 3.5 et 5 g/kg du poids corporel, n'a provoqué aussi aucune mortalité, ni anomalie de comportement. L'évolution normale du poids corporel, facteur utilisé en toxicité comme indicateur d'effets secondaires, démontre l'absence de signes de toxicité de l'extrait pendant 16 jours. Cependant il a été observé une défécation abondante chez les souris traitées avec les doses (3.5 et 5g/kg) par rapport aux témoins. Ceci montre qu'à forte dose, l'extrait provoque une polyurie et une évacuation fréquente des selles. Nous pouvons donc supposer que l'extrait a un effet laxatif et diurétique.

La détermination de la toxicité subaiguë permet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou anatomopathologiques consécutives aux administrations répétées d'une substance active. D'après les recommandations de l'OECD (2002), au moins trois doses doivent être testées dans l'étude de la toxicité subaiguë ou chronique. Cependant comme le test de la toxicité aiguë n'a pas fourni les informations nécessaires pour nous guider à choisir les doses appropriées ($DL_{50} > 5$ g/kg), ainsi qu'en absence de données toxicologiques locale sur la plante de RT, qui peuvent nous aider à déterminer la durée du traitement, cette étude a été réalisée en utilisant les recommandations décrites par les directives 407 d'OCDE (OCDE, 2008 b).

Nous avons testé les mêmes doses 0.5, 1, 2, 3.5 g/kg de la toxicité aiguë pour évaluer la toxicité subaiguë. Pour les doses 0.5, 1, 2 g/kg /j correspondent aux doses limites recommandée par les directive 407 d'OCDE. Alors que la dose 3.5 g/kg /j correspond à l'utilisation journalière d'une cuillère à café de la plante en poudre par la population enquêtes.

Les résultats obtenus de cette toxicité subaiguë qui a durée 16 jours, n'a montré aucun cas de mortalité ou de toxicité ni dans le groupe témoins ni dans les groupes des souris traitées. Ainsi qu'aucun changement de comportement n'a été observé. Les seuls observations notés pour les souris traitées avec les doses 2 et 3.5 g/kg, sont principalement une défécation fréquente (selles pâteuses est coloré en rouge) et une polyurie (urine coloré en rouge) juste après l'administration orale de l'extrait. D'autre part, il a été remarqué que tous les groupes traités ont perdu légèrement leurs poids au deuxième jour de l'expérience. Ceci pourrait être corrélé à la défécation et la polyurie notée lors de l'observation du comportement des souris traité. Ces deux paramètres, pourrait s'expliquer par l'effet laxatifs et diurétique de la plante (Bellakhdar, 1997). D'un autre côté, l'administration orale réitérée de l'extrait éthanolique de RT n'as causé aucune influence sur l'évolution du poids corporel des souris traitées par la dose 0.5g/kg. Tandis qu'il a favorisé la croissance pondérale des souris aux doses 1, 2 et 3.5 g/kg par rapport aux témoins. Cette prise de poids est probablement due à une stimulation de l'appétit causé par l'extrait.

Le bilan hématologique n'a révélé aucune variation significative des paramètres (GB, GR, PLQ et Hgb) déterminés chez les souris traitées. Les résultats sont comparables à ceux des témoins. Les animaux ont donc été considérés comme n'ayant pas été affectés par le traitement. L'extrait éthanolique de RT n'a induit aucun changement des paramètres biochimique (ALAT, ASAT, l'acide urique, créatinine et l'urée) chez les animaux traités par les doses (0.5, 1 et 2 g/kg) par rapport aux témoins. Cependant, a forte dose (3.5g/kg) les souris ont été plus sensible au traitement et elles ont présentés une augmentation significative ($P < 0.05$) de l'urée, la créatinine, l'acide urique et l'ASAT.

L'augmentation de l'urée pourrait être expliquée par une augmentation de catabolisme des composés protéiques, et par une atteinte de la fonction de filtration rénale (Dugan *et al.*, 1989; Piva *et al.*, 1997), l'élévation sérique de la créatinine et l'ASAT pourrait être due à des altérations du flux sanguin rénal ou de la fonction rénale, ou bien de la déplétion urinaire (OECD, 2002; Kataya et Hamza, 2008). Concernant l'augmentation sérique de l'acide urique, il pourrait être dû à une diminution de son élimination par les reins (Johnson *et al.*, 2013).

Cependant, tous ces résultats observés à la dose 3.5 g/kg n'ont pas été confirmés par les examens histopathologique des reins et du foie, qui ont montré une architecture normale semblable à celle du groupe témoin, suggérant qu'aucun changement dommageable ou des perturbations morphologiques n'aient été causés par l'administration orale réitérée de l'extrait éthanolique de RT. Ce qui conduit à la conclusion que l'impact toxicologique de RT à ce stade, est plus probablement de nature fonctionnelle, plutôt que structurale (Hall, 2001). Cette théorie n'exclut pas le fait que dans le cas de la consommation chronique ou répétitive de la plante, des signes de détériorations histologiques apparents pourraient s'installer. Nos résultats rejoignent ceux déjà trouvés par Ino *et al.*, (1995) qui a montré que l'administration orale de l'extrait des racines de RT des doses similaire à notre étude n'a aucun effet toxique aigu ou subaigu chez la souris.

D'un autre côté, le screening phytochimique des racines de RT, nous a révélé sa richesse en polyphénols (flavonoïdes). Cette famille de composés est connue pour sa large gamme d'activités biologique (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Muanda *et al.*, 2011 ; Panche *et al.*, 2016 ; Zheng *et al.*, 2010 ; Sies *et al.*, 2010). La caractérisation chimique de RT par *HPLC* a mis en évidence une variété de composition chimique qui est: la vanilline, l'acide cinnamique, la quercetine, l'acide syringique et la catéchine. En effet, dans plusieurs études, les polyphénols sont reportés comme étant de bons inhibiteurs de l'activité de l'enzyme α - glucosidase intestinale (Xiao *et al.*, 2013 ; Akkarachiyasit *et al.*, 2010 ; Daniel *et al.*, 1991 ; Hakamata *et al.*, 2006). Du fait que l'inhibition de l'activité de l' α -glucosidase intestinale peut engendrer une malabsorption des hydrocarbures, le bol intestinal serait augmenté. Il y aurait donc une augmentation de la pression osmotique au niveau du gros intestin, ce qui engendrerait un appel d'eau et ferait ainsi augmenter le contenu hydrique (Wolf, 2003). D'où l'apparition de selles molles (ou de diarrhées) observées en cas de consommation de fibres alimentaires ou en cas d'administration d'inhibiteurs commerciaux de l' α -glucosidase tel l'acarbose prescrit dans le traitement de l'obésité (William-Olsson, 1986). Par conséquent, la défécation fréquente observée dans notre étude pourrait appuyer l'hypothèse que l'extrait éthanolique des racines de RT via sa fraction polyphénolique, inhibe l'activité de l' α -glucosidase intestinale (Woolf, 2003). De plus, les propriétés diurétiques des polyphénols reportées par plusieurs auteurs (Gupta et Arya, 2011 ; Afzal *et al.*, 2004 ; Devi et Shyamala, 1999) pourraient expliquer la polyurie observée chez les souris.

Finalement, toutes ces allégations discutées sur les cibles moléculaire et leurs mécanismes d'action ne font que surlignés l'aspect préliminaire de la présente investigation et la nécessité

d'autres études pharmacologiques et toxicologiques à grande échelle pour la production des molécules naturelles actives et pour une modération de sécurité dans l'utilisation de cette plante.

Chapitre V: Effets Biologiques

I. Introduction

D'après l'enquête ethnopharmacologique, auprès de la population locale de Marrakech et ses régions, RT présente une plante très utilisée pour le traitement de divers pathologie entre autre les atteintes hépatiques et l'anémie. Cependant, il n'y a aucune donnée de ses effets hépatoprotecteur, anti-urolithiasique et antiagrégant plaquettaire bien que traditionnellement était utilisé pour soigner différentes pathologies et des carences telles que l'anémie.

Cette partie a été entreprise dans le but de vérifier les données recensées sur l'utilisation des racines de RT, à travers l'évaluation de quatre activités qui sont : l'activité antioxydante, l'activité hépatoprotectrice, l'activité antilithiasique, l'activité antiagrégante plaquettaire.

Dans un premier objectif, nous avons étudié l'activité antioxydante des extraits de racines de RT selon la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH.

Dans un second objectif, nous avons étudié l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique des racines de RT. La méthode selon laquelle l'amplitude de l'activité hépatoprotectrice de l'extrait a été déterminée c'est l'induction d'une hépatotoxicité expérimentale par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) chez le rat. Le tétrachlorure de carbone (CCl₄) est le plus communément utilisé d'une part et d'autre part, il induit une pathologie rencontrée en clinique: lésions de stéatose, nécrose hépatocytaire et même cirrhose (Martin et Feldmann, 1983; Fleurentin et Joyeux, 1990).

Dans un troisièmes objectif, nous nous sommes intéressés à tester l'effet des extraits de racines de *Rubia tinctorum* sur la lithiase rénale. Le modèle expérimental adopté étant le rat blanc rendu lithiasique par ingestion de l'éthylène glycol (EG). Ce modèle est largement utilisé pour mettre en évidence l'activité antilithiasique chez l'animal afin de confirmer ou d'infirmer son utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement de la formation des calculs rénaux.

Finalement la dernière partie des études pharmacologiques porte sur l'évaluation de l'effet antiagrégant plaquettaires des extraits de racines de RT *in vitro* et *ex vivo*. L'exploration plaquettaire *in vitro* a été mesurée par agrégométrie en présence des plaquettes humaines laves, incubées avec les extraits et induite par des agonistes plaquettaires. Tandis que l'agrégation plaquettaire *ex vivo* a été mise en évidence par deux tests le temps de saignement (bleeding time), et la numération plaquettaires chez le rat.

II Matériel et méthodes

1. Evaluation du potentiel antioxydant des extraits des racines de RT

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes est basée sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude, nous avons utilisé deux méthodes différentes à savoir : le test du pouvoir réducteur et l'effet chélateur sur le radical 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

1. 1 Piégeage du radical 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

L'évaluation de la capacité des extraits éthanolique de donner un hydrogène au radical synthétique DPPH., de coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune- verte a été réalisé selon la méthode de Von Gadow *et al.*, (1997) avec quelques modifications. La solution de DPPH a été préparée en solubilisant 4mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol. 100µl des extraits ou des contrôles (l'acide gallique) à différentes concentrations ont été mélangés avec 3 ml de la solution de DPPH, le tout a été incubé pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance est lue à 517 nm contre un blanc préparé avec l'éthanol pur. La concentration d'échantillon nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• (IC50) a été calculée par la relation suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [(\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}) / \text{Abs}_{\text{contrôle}}] \times 100\%.$$

2. Matériel biologique Animaux

Les animaux utilisés dans nos expériences sont des souris *Swiss Albinos* mâles et femelles pesant entre 25 et 35 g et des rats *Sprague Dawley* pesant entre 160 à 220g. Lors des expériences, les animaux étaient placés dans des cages transparentes dans une animalerie soumise à une photopériode de 12 h de lumière (7 à 19 h) et 12 h d'obscurité (19 à 7 h). La nourriture et l'eau ont été fournies à volonté.

3. Test de l'activité hépatoprotectrice

Ce test consiste à provoquer chez le rat, une insuffisance hépatique aigüe et évaluer les effets curatifs des extraits des racines de RT. Le produit chimique le plus fréquemment utilisé chez les rats, pour provoquer une insuffisance hépatique aigüe, est le tétrachlorure de carbone (CCl₄), car il cause une stéatose et des altérations hépatobiliaires périphériques. Il a montré que le CCl₄ possède une action hépatotoxique ictérogène. Il peut être utilisé pur ou mélangé à des substances huileuses (Plaa *et al.*, 1982), tétrachlorure de carbone permet à la fois l'étude de l'activité anti-ictérique et hépatoprotectrice, ces deux fonctions étant étroitement liées. Pour toutes ces raisons, nous avons choisi le CCl₄ comme hépatotoxique dans le cadre de nos essais.

3. 1 Protocole expérimental

a- Préparation des lots

L'hépto-toxicité a été induite par administration intrapéritonéale de 1ml/kg du Tétrachlorure de carbone (CCl₄) mélangé avec un volume égal d'huile d'olive toutes les 72 heures pendant 15 jours. Le clivage du CCl₄ abouti à la formation de radicaux libres (trichlorométhyl, dichlorocarbène, trichlorométhylpéroxyde) qui sont responsables d'une nécrose hépatique.

Les rats ont été partagés en 4 groupes, chaque groupe contenant 6 rats:

- **Groupe 1:** Traité par l'eau physiologique (0.9%) (10 ml/kg, v.o.) chaque jour pendant 15 jours successifs.
- **Groupe 2 :** Traité par l'huile d'olive (1 ml/kg. v.o.) chaque jour pendant 15 jours successifs.
- **Groupe 3 :** Traité par (1 ml/kg) de CCl₄ mélangé avec un volume égal d'huile d'olive (1ml/kg. v.*ip.*) toutes les 72h pendant 15 jours.
- **Groupe 4 :** Traité par l'extrait éthanolique de RT (1g/kg, v.o.) chaque jour pendant 15 jours avec injection du CCl₄ toutes les 72 heures.

b- Evaluation de l'effet hépto-protecteur de l'extrait éthanolique des racines de RT

L'activité héptoprotectrice de l'extrait éthanolique des racines de RT a été évaluée par le dosage sérique des paramètres biochimiques qui explore la fonction hépatique et par des examens histologiques du foie.

c- Dosage sérique des paramètres biochimiques

Après la période expérimentale de 15 jours, les rats ont été anesthésiés avec une injection *i.p.* d'hydrate de chloral (10 mg/kg). Un volume sanguin de 1 à 2 ml a été prélevé de la veine jugulaire dans deux tubes sans aucun additif. Le sérum a été séparé par centrifugation (4000 tr/min, pendant 10 minutes) et utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques (ASAT, ALAT, phosphatase alcaline (PAL), Gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) et bilirubine directe (BD). Les concentrations de substrats ont été déterminées enzymatiquement par des méthodes standard avec un automate biochimique (Cobas C311 analyzer Roche Diagnostics GmbH D-68298, Mannheim Allemagne).

Les concentrations de substrats ont été déterminées enzymatiquement par des méthodes standard avec un automate biochimique (Cobas C311 analyzer Roche Diagnostics GmbH D-68298, Mannheim Allemagne).

d- Analyse histopathologique:

Après le prélèvement sanguin, les rats ont été sacrifiés et le foie a été soigneusement excisé et pesé. Par la suite, de petites tranches de ce tissu fraîchement prélevé ont été fixées dans une solution de formaldéhyde tamponnée à 10 %, déshydratées par des solutions d'éthanol en série, diaphanéisées avec de l'éthanol-benzène et incluses dans de la paraffine. Des coupes de 20 µm ont été coupées en tranches à l'aide d'un microtome avant d'être colorées à l'hématoxyline-éosine et examinées sous un microscope optique.

4. Test de l'activité anti-urolithiasique

La recherche de l'activité anti-urolithiasique des extraits des racines de RT a été réalisée sur des rats *sprague dawley* mâles. Tous les animaux ont été acclimatés pendant 3 jours dans des cages appropriés avant de commencer le test. Durant nos expériences, 5 rats blancs de sexe mâle par lot ont été utilisés pour chaque test. Leur poids est compris entre 150 et 250 g. La lithiase rénale est provoquée par l'éthylène glycol (EG) (0.75%) et du chlorure d'ammonium NH₄Cl (2%), fournis aux animaux dans l'eau de boisson *ad-libitum* pendant 10 jours.

4. 1 Protocole expérimental

a- Préparation des lots:

Au cours de nos expériences, la solution [EG (0,75%) + CA (2%)] et la solution mère de l'extrait éthanolique des racines de RT ont été préparées quotidiennement pour éviter les problèmes de dégradation.

Quatre groupes de rats (n=5) ont été testés:

- **Un groupe 1** utilisé comme témoin négatif recevant uniquement de l'eau de robinet comme boisson et de l'eau distillée comme produit de gavage.
- **Un groupe 2** utilisé comme traité recevant la solution [EG (0,75%) + CA (2%)] comme boisson et 1 g/kg de l'extrait comme produit de gavage.
- **Un groupe 3** utilisé comme traité recevant la solution [EG (0,75%) + CA (2%)] comme boisson et 2 g/kg de l'extrait comme produit de gavage.
- **Un groupe 4** utilisé comme témoin positif recevant la solution [EG (0,75%) + CA (2%)] comme boisson et de l'eau distillée comme produit de gavage.

Les solutions ingérées par chaque animal étaient de l'ordre de 5 microlitres par gramme de poids corporel de rat. Le gavage a été réalisé de la même façon et à la même heure du jour pour tous les animaux testés. Il a été réalisé par une sonde gavage gastrique adaptée aux rats.

b- Variation du poids corporel des rats au cours de l'expérience

L'évaluation de la variation du poids corporel de chaque animal a été notée durant 10 jours de l'expérience.

c- Collecte et analyse des urines :

Le 9^{ème} jour, des rats de chaque groupe ont été placés individuellement dans des cages métaboliques pendant 24 h pour recueillir l'urine. La forme et la taille des cristaux d'oxalate de calcium ont été analysées au microscope optique. Après le prélèvement, les échantillons d'urine ont été immédiatement analysés pour leur volume, urée, créatinine, calcium, phosphore, acide urique, Na, K, Cl et teneur totale en protéines.

d- Dosage sérique des paramètres biochimique

Après la période expérimentale de 10 jours, les rats ont été anesthésiés avec une injection *i.p.* d'hydrate de chloral (10 mg/kg). Un volume sanguin de 1 à 2 ml a été prélevé de la veine jugulaire dans deux tubes sans aucun additif. Le sérum a été séparé par centrifugation (4000 tr/min, pendant 10 minutes) et utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques. La créatinine a été mesuré selon une méthode colorimétrique qui se base sur la réaction de Jaffé. Tandis que pour le dosage de l'urée, nous avons utilisé des techniques enzymatiques à l'uréase. Le dosage du phosphore, Na, K, et CL a été réalisé avec la potentiométrie indirecte. Concernant l'acide urique, il est été dosé selon la technique enzymatique en utilisant une uricase (urate oxydase). Le dosage du calcium a été fait selon la technique NMBAPTA. Les concentrations de substrats, de minéraux et d'électrolytes ont été déterminées enzymatiquement par des méthodes standard avec un automate biochimique (Cobas C311 analyzer Roche Diagnostics GmbH D-68298, Mannheim Allemagne).

e- Analyse histopathologique:

Après le prélèvement sanguin, les rats ont été sacrifiés et les deux reins de chacun ont été soigneusement excisés. De petites tranches de ce tissu fraîchement prélevé ont été mises dans une solution de formaldéhyde tamponnée à 10 %, déshydratées par des solutions d'éthanol en série, diaphanéisées avec de l'éthanol-benzène et incluses dans de la paraffine. Des coupes de 20 µm ont été coupées en tranches à l'aide d'un microtome avant d'être colorées à l'hématoxyline-éosine et examinées sous un microscope optique.

5. Tests de l'activité antiagrégante plaquettaire

5. 1 Préparation des plaquettes lavées chez le rat

a- Prélèvement sanguin

Le sang est prélevé de la veine jugulaire à l'aide d'un épicrotène G23 avec adaptateur, sur des rats anesthésiés avec une injection i.p. d'hydrate de chloral (10 mg/kg). Un volume sanguin de 4 à 5 ml a été prélevé dans deux tubes contenant un anticoagulant le citrate de sodium.

b- Isolement des plaquettes sanguines

Le sang a été prélevé selon la méthode de Zhou et Schmaier, 2005. Il a été immédiatement centrifugé à 276 G (1800 rpm) pendant 15 min à 20°C pour séparer le plasma riche en plaquettes (PRP) des autres éléments sanguins. Une seconde centrifugation à 120 G (800 rpm) pendant 8 min permet la sédimentation des globules blancs et globules rouges résiduels. Afin de prévenir l'agrégation spontanée des plaquettes lors des centrifugations, un volume de prostaglandine E1PGE1 (concentration finale = 10^{-7} M) a été ajouté au PRP isolé. A cette étape, quelques microlitres du PRP ont été prélevés pour faire le comptage des plaquettes. Le PRP a été recentrifugé à 400G (2700 rpm) pendant 15 min pour décanter les plaquettes en culot. Le plasma pauvre en plaquettes (PPP) surnageant a été récupéré et son volume a été noté. Le culot plaquettaire a été délicatement remis en suspension dans un tampon de lavage avec un volume égale au volume noté de PPP. Ainsi nous avons obtenu une suspension de plaquettes semi-lavées. Après une centrifugation de cette dernière (400 G pendant 15min), le culot plaquettaire a été remis en suspension dans le tampon final de telle sorte à avoir toujours la même concentration de plaquettes lavées 5×10^5 cellules/mm³.

C. Mesure de l'agrégation plaquettaire *in vitro*

L'agrégation plaquettaire a été déterminée par la mesure de la transmission de la lumière à travers la suspension plaquettaire grâce à l'agrégomètre (SD Medical Innovation) (*Figure 41*). Un ordinateur couplé à l'agrégomètre par une interface équipé d'un logiciel, a permis d'enregistrer les signaux et de faire leur analyse (% d'agrégation; temps de latence; pente d'agrégation). Le pourcentage (100 %) de la transmission du faisceau lumineux correspond à une agrégation totale. L'agrégation plaquettaire a été induite par l'addition de différents agonistes collagène, thrombine, ADP et acide arachidonique. Le protocole de l'étude de l'effet antiplaquettaire des extraits consiste à préincuber dans l'agrégomètre la suspension plaquettaire en présence des différentes concentrations des extraits sous une agitation de 1000 rpm à 37 °C pendant une minute. Puis l'agrégation a été induite par l'ajout de l'agoniste et enregistrée pendant 5 min à 10 min. les mesures ont été répétées 3 fois.

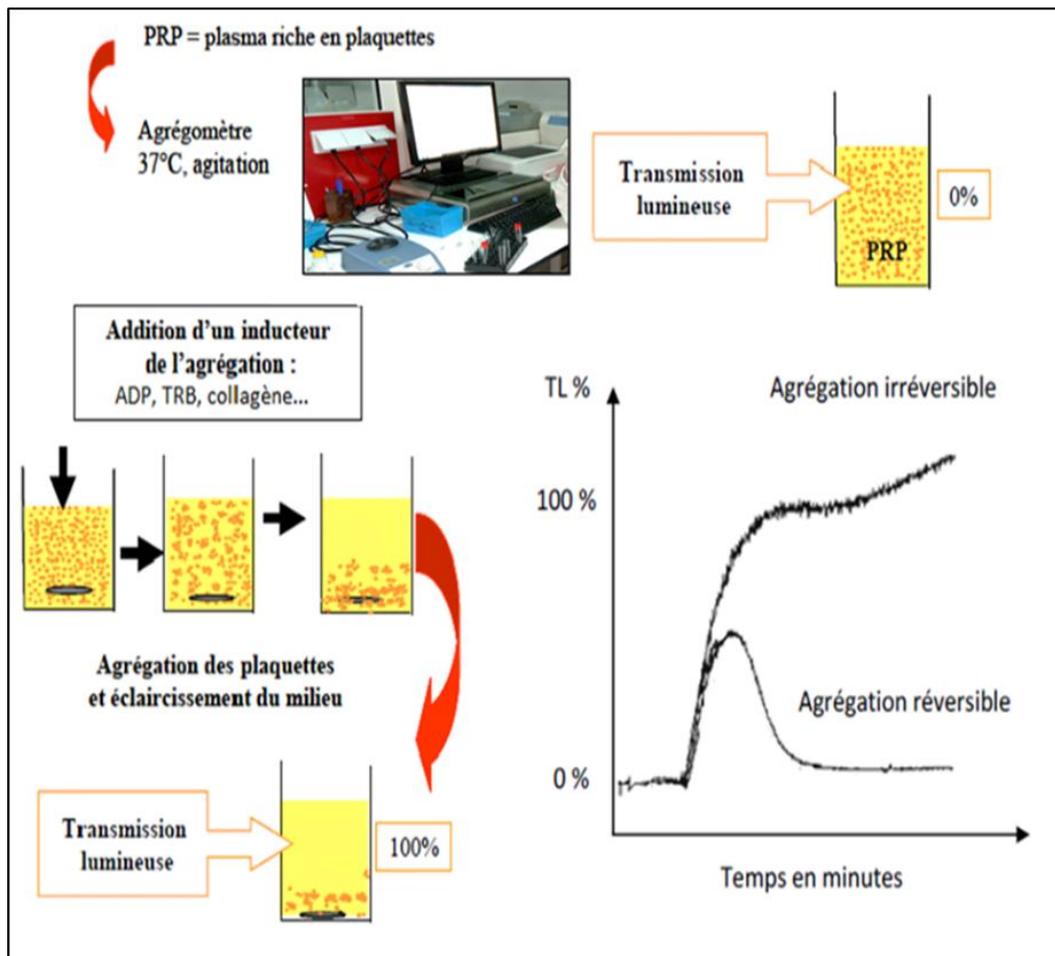


Figure 41: Protocole expérimental de mesure de l'agrégation plaquettaire

d- Mesure de l'agrégation plaquettaire en *ex vivo*

➤ Test du temps de saignement

Le temps de saignement (TS) mesure la durée de saignement provoquée par une incision dermo-épidermique. Il explore la qualité de l'hémostase primaire (Sultan *et al.*, 1978).

Dans notre étude, des rats *sprague-dawley* (mâles et femelles) ont été répartis de manière aléatoire en 6 lots, chaque lot contient 5 rats.

- **Lot 1 :** Recevant de l'eau physiologique (0.9% w/v Na Cl) (contrôle négatif),
- **Lot 2 :** Recevant le collagène fort (dose 2,5 µl/g) par voie, intraveineuse (contrôle positif),
- **Lot 3 :** Recevant l'extrait butanolique des racines de RT à 100 mg/kg,
- **Lot 4:** Recevant l'aspirine à 50 mg/kg,
- **Lot 5 :** Recevant l'aspirine (50 mg/kg) par voie orale + collagène à forte dose (2.5 µl/g) par voie intraveineuse,
- **Lot 6:** Recevant l'extrait butanolique des racines de RT (100mg/kg) par voie orale +

collagène à faible dose (2.5 µl/g) par voie intraveineuse.

Les animaux anesthésiés par l'hydrate de chloral (10 mg/kg) ont été placés sur une plaque de dissection. Après désinfection de la queue, une coupure de 2-5 mm est effectuée à ce niveau à l'aide d'un scalpel pour activer le saignement. Par la suite, la queue a été trempée dans un tube en verre contenant de l'eau saline à 37°C. Dès que le sang commence à couler, le chronomètre est déclenché jusqu'à l'arrêt du saignement. Le temps affiché a été le T S, exprimé en minutes. A la fin, l'extrémité incisée de la queue est de nouveau désinfectée.

➤ **Détermination du taux plaquettaire**

Après le test de saignement, un volume sanguin de 2 ml a été prélevé de la veine jugulaire dans des tubes avec anticoagulant le citrate de sodium. Le taux plaquettaire a été déterminé à l'aide d'un compteur automatique (Kx-21 Sysmex).

5. 2 Etude de l'effet antiplaquettaire des extraits de racines de RT chez l'Homme

a- Prélèvement sanguin

Des échantillons sanguins provenant de donateurs sains (Laboratoire d'hématologie, unité d'hémostase spécialisé Hôpital ARRAZI CHU Mohamed VI) n'ayant pas pris de médicaments pouvant interférer avec les fonctions plaquettaires ont été utilisés. Le sang a été recueilli par ponction veineuse sur anticoagulant, le citrate de sodium, à raison d'un volume de citrate de sodium pour 9 volumes de sang.

b- Numération plaquettaire

La numération plaquettaire a été réalisée directement après prélèvement à l'aide d'un compteur automatique (Kx-21 Sysmex).

c- Mesure de l'agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire a été déterminée par la mesure de la transmission de la lumière à travers la suspension plaquettaire grâce à l'agrégomètre (SD Medical Innovation). La suspension plaquettaire (PRP) a été préincubée 1 min avec les différentes doses de l'extrait butanolique des racines de RT à 37°C, puis l'agoniste a été ajouté (thrombine, l'acide arachidonique et ADP). L'agrégation a été mesurée pendant 5 min à 37°C sous agitation continue à 1000 rpm. Toutes les mesures ont été répétées trois fois.

6. Analyse statistique

Le traitement statistique des données a été effectué par un logiciel spécialisé dans l'analyse statistique Sigma Plot 12.5. Les résultats ont été analysés par l'ANOVA à une voie (one way ANOVA). La comparaison des groupes a été réalisée en utilisant le test-T. Les données ont été exprimées en moyennes plus au moins écart types (S.E.) ou plus au moins les erreurs standard

moyenne (S.E.M.) selon le test. Le degré de significativité a été représenté sur chaque graphique par des étoiles quand la comparaison a été effectuée avec le lot témoin.

*** $P < 0.001$ (très significatif)

** $P < 0.01$ (significatif)

* $P < 0.05$ (légèrement significatif)

ns : non significatif

III. Résultats

1. Evaluation du potentiel antioxydant des extraits des racines de RT par le test de DPPH

Le radical (DPPH) est utilisé pour déterminer la capacité antioxydante. En présence d'un antioxydant. Le (DPPH) est réduit en DPPH-H et son absorbance spectrophotométrique diminue. L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical (DPPH) après 30 min d'incubation. Parmi les 4 extraits testés, c'est l'extrait butanolique qui représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ de 118,4 mg/ml suivi par l'extrait éthanolique avec une IC₅₀ de 156,4 mg/ml. L'extrait acétate d'éthyle et aqueux présentent une activité antioxydante très faible avec une IC₅₀ de 206,2 mg/ml et 279,3 mg/ml respectivement (Tableau 11).

L'acide gallique est utilisé comme antioxydant standard. Il a montré une activité antioxydante très puissante avec une IC₅₀ de 64,5 mg/ml. En comparaison avec l'antioxydant standard, l'extrait butanolique et éthanolique s'avèrent modestement actifs.

Tableau 15: Activité antioxydante (test de DPPH) des extraits des racines de RT

Extraits	IC ₅₀ % en mg/mL	Acide gallique
Éthanolique	156,4 ± 2,76	64,5 ± 0,7
Butanolique	118,4 ± 2,5	
Acétate d'éthyle	206,2 ± 0,68	
Aqueux	279,3 ± 3,01	

2. Evaluation de l'effet hépato-protecteur de l'extrait éthanolique des racines de RT

a- Evaluation des paramètres biochimiques

Les analyses biochimiques des paramètres sériques, de l'ALAT, l'ASAT, PAL, GGT et la bilirubine directe ont été estimées comme des biomarqueurs de la fonction hépatique. Ces résultats sont présentés dans la *Figure 42*.

L'administration de tétrachlorure de carbone CCl₄ chaque 72 heures pendant 10 jours a provoqué une montée significative ($P < 0.001$) des marqueurs sériques enzymatiques en particulier les transaminases (ASAT, ALAT et GGT), la phosphatase alcaline (PAL) et la bilirubine directe en comparaison avec le groupe témoin. Toutefois, le traitement avec l'extrait éthanolique des racines de RT a entraîné une baisse significative ($P < 0.001$) du taux sérique des transaminases ainsi que la PAL et la bilirubine directe comparativement aux groupes traité par le CCl₄ (*Figure 42*).

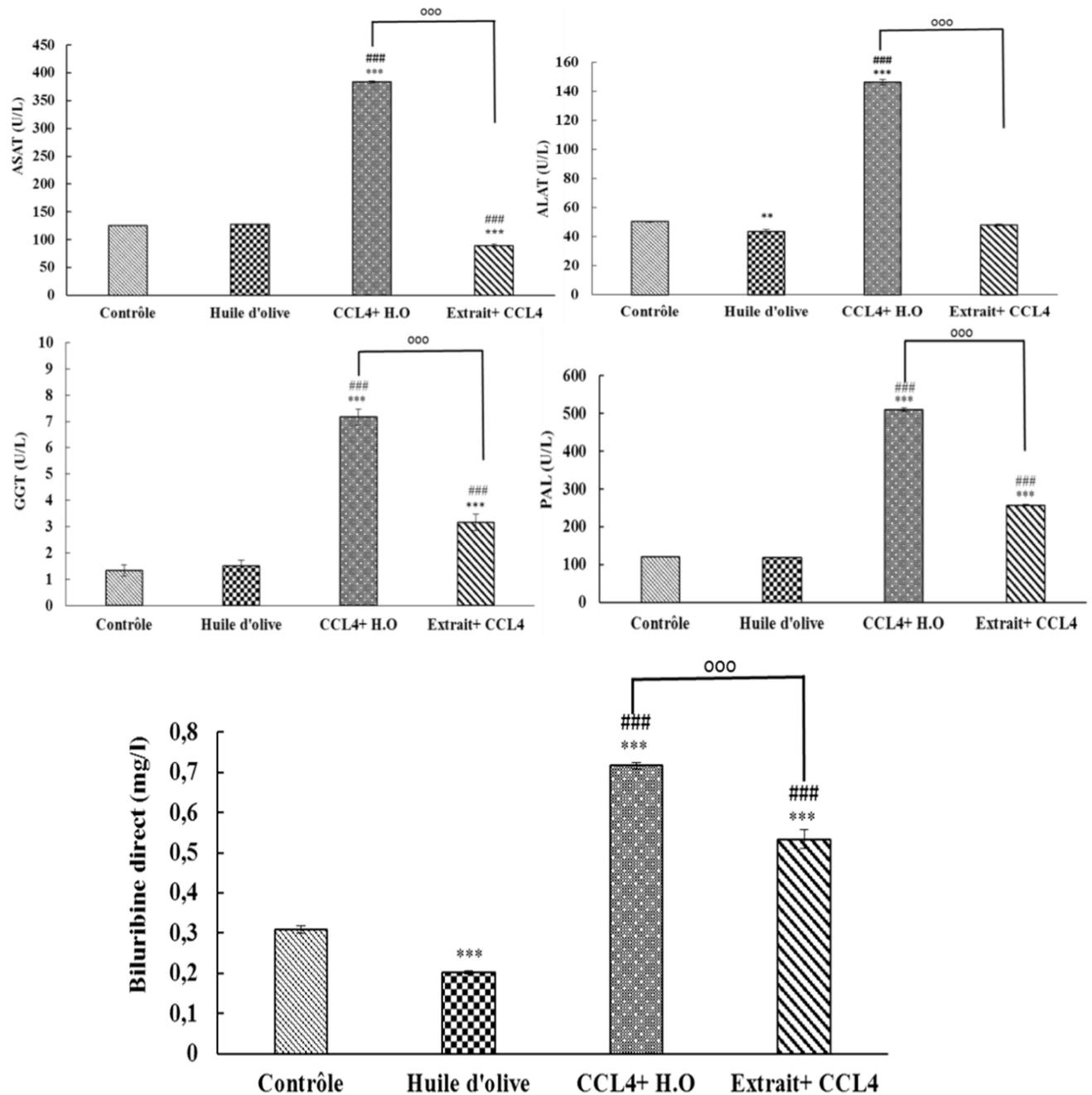


Figure 42: Effet de l'extrait éthanolique des racines de RT sur les taux sériques des paramètres biochimiques. (**ASAT**) : Aspartate aminotransférase ; (**ALAT**) : Alanine aminotransférase ; (**PAL**) : Phosphatase alcaline ; (**GGT**) : Gamma-glutamyl-transpeptidase, Bilirubine directe. Valeurs exprimées en Moyenne \pm écart type (n=6). *** $P < 0.001$. Les valeurs sont significativement différentes comparées au contrôle ; (###) $P < 0.001$ comparées au groupe qui a reçu l'huile d'olive ; (°°°) $P < 0.001$ comparées au groupe qui a reçu l'extrait.

b-Analyse des coupes histopathologique du foie

Les analyses des coupes histologiques du foie des groupes témoins (1 et 2) ont montré une architecture cellulaire normale (*Figure 43*) avec un cytoplasme bien conservé, un noyau et un nucléole proéminents et une veine centrale bien mise en évidence (*Figures 43: A et B*). Toutefois, les sections hépatiques de rats intoxiqués au CCl_4 (groupe 3) présentaient des changements graisseux massifs, une nécrose, une dégénérescence en ballon (ballonisation), des histiocytes et des lymphocytes infiltrés autour de la veine centrale, une clarification et une perte des frontières cellulaires (*Figure 43 C*). L'architecture histologique des sections hépatiques de rats traités avec un extrait (groupe 4) présentait une configuration lobulaire plus ou moins normale avec un léger changement de graisse, sans lésions hépatocytaires. Cette configuration est presque comparable à celle du témoin normal (*Figure 43 D*).

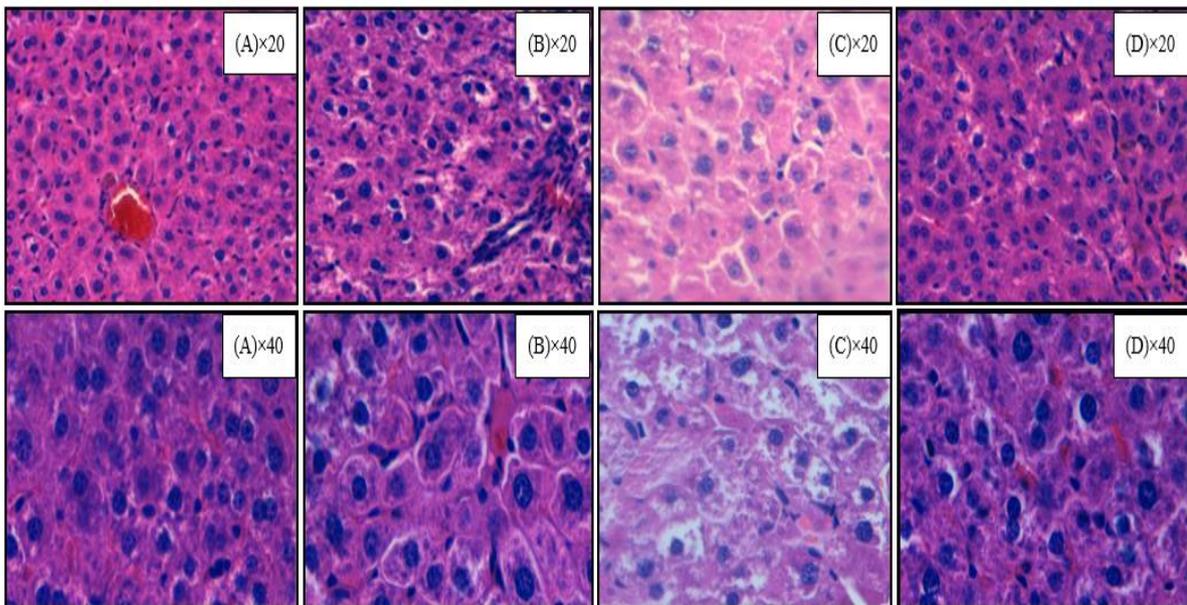


Figure 43: Coupes histologiques des modifications hépatiques chez les rats intoxiqués par le CCl_4 et traités par l'extrait éthanolique de RT (Grossissement 20 \times et 40 \times). **(A)** Section hépatique des rats témoins **(B)** Section hépatique des rats traités à l'huile d'olive présentant des cellules hépatiques normales avec un cytoplasme bien conservé; veine centrale bien mise en évidence; noyau et nucléole saillants. **(C)** Section du foie des rats traités par le CCl_4 . Cholestase avec inclusion intra-cytoplasmique biliaire. Changements massifs de graisse, nécrose, ballonisation dégénérescence. **(D)**: Section hépatique des rats traités par le CCl_4 + huile d'olive et extrait de RT. Motif lobulaire normal avec un léger degré de changement de graisse, sans nécrose presque comparable au contrôle normal.

3. Evaluation de l'effet antilithiasique

a- Analyse physiopathologique de l'urolithiasie induite par EG/AC chez le rat

Le traitement des rats pendant 10 jours par EG/AC a entraîné la formation d'urolithiasie et des modifications des paramètres urinaires, sériques et rénaux. L'analyse des changements induits montre que notre modèle expérimental reproduit la pathophysiologie d'une forme d'urolithiasie chez le rat. Comme le montre le tableau 16, les taux d'urée, de créatinine, d'acide urique, de calcium et de phosphore dans le groupe lithiasique (G2) ont été significativement élevés ($P < 0,001$) comparativement au groupe témoin (G1). Les concentrations sériques de l'urée, de la créatinine, d'acide urique, de calcium et de phosphore étaient également significativement élevées ($P < 0,001$) dans le groupe urolithiasique comparativement au groupe témoin. Par ailleurs, des changements similaires ont affecté les concentrations des électrolytes (Na^+ , Cl^- , K^+) dans les urines et le sérum. Les urines du groupe urolithiasique contenait des concentrations élevées significatives ($P < 0,001$) de potassium, de chlorure et de sodium par rapport aux groupe témoin. Sur le plan anatomopathologique, des altérations histologiques marquées (Tableau 17), y compris l'infiltration de cellules mononucléaires interstitielles et des dommages dans les glomérules, ont été observées dans le groupe urolithiasique mais pas dans le groupe témoin.

Tableau 16: Taux sériques et urinaires des paramètres biochimiques chez les rats

Paramètres	Urine		Sérum	
	G1 Témoin	G 2 Lithiasique	G1 Témoin	G 2 Lithiasique
Urée (g/l)	33,96±0,95	311,67±5,66***	0,26±0,02	5,91±0,17***
Creatinine (mg/l)	27,75±1,66	116,28±4,02***	5,49±0,21	39,51±4,86***
Calcium (mg/l)	74,36±1,36	217,08±3,73***	103,77±1,01	119±1,59***
Acide urique (mg/l)	58,33±3,48	230,5±10,79***	10,71±0,29	44,86±3,001***
Phosphore (mg/l)	12,83±0,601	2169,41±1,47***	83,34±0,33	107,16±1,74***
Sodium (mmol/l)	8,33±0,21	18,33±0,49***	137,53±0,29	182,55±2,322***
Potassium (mmol/l)	6,13±0,16	196,03±0,81***	93,68±0,72	151,55±1,30***
Chlore (mmol/l)	36,45±0,59	132,31±0,75***	8,24±0,07	12,27±0,34***
Protéine	0,28±0,01	1,03±0,04***	-	-

Valeurs exprimées en Moyenne ± écart type (n=6).

*** $P < 0.001$. Les valeurs sont significativement différentes comparées aux témoins négatifs

Tableau 17: Changements histopathologiques dans les reins des rats traités par EG/AC

	G 1 Témoin	G 2 lithiasique
Dégénérescence albumineuse	-	+++
Infiltration des cellules mononucléaires	-	+++
Hémorragie rénale	-	+++
Désorganisation morphologique des tubules et des glomérules	-	+++

Les changements ont été compilés et la moyenne a été calculée à partir de six rats adultes mâles par groupe.

(-) : aucune altération, (++++): altération marquée.

b- Evaluation de l'activité antilithiasique des extraits éthanolique et acétate d'éthyle de RT sur la physiopathologie de la lithiase urinaire induite par EG/AC

➤ **Variation du poids corporel des rats**

La figure 48 représente la variation du pourcentage de gain ou de perte de poids en fonction du temps. L'analyse des courbes montre que les poids corporels moyens (PCM) des six groupes expérimentaux étaient semblables au début de l'expérience. Après les dix jours de traitement avec l'éthylène glycol, le PCM des cinq groupes a diminué par rapport au groupe témoin. La figure 44 montre également que le groupe lithiasique présente une diminution plus importante ($P < 0,001$) de poids corporel par rapport au témoin négatif et au groupes traités par les extraits de racines de RT. D'autre part, le groupe traité par l'extrait éthanolique de RT (E-RT) (1 et 2g/kg) n'a pas présenté un chute de poids significative par rapport au groupe témoin négatif

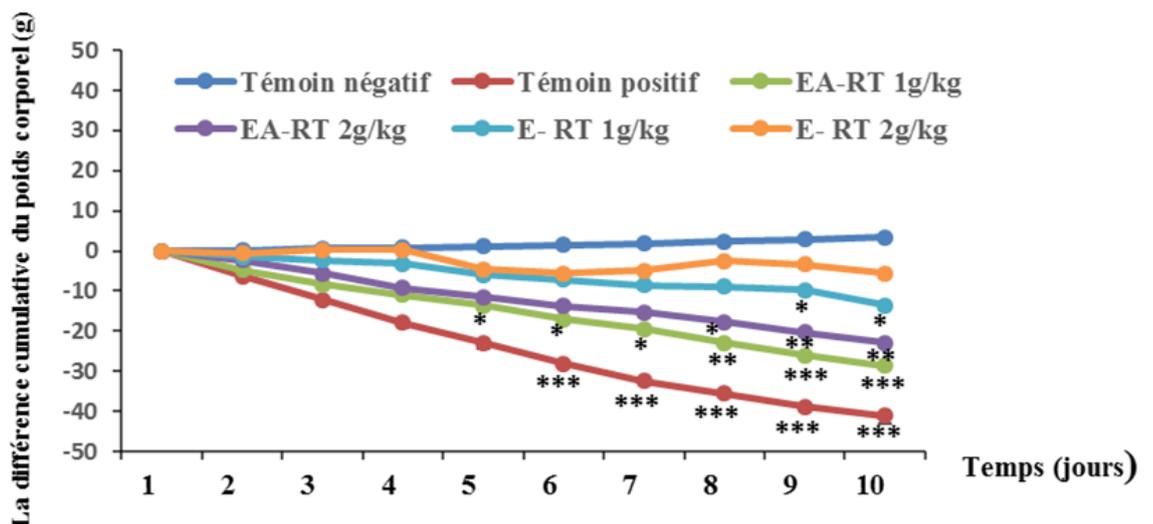


Figure 44: Variation du poids corporel des rats pendant les dix jours de l'expérience: Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type. Les valeurs sont significativement différentes comparées au témoin négatif; (***) $P < 0.001$, (**), $P < 0.01$, * $P < 0,05$

➤ Analyse microscopique des urines

L'analyse microscopique des urines du groupe témoin négatif présente un aspect clair avec absence de cristaux de CaOx (*Figure. 45, A*). Cependant, le traitement par EG/AC a entraîné la formation de cristaux de CaOx bipyramidiques (*Figure 45, B*). Le traitement concomitant avec les deux doses des extraits de RT a diminué le nombre et la taille des cristaux d'une manière proportionnelle à la dose (*Figure. 45, C, D, E et F*).

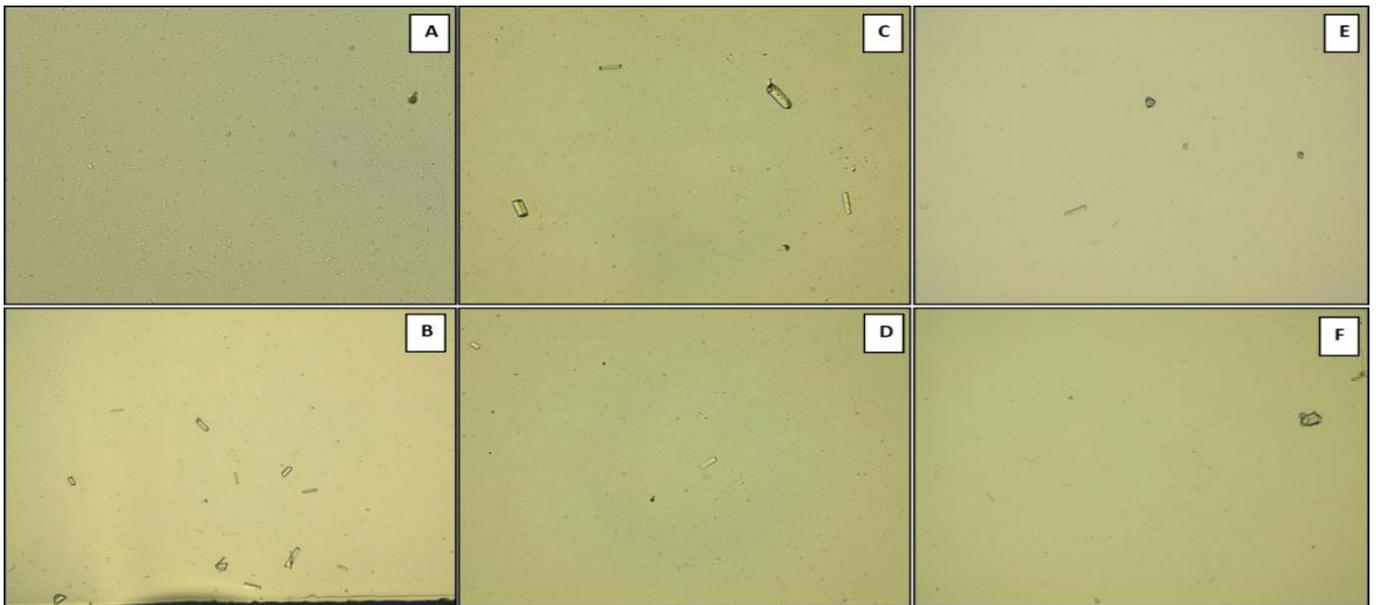


Figure 45: Cristaux typiques d'oxalate de calcium observés au microscope optique (Leica DMD 108) (50 x) dans les urines de 24 h chez les rats. Groupe témoin (A), groupe lithiasique (B), groupes traités avec EA-RT à 1g/kg (C) et 2 g/kg (D) et groupes traités avec E-RT à 1g/kg (E) et 2 g/kg (F).

➤ Dosages sériques et urinaires des paramètres biochimiques

Dosage sérique

Les taux sériques d'urée, de créatinine, d'acide urique, de calcium, de phosphore, de chlorure, de sodium et de potassium étaient significativement ($p < 0,001$) plus élevés chez le groupe lithiasique (G2). Ces concentrations ont été considérablement réduites par le traitement préventif avec les deux doses d'E-RT (1 et 2 g/kg) et la dose élevée d'AE-RT (2g/kg). La dose élevée d'E-RT s'est avéré la plus efficace dans le rétablissement de ce dysfonctionnement rénal (Tableau 18).

Tableau 18: Taux sériques des paramètres biochimiques chez les rats

Paramètres	G 1 Témoin négatif	G 2 Groupe lithiasique	G 3 E-RT 1g/kg	G 4 E-RT 2g/kg	G 5 AE-RT 1g/kg	G 6 AE-RT 2g/kg
Urée (g/l)	0,26±0,02	5,91±0,17 ^b	0.40±0.01 ^{c, a}	0,31±0,02 ^{a, (ns)}	0,45±0.07 ^{a, b}	0,38±0.04 ^{a, d}
Créatinine (mg/l)	5,49±0,21	39,51±4,86 ^b	5,65±0,71 ^a	5,16±0,79 ^a	7,08±0.37 ^a	6,93±0,83 ^a
Calcium (mmg/l)	103,77±1,01	119±1,59 ^b	106,33±0,98 ^a	104,50±1,03 ^a	109,5±2,09 ^{a, (ns)}	107,7±1,63 ^a
Acide urique (mg/l)	10,71±0,29	44,86±3,001 ^b	13,66±0,95 ^a	11,00±1,03 ^a	18,66±1,28 ^{a, b}	14,66±1,60 ^{a, (ns)}
Phosphore (mg/l)	83,34±0,33	107,16±1,74 ^b	85,44±1,39 ^a	84,03±3,40 ^a	92,76±3,23 ^{a, d}	91,38±1,26 ^a
Sodium (Na ⁺) (mmol/l)	137,53±0,29	182,55±2,322 ^b	139,20±0,54 ^a	137,63±0,53 ^a	141,68±0,67 ^{a, b}	139,97±2,07 ^{a, (ns)}
Chlore (Cl ⁻) (mmol/l)	93,68±0,72	151,55±1,30 ^b	94,49±1.17 ^a	93±0,81 ^a	96,48±0,76 ^a	95,34±0,96 ^a
Potassium (K ⁺) (mmol/l)	8,24±0,07	12,27±0,34 ^b	8,55±0.07 ^a	8,36±0.09 ^a	9,11±0,39 ^a	8,56±0,25 ^a

Valeurs exprimées en Moyenne ± écart type (n=6).

^a $P < 0.001$: Les valeurs sont significativement différentes comparées au témoin positif (lithiasique groupe).

^b $P < 0.001$, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$: Les valeurs sont significativement différentes comparées aux témoins négatif.

^(ns): Les valeurs ne sont pas significativement différentes comparées aux témoins négatif

Dosage urinaire

Les concentrations d'urée, de créatinine, d'acide urique, de calcium, de phosphore, de chlore, de sodium, de potassium et de protéines étaient significativement plus élevées ($P < 0,001$) chez le groupe lithiasique en comparaison au groupe témoin négatif. Le traitement par les extraits (E-RT et AE-RT) a empêché d'une façon significative ($P < 0,001$, $P < 0,01$ et $P < 0,05$) l'augmentation de ces paramètres biochimiques induits par EG/AC. La dose élevée d'E-RT (G 4) s'est avérée être la fraction la plus efficace (Tableau 19).

Tableau 19: Dosage des paramètres biochimiques dans les urines

Paramètres	G 1	G 2	G 3	G 4	G 5	G 6
	Témoin négatif	Lithiasique groupe	E-RT 1g/kg	E-RT 2g/kg	EA-RT 1g/kg	EA-RT 2g/kg
Urée (g/l)	33,96±0,95	317,90±0,95 ^b	27,15±1,85 ^{a, c}	34,12±1,27 ^{a(ns)}	28,53±1,64 ^{a(ns)}	25,96±0,26 ^{a, c}
Creatinine (mg/l)	27,75±1,66	116,28±4,02 ^b	35,98±1,53 ^{a, c}	31,32±1,07 ^{a(ns)}	38±2,31 ^{a, b}	35,21±1,66 ^{a,d}
Calcium (mmg/l)	74,36±1,36	217,08±3,73 ^b	98,16±2,65 ^{a, b}	73,57±1,76 ^a	83,95±3,79 ^{a(ns)}	77,66±1,56 ^a
Acide urique (mg/l)	58,33±3,48	230,5±10,79 ^b	101,83±0,703 ^{a, b}	70±3,14 ^{a(ns)}	121,83±0,94 ^{a, b}	149,83±0,98 ^{a, b}
Phosphore (mg/l)	12,83±0,601	2169,41±1,47 ^b	34,98±0,78 ^{a, b}	17,16±0,47 ^{a,d}	234,25±0,93 ^{a, b}	163,16±0,94 ^{a, b}
Sodium(mmol/l)	8,33±0,21	18,33±0,49 ^b	10±0,57 ^{a(ns)}	9,83±1,16 ^{a (ns)}	8,66±0,49 ^{a(ns)}	12±0,57 ^{a, c}
Potassium(mmol/l)	6,13±0,16	196,03±0,81 ^b	42,74±0,73 ^{a, b}	12,67±0 ^{a, b}	22,56±0,29 ^{a, b}	17,38±0,16 ^{a, b}
Chlore (mmol/l)	36,45±0,59	132,31±0,75 ^b	99,42±0,50 ^{a, b}	56,66±0,34 ^{a, b}	107,55±2,61 ^{a, b}	68,94±0,98 ^{a, b}
Protéine (mg/l)	0,28±0,01	1,03±0,04 ^b	0,36±0,06 ^{a (ns)}	0,11±0,009 ^{a,d}	0,78±0,02 ^{a, b}	0,76±0,01 ^{a, b}

Valeurs exprimées en Moyenne ± écart type (n=6).

^a $P < 0.001$: Les valeurs sont significativement différentes comparées au témoin positif (lithiasique groupe).

^b $P < 0.001$, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$: Les valeurs sont significativement différentes comparées aux témoins négatif.

^(ns): Les valeurs ne sont pas significativement différentes comparées aux témoins négatif

➤ Analyse des coupes histopathologique des reins

L'analyse des coupes histologiques des reins du groupe témoin négatif montre une structure cellulaire normale dans les glomérules, les tubules rénaux et les vaisseaux sanguins (Tableau 20 et *Figure 46, A*), tandis que celles du groupe lithiasique présentaient des lésions tissulaires graves et importantes. Les altérations comprenaient une infiltration interstitielle de cellules mononucléaires, une dilatation tubulaire et des lésions de glomérules (Tableau 20 et *Figure 46, B*).

Par ailleurs, le traitement avec l'extrait éthanolique de RT (1 et 2 g/kg) a empêché les altérations tissulaires (*Figure 46*). L'extrait EA-RT (1 et 2 g/kg) et a été efficace dans la prévention des lésions tissulaires induites par l'éthylène glycol. Les coupes histologiques rénales des rats traités par EA-RT ont montré des structures cellulaires normales dans les tubules rénaux, les vaisseaux sanguins et les glomérules (*Figure 46, E-F*). De plus, les deux extraits éthanolique et acétate d'éthyle de RT ont empêché l'infiltration des cellules mononucléaires et l'hémorragie. L'extrait E-RT a montré une efficacité plus importante que l'extrait l'EA-RT (Tableau 20).

Tableau 20: Changements histopathologique des reins des rats avec ou sans traitement par

	G 1 Témoin	G 2 lithiasique	G 3 EA-RT 1g/kg	G 4 EA-RT 2g/kg	G 5 E-RT 1g/kg	G 6 E-RT 2g/kg
Dégénérescence albumineuse	-	+++	++	+	-	-
Infiltration des cellules mononucléaires	-	+++	++	+	-	-
Hémorragie rénale	-	+++	++	+	+	-
Désorganisation morphologique des tubules et des glomérules	-	+++	++	++	+	+

Les changements ont été compilés et la moyenne a été calculée à partir de six rats adultes mâles par groupe.

(-) : aucune altération, (+) : légère altération ; (++) : altération modérée ; (++++) : altération marquée.

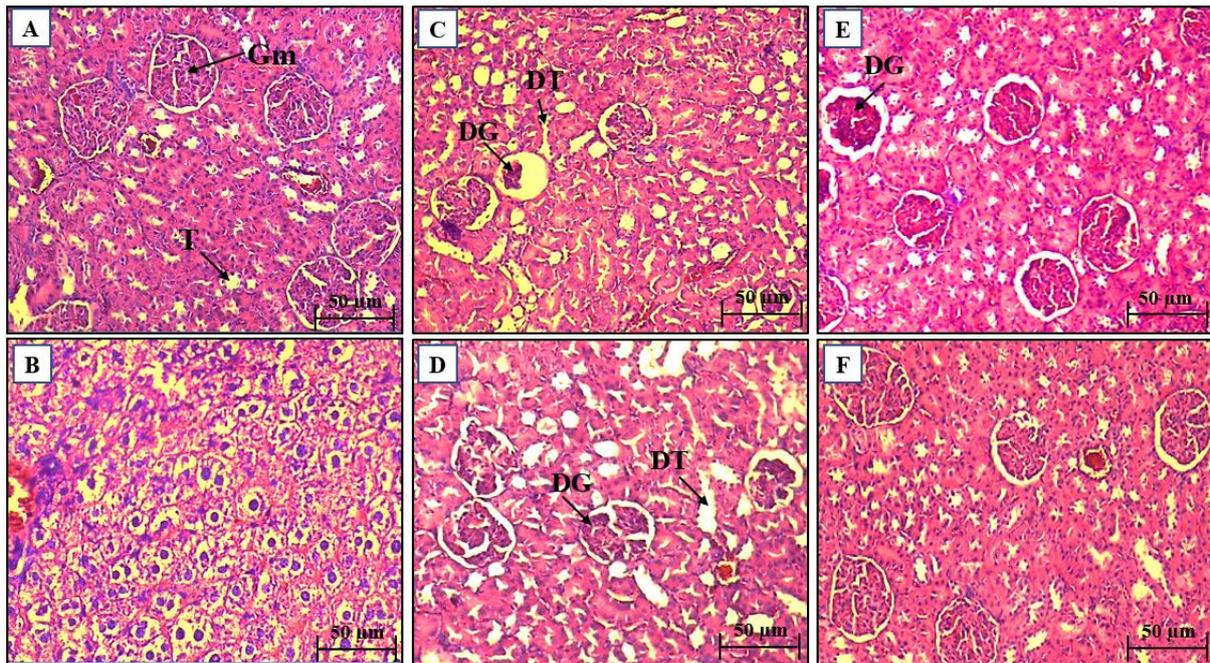


Figure 46: Coupes histologiques rénales des rats témoins et traités colorées à l'hématoxyline et à l'éosine observées au microscope optique (50 ×). Témoin négatif (A), Témoin positif (lithiasique) (B), traités par EA-RT à 1 g/kg (C) et 2 g/kg (D), traités par E-RT à 1g/kg (E) et 2g/kg (F).

4. Effet des extraits des racines de RT sur la fonction plaquettaire chez le rat.

a- Effet antiagrégant des différents extraits des racines de RT

Afin de sélectionner l'extrait qui présente une importante activité antiagrégante plaquettaire, les plaquettes lavées de rats ont été préincubées avec les cinq extraits (éthanolique, acétate d'éthyle, hexanique, butanolique et aqueux) à deux doses, (250µg/ml et 500µg/ml). La *Figure 47* montre que l'agrégation induite par le collagène 2µg/ml est inhibée différemment par les cinq extraits. La réalisation des courbes dose réponse de ces extraits en présence du collagène (*Figures 47 et 48*), a montré que l'effet inhibiteur maximal de l'agrégation plaquettaire (10% et 20%) est obtenu à 500µg/ml et 250µg/ml, pour l'extrait butanolique et 500µg/ml et l'extrait acétate d'éthyle (39%) respectivement. Les analyses statistiques de ces résultats montrent que l'extrait butanolique présente une activité plus importante par rapport à l'extrait acétate d'éthyle ($P < 0,001$). Aux mêmes doses, les 3 autres extraits (éthanolique, aqueux et hexanique) ne possèdent aucune activité antiagrégants plaquettaire.

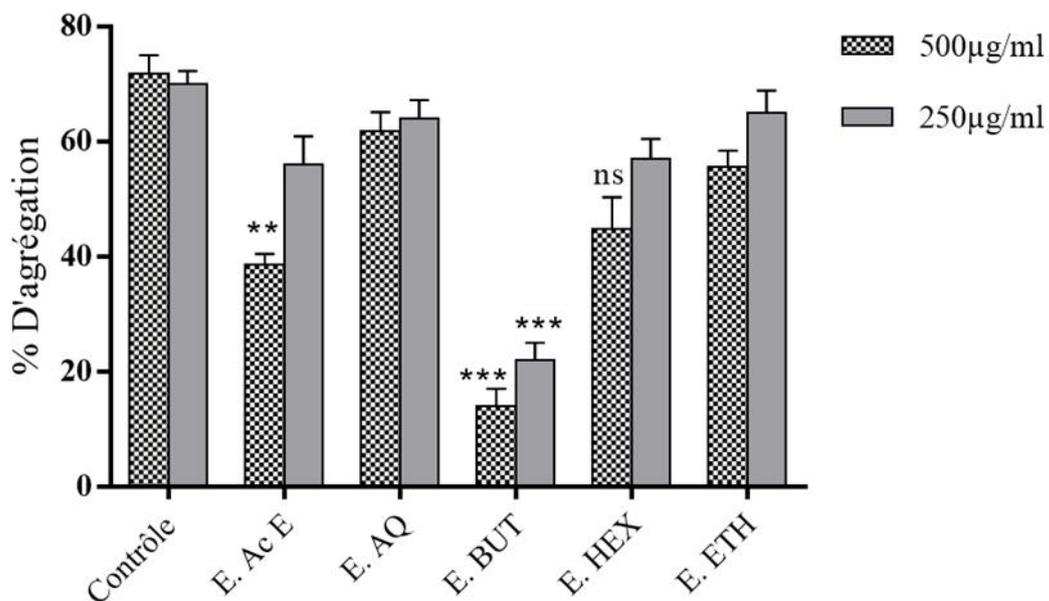


Figure 47: Effets des différents extraits organiques des racines de RT sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène. Les plaquettes sont incubées pendant 1 min à 37 °C en présence de différents extraits avant l'addition de l'agonistes; (n= 3). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ et (ns). Non significatif Vs contrôle (test *t*).

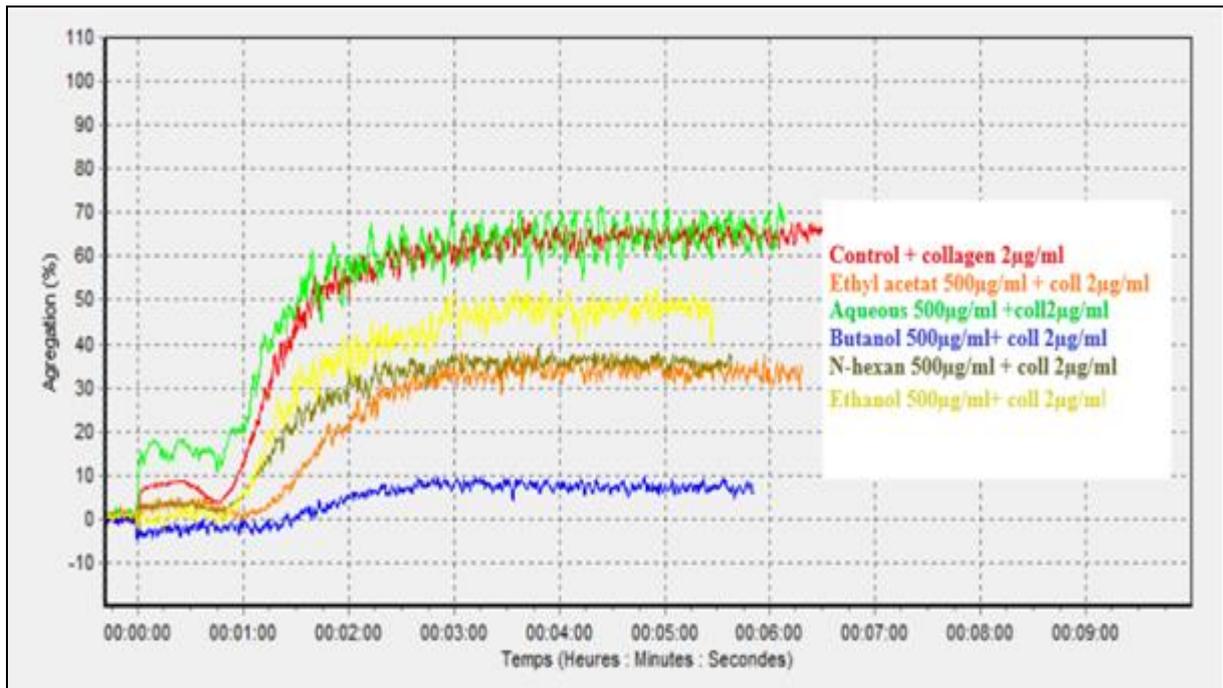


Figure 48: Tracés originaux de l'agrégation plaquettaire montrant l'effet des différents extraits organiques des racines RT à 500 µg/ml en présence du collagène (2µg/ml).

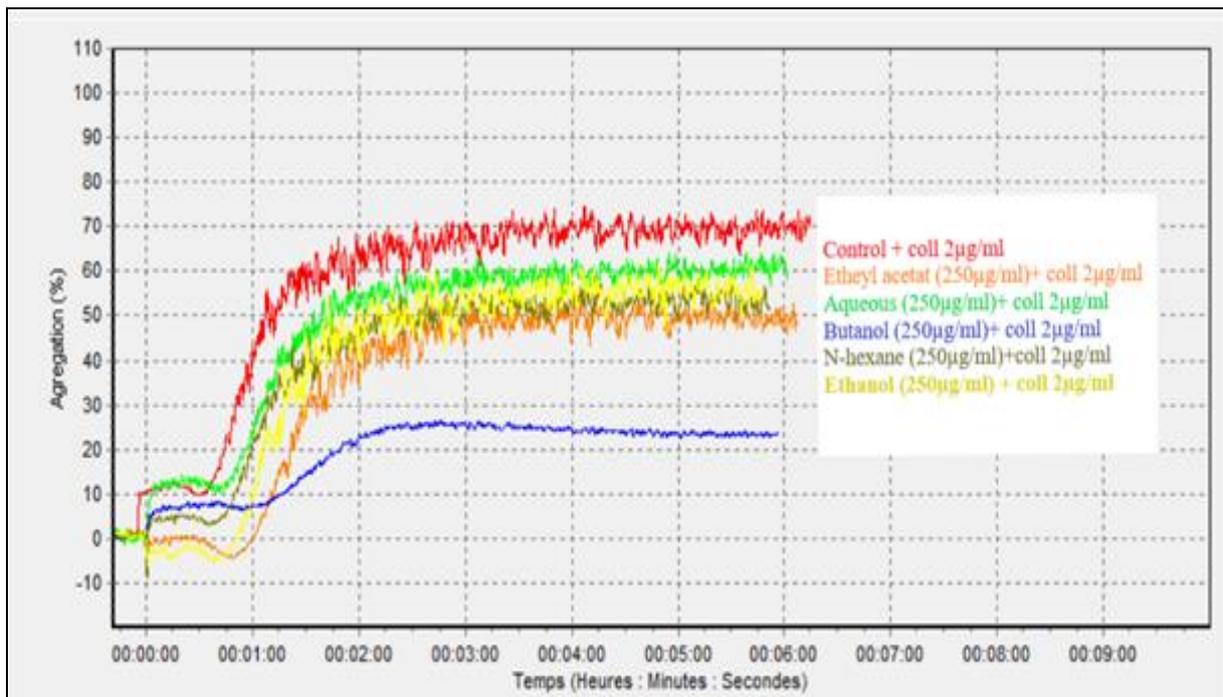


Figure 49: Tracés originaux de l'agrégation plaquettaire montrant l'effet des différents extraits organiques des racines RT à 250 µg/ml en présence du collagène (2µg/ml).

b- Effet antiagrégant de l'extrait butanolique des racines de RT *in vitro et ex vivo*

➤ Test d'agrégation *in vitro*

Les tests réalisés en présence des différents extraits à deux concentrations 250 et 500 µg/ml ont montrés que c'est l'extrait butanolique qui possède un effet antiagrégant plaquettaire très important. Pour confirmer cet effet, une courbe dose réponse est réalisée en utilisant les concentrations (250, 500 et 1000 µg/ml) en présence du collagène.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait butanolique des racines de RT inhibe significativement ($P < 0.001$) l'agrégation plaquettaire de manière dose dépendante (Figure 50). Les analyses statistiques ont montré que L'B-RT à 1mg/ml provoque une inhibition maximale de l'agrégation plaquettaire (1,48 % ±0,76) (Tableau 21).

Tableau 21: Effet inhibiteur de l'extrait butanolique de RT sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène

	Collagène 2µg/ml (Control)	B-RT 250µg/ml	B-RT 500µg/ml	B-RT 1000µg/ml
% d'agrégation	69,85±1,86 n=3	9,44±0,39*** n=3	4,30±1,82*** n=3	1,48±0,76*** n=3

Valeurs moyennes ± SEM.

*** $P < 0,001$ en comparaison avec le contrôle (collagène).

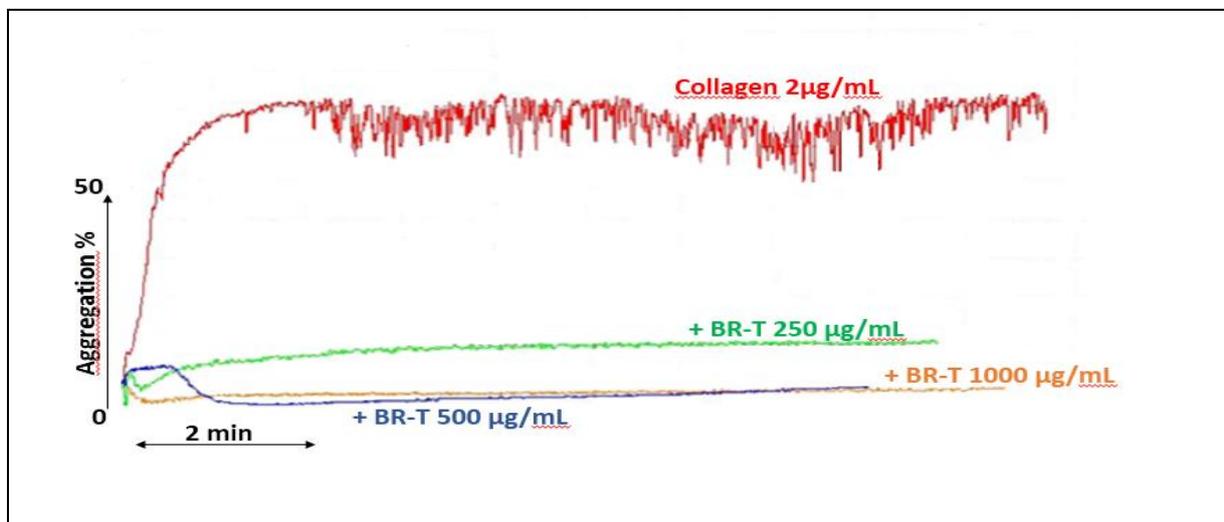


Figure 50: Tracés originaux montrant l'effet inhibiteur de l'extrait butanolique des racines de RT sur l'agrégation plaquettaire chez le rat, induite *in vitro* par: le collagène (2µg/ml). La suspension plaquettaire est incubée 5 min à 37°C en absence (contrôle) et en présence de l'B-RT (250, 500 et 1000 µg/ml).

➤ **Test du temps de saignement (TS) *ex vivo***

L'étude réalisée sur le TS chez le rat a permis de montrer que l'extrait butanolique, des racines de la plante, administré oralement à 100 mg/kg a prolongé significativement ($P < 0,001$) ce paramètre en comparaison avec le témoin (contrôle négatif). Cette prolongation est similaire à celle obtenue chez le groupe traité par l'aspirine. L'administration orale du collagène à forte dose a significativement ($P < 0,001$) réduit le temps de saignement par rapport au témoin (Figure 51). Par ailleurs, le prétraitement des rats avec l'extrait butanolique des racines de RT (100 mg/kg) a significativement ($P < 0,01$) empêché l'agrégation plaquettaire induite par le collagène à forte dose en comparaison avec le groupe contrôle positif (groupe traité uniquement avec le collagène forte dose). Par conséquent, le temps de saignement est similaire à celui du groupe témoin. Les résultats obtenus ont été comparé avec ceux du groupe prétraité par l'aspirine.

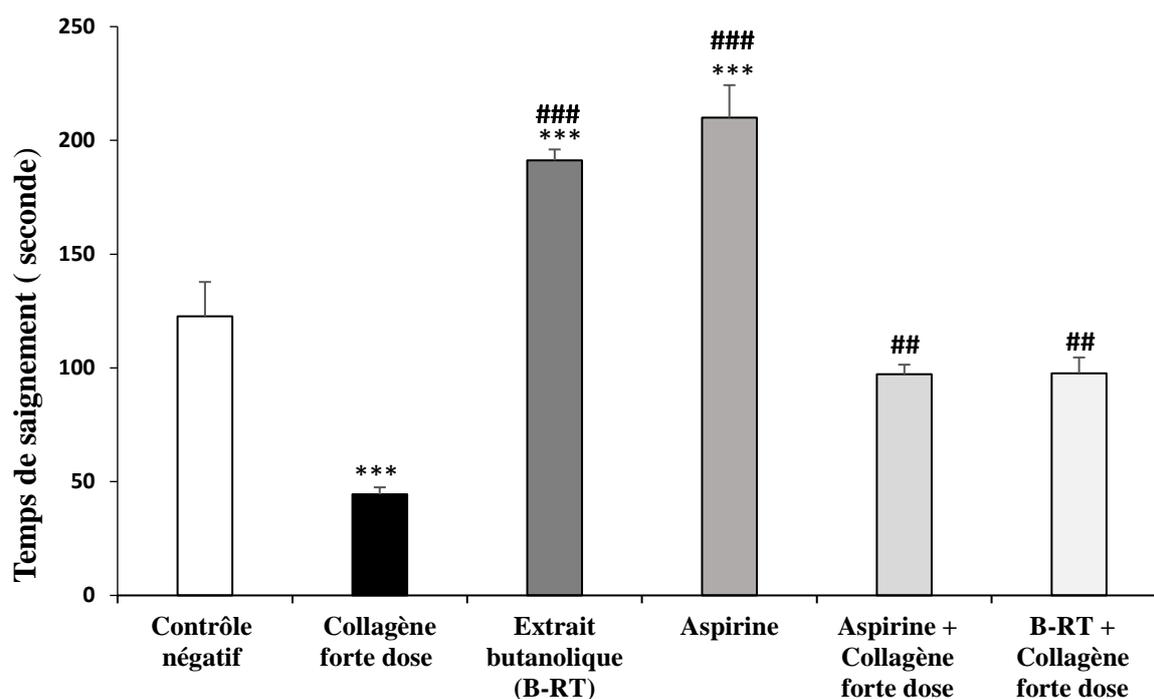


Figure 51: Effet de l'extrait butanolique des racines de RT sur le temps de saignement chez le rat. Valeurs moyennes \pm SEM ($n = 5$); *** $P < 0,001$ versus Contrôle négatif ; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ versus Collagène forte dose.

➤ Analyse du taux des plaquettes sanguines

Le traitement par l'extrait butanolique des racines de RT et l'aspirine n'a pas modifié la numération plaquettaire. Tandis que le traitement par le collagène à forte dose a significativement ($P < 0,001$) entraîné une thrombopénie (réduction de taux des plaquettes). Par ailleurs, le prétraitement avec l'extrait butanolique des racines de la plante ainsi que l'aspirine ont empêché de manière significative ($P < 0,001$) la réduction du taux des plaquettes. L'effet de retournement de B-RT a atteint un niveau qui ne diffère pas statistiquement du groupe témoin (contrôle négatif) (Figure 52).

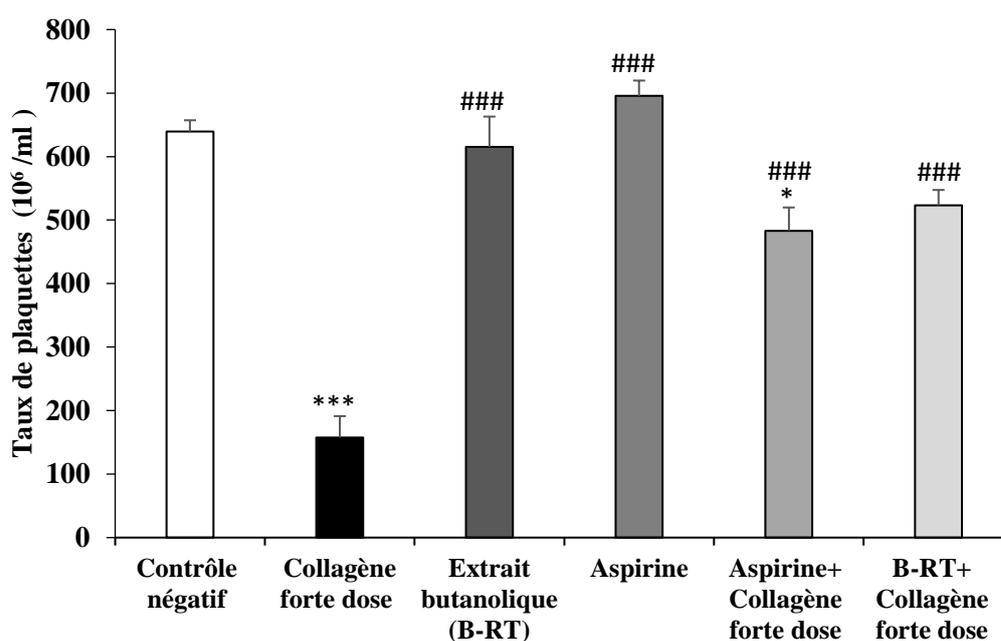


Figure 52: Effet de l'extrait butanolique des racines de RT sur le temps de saignement chez le rat. Valeurs moyennes \pm SEM ($n = 5$); * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ versus Contrôle négatif; ### $P < 0,001$ versus Collagène forte dose.

c- Etude des effets des extraits des racines de RT sur le sang humain

C'est une étude comparative sur le sang humain, qui a permis d'évaluer in vitro l'effet de l'extrait butanolique des racines de RT sur les plaquettes humaines. L'effet antiagrégant plaquettaire des extraits des racines de RT est étudié par incubation du PRP humain avec différentes concentrations (250, 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$) pendant 5 minutes. L'agrégation plaquettaire est ensuite induite par l'addition d'un agoniste (l'ADP (50 μM), l'acide arachidonique (15 Mm) ou la thrombine (0.2 U/ml).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait du B-RT inhibe l'agrégation plaquettaire de manière dose dépendante (Tableau 22 et Figure 53). Les analyses statistiques ont montré que l'extrait B-RT à 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ provoque un effet inhibiteur maximal lorsque l'agrégation

est induite par la thrombine (18,33±3,48 % et 5±0,57 %) ou l'ADP (36,55±1,34 et 25,05±0,91) respectivement (n=3). Cependant, l'effet inhibiteur maximal de l'extrait B-RT en présence de l'acide arachidonique (35,66 ± 2,60 %) n'est obtenu qu'à 1000 mg/ml (n = 3). L'activité inhibitrice est significativement moins importante ($P<0,05$) lorsque l'agrégation est induite par l'acide arachidonique en comparaison avec celle de l'ADP et la thrombine ($P<0.001$).

Tableau 22: Inhibition de l'agrégation plaquettaire (%) par les différentes concentrations de l'extrait B-RT.

		Contrôle	B-RT 250µg/ml	B-RT 500µg/ml	B-RT 1000µg/ml
Agrégation % n=3	ADP (50µM)	74 ,06± 2,96	67,69±0,77	36,55±1,34***	25,05±0,91***
	Acide arachidonique (15Mm)	77,66±1,85	75± 4,5	78± 8,7	35,66± 2,60*
	Thrombine (0.2 U/ml)	88.33± 1,76	73,00±6,50	18,33±3,48***	5±0,57***

Valeurs moyennes ± SEM (n = 3); *** $P<0.001$, * $P<0.05$ versus Contrôle

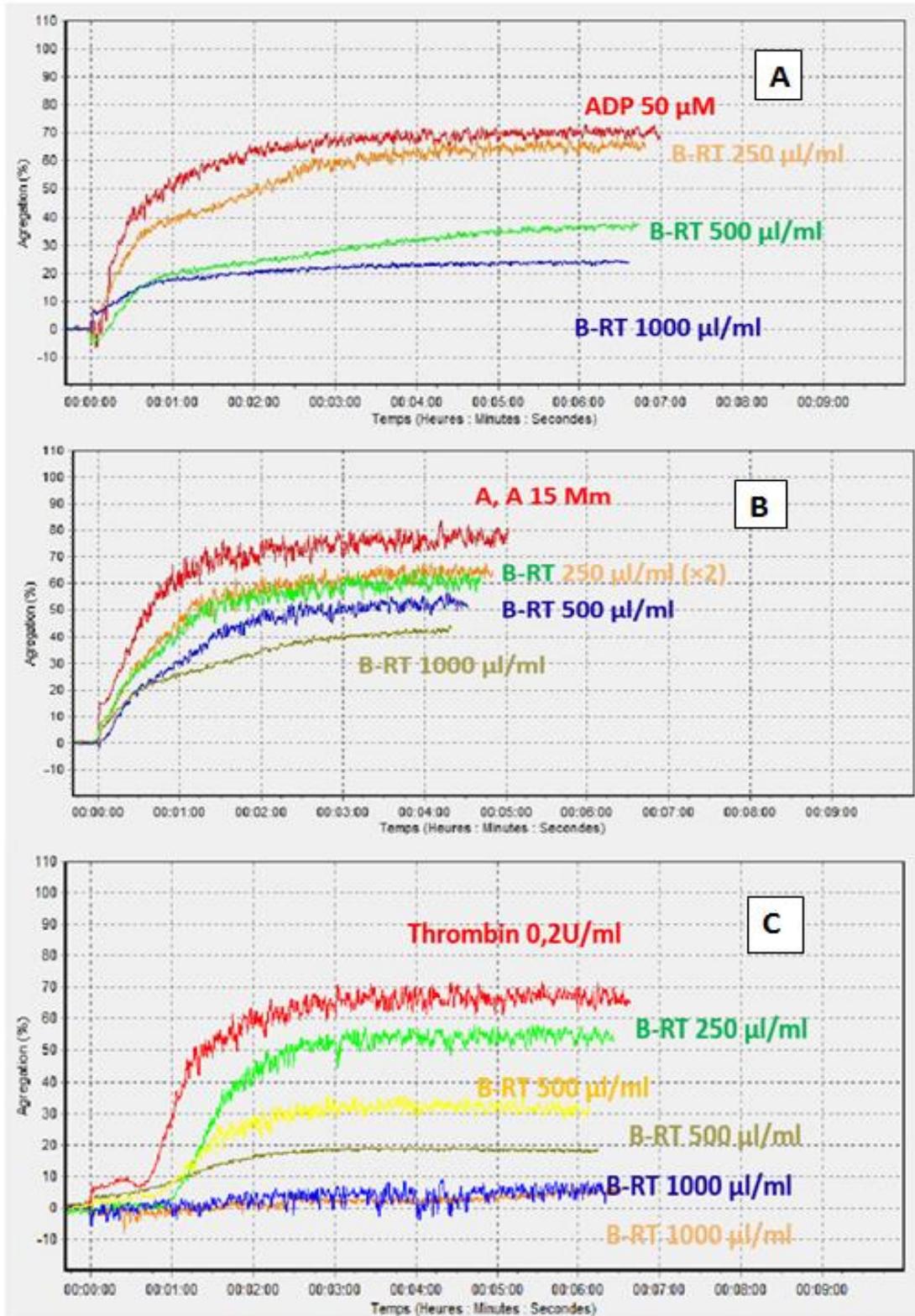


Figure 53: Tracés originaux montrant l'effet de l'extrait butanolique de RT sur l'agrégation plaquettaire des plaquettes humaines en présence de l'ADP 50 μ M (A), acide arachidonique 15mM (B) et la thrombine 0.2U/ml (C)

IV Discussion

a- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de RT par piégeage du radical libre DPPH.

L'activité antioxydante des différents extraits des racines de RT a été évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus ont montré que certains extraits possèdent un pouvoir antioxydant puissant alors que d'autres ne l'en possèdent pas. En comparaison avec l'antioxydant standard l'acide gallique, c'est l'extrait butanolique et éthanolique qui s'avèrent modestement actifs. Tandis que les extraits acétate d'éthyle et aqueux présentent une activité antioxydante très faible. En effet, il a été démontré précédemment que les racines de RT contiennent des polyphénols, Le dosage de ses composés vient conforter ce résultat. Il ressort également que l'activité antioxydante dépend de la qualité des composés phénoliques et non uniquement de leur quantité comme cela a été rapporté par Saadaoui *et al.*, (2007). Nous avons trouvé que l'extrait éthanolique des racines de RT possède un taux élevé en polyphénols, néanmoins une activité antioxydante faible. Contrairement à l'extrait butanolique qui a montré une activité antioxydante importante, néanmoins une faible teneur en polyphénols totaux. L'analyse quantitative des extraits par *HPLC* a montré que l'extrait éthanolique referme plusieurs molécules bioactives par rapport à l'extrait butanolique. Cette différence pourrait être dû en grande partie à la composition chimique des deux extraits et aussi à l'effet antagoniste entre les composés.

b- Evaluation de l'effet hépato-protecteur de l'extrait éthanolique des racines de RT

L'ictère provoqué expérimentalement chez les rats (*Sprague Dawley*) dans cette étude est le résultat de la toxicité par le tétrachlorure de carbone (CCl_4), un toxique organochloré à tropisme essentiellement hépatique et un agent potentiel cité par plusieurs chercheurs (Shah *et al.*, 2009 ; Sanmugapriya, 2006). En outre, les changements associés à des lésions hépatiques induites par le CCl_4 sont similaires à celui de l'hépatite virale aiguë (Suja *et al.*, 2004).

Son mécanisme d'action physiopathologique décrit par plusieurs auteurs, entre autres (Sarada *et al.*, 2012 ; Lettéron *et al.*, 1990) permet de mieux appréhender les dommages hépatiques dont il est responsable. En effet, la métabolisation hépatique du CCl_4 commence par sa transformation en ses métabolites primaires (Trichlométhyl CCl_3 et trichlométhylperoxyde CCl_3OO_2) grâce au cytochrome P450 oxydase hépatique, principal système enzymatique responsable des réactions d'oxydo-réduction des xénobiotiques au niveau hépatique. Le trichlométhylperoxyde est un radical libre hautement réactif, qui va initier une lipoperoxydation autrement dit oxydation des acides gras polyinsaturés des phosphomembranes lipidiques des

hépatocytes. Une conséquence de cette activité radicalaire est la désagrégation des membranes des hépatocytes dont les enzymes intra-cytoplasmiques entre autres les transaminases (ASAT et ALAT), la gamma GT et la phosphatase alcalines (PAL), vont se déverser dans le milieu extracellulaire (plasma sanguin) (Singh *et al.*, 1998 ; Ozturk *et al.*, 2009). L'élévation de ces marqueurs sériques à localisation cytoplasmique est attribuée à l'endommagement de l'intégrité structurale des hépatocytes et par conséquent le développement de l'hépatotoxicité.

La bilirubine est un autre biomarqueur de confirmation de la toxicité hépatique. C'est une protéine excrétée par voie biliaire après conjugaison dans les hépatocytes. Lors d'insuffisance hépatique, les hépatocytes lésés sont incapables d'assurer complètement la conjugaison de la bilirubine; il s'en suit une accumulation dans le sang de bilirubine provenant de l'hémolyse physiologique et secondairement un ictère.

Les résultats de la présente étude ont révélé une augmentation significative des activités sériques des transaminases, GGT, PAL et bilirubine directe sur l'exposition au tétrachlorure de carbone CCl₄ (groupe 3), indiquant des dommages considérables hépatocellulaire. Ceci a été confirmé par les analyses histologiques du foie des rats traités par le CCl₄ seul, qui ont montré des lésions hépatocytaires cytolytique et choléstatiques avec clarification et perte des frontières cellulaires.

L'administration de l'extrait éthanolique de RT à une dose de 1g/kg, trois jours avant et pendant le traitement par le CCl₄, provoque un processus de restauration des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique ainsi que les niveaux de la bilirubine directe, vers une évolution à la normale. Ceci, illustre la capacité de l'extrait à assurer une protection de l'intégrité des membranes des hépatocytes contre l'intoxication organochloré (CCl₄), et stimuler les fonctions métaboliques du foie, en particulier la conjugaison de la bilirubine. Cette éventualité expliquerait la baisse de la bilirubinémie totale des rats traités avec l'extrait. L'effet hépatoprotecteur a été évalué également par une étude histopathologique du foie du groupe traité (groupe 4) et des groupes témoins (groupes : 1et 2), qui ont montré une architecture histologique plus ou moins normale sans lésions hépatocytaires presque comparable à celle du témoin.

Le mécanisme d'action de l'effet hépatoprotecteur présenté par l'extrait éthanolique des racines de RT pourrait être attribué à son activité antioxydante ainsi que sa composition phytochimique. En effet, il a été démontré précédemment (étude phytochimique) que l'extrait éthanolique de RT possède une activité antioxydante marquée, et cette activité antioxydante est probablement associée à la composition poly phénolique identifiée par l'analyse *HPLC*.

Il a été établi que les activités hépato protectrices peuvent être liées à la capacité antioxydante de piéger les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Chang *et al.*, 2007). En effet, il a été démontré que les antioxydants issus de plantes peuvent prévenir la toxicité du CCl₄ par inhibition de la peroxydation lipidique. Teselkin *et al.*, (2000) et Harish *et al.* 2006 ont effectué un test de TBA sur *P. niiruri in vivo*, et ont démontré une grande habilité de cette plante à inhiber la peroxydation lipidique qui est d'environ de 50%, alors que dans l'expérience menée par Naskar *et al.*, (2010) l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Phoenix dactylifera* a démontré un pouvoir inhibiteur de 24% uniquement. D'autres plantes telles que *Silybum marianum* (L.) Gaertner, *Cynarascolymus* L., *Taraxacum officinale* Weber, et *Angelica archangelica* L. ont montrés leurs grandes efficacités dans la prévention des maladies du foie et des reins, individuellement ou en combinaison (Karakus *et al.*, 2017). Ceci explique que l'efficacité des plantes à contrôler la toxicité de CCl₄ est attribué à ses constituants, soit par la capacité d'induire les enzymes microsomales, soit par l'accélération de l'élimination de CCl₄ ou par inhibition de la peroxydation lipidique (Qureshi *et al.*, 2010). En comparaison avec les résultats de notre étude, nous pouvons supposer que l'extrait éthanolique de RT protège les cellules hépatocytaires via sa capacité à éliminer les radicaux libres issus de l'activation du CCl₄ ou bien à l'inhibition du cytochrome P450, l'enzyme responsable de la transformation de CCl₄ en des métabolites, notamment le radicale trichlorométhyle et le trichlorométhyle peroxyde.

L'analyse qualitative et quantitative par *HPLC* de l'extrait éthanolique de RT a mis en évidence la présence de quatre molécules majoritaires qui sont : la quercétine, la catéchine, la vanille et l'acide rosmarinique. Ainsi, On pourrait émettre l'hypothèse selon laquelle l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique s'exercerait via ces quatre molécules. En effet, plusieurs travaux récents ont démontré que la quercétine possède un effet protecteur puissant contre l'inflammation induite par le CCl₄, en supprimant l'activation TLR2/4 et du MAPK/NF-κB et en inhibant les taux de iNOS, COX-2 et IL-1β (Lin *et al.*, 2014 ; Tu *et al.*, 2012 ; Bhaskar *et al.*, 2011, Byun *et al.*, 2013). D'autres travaux ont rapportés que l'administration de la quercétine atténuait les dommages oxydatifs induits par le CCl₄ en inhibant la génération de ROS dans les cellules hépatocytaires (Ma *et al.*, 2015). Pareil pour la catéchine, il a été prouvé que cette molécule possède une activité antioxydante très sollicitée dans le traitement et la prévention de la cirrhose hépatique (Hassan *et al.*, 2009). Siegers *et al.*, (1982). Ces auteurs ont rapporté que la catéchine pouvait abaisser l'élévation des triglycérides hépatiques et de l'hydroxyproline d'une manière dose-dépendante face à une toxicité hépatique induite par le CCl₄. Par ailleurs, la vanilline comme tous les flavonoïdes possède un potentiel antioxydant plus important que l'acide

ascorbique et le trolox (Tai *et al.*, 2011), de plus il a été rapporté que la vanilline inhibe la peroxydation des lipide et l'oxydation des protéines induites par la photosensibilisation dans les mitochondries des hépatocyte (Kamat *et al.*, 2000). Dans une autre étude similaire, Makni *et al.*, (2012) ont démontré l'effet protecteur de la vanilline contre les altérations érythrocytaires induites par le CCl₄ via son mécanisme d'inhibition de la peroxydation des phospholipides membranaires.

De notre côté, nous pouvons suggérer que la diversité des composés polyphénoliques de l'extrait éthanolique de RT expliquerait la grande activité hépatoprotectrice face à une hépatotoxicité induite par le CCl₄. Ainsi nous pouvons supposer que le mécanisme d'action de l'extrait réside dans sa capacité à éliminer les radicaux libres issus du métabolisme du CCl₄ par le foie. La compréhension des mécanismes qui expliquent l'effet hépato-protecteur de l'extrait éthanolique des racines de RT est très important pour développer de nouvelles molécules pour le traitement des atteintes hépatiques.

c- Evaluation de l'effet anti-urolithiasique des extraits éthanolique et acétate d'éthyle des racines de RT.

RT est une plante qui fait partie de la famille des *Rubiacees* dont la racine est utilisée en médecine populaire pour guérir diverses maladies, dont les calculs rénaux et les maladies de la vessie dans plusieurs pays d'Asie et d'Europe (Agarwal et Varma, 2015 ; Derksen et Vanbeek, 2002) et aussi au Maroc (données non publiées). Afin de confirmer ou d'infirmer cet usage, nous avons recherché si les extraits des racines de RT auraient un effet contre la lithiase rénale.

Pour comprendre les mécanismes impliqués dans la genèse des calculs urinaires et pour évaluer les effets de divers agents thérapeutiques sur le développement et la progression de cette maladie lithiasique, plusieurs modèles *in vivo* ont été développés (Atmani *et al.*, 2004, Fan *et al.*, 1999). Le rat est l'animal le plus utilisé dans les modèles du dépôt des cristaux d'oxalate de calcium dans les reins, un processus imitant la formation des calculs rénaux chez les humains (Atmani *et al.*, 2004). Ces modèles *in vivo* ont utilisé soit l'éthylène glycol seul, soit combiné avec d'autres produits, comme le chlorure d'ammonium, la vitamine D3, la gentamycine, ou une diète pauvre en magnésium. Le chlorure d'ammonium étant le plus utilisé (Fan *et al.*, 1999).

Le choix de ce modèle expérimental est basé sur le fait que l'insuffisance rénale produite n'est pas si grave, et que les calculs s'accumulent lentement et graduellement dans les reins des rats. L'EG reste ainsi le principal responsable de la formation des cristaux d'oxalate de calcium (CaOx) dans les reins (des lésions rénales tubulaires et parfois glomérulaire) (Robinson *et al.*, 1990). Une telle action est sexe-dépendante : les femelles des rats développent la lithiase à des

doses plus élevées par rapport aux males. Cette remarque a été discutée dans la littérature (Melnick, 1984; Depass *et al.*, 1986), certains auteurs suggèrent que cette différence peut être expliquée par la grande aptitude des rats à transformer l'EG en oxalate.

Au fur et à mesure que nous réexaminerons différents paramètres du modèle EG/AC de l'urolithiasis chez le rat, nous discuterons d'abord de la physiopathologie de ce modèle à la lumière de nos résultats.

Les résultats de la présente étude ont montré qu'en réponse à l'administration de 0,75 % d'EG et de 2 % d'AC pendant 10 jours, les rats mâles ont développé des calculs rénaux composés principalement de CaOx. Ils perdent du poids parce qu'ils boivent moins d'eau et cessent presque de manger. Le modèle EG/AC induit dans cette étude, est similaire aux modèles expérimentaux d'urolithiase décrits précédemment (Ravindra et Sunsil, 2016 ; Atmani *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2002).

Les mécanismes physiopathologiques responsables des altérations induites dans ce modèle pourraient être liés à une augmentation de la concentration urinaire en oxalate du calcium. EG est facilement absorbé le long de l'intestin, puis métabolisé dans le foie en CaOx, entraînant ainsi, une hyperoxalurie. L'oxalate précipite dans l'urine sous forme de CaOx en raison de sa faible solubilité. Des niveaux élevés de cristaux de Ox et de CaOx, en particulier dans les cellules épithéliales du néphron, induisent une nucléation hétérogène suivie d'une agrégation des cristaux (Scheid *et al.*, 2004 ; Thamilselvan *et al.*, 2003). Le chlorure d'ammonium (AC) potentialise l'action de l'EG et accélère le phénomène d'urolithiase (Fan *et al.*, 1999).

L'examen microscopique des urines a clairement montré que le traitement induisant l'urolithiase a conduit à l'apparition de cristaux de CaOx avec une forme bipyramide dans les urines, alors que les urines de rats témoins non traités étaient exemptes de ces cristaux. Ce résultat est similaire aux données rapportées précédemment (Ravindra et Sunsil, 2016) et pourrait être associé à une diminution du débit urinaire, un pH élevé, une hyperoxalurée et une hypercalciurie (Leth et Gregersen, 2005). L'analyse biochimique de l'urine a confirmé, au moins en partie, une hypothèse comme celle des rats lithiasiques qui présentaient une augmentation de l'excrétion du phosphore et du calcium. Une concentration élevée de phosphore dans les tubules rénaux pourrait potentialiser la lithiase induite par l'EG (Soundararajan *et al.*, 2006), alors que le calcium agirait comme un facteur important dans la nucléation et la précipitation de l'oxalate sous forme de CaOx (Scheid *et al.*, 2004 ; Thamilselvan *et al.*, 2003) et dans la croissance cristalline qui en résulte (Soundararajan *et al.*, 2006). Une augmentation de l'excrétion de protéines urinaires a également été enregistrée, indiquant un dysfonction tubulaire

proximale (Divakar, 2010 ; Bashir et Gilani, 2009 ; Selvam *et al.*, 2001). L'excrétion de protéines pourrait être liée à des lésions sévères des glomérules et à une dilatation tubulaire (Ghelani *et al.*, 2016 ; Grases *et al.*, 2015). Un autre facteur contribuant à la protéinurie pourrait être une inflammation interstitielle attestée par l'infiltration de cellules mononucléaires.

Les taux sériques d'urée, de créatinine et d'acide urique étaient significativement plus élevés dans le groupe urolithiasique que dans le groupe témoin, ce qui indique des lésions rénales. Ces résultats concordent avec ceux d'une étude antérieure (Pawar et Vyawahare, 2017) et indiquent que l'accumulation de substances azotées dans le sérum peut être la conséquence d'une diminution du taux de filtration glomérulaire (TFG) due à une obstruction lithiasique (Thangarathinam *et al.*, 2013). L'acide urique se lie à CaOx et module sa cristallisation et sa solubilité et réduit également l'activité inhibitrice du glycosaminoglycan (Soundararajan *et al.*, 2006). Les concentrations plasmatiques de Na⁺, K⁺ et Cl⁻ ont augmenté de façon significative dans le groupe lithiasique. Le déséquilibre électrolytique perturbe le métabolisme des cellules rénales, ce qui entraîne le développement d'altérations de la structure cellulaire (Blachley et Hill, 1981).

Le traitement EG/AC a provoqué une dilatation tubulaire, des lésions glomérulaires et une infiltration des mono-nucléocytaires. Ces lésions rénales observées dans le groupe lithiasique pourraient être attribuées à une action peroxydante sur l'épithélium rénal (Rathod *et al.*, 2012) résultant du taux élevé des oxalates urinaires et de son dépôt dans les tubules et glomérules. En effet, il a été démontré que le dépôt de CaOx induit un stress oxydatif qui pourrait être responsable de lésions des tissus papillaires (Khan *et al.*, 2010).

Dans cette étude, nous avons étudié les activités anti-urolithiasiques de l'éthanol et de l'extrait d'acétate d'éthyle de RT sur la lithiase rénale induite par EG/AC chez le rat. Une expérience toxicologique menée dans notre laboratoire a démontré que jusqu'à 5 g/kg d'extrait de RT, aucun effet secondaire majeur n'a été observé. Les doses choisies de 1 g/kg et de 2 g/kg étaient dépourvues de tout effet toxicologique et se situaient dans la gamme des doses utilisées dans des expériences similaires (Prasad *et al.*, 1994 ; Al-Snafi, 2015).

Le traitement avec les extraits E-RT et EA-RT a protégé les cellules contre les altérations induites par les EG/AC à des valeurs proches aux valeurs du témoin négatif. Cet effet préventif concernait la formation de cristaux dans l'urine et les paramètres biochimiques du sérum et de l'urine. Les extraits de RT ont également empêché la perte de poids corporel induite par le traitement lithiasique d'une manière dose-dépendante. Ce résultat est similaire à celui obtenu avec un extrait standardisé de graines de fenugrec sur la lithiase expérimentale chez le rat

(Kapase *et al.*, 2013). Le mécanisme possible proposé, est une amélioration de la diurèse qui pourrait induire la dissolution du tartre formé et une interruption dans le processus d'agrégation et de dépôt de cristaux supplémentaires. Cependant, d'autres expériences sont nécessaires pour confirmer si les extraits de RT partagent un mécanisme protecteur similaire à celui des extraits de fenugrec.

Par ailleurs, le traitement avec l'extrait éthanolique de RT à deux doses (1 et 2 g/kg) et la dose élevée de l'extrait AE-RT ont empêché l'augmentation des taux d'urée sérique, de créatinine et d'acide urique. La réduction de l'accumulation de ces substrats par les extraits de RT pourrait être attribuée à une préservation du taux de filtration glomérulaire normal qui empêche la formation de calculs dans le système urinaire (Thangarathinam *et al.*, 2013). Les électrolytes (calcium, phosphore, K⁺, Na⁺ et Cl⁻) ont également été inhibés par les extraits de RT. Le maintien de l'équilibre électrolytique peut donc permettre de préserver le métabolisme cellulaire.

De ce fait, la dose 2 g/kg de l'extrait éthanolique de RT a été la plus efficace pour diminuer les taux de protéines urinaires et de créatinine et pour restaurer la diurèse basse induite par EG/AC en améliorant le taux de filtration glomérulaire. Les extraits de RT ont également réduit de manière significative les niveaux de phosphore, de sodium, de potassium, de calcium et d'acide urique pour les ramener à la normale. L'AE-RT (2 g/kg) possède un effet moins efficace par rapport à l'action de l'extrait éthanolique, et son action s'est limitée à la récupération du taux de filtration glomérulaire et à l'inhibition de la formation des calculs.

Les analyses histopathologiques ont montré des résultats concordants avec les variations biochimiques. En effet, les extraits de RT ont empêché les changements dégénératifs dans les tissus rénaux qui pourraient être induits par les EG/AC. Il est intéressant de noter que cet effet préventif dépendait du type d'extrait. Les résultats obtenus ont montré que le traitement par l'extrait éthanolique de RT E-RT (2 g/kg) s'est présenté le plus efficace pour protéger l'architecture rénale contre la désorganisation induite par EG/AC, même si aucune différence n'a été observée entre les deux extraits (AE-RT et E-RT) à 2 g/kg concernant leur effet protecteur contre la formation d'urolithiase par oxalate de calcium.

Nos résultats concordent avec ceux déjà obtenus dans des travaux précédents (Ghelani *et al.*, 2016). Ces derniers ont rapporté que le traitement avec l'extrait éthanolique d'*Acorus calamus*, l'extrait hydroalcoolique de *Peucedanum grande* (Kumar *et al.*, 2016) et la cystone, une formulation ayurvédique bien connue pour être utilisée dans le traitement de l'urolithiase (Kasote *et al.*, 2017) possèdent un effet préventif sur la lithiase urinaire.

Cependant, nous avons émis l'hypothèse que les améliorations biochimiques et histopathologiques observées chez les animaux lithiasiques après traitement avec les extraits soient directement liées à leur capacité antioxydante. Les antioxydants pourraient avoir une action importante dans la prévention de la formation des calcifications intrapapillaires induites par le stress oxydatif qui conduisent à la formation de calculs papillaires (Grases *et al.*, 2015). Pour vérifier l'hypothèse de l'effet préventif des antioxydants, nous avons évalué les propriétés antioxydantes des extraits de RT et identifié leur composition en polyphénols. Dans le test de piégeage de la DPPH, nous avons constaté que les extraits de RT possédant une activité antioxydante marquée. Une telle activité antioxydante peut être due, en grande partie, à la composition polyphénolique spécifique identifiée par l'analyse HPLC. En effet, il existe une corrélation positive entre le contenu phénolique total et la capacité antioxydante (Cai *et al.*, 2004 ; Djeridane *et al.*, 2006 ; Katalinic *et al.*, 2006 ; Katsube *et al.*, 2004). Le potentiel antioxydant de la RT pourrait être considéré comme important par rapport au puissant acide phénol-gallique (Naksuriya, Okonogi, 2015). La description de la composition spécifique de chaque extrait de RT permet de conclure que l'activité antioxydante de l'E-RT peut être due à la quercétine, la catéchine, la vanilline et l'acide cinnamique qui ont été trouvés à des concentrations élevées. De ce fait, l'activité antioxydante de l'AE-RT pourrait être due à la quercétine seule puisque ce composé phénolique est le plus représenté. À l'appui de notre suggestion, plusieurs données indiquent que la quercétine a un effet protecteur contre le stress oxydatif associé à l'insuffisance rénale induite dans le modèle EG/AC (Amengual-Cladera *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2012) et qu'elle diminue l'oxydation des bases d'ADN par modulation des voies antioxydantes (Subash *et al.*, 2010 ; Calabrese *et al.*, 2010). D'autres rapports suggèrent que la quercétine a un effet potentiellement néphroprotecteur contre les dommages à l'ADN induits par le Pb et l'apoptose par sa capacité antioxydante (Liu *et al.*, 2010). Il est également prouvé que la catéchine a des effets préventifs sur la cristallisation rénale du calcium in vitro et dans le modèle EG (Zhai *et al.*, 2013). Par conséquent, on pourrait suggérer, sur la base de ces rapports que la supériorité de l'E-RT sur l'AE-RT concernant leur action antioxydante et la prévention de l'urolithiase est due à une synergie entre les deux composés phénoliques catéchine et quercétine. En outre, on pourrait émettre l'hypothèse que la vanilline et l'acide cinnamique trouvés dans l'E-RT pourraient également contribuer à un effet préventif supplémentaire de cet extrait puisque les deux composés ont un potentiel antioxydant (Ramachandran *et al.*, 2010 ; Stanely *et al.*, 2011). Cependant, l'effet préventif potentiel de ces deux phénols sur l'urolithiase expérimentale reste à démontrer.

d- Effet des extraits des racines de RT sur la fonction plaquettaire chez le rat

➤ Effet antiagrégant des différents extraits des racines de RT

Les travaux que nous avons réalisés montrent que l'incubation des plaquettes sanguines des rats avec les cinq extraits des racines de RT (éthanolique, acétate d'éthyle, hexanique, butanolique et aqueux) à deux doses, (250µg/ml et 500µg/ml) provoque une inhibition dose dépendante de l'agrégation induite *in vitro* par le collagène. L'effet inhibiteur maximal (10% et 20%) est obtenu par l'extrait butanolique. Pour confirmer cet effet, une courbe dose réponse est réalisée en utilisant les concentrations (250, 500 et 1000 µg/ml), en présence du collagène.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait butanolique des racines de RT inhibe significativement ($P < 0.001$) l'agrégation plaquettaire de manière dose dépendante. L'effet maximal (1.48%) est obtenu à 1mg/ml.

L'agrégation plaquettaire est un processus complexe influencé par de nombreux éléments. Le collagène qui est une protéine thrombogène stimule l'agrégation plaquettaire et induit l'activation de divers médiateurs intracellulaires (ADP, thromboxane A₂, Calcium^o via les récepteurs glycoprotéiques (GP IIbIIIa, GP VI) (Broos *et al.*, 2011). De plus, l'agrégation plaquettaire peut être bloquée en inhibant la thrombine, l'ADP, la phosphodiesterase et la thromboxane (Broos *et al.*, 2011 ; Sikka et Bindra, 2010).

Dans notre étude, l'extrait de B-RT inhibe l'agrégation plaquettaire induite par le collagène de manière dose dépendante, ceci pourrait être dû à une inhibition des médiateurs intracellulaire ou bien à un freinage de la liaison du fibrinogène à son récepteur plaquettaire membranaire (glycoprotéine (GP) IIb-IIIa), qui est une voie finale et commune de l'agrégation plaquettaire.

En effet, Endale et ses collaborateurs (2012) ont démontré que *ginsenoside- Rp1* isolé de *Panax ginseng* inhibent l'activation plaquettaire induite par le collagène via la voie de signalisation de la glycoprotéine VI altérée.

Pour mieux comprendre l'interaction de l'extrait butanolique avec les plaquettes sanguines du rat, deux autres paramètres ont été mesurés dans cette étude : la numération plaquettaire et le temps de saignement. Ce dernier, permet une exploration globale de la fonction de l'hémostase primaire en tenant compte de tous les facteurs impliqués *in vivo* dans ce processus (plaquettes, fibrinogène, facteur de vWF, ainsi que leurs interactions avec la paroi vasculaire) (Dejana *et al.*, 1982; Rodgers, 1990).

L'étude réalisée sur le temps de saignement chez les rats a permis de montrer que l'extrait butanolique des racines de la plante administrée oralement à 100 mg/kg, prolonge significativement ce paramètre en comparaison avec le groupe contrôle positif. Cette

prolongation est comparable à celle obtenu chez le groupe traité par l'aspirine, qui est connu en pharmacologie comme un agent antiplaquettaire. L'injection du collagène à forte dose par voie veineuse a significativement ($P < 0,001$) réduit le temps de saignement par rapport au témoin. Toutefois, le prétraitement des rats avec l'extrait butanolique de RT (100 mg/kg) a significativement ($P < 0,01$) empêché l'agrégation plaquettaire induite par le collagène forte dose en comparaison avec le groupe contrôle positive. Le même résultat est observé chez le groupe prétraité par l'aspirine. D'autre part, les résultats du temps de saignement corrént bien avec les résultats de la numération plaquettaire qui n'a pas été affecté par une thrombopénie chez le groupe prétraité par l'extrait après l'injection du collagène forte dose.

Selon une étude similaire antérieure (Seo *et al.*, 2013), l'inhibition de l'agrégation plaquettaire pourrait être associée à un allongement du temps de saignement.

Dans notre étude, on peut suggérer que le prolongement du temps de saignement induit par l'extrait butanolique des racines de RT serait causé en partie, probablement par l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Le fait que ces effets soient mis en évidence après une administration par voie orale de l'extrait, indiquent qu'il y a présence des composés actifs dans cet extrait qui atteignent la circulation sanguine après être absorbée au niveau du tractus digestif et affecte les paramètres hémostatiques. Par conséquent, les plaquettes sanguines des rats traités seraient moins sensibles aux différents agonistes. Des études similaires à la nôtre ont rapportés que certaines plantes médicinales exhibèrent un effet antiagrégant plaquettaire pareil à celui de RT, comme par exemple *Allium cepa* (oignon) (Moon *et al.*, 2000), *Allium sativum* (ail) (Rahman et Billington, 2000), *Lycopersicon esculentum* (tomate) (Dutta-Roy *et al.*, 1991), argan oil (Mekhfi *et al.*, 2004), *Petroselinum crispum* (persil) (Gadi *et al.*, 2012), *Vigna radiata* (Haricot mungo) (Akbar *et al.*, 2017) et les racines de *Juglans regia* (Noyer commun) (Amirou *et al.*, 2018).

La recherche sur les mécanismes cellulaires et moléculaires qui pourraient produire l'effet antiagrégant plaquettaire de l'extrait butanolique des racines de RT, nous a conduit à déterminer la composition phytochimique de la plante.

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique de l'extrait butanolique a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques. Ceci a été confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés. Ces dosages révèlent que la fraction butanolique contient une concentration assez importante en flavonoïdes et tanins. L'analyse qualitative et quantitative par *HPLC* a mis en évidence la présence de quatre molécules qui sont la vanille (en grande concentration),

l'acide rosmarinique, la quercétine et l'acide cinnamique. En effet, l'activité antiagrégante plaquettaire pourrait être attribuée à la présence des flavonoïdes et particulièrement à la vanilline.

Dans ce sens, Scalbert *et al.* (2005) ont signalé que l'ingestion des polyphénols, dont les flavonoïdes présentent une classe importante, prolonge le temps de saignement et réduit l'agrégation plaquettaire en *ex vivo*. Ce qui nous laisse suggérer que les polyphénols présents dans la plante pourraient être responsables de l'effet obtenu. D'autres études ont montré que les flavonoïdes possèdent d'une manière générale une grande affinité aux récepteurs de TXA₂ et inhibent l'agrégation plaquettaire de manière importante lorsque les plaquettes sont stimulées par le collagène (Guerrero *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2010). D'autres études ont rapportés que certaines molécules comme les flavones, la chrysin, l'apigénine et la phlorétine ont inhibé significativement la cyclo-oxygénase plaquettaire (CO) et ont diminué la réponse de l'AMPc à la prostacycline. (Middleton *et al.*, 2000). La cyclo-oxygénase plaquettaire (CO) et la lipoxigénase (12-LO) sont deux enzymes impliqués dans la synthèse d'activateurs plaquettaires comme le thromboxane A₂ (Kundu *et al.*, 2006). De temps plus, il a été déjà signalé dans des études antérieures que l'effet antiagrégant plaquettaire pourrait être dû à l'inhibition de la COX par la vanilline (Liu *et al.*, 2003). D'autres rapports ont montré que l'acide rosmarinique peut moduler la réduction de la mobilisation du calcium intracellulaire par conséquent, inhibition de l'agrégation plaquettaire (Chapado *et al.*, 2010). Récemment, Du *et al.*, 2016 ont montré que la quercétine et la rutine sont les flavonoïdes les plus fréquents étudiés pour leurs effets cardiovasculaires. La quercétine est un inhibiteur actif de l'activité de la lipoxigénase (12-LO) dans les plaquettes humaines et son action a été associée à l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique par CO (Middleton *et al.*, 2000).

➤ **Effet sur l'agrégation plaquettaire *in vitro***

Dans la continuité de la recherche de l'activité antiplaquettaire des extraits des racines de RT, notre étude a été menée sur les plaquettes sanguines humaines en mesurant *in vitro* l'agrégation plaquettaire. Un processus important de l'hémostase primaire. L'agrégation plaquettaire a été mesurée sur des plaquettes lavées en réponse à trois agonistes (la thrombine, ADP et l'acide arachidonique), et en présence de différentes concentrations de l'extrait (250, 500 et 1000 µg/ml).

Pour les extraits organiques, nous se somme limité à tester uniquement l'extrait le plus actif chez le rat, à savoir, l'extrait butanolique. Les pourcentages d'agrégation obtenus avec les plaquettes humaines montrent que l'extrait butanolique exerce un effet inhibiteur très

significatif ($P < 0.001$) avec la thrombine et l'ADP à partir 500 $\mu\text{g/ml}$. Cependant avec l'acide arachidonique, l'extrait butanolique induit un effet inhibiteur moins important, mais avec une dose d'extrait un peu élevée (1mg/kg). Ces résultats laissent suggérer que l'effet inhibiteur de l'extrait butanolique sur les plaquettes humaines dépend de l'agoniste utilisé.

La thrombine et l'ADP sont deux inducteurs de l'activation plaquettaire qui réagissent avec des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Les récepteurs à l'ADP (P_2Y_1), et à la thrombine (PAR_1 et PAR_4) sont couplés à la protéine de couplage (PG) dont l'activation entraîne celle de la phospholipase C (PLC), qui hydrolyse à son tour les phosphoinositides membranaires, en particulier le phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP_2) pour fournir deux produits: le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP_3), qui activent respectivement la protéine kinase C (PKC) et la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire. Ainsi, suite à l'augmentation des taux du Ca^{2+} intracellulaire, la phospholipase A_2 (PLA_2) une translocation vers la membrane plasmique. Sa phosphorylation par des kinases entraîne son activation et par la suite l'acide arachidonique (AA) est libéré (Balla, 2006). Grâce à la cyclo-oxygénase COX, l'AA est transformé en prostaglandines (PGs) et par la suite en plusieurs molécules d'importance biochimique dont le Thromboxane A_2 (TXA_2). Sous l'effet de la 12-lipoxygénase (12-LOX), l'AA est transformé en acide 12-hydroperoxyéicosatétraéonique (12-HpETE). Les PGs, le TXA_2 et le 12-HpETE sont des régulateurs majeurs de l'activité plaquettaire (Nardini et Natella, 2007). Quant au deuxième récepteur à l'ADP, P_2Y_{12} , il est couplé à la protéine G_i . Cette dernière va inhiber l'activité de l'adénylate cyclase (AC) membranaire, empêchant ainsi une accumulation d'AMPc, ce qui va potentialiser l'activation et l'agrégation déclenchées par l'ADP (Hechler *et al.*, 2005).

Pour le collagène, il peut réagir avec les glycoprotéines GP Ia-IIa (intégrine $\alpha_2\beta_1$), GP IV. Ainsi, l'interaction du collagène avec son récepteur (GP VI) conduit à l'activation d'une voie tyrosine kinase impliquant de nombreux messagers, la voie de la PLC est ainsi mise en jeu, ce qui active d'une manière inside-out la GP Ia-IIa capable de fixer ensuite le collagène. La stimulation par le collagène résulte en un changement de forme, et une sécrétion granulaire. L'agrégation dépend plutôt de la sécrétion de TXA_2 et de prostaglandines H_2 (PGH_2) (Gibbins, 2004). Certes, ces voies de signalisation conduisent toutes à l'activation du récepteur GP IIb-IIIa, permettant ainsi la fixation du fibrinogène et la formation des agrégats plaquettaires.

L'existence de plusieurs voies de signalisation plaquettaire laisse supposer plusieurs mécanismes par lesquels les flavonoïdes des racines de RT peuvent exercer leurs effets

inhibiteurs. Ceci a été confirmé, dans la littérature, par plusieurs études qui ont montré que les flavonoïdes isolés à partir des plantes agissent par:

- Intervention dans les voies de signalisations médiées par la PLA₂ et le TXA₂ en bloquant la synthèse de plusieurs enzymes intra-plaquettaires comme : la 12-LOX, la COX, le TXA₂ synthétase, ou par l'inhibition de la liaison du TXA₂ à son récepteur (Pace-Asciak *et al.*, 1996; Blache, 1992; Guerrero *et al.*, 2007).
- Inhibition de la voie de signalisation médiée par la PLC, soit par inhibition directe de la PLC, soit indirectement par diminution du taux cytoplasmique d'IP₃ (Kang *et al.*, 2001; Sheu *et al.*, 2004 ; Hsiao *et al.*, 2005).
- Stimulation de l'AC, la guanylatecyclase (GC) ou l'inhibition des phosphodiésterases provoquant ainsi l'accumulation intraplaquettaire d'AMPc et de GMPc (Landolfi *et al.*, 1984).
- Réduction du taux de calcium cytoplasmique qui est nécessaire pour l'activation plaquettaire en inhibant la phosphorylation des protéines tyrosines kinases (PTK) (Hubbard *et al.*, 2003, 2004 ; El Haouari *et al.*, 2007(a-b); Navarro-Núñez *et al.*, 2009).
- Inhibition de la liaison de VWF à son récepteur GP Ib-V-IX (Mruk *et al.*, 2000).

Au vue de toutes ces informations et de nos résultats, il paraît que les molécules bioactives contenues dans les racines de RT, seraient par le biais de ces mécanismes, en partie responsable des effets obtenus.

La compréhension des mécanismes qui expliquent l'effet inhibiteur des flavonoïdes est important pour développer de nouvelles stratégies pour le traitement des thromboses.

Chapitre VI: Étude neuropharmacologique

I- Introduction

Dans cette partie, nous nous proposons de déterminer le profil neuropharmacologique des extraits de *RT*. Dans un premier objectif, nous avons étudié l'effet antinociceptif des extraits aqueux, butanolique et acétate d'éthyle de *RT* au moyen de trois modèles spécifiques d'étude de la douleur et de l'analgésie : test de la plaque chauffante, test de contorsions et test au formol chez la souris.

Dans un second objectif, nous avons étudié l'activité antidépressive des extraits de *Rubia tinctorum* au moyen de deux tests de la nage forcée et la suspension par la queue.

II Matériels et méthodes

1. Etude de l'activité antinociceptive des extraits de racines de RT

1. 1 Test de contorsion ('writhing test')

a- Principe

Nous avons réalisé ce test chez la souris pour étudier l'effet des extraits de RT sur la sensibilité nociceptive périphérique. Ce modèle permet d'étudier la réponse de l'animal au stimulus nociceptif chimique. L'injection intrapéritonéale de l'acide acétique (0,6% à raison de 0,1 ml par 10 g de poids) provoque chez la souris une réaction typique de contorsions (*Figure 23*), réaction caractérisée par de vagues de contractions et d'élongations de la musculature abdominale suivies par l'extension des pattes postérieures.

b- Protocole expérimental

Après l'injection de l'acide acétique, chaque souris a été placée dans une enceinte de Plexiglas transparente. Le nombre de contorsions a été noté 5 minutes après l'injection de l'acide acétique et pendant une période de 30 minutes.



Figure 54: Photo d'une souris présentant une réaction de contorsion après injection de l'acide acétique 0.6%. La réaction consiste en élongation de la musculature abdominale suivie d'un étirement des pattes postérieures

c- Méthodologie

Dans le but d'étudier l'effet de l'administration orale (par gavage) des extraits de RT sur la sensibilité nociceptive périphérique, les souris ont été réparties selon la nature des traitements en dix lots de 6 souris chacun:

- **Groupe 1 :** Témoin ayant reçu du sérum physiologique (9 %, v.o.).
- **Groupe 2 :** Traité par l'extrait éthanolique (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 3 :** Traité par l'extrait acétate d'éthyle (1 g/kg, v.o.).

- **Groupe 4 :** Traité par l'extrait butanolique (1 g/kg, v.o.).
- **Groupe 5 :** Traité par l'extrait aqueux (1 g/kg, v.o.) Lot 10 : Souris traités par l'Acide Acétyle Salicylique (AAS) (200 mg/kg, v.o.).
- **Groupe 6:** Souris traités par l'extrait éthanolique (2g/kg, v.o.)
- **Groupe 7:** Souris traités par l'extrait acétate d'éthyle (2g/kg, v.o.).
- **Groupe 8:** Souris traités par l'extrait butanolique (2g/kg, v.o.).
- **Groupe 9:** Souris traités par l'extrait aqueux (2g/kg, v.o.).
- **Groupe 10:** Souris traités par l'Acide Acétyle Salicylique (AAS) (200 mg/kg, v.o.).

Tous les traitements ont été réalisés 30 min avant l'injection de l'acide acétique à raison de 10 ml/10 kg du poids de l'animal.

Un Pourcentage d'Inhibition (PI) de la réponse nociceptive est calculé. Il est défini comme suit :

$$PI = (\text{Moyen témoin} - \text{Moyen traité} / \text{Moyen témoin}) * 100$$

Moyen témoin : *La moyenne du Nombre de contorsions chez les animaux témoins*

Moyen traité : *La moyenne du Nombre de contorsions chez les animaux traités*

1. 2 Test au Formol (Formalin test)

a- Principe

L'injection d'une solution de formol diluée, molécule inflammatoire produisant des lésions tissulaires, est à l'origine d'une réponse biphasique de léchage de la patte lésée. Une phase précoce suit immédiatement l'injection résultant d'une stimulation chimique directe des nocicepteurs. Une phase nociceptive tardive et prolongée s'ensuit avec le développement de l'inflammation (Tjolsen *et al.*, 1992).

b- Protocole expérimental

Ce test est réalisé chez les souris selon le protocole décrit par De Miranda *et al.*, (2001). Le protocole expérimental consiste à injecter une solution de formol diluée (20 µl, 2%/ souris) dans la plante de la patte postérieure des animaux ayant préalablement reçu la solution testée ou témoin. Après l'injection du formol, les animaux sont placés dans une enceinte de plexiglas transparente en le temps de léchage de la patte lésée est mesuré pendant 30 min (*Figure 24*). La réponse nociceptive est représentée par le cumul du temps de léchage de cette patte dans la phase précoce (0-5 min) et dans la phase tardive (15-30 min). Vu que ce test est un très bon modèle qui caractérise la douleur préclinique (Alreja *et al.*, 1984 ; Tjolsen *et al.*, 1992), il est défini comme une méthode de choix pour étudier la sensibilité nociceptive.



Figure 55: Photo d'une souris exhibant une réaction de léchage de la patte postérieure après injection de 20 μ l de formol à 2% dans la plante de la même patte

c- Méthodologie

Le but de cette manipulation a été d'étudier l'effet de l'administration orale (par gavage) des extraits de RT sur la sensibilité nociceptive. Cette expérimentation a été réalisée chez les souris. Elles ont été réparties selon leur traitement en 11 groupes :

- **Groupe 1 :** Témoin ayant reçu du sérum physiologique (9 ‰, v.o.).
- **Groupe 2 :** Traité par l'extrait éthanolique (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 3 :** Traité par l'extrait acétate d'éthyle (1 g/kg, v.o.).
- **Groupe 4 :** Traité par l'extrait butanolique (1 g/kg, v.o.).
- **Groupe 5 :** Traité par l'extrait aqueux (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 6 :** Traité par l'extrait éthanolique (2g/kg, v.o.)
- **Groupe 7 :** Traité par l'extrait acétate d'éthyle (2g/kg, v.o.).
- **Groupe 8 :** Traité par l'extrait butanolique (2g/kg, v.o.).
- **Groupe 9 :** Traité par l'extrait aqueux (2g/kg, v.o.).
- **Groupe 10 :** Traité par l'Acide Acétyle Salicylique (AAS) (200 mg/kg, v.o.).
- **Groupe 11 :** Traité par la morphine (10 mg/kg, v.o.).

Vu que le test au formol est largement utilisé pour étudier les mécanismes de la douleur et de l'analgésie (Dubuisson et Dennis, 1977), nous l'avons utilisé pour élucider le mécanisme d'action des extraits éthanolique, acétate d'éthyle, butanolique, et aqueux de RT. Un

pourcentage d’Inhibition (PI) de la réponse nociceptive a été calculé pour chaque phase du test. Il a été défini comme suit :

PI = $[(\text{Temps moyen de léchage de la patte par le témoin} - \text{temps de léchage de la patte par le traité}) / \text{Temps de léchage de la patte par le témoin}] \times 100$.

1.3 Test de la plaque chauffante

a- Principe

Ce test consiste à étudier la réaction de l’animal suite à une stimulation nociceptive thermique de courte durée.

b- Protocole expérimental

Dans ce test, l’animal a été placé dans un cylindre placé sur une plaque métallisée chauffante dont la température est maintenue à 55°C. Le temps de latence que met l’animal pour lécher l’une de ses pattes ou pour sauter a été enregistré et considéré comme le temps de la réaction. Ce temps a été déterminé juste avant et 30 min après l’administration de la solution témoin ou testée.

c- Méthodologie

L’objectif de cette expérience a été d’étudier l’effet de l’administration des extraits de RT par voie orale sur la sensibilité nociceptive profonde.

- **Groupe 1** : Témoin ayant reçu du sérum physiologique (9 %, v.o.).
- **Groupe 2** : Traité par l’extrait éthanolique (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 3** : Traité par l’extrait acétate d’éthyle (1 g/kg, v.o.).
- **Groupe 4** : Traité par l’extrait butanolique (1 g/kg, v.o.).
- **Groupe 5** : Traité par l’extrait aqueux (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 6** : Traité par l’extrait éthanolique (2g/kg, v.o.)
- **Groupe 7** : Traité par l’extrait acétate d’éthyle (2g/kg, v.o.).
- **Groupe 8** : Traité par l’extrait butanolique (2g/kg, v.o.).
- **Groupe 9** : Traité par l’extrait aqueux (2g/kg, v.o.).
- **Groupe 10** : Traité par l’Acide Acétyle Salicylique (AAS) (200 mg/kg, v.o.).
- **Groupe 11** : Traité par la morphine (10 mg/kg, v.o.).

Chaque groupe contient 6 souris. Les injections ont été réalisées dans un volume d’injection de 10ml/1 kg de poids de l’animal.

2. Etude de l'activité antidépressive des extraits de racines de RT

2. 1 Test de la nage forcée

a- Principe

Dans ce test, nous avons étudié l'effet des extraits de RT sur le comportement de la nage forcée.

b- Protocole expérimental

Ce test qui a été décrit par Prosolt en 1977, consiste à mettre les animaux dans des cylindres remplis d'eau. Pour les souris, nous avons utilisé un cylindre de 30 cm de hauteur et 20 cm de diamètre et il a été rempli d'eau jusqu'à 10 cm (*Figure 25*). La température d'eau a été maintenue à 25°C. L'expérience s'est déroulée sur deux jours. Le premier jour (conditionnement, session pré-test), l'animal a été mis dans son cylindre pendant 10 minutes durant lesquelles deux paramètres ont été notés : le temps de nage qui correspond au temps passé par l'animal à nager et à essayer de s'échapper du cylindre et le temps d'immobilité pendant lequel l'animal arrête ses tentatives de fuite et s'immobilise, tout en gardant son museau hors de l'eau (Chait, 1996). Lorsque les 10 minutes se sont achevées, l'animal a été ressorti de l'eau, réchauffé et remis dans sa cage. Le lendemain (24h après) (session test), le test a été recommencé et l'animal s'est remis vite dans la position d'immobilisation. Il a appris le comportement de résignation.



Figure 56: Dispositif expérimental utilisé dans le test de la nage forcée

c- Méthodologie

L'objectif de cette expérience a été d'étudier l'effet de l'administration par voie orale des extraits de RT sur le comportement de la nage forcée.

Les animaux sont répartis selon la nature des traitements en 10 groupes :

- **Groupe 1** : Témoin ayant reçu du sérum physiologique (9 ‰, v.o.)
- **Groupe 2** : Traité par l'extrait éthanolique (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 3** : Traité par l'extrait acétate d'éthyle (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 4** : Traité par l'extrait butanolique (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 5** : Traité par l'extrait aqueux (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 6** : Traité par l'extrait éthanolique (2 g/kg, v.o.)
- **Groupe 7** : Traité par l'extrait acétate d'éthyle (2 g/kg, v.o.)
- **Groupe 8** : Traité par l'extrait butanolique (2 g/kg, v.o.)
- **Groupe 9** : Traité par l'extrait aqueux (2 g/kg, v.o.)
- **Groupe 10** : Traité par l'ANAFRANIL 25 mg/kg, v.o.)

Tous les traitements ont été réalisés 30 min avant le test du deuxième jour (session test : 10 minutes) à raison de 10 ml/1 kg du poids de l'animal. Chaque groupe contient 6 souris.

2. 2 Test de suspension par la queue

a- Principe

Dans ce test, nous avons étudié l'effet des extraits de RT sur le comportement de la suspension par la queue. Ce test repose sur le fait qu'une souris suspendue par la queue montre des périodes alternées d'agitation et d'immobilité.

b- Protocole expérimental

Ce test qui a été décrit par Steru *et al.*, (1985), consiste à suspendre individuellement les animaux par la queue à une barre verticale dans une boîte en bois. Les animaux ont été attachés au ruban adhésif fixé à 2 cm de l'extrémité de la queue. La durée totale de l'immobilité a été enregistrée pendant les 6 minutes du test. La souris était jugée immobile lorsqu'elle cessait de bouger ses membres et son corps, ne faisant que les mouvements nécessaires pour respirer (Steru *et al.*, 1985) (*Figure 26*).

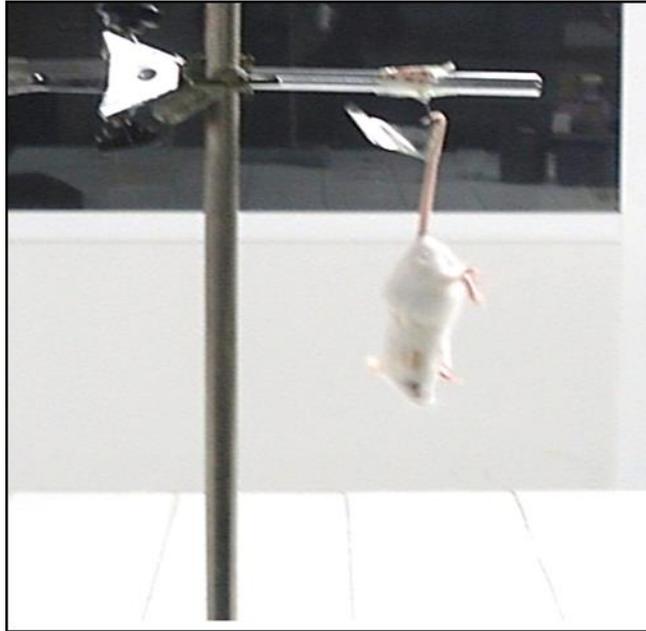


Figure 57: Une souris suspendue par la queue

c- Méthodologie

L'objectif de cette expérience est d'étudier l'effet de l'administration par voie orale des extraits de RT sur le comportement de la suspension par la queue.

Les animaux ont été répartis selon la nature des traitements en 10 groupes.

- **Groupe 1 :** Témoin ayant reçu du sérum physiologique (9 %, v.o.)
- **Groupe 2 :** Traité par l'extrait éthanolique (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 3 :** Traité par l'extrait acétate d'éthyle (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 4 :** Traité par l'extrait butanolique (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 5 :** Traité par l'extrait aqueux (1 g/kg, v.o.)
- **Groupe 6 :** Traité par l'extrait éthanolique (2 g/kg, v.o.)
- **Groupe 7 :** Traité par l'extrait acétate d'éthyle (2 g/kg, v.o.)
- **Groupe 8 :** Traité par l'extrait butanolique (2 g/kg, v.o.)
- **Groupe 9 :** Traité par l'extrait aqueux (2 g/kg, v.o.)
- **Groupe 10 :** Traité par l'ANAFRANIL 25 mg/kg, v.o.).

3. Analyse statistique

Le traitement statistique des données a été effectué par un logiciel spécialisé dans l'analyse statistique Sigma Plot 12.5. Les résultats ont été analysés par l'ANOVA à une voie (one way ANOVA). La comparaison des groupes a été réalisée en utilisant le test-T. Les données ont été exprimées en moyennes plus au moins écart types (S.E.) ou plus au moins les erreurs standard

moyenne (S.E.M.) selon le test. Le degré de significativité a été représenté sur chaque graphique par des étoiles quand la comparaison a été effectuée avec le lot témoin.

*** $P < 0.001$ (très significatif)

** $P < 0.01$ (significatif)

* $P < 0.05$ (légèrement significatif)

ns : non significatif

III Résultats

1. Étude de l'activité antinociceptive des extraits de RT

a- Test de contorsions

La réponse nociceptive est représentée par le nombre de contorsions effectuées par l'animal suite à l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique. Dans ce test, tous les extraits testés (1 et 2 g/kg, v.o.) réduisent de façon dose dépendant le nombre de contorsions induites par l'acide acétique (*Figure 58*). Cet effet commence à 30 minutes après l'administration des extraits et persiste tout au long du test. En comparaison avec l'activité de l'Acide Acétyle Salicylique (AAS), c'est l'extrait aqueux (2 g/kg, v.o.) qui a montré une activité antinociceptive maximale et qui peut atteindre 70,78 % d'inhibition de la réaction de l'animal face au stimulus nociceptif chimique (Tableau 23). Tandis que l'effet de l'extrait butanolique (66,85 %) et éthanolique (66,29 %) sont plutôt similaires à celui de l'AAS (66,29 %). L'extrait d'acétate d'éthyle (34,64 %) est très inférieur à celui de l'AAS.

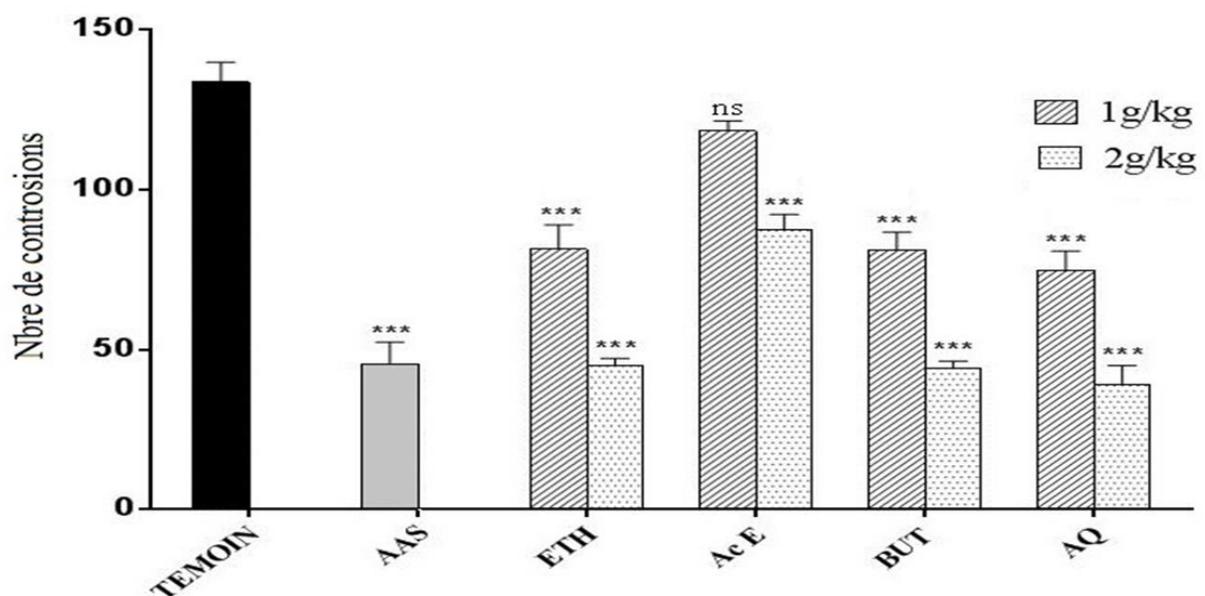


Figure 58: Effet des extraits de RT sur le nombre de contorsions effectuées par la souris après injection de l'acide acétique au test de contorsions. Les extraits (1g/kg et 2g/kg, v.o.) ont été administrés 30 min avant l'injection de l'acide acétique (0.6% ip). **ETH:** extrait éthanolique, **Ac E:** extrait acétate d'éthyle, **BUT:** extrait butanolique, **AQ:** extrait aqueux, **AAS:** acide acétyle salicylique

Tableau 23: Pourcentages d'inhibition de la réponse nociceptive au test de contorsions

Groups	Dose g/kg	Nombre de contorsions Durant 30 min	% d'inhibition
Témoin négatif	-	133,5 ± 6,19	-
Acide acétyle salicylique (témoin positif)	0.2	45 ± 7,24 ^a	66,29
Extrait éthanolique	1	81,25 ± 7,60 ^a	39,13
	2	45 ± 2.19 ^a	66,29
Extrait acétate d'éthyle	1	118,25 ± 3,11 ^{ns}	11,42
	2	87,25 ± 4,92 ^a	34,64
Extrait butanolique	1	81 ± 5,71 ^a	39,32
	2	44,25 ± 2,09 ^a	66,85
Extrait aqueux	1	74,75 ± 5,97 ^a	44,01
	2	39 ± 5,98 ^a	70,78

b- Test de formol

Dans ce test, la réponse nociceptive est représentée par le cumul du temps de léchage de la patte lésée. Les résultats obtenus sont traités selon deux phases : phase précoce qui s'étend de 0 à 5 min et phase tardive qui s'étend de 15 à 30 min.

Durant la phase précoce, les résultats montrent que les extraits éthanolique et butanolique atténuent significativement la réponse nociceptive suite à l'injection intraplantaire du formol. La *figure 59* a montré un effet significatif ($P < 0.001$) de ces deux extraits (2 g/kg) sur le temps de léchage de la patte lésée au cours de cette phase d'inhibition de la réaction de l'animal face au stimulus nociceptif, pour les deux extraits, éthanolique et butanolique à forte dose respectivement (tableau 24). Ces résultats montrent que c'est l'extrait éthanolique qui est le plus puissant suivi de l'extrait butanolique. L'extrait acétate d'éthyle, aqueux et l'Acide Acétyle Salicylique (AAS) ont montré une activité très faible durant cette phase.

Au cours de la phase tardive, les deux extraits (éthanolique, butanolique) aux deux doses (1 et 2 g/kg) testées ont diminué significativement ($P < 0.001$, $P < 0.01$) la réponse nociceptive dans ce test (*Figure .59B*). L'inhibition maximale est obtenue avec l'extrait butanolique à 2

g/kg (69.04 %), suivi de l'extrait éthanolique (Tableau 24). Tandis que les extraits d'acétate d'éthyle et aqueux, ils ont montré une activité très faible durant cette phase.

La *figure 59* montre en plus que durant la phase précoce, l'extrait éthanolique et butanolique ont un effet légèrement supérieur à celui de la morphine et l'AAS. Tandis que durant la phase tardive, l'effet de l'extrait butanolique est plutôt similaire à celui de la morphine. Les résultats ont également montré que durant les deux phases, c'est l'AAS qui présente l'inhibition maximale de la réponse nociceptive (36.85 % durant la phase précoce 74,24 % durant la phase tardive). Une comparaison de la réponse nociceptive des différents extraits testés durant les deux phases montre que ce sont les extraits butanolique et éthanolique qui donnent l'inhibition maximale de la réponse nociceptive la plus élevée presque similaire à la morphine (Tableau 24).

Tableau 24: Effet des extraits de RT sur la sensibilité nociceptive au test au formol

Traitement	% inhibition	
	La phase précoce	La phase tardive
Témoin	-	-
Morphine	33,51	70,61
Acide acétyle salicylique 200mg/kg	36,85	74,24
Extrait éthanolique		
1 /kg	27,74	50,15
2 /kg	59,74	60,87
Extrait acétate d'éthyle		
1 /kg	-9,40	-3,35
2 /kg	3,31	35,03
Extrait butanolique		
1 /kg	5,57	50,27
2 /kg	54,42	69,04
Extrait aqueux		
1 /kg	13,85	35,94
2 /kg	9,84	45,31

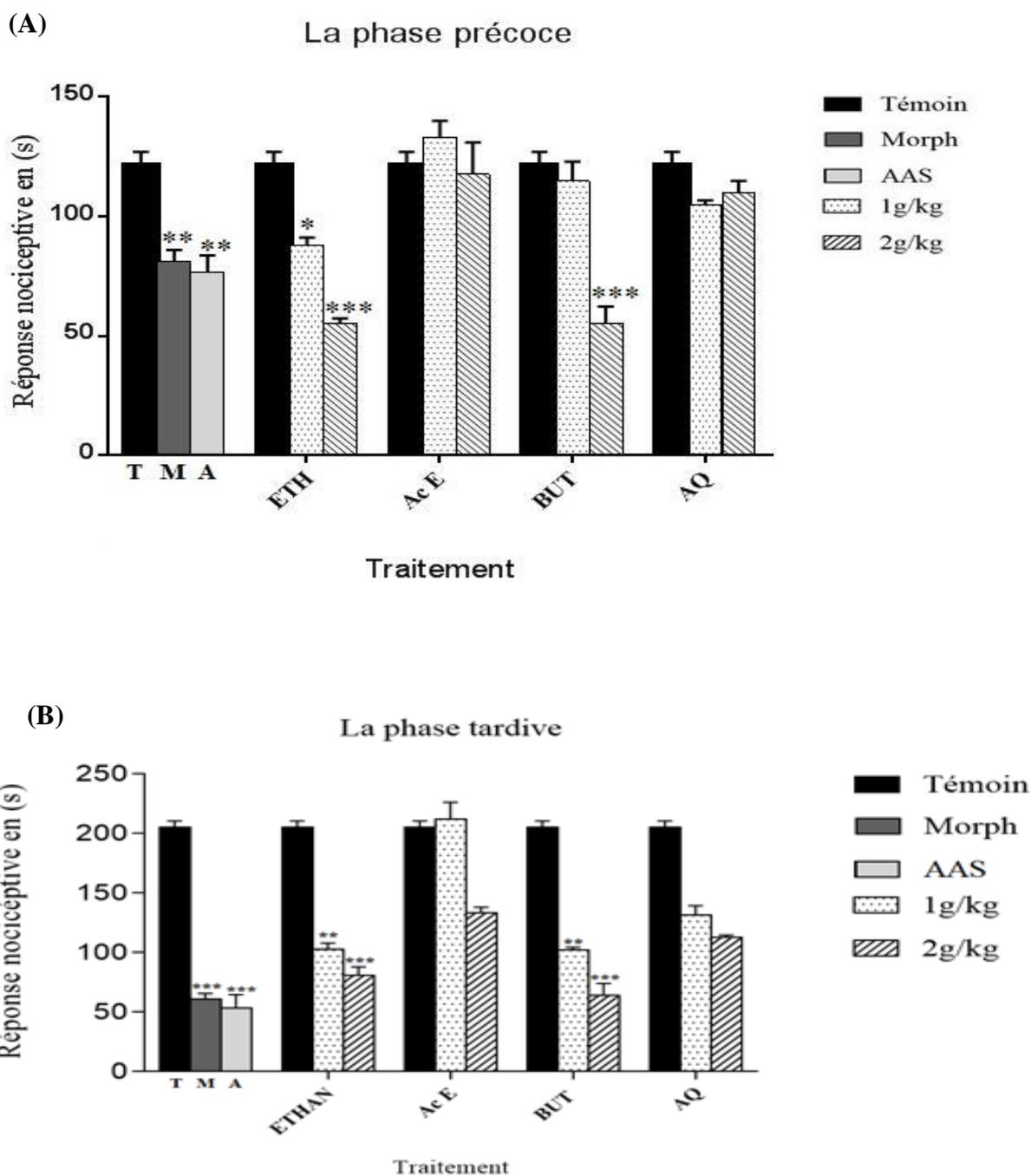


Figure 59: Effet des extraits de RT sur la sensibilité nociceptive au test au formol. Les extraits ont été administrés par voie orale à raison de 1 et 2 g/kg 30 min avant l'injection intraplantaire du formol (2 μ l, 2 %). **ETH**: extrait éthanolique, **Ac E** : extrait acétate d'éthyle, **BUT** : extrait butanolique, **AQ** : extrait aqueux, **AAS** : acide acétyle salicylique, **M**: Morphine

C. Test de la plaque chauffante.

Dans cette expérimentation, nous avons cherché également une éventuelle action des quatre extraits testés sur la sensibilité nociceptive de l'animal. Les résultats obtenus (*Figure 60*) montrent que l'administration orale des extraits butanolique et éthanolique (2 g/kg) ont un effet inhibiteur significatif ($P < 0.001$) sur la sensibilité nociceptive de l'animal au test de la plaque chauffante. En revanche, les autres extraits, aqueux et acétate d'éthyle, n'ont montré aucun effet apparent sur le temps de latence au stimulus nociceptif. Une comparaison de l'effet des extraits montre que l'extrait butanolique est le plus actif ($P < 0.001$). La morphine (10 mg/kg, ip.) utilisée dans cette expérimentation comme un analgésique central augmente très significativement le temps de latence au stimulus nociceptif.

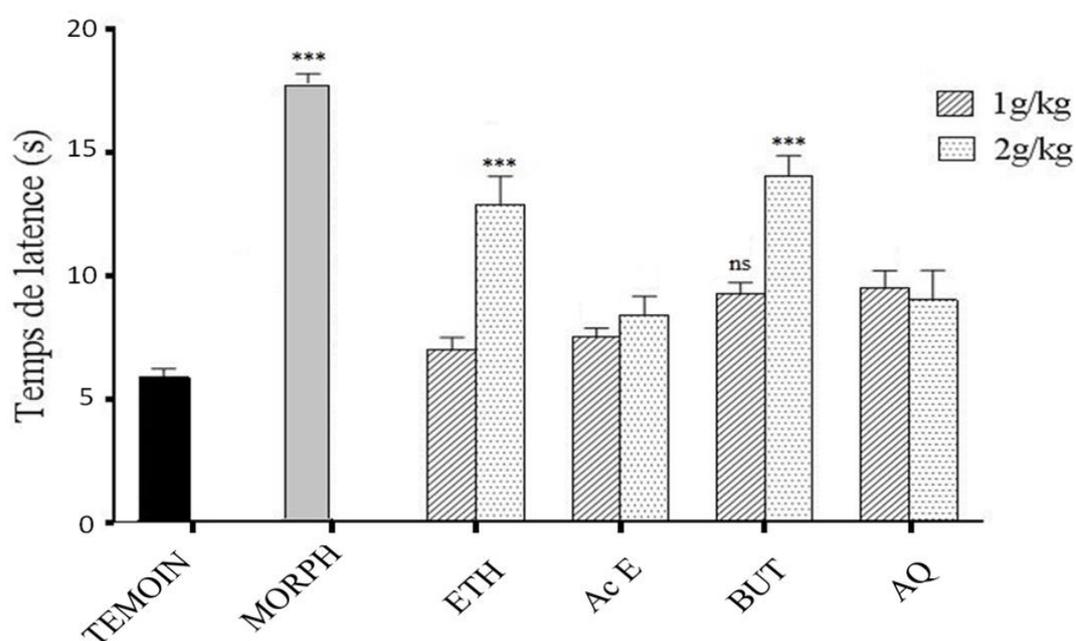


Figure 60: Effet de l'administration orale des extraits de RT sur la réponse Nociceptive de l'animal au test de la plaque chauffante. **ETH:** *extrait éthanolique*, **Ac E:** *extrait acétate d'éthyle*, **BUT:** *extrait butanolique*, **AQ:** *extrait aqueux*, **MORPH :** *Morphine*

2. Étude de l'activité antidépressive des extraits de RT

a. Test de la nage forcée

L'activité antidépressive des extraits de RT est clairement mise en évidence avec le test de la nage forcée qui est une expérience de référence pour les antidépresseurs. La durée d'immobilité observée est considérée comme une mesure de l'état de désespoir comportemental de l'animal. Les résultats obtenus montrent l'existence d'une différence entre le premier jour

(session pré-test) et le deuxième jour (session test) au sein du groupe témoin. Au deuxième jour, il y a une augmentation légère du temps d'immobilisation par rapport au premier. Cela est sans doute dû au fait que les animaux ont appris qu'il ne leur servait à rien de nager encore plus. Ils préfèrent se tenir immobiles avec uniquement le museau hors de l'eau. Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont été rapportés par Porsolt en 1977.

Dans ce test, les extraits éthanolique, acétate d'éthyle, butanolique et aqueux (1 et 2 g/kg, v.o.) de RT réduisent significativement ($P < 0.001$, $P < 0.01$) et de façon dose dépendant le temps d'immobilité chez les souris au cours de la nage forcée (Figure 61). Le traitement antidépresseur (Anafraline, 10 mg/kg, ip) a diminué le comportement d'immobilisation et par conséquent, a entraîné une diminution du désespoir des animaux soumis à ce test. En plus, une comparaison de l'activité des différents extraits testés au cours de ce test montre que les extraits éthanolique, butanolique et aqueux (à une forte dose 2 g/kg) qui donnent l'activité antidépressive maximale, qui est presque similaire à celle de l'Anafraline.

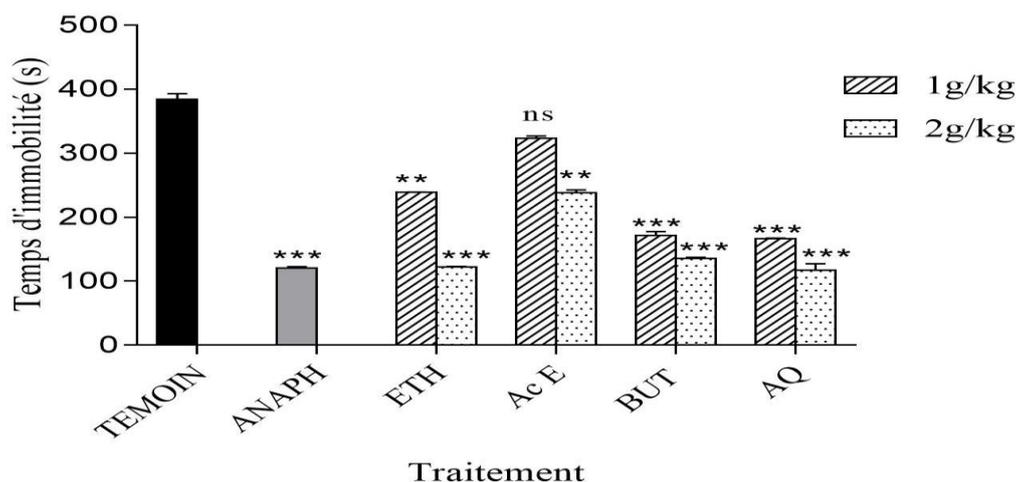


Figure 61: Effet de l'administration orale des extraits de RT sur le temps d'immobilité au test de la nage forcée chez les souris. (Temps d'immobilité pendant les 10 minutes). **ETH:** *extrait éthanolique*, **Ac E :** *extrait acétate d'éthyle*, **BUT :** *extrait butanolique*, **AQ :** *extrait aqueux*, **ANAF :** *Anafralin*.

b. Test de la suspension par la queue

Ce test est basé sur la mesure de la durée des mouvements déployés lors d'une suspension par la queue. Il a été observé que les souris se débattaient au début (les 2 premières minutes) puis finissaient par abandonner en adoptant une posture immobile, ce qui correspond à une situation de dépression chez l'Homme.

Dans ce test, c'est l'extrait éthanolique (2 g/kg, v.o) de RT qui a réduit significativement ($P < 0.05$) le temps d'immobilité chez les souris au cours de la suspension par la queue (Figure 62). Les autres extraits n'ont exhibé aucun effet antidépresseur sur les souris. Le traitement antidépresseur (Anafralin, 10mg/kg, ip) a diminué le temps d'immobilisation et par conséquent, diminuerait le désespoir des animaux soumis à ce test. En plus, une comparaison de l'activité des différents extraits testés dans ce test, montre que c'est l'extrait éthanolique à forte dose (2 g/kg) qui a exhibé l'activité antidépressive maximale, qui est presque similaire à celle de l'Anafraline.

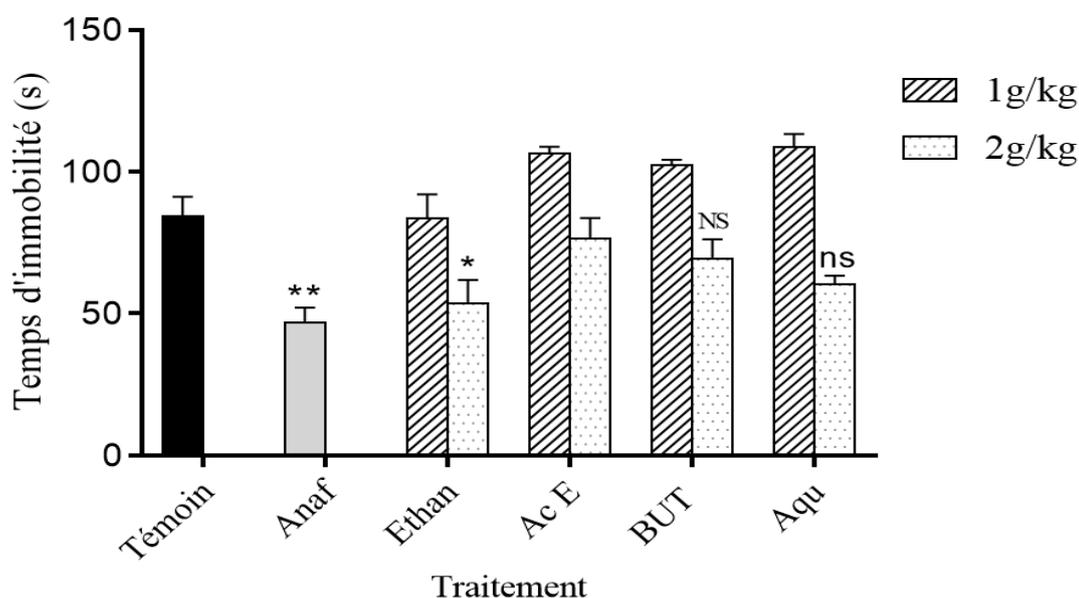


Figure 62: Effet de l'administration orale des extraits de RT sur le temps d'immobilité au test de la suspension par la queue chez les souris. (Temps d'immobilité pendant les 10 minutes). **ETH:** extrait éthanolique, **Ac E :** extrait acétate d'éthyle, **BUT:** extrait butanolique, **AQ:** extrait aqueux, **Anaf :** Anafralin.

IV Discussion

a- Etude de l'activité antinociceptive des extraits des racines de RT

Les résultats obtenus nous conduit à confirmer que les trois extraits éthanolique, butanolique et aqueux de RT (1 et 2 g/kg *v.o*) exercent chez l'animal une activité antinociceptive. Cet effet a été mis en évidence au moyen de trois modèles d'étude de la douleur et de l'analgésie.

Le test de contorsion que certains auteurs considèrent comme un modèle de la douleur viscérale du fait que la douleur induite dans ce test est similaire à une péritonite (Le Bars *et al.*, 2001), est fréquemment utilisé pour tester l'activité antinociceptive. Malgré cela, ce test est peu spécifique et plusieurs substances non analgésiques à savoir les myorelaxants, les antihistaminiques, les antidépresseurs peuvent avoir un effet positif (Yeh, 1985; Takahachi et Paz, 1987). Dans ce test, nos résultats ont montré que les quatre extraits, éthanolique, butanolique, acétate d'éthyle et aqueux doses dépendant atténuent très significativement ($P < 0.001$) la douleur induite par l'acide acétique. En comparaison avec l'activité de l'Acide Acétyle Salicylique (AAS), c'est l'extrait aqueux qui a montré une activité antinociceptive maximale face au stimulus nociceptif chimique. Tandis que l'effet des extraits butanolique et éthanolique ont un effet similaire à celui de l'AAS. Il semblerait donc que les quatre extraits de RT agissent au niveau périphérique pour produire leur activité antalgique.

Dans le test au formol, qui est un modèle sensible aux différentes classes des analgésiques (Dubuisson et Dennis, 1977; Hunskaar et Hole, 1987), nos résultats ont montré que les extraits éthanolique et butanolique réduisent significativement la réponse nociceptive dans les deux phases du test. Alors que les extraits acétate d'éthyle et aqueux agissent surtout au cours de la phase tardive à une forte dose (2g/kg). Durant la phase précoce, l'extrait éthanolique et butanolique ont un effet légèrement supérieur à celui de la morphine et l'AAS. Tandis que durant la phase tardive, l'effet de l'extrait butanolique est plutôt similaire à celui de la morphine.

Dans ce modèle, la sensibilité nociceptive au cours de la phase précoce serait due à une activation directe des fibres sensorielles C par le stimulus nocif (Heapy *et al.* 1987). La douleur de la phase tardive serait surtout due à un processus généré par le tissu inflammatoire périphérique combiné à des changements fonctionnels dans la corne dorsale de la moelle épinière (Dickenson et Sullivan, 1987 ; Dalal *et al.*, 1999). Ces changements peuvent être associés à la modulation de quelques neuromédiateurs (Malmberg et Yaksh, 1993). Dans ce sens, certains travaux ont montré que les analgésiques qui agissent au niveau central tel que les narcotiques (morphine) inhibent la réponse nociceptive au cours des deux phases du test. En

revanche, les analgésiques qui ont une action plutôt périphérique (AAS) réduisent la réponse nociceptive surtout au cours de la phase tardive (Shibata *et al.*, 1989). Cela nous conduit à supposer que les extraits butanolique et éthanolique qui ont une activité antinociceptive significative au cours des deux phases du test au formol agiraient au niveau central alors que l'extrait acétate d'éthyle et aqueux qui ne sont efficace qu'au cours de la phase tardive auraient plutôt un mécanisme d'action périphérique.

Dans le test de la plaque chauffante, modèle central sélectif pour les analgésiques opioïdiques (Abbott et Melzack, 1982), nous avons étudié l'effet antinociceptif des extraits éthanolique, acétate d'éthyle, butanolique et aqueux (2g/kg, v.o) en utilisant la morphine (10 mg/kg, *i.p*) comme analgésique opioïdique de référence. Les résultats de ce test ont révélé que le traitement par les extraits éthanolique et butanolique exercent une forte activité antinociceptive chez l'animal confirmant une fois de plus l'effet analgésique central de ces extraits.

A l'issue des résultats obtenus dans ces différents modèles, nous pouvons déduire que tous les extraits possèdent une activité antinociceptive. L'extrait acétate d'éthyle et aqueux ont un effet similaire à celui de l'AAS, ils agiraient au niveau périphérique probablement en interférant avec le processus inflammatoire tandis que les extraits éthanolique et butanolique pourraient agir à la fois aux deux niveaux, périphérique et central. Il paraît également, que cette activité dépendrait d'au moins deux composés chimiques (ou deux groupes différents de composés) avec deux mécanismes d'action distincts. Le premier groupe de composés agirait par l'intermédiaire d'un mécanisme opioïdique et Le deuxième groupe de composés agirait au niveau périphérique en interagissant avec la réaction inflammatoire. En plus, Ces résultats ont révélé également que les extraits éthanolique et butanolique sont les plus actifs et exercent une forte activité antinociceptive chez l'animal au moyen de trois modèles d'étude de la douleur et de l'analgésie. Selon des études antérieure et similaire à notre étude, il a été rapporté que certaines plantes médicinales comme le thym (*T. broussonetii*, *T. satureioides* et *T. willdenowii*) et *Peganum harmala* exercent un effet antinociceptive similaire a celui de RT (Elhabazi *et al.*, 2006 ; Farouk *et al.*, 2008).

Afin de mieux comprendre quelles sont les molécules bioactives qui actent comme des antagonistes analgésiques, contenant dans les extraits de RT. Nous avons réalisé une identification phytochimique par *HPLC* sur les quatre extraits de RT. L'analyse chromatographique a révélé sur la présence de 9 composés polyphénoliques qui sont: la vanilline, acide syringique, acide rosmarinique, catéchine, acide cinnamique, tyrosol, acide

férulique, acide retinique et quercétine. Ce sont les extraits éthanolique et butanolique qui contiennent une concentration importante de la vanilline, l'acide rosmarinique et la quercétine. Dans ce sens, Il a été rapporté dans la littérature que la vanilline possède une activité antinociceptive, qui pourrait être due à l'implication des récepteur opioïde et α_2 -adrénergique (Park *et al.*, 2009) d'autres études ont rapporté que L'excitation répétée des neurones nociceptifs par des agonistes comme les vanilloïdes induit une désensibilisation du récepteur/canal TRPV1 (*transient receptor potential vanilloïde 1*), durant laquelle les récepteurs ne répondent plus à aucun stimulus.(Robbins *et al.*, 1998 ; Niazi *et al.*, 2014); Boonyarikpunchai ont récemment montré que l'acide rosmarinique possède une activité anti-inflammatoire et anti-nociceptive impliquant aussi la stimulation des récepteurs vanilloïdes (TRPV1), les voies de la phospholipase C (PLC) et de la protéine kinase C (PKC) (Boonyarikpunchai *et al.*, 2014).

Par ailleurs, Anjaneyulu et Chopra, (2003) ont rapporté que la quercétine possède une activité anti-nociceptive et anti-inflammatoire due à l'implication du système opioïde, d'autre études ont montré que l'effet anti nociceptif de la quercétine pourrait être médier par l'activation du système adrénergique (α_2 récepteur) et le système GABA (Kaur *et al.*, 2005. Filho *et al.*, 2008).

Il est généralement connu que l'effet analgésique des opioïdes est basé sur une action centrale spinale et supraspinale. L'effet spinal des opioïdes s'exerce par l'activation des récepteurs μ et δ , aboutit au niveau présynaptique à une diminution de l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant ce qui conduit à une diminution de la libération des neurotransmetteurs excitateurs et l'inhibition de la transmission synaptique. Au niveau post-synaptique, l'activation des récepteurs α_2 (alpha-2) qui sont couplés à une protéine G_i (G inhibitrice) inhibent l'adénylate cyclase (AC), par conséquence diminue la concentration intracellulaire d'AMP cyclique (AMPC) et donc l'activité de la protéine kinase A (PKA) AMPC-dépendante. Le taux d'AMP cyclique et facilite l'ouverture des canaux potassiques conduisant à une hyperpolarisation. Au niveau supraspinale, les opioïdes bloquent les influences inhibitrices qu'exerce le GABA sur le système inhibiteur descendant (Vaughan *et al.*, 1999, 2000). Le mécanisme par lequel RT produit un effet antalgique n'est pas encore bien élucidé. Ainsi, nous pouvons suggérer que les molécules bioactives contenant dans cette plante (à effets analgésique périphérique et central), expliquerait sa grande activité et son efficacité par rapport à l'AAS dans le soulagement de certaines douleurs.

En fin, cet ensemble de résultats permet de mettre en évidence l'activité analgésique des extraits éthanoliques, acétate d'éthyle, butanolique et aqueux, de RT. De ces quatre extraits, c'est l'extrait éthanolique qui est le plus actifs et le plus puissant. Le mode d'action de cet extrait impliquerait un mécanisme opioïdergique comparable à celui de l'analgésique opioïdergique de référence employé dans nos expérimentations (la morphine).

b- Etude de l'activité antidépressive des extraits des racines de RT

Vue les résultats fort important obtenus dans la partie précédente, nous avons cherché à compléter le tableau pharmacologique des extraits éthanolique, butanolique, acétate d'éthyle et aqueux chez l'animal. Cet effet a été mis en évidence au moyen de deux modèles animal de dépression : le test de la nage forcé et la suspension par la queue. La durée d'immobilité observée est considérée comme une mesure de l'état du désespoir comportemental de l'animal. Le test de la nage forcée « test du comportement du désespoir », décrit par Porsolt *et al.*, 1977, a suscité beaucoup d'intérêt et se trouve actuellement comme l'un des tests très utiles pour le « screening » des antidépresseurs (Borsini et Meli, 1988). Ce test simple repose sur les constatations suivantes: un animal, placé dans un cylindre rempli d'eau, dont il ne peut s'échapper, nage pendant un certain temps, puis adopte une attitude immobile très particulière. Il surnage et flotte, mais ne bouge plus. La plupart des antidépresseurs restaurent la nage. Les auteurs du test attestent qu'au bout d'un certain temps, l'animal se résigne à l'évidence que nager ne lui sert plus à rien (désespoir), ce qui expliquerait ce comportement d'immobilité. L'administration d'antidépresseurs viendrait corriger cette conception pessimiste, autorisant une reprise de l'activité. Sans pouvoir vérifier cette conception, il faut reconnaître que presque tous les antidépresseurs modifient le comportement de l'animal dans ce test. Ceci se traduit au niveau expérimental par la diminution du temps d'immobilité de l'animal au cours du comportement de nage forcée. Les résultats obtenus montrent que l'administration par voie oral des extraits éthanolique, butanolique, et aqueux (1 et 2 g/kg) atténuent très significativement et de manière dose-dépendante le temps d'immobilité au cours de la nage forcée. Cet effet est en accord avec ce qui a précédemment été cité concernant l'effet des substances à effet antidépresseur. En comparaison avec l'activité de l'imipramine utilisée comme contrôle positif (antidépresseur), c'est l'extrait éthanolique et butanolique qui ont montré une activité antidépresseur maximale au test de la nage forcée. Tandis que l'effet de l'extrait acétate d'éthyle est très inférieur à celui de l'imipramine.

Dans le test de la suspension par la queue qui est un test basé sur la mesure de la durée des mouvements déployés lors de la suspension par la queue, nous avons observé que les souris se débattaient au début puis finissaient par abandonnée, en adoptant une posture immobile, ce qui correspond à une situation de dépression chez l'Homme. Les extraits butanolique, acétate d'éthyle et aqueux n'ont exhibé aucun effet antidépresseur sur les souris, à part l'extrait éthanolique a une forte dose qui a présenté une activité antidépressive significative ($P < 0.05$) plus au moins similaire à l'*anafraline*® (antidépresseur). Le test de la suspension par la queue est largement utilisé pour évaluer les propriétés antidépressives de nouvelles molécules, car il détecte un large éventail d'antidépresseurs, tels que les antidépresseurs tricycliques, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, les inhibiteurs de la monoamine oxydase et même les antidépresseurs atypiques (Ebrahimzadeh *et al.*, 2010).

La comparaison des résultats obtenus dans les deux tests démontre bien une meilleure activité antidépressive pour le test de la nage forcé. Les différents résultats obtenus dans les deux tests peuvent être attribués à plusieurs facteurs. Entre autres leurs variabilités, en réponse à certains antidépresseurs indiquant potentiellement différents mécanismes pharmacologiques médian la performance dans ces deux tests (Bai *et al.*, 2001), le spectre de la sensibilité pharmacologique des deux tests qui est différent (Cryan *et al.*, 2005). Troisièmement, le test de la suspension par la queue a de nombreux avantages par rapport au test de la nage forcée, y compris l'absence d'effets hypothermiques induit par l'eau, la possibilité de tester des souris pouvant avoir des déficits moteurs qui rendent la natation difficile, et une sensibilité accrue à une plus large gamme de composés antidépresseurs (Carr et Lucki, 2011). Pour mieux comprendre l'effet pharmacologique exhibé par RT sur l'activité antidépressive, nous avons réalisé une caractérisation phytochimique des molécules bioactives contenant dans les extraits éthanolique et butanolique. L'identification a révélé la présence des polyphénols comme la vanilline, l'acide rosmarinique, la catechin et la quercitine. Plusieurs études vantent les propriétés antidépressives de ces molécules bioactives. Samad *et al.*, (2018) ont montré que la quercétine pouvait prévenir l'altération des enzymes antioxydants, réguler la neurotransmission sérotoninergique et cholinergique et produire un effet anxiolytique, antidépresseur. D'autres études ont indiqué que la vanilline pourrait soulager les symptômes dépressifs dans le modèle de dépression chronique chez le rat par la voie olfactive. L'analyse préliminaire des neurotransmetteurs de la monoamine a révélé que la vanilline élevait les taux de sérotonine et de dopamine dans le tissu cérébral. Cela suggère que la vanilline pourrait être un agent pharmacologique potentiel pour le traitement du trouble dépressif majeur (Xu *et al.*, 2015).

Quant à la catechin, il a été démontré par des études antérieures que la catechin pourrait inhiber l'absorption de la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline par les synaptosomes dans différentes régions du cerveau (Rocha *et al.*, 2007). Cela nous laisse suggérer que les composés responsables en grande partie de l'activité antidépressive de RT seraient les polyphénols et les flavonoïdes.

La dépression est un syndrome très complexe, les chercheurs ne sont pas d'accord sur tous les aspects le concernant. Ce phénomène implique un tel nombre de neurotransmetteurs et de mécanismes que plusieurs familles d'antidépresseurs existent déjà, et de nouvelles molécules continuent de voir le jour. D'une manière assez simpliste, on peut dire que les traitements antidépresseurs actuels agissent sur les principaux neurotransmetteurs soupçonnés être impliqués dans la dépression. Les monoamines (sérotonine, adrénaline et noradrénaline) et le GABA sont les principales molécules incriminées dans l'apparition des troubles anxieux, bien qu'on sache qu'il en existe d'autres d'importance discutable.

Les antidépresseurs agissant sur les monoamines vont soit bloquer la recapture des neurotransmetteurs, ou bien, ils vont inhiber l'action de la MAO (a et b) (Dorosz, 1998), qui est l'enzyme de dégradation des monoamines. Le résultat pour ce type de traitement est le même, est-ce que ça consiste à augmenter la biodisponibilité du transmetteur dans l'espace inter synaptique, ce qui a pour effet d'augmenter son action. La deuxième famille d'antidépresseurs connus c'est : les benzodiazépines. Ces molécules ont une affinité au GABA. Leur mode d'action consiste en une augmentation de l'affinité du GABA pour ses récepteurs et provoquent ainsi une augmentation de la perméabilité de la membrane des cellules nerveuses au chlore (Purves *et al.*, 2000). Il s'en suit une diminution de l'excitabilité de la cellule nerveuse, ce qui a pour conséquence de tranquilliser l'animal (Lullmann *et al.*, 1991).

Les résultats obtenus nous permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle les polyphénols de RT exerceraient leur activité antidépressive-like via un ou plusieurs mécanismes, soit en inhibant la recapture des neurotransmetteurs, augmentant ainsi leur concentration au niveau de l'espace inter-synaptique et/ou en inhibant des enzymes comme la MAOa et la MAOb, ou bien en interagissant avec le système GABAérgique.

Conclusion générale et perspectives

Nous constatons un regain d'intérêt pour l'utilisation des plantes médicinales depuis quelques années. Plusieurs raisons favorisent cela. Comme principales causes, nous pouvons citer les nombreuses vertus curatives des plantes ainsi que leur mode d'action. Les principes actifs des plantes agissent en douceur et en profondeur sans agresser l'organisme. Ils le stimulent et renforcent ses défenses immunitaires.

Dans ce cadre, nous nous sommes particulièrement intéressés à RT, une plante utilisée pour le traitement des atteintes hépatiques et le syndrome anémique. L'objectif principal de notre travail a été double : Mettre en évidence les vertus thérapeutiques de la plante et apporter à travers des études pharmacologiques la preuve scientifique de l'efficacité de ses principes actifs afin d'en faire un usage rationnel en médecine conventionnelle.

Nous avons opté au début de cette étude à effectuer une enquête ethnopharmacologique sur l'utilisation traditionnelle de RT auprès des herboristes, tradithérapeutes et des femmes au foyer de la ville de Marrakech et de ses environs. A l'issue de cette étude, nous avons collecté des données ethnopharmacologiques, pharmacognosiques, pharmacologiques et finalement toxicologiques. Ces données constituent une source d'information importante à exploiter pour l'élaboration d'une pharmacopée nationale des plantes médicinales marocaines.

Dans un second temps nous avons réalisé une étude phytochimique qualitative et quantitative pour avoir une approche phytochimique les différents composants chimiques présents dans les extraits de RT. La caractérisation phytochimique nous a permis d'identifier neuf composés phénoliques qui sont : la vanilline, l'acide rosmarinique, l'acide cinnamique, la quercétine, la catéchine, l'acide syringique, l'acide rétinique, l'acide férulique et la tyrosole. Ce qui est essentiellement important pour l'évaluation des propriétés pharmacologiques de la plante.

Si la caractérisation phytochimique est indispensable pour bien accomplir toute investigation pharmacologique des extraits d'origine végétale, une étude de toxicité n'en demeure pas de moindre importance. Il s'agit là, de déterminer la toxicité aiguë de l'extrait ainsi

que la marge thérapeutique. C'est une étape indispensable à l'utilisation de toute substance à des fins thérapeutiques. Dans ce sens, nos résultats ont montrés que l'extrait éthanolique de RT est dépourvu de tout effet toxique chez les souris même à une dose maximale de 5g/kg. Notre intérêt s'est porté également sur l'étude de la toxicité subaiguë afin de déterminer l'effet toxique à long terme et aussi chercher la DL₅₀.

Ainsi donc, c'est en tenant compte des différents éléments précités ci-dessous qu'on pourrait mettre au point une expérimentation pharmacologique fiable. Dans cette partie, les travaux réalisés ont consistés à étudier l'activité antioxydante, l'activité hépato-protectrice, l'activité anti-urolithiasique, l'activité antiagrégante plaquettaire, l'activité analgésique et finalement l'activité antidépressive.

Les extraits de la plante sont généralement utilisés à l'état brut. C'est pourquoi nous avons utilisé des doses élevées pour nos tests comparativement au produit de référence. Pour pallier à cela dans l'avenir, il est préférable d'isoler les principes actifs des différents extraits de la plante et de les présenter sous une forme galénique acceptable.

L'ensemble des résultats, suite à des tests pharmacologiques semble indiquer que les extraits butanolique et éthanolique de RT ont exhibé pour leur part, un pouvoir antioxydant très important contrairement aux extraits aqueux et acétate d'éthyle qui n'ont pas montrés d'effet important pour cette activité. En outre, l'extrait éthanolique de RT a montré qu'il exerce plusieurs effets bénéfiques tels que : activité anti-nociceptive, et antidépressive, antilithique et enfin hépato-protectrice. Quant à l'extrait butanolique, il présente une activité antiagrégant plaquettaire très importante *in vitro* et *ex vivo* chez l'animal et *in vitro* chez l'Homme. L'importance des différents effets pharmacologiques exhibés par les différents extraits de la plante, montre bien une certaine inter-potentialisation et une synergie d'action entre ses constituants actifs.

Enfin, les résultats obtenus peuvent justifier l'utilisation traditionnelle marocaine de RT, cet usage devrait se faire sous contrôle des doses à prendre.

En perspective, d'autres études s'imposent pour l'explication des différents mécanismes d'action intervenant dans les activités biologiques testées. Certes, cette étude ne s'arrêtera pas dans ce stade car il reste énormément d'activités biologiques à tester ainsi le travail doit s'orienter vers l'étude des principes actifs de la plante sur toutes les activités déjà étudiées et

celle que nous n'avons pas encore testé toute en tenant en considération leurs études toxicologiques

Références bibliographiques

- Aafi A., Fechtal M., Taleb M. S. (2002).** Espèces remarquables de la flore du Maroc. *MCEF, DREF*. 146
- Abbott F.V., Melzack R. (1982).** Brainstem lesions dissociated neural mechanisms of morphine analgesia in different kinds of pain. *Brain Research*, 251, 149-155.
- Aboufatima R., Chait A., Dalal A., Ziyad A., De Beaurepaire R. (2002).** Antinociceptive effects of single and repeated intra-cerebro-ventricular and intra-peritoneally injections of CT evaluated by tail flick test in rats and writhing test in mice. *Reviews in biology and biotechnology*, 2, 38-43.
- Afzal M., Khan A., Ghufraan A., Iqbal A., Inamuddin M. (2004).** Diuretic and nephroprotective effect of Jawarish Zarooni Sada polyherbal unani formulation. *Journal of ethnopharmacology*, 91 (2-3), 219-223.
- Agarwal K., Varma R. (2015).** Ethnobotanical study of antilithic plants of Bhopal district. *Journal of ethnopharmacology*, 174, 17-24.
- Akbar B.S., Maheswarajah A., PrasadaRao U.J.S. (2017).** Antioxidant profile, acetylcholinesterase inhibition, and platelet aggregation of polyphenols and proteins from germinating green gram (*Vigna radiata*). *Int. J. Food Prop*, 20, 959–971.
- Akkarachiyasit S., Charoenlertkul P., Yibchok-anun S., Adisakwattana S. (2010).** Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *International journal of molecular sciences*, 11 (9), 3387-3396.
- Almeida T.F., Roizenblatt S., Tufik S. (2004).** Afferent pathways: a neuroanatomical review. *Brain research*, 1000, 40-56.
- Alreja M., Mutalik P., Nayar U., Manchanda S.k. (1984).** The formalin test: a tonic pain model in the primate, *Pain*, 20, 97-105.
- Alsarhan Ali. (2013).** Effet antibactérien des extraits des racines de garance. *European Scientific Journal*, 9(15), 241-254.
- Al-Snafi A.E. (2015).** The chemical constituents and pharmacological effects of *Ammanniacumbaccifera*-A review. *International Journal of Pharmacy*. 5 (1), 28-32.
- Amengual-Cladera E., Nadal-Casellas A., Gómez-Pérez Y., Gomila I., Prieto R. M., Proenza A.M., Lladó I. (2011).** Phytotherapy in a rat model of hyperoxaluria: the

- antioxidant effects of quercetin involve serum paraoxonase1 activation. *Exp Biol Med*, 236 (10), 1133-8
- American Psychiatric Association. (1994).** Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed.). *Washington*, DC: Author.
- Amirou A., Bnouham M., Legssyer A., Ziyat A., Aziz M., Berrabah M., Mekhfi H. (2018).** Effects of Juglansregia Root Bark Extract on Platelet Aggregation, Bleeding Time, and Plasmatic Coagulation: in Vitro and Ex Vivo Experiments. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018.
- André J., Becker C.H., Zeau B., Le Bars D., Hamon M., Cesselin F., Benolil J.J. (2008).** - Relations entre pathologies psychiatriques et douleur: une approche chez l'animal. *Douleur et Analgésie*, 16 (1), 29-36.
- Anjaneyulu, M., Chopra, K.(2003).** Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 27, 1001–1005.
- Asberg M., Thoren P., Traskaman L. Bertilsson L. Ringbergr V., (1976).** “Serotonin depression” A biochemical subgroup within the affective disorders. *Science*, 191, 478-480.
- Atmani F., Slimani Y., Mimouni M., Aziz M., Hacht B et Ziyat A., (2004).** Effect of aqueous extract from *Herniaria hirsuta* L. on experimentally nephrolithiasic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 95 (1), 87-93.
- Atmani F., Slimani Y., Mimouni M., Hacht B., (2003).** Prophylaxis-of calcium oxalate stones by *Herniaria hirsuta* on experimentally induced nephrolithiasis in rats. *BJU International*, 92, 137–140.
- Austin M.P., Mitchell P., Goodwin G.M., (2001).** Cognitive deficits in depression: Possible implications for functional neuropathology. *The British Journal of Psychiatry*, 78, 200-206.
- Bai F., Li X., Clay M., Lindstrom T., Skolnick P. (2001).** Intra- and interstrain differences in models of “behavioral despair”. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 70 (2-3): 187-192.
- Balla T.(2006).** Phosphoinositide-derived messengers in endocrine signaling. *J Endocrinol*, 188 (2), 135-153.

- Barbey F., Joly D., Rieu P., Mejean A., Daudon M., Jungers P. (2000).** Medical treatment of cystinuria: critical reappraisal of long-term results. *The Journal of urology*, 163 (5), 1419-1423.
- Bashir S., Gilani AH. (2009).** Antiurolithic effect of *Bergenia ligulata* rhizome: an explanation of the underlying mechanisms. *Journal of ethnopharmacology*. 122 (1), 106-116.
- Bataller R., Brenner D. A. (2005).** Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 115 (2), 209-218.
- Bayes M., (1997).** Contribution à l'activité anti-inflammatoire de la pulpe de *balanites aegyptica*. L (Zygophyllaceae). *Thèse de pharmacie*. Bamako , Mali, 67.
- Becker C., Zeau B., Benoliel J.(2007).** Dépression, anxiété et douleurs: de nouvelles cibles thérapeutiques. *Douleurs*, 8 (3), 152-157.
- Bellakhdar J. (1978).** Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-saharienne. *Techniques Nord-Africaines*, 332, 302-303.
- Bellakhdar J. (1997).** La pharmacopée marocaine (Médecine arabe et ancienne et savoirs populaires). *Edit. Ibis Press, Saint Etienne*, 529-530.
- Bellakhdar J. (2006).** Plantes médicinales au Maghreb et soins de base: précis de phytothérapie moderne. *Eds Le Fennec*.
- Benchaabane A., Abbad A. (1994).** Contribution A L'etude Ethnobotanique De La Region De Marrakech (Maroc). Les Plantes Medicinales Commercialisees A Marrakech. *Al-Biruniya*, 10 (2), 79-107.
- Bener M., Özyürek M., Güçlü K. (2010).** Polyphenolic contents of natural dyes produced from industrial plants assayed by HPLC and novel spectrophotometric methods. *Industrial crops and products*, 32 (3), 499-506.
- Benlamdini N., Elhafian M., Rochdi A., Zidane L. (2014).** Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haut Atlas oriental (Haute Moulouya). *Journal of applied biosciences*, 78(1), 6771-6787.
- Bentahar B. (2016).** Evaluation ethnobotanique des potentialités thérapeutiques de *Ptychotis verticillata*. *Thèse de pharmacie*, Faculté De Médecine Et De Pharmacie, Université Mohamed V, Rabat. N°89.
- Bernal W. (2003).** Changing patterns of causation and the use of transplantation in the United Kingdom. *In Seminars in liver disease*, 23 (3), 227-238.
- Berteau P., Claude N. L. C. (1971).** *Revue Médicales Normandes*. 10, 7-33.
- Besson J.M. (1997).** The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. *Drugs*, 2, 1-9.

- Bhaskar S., Shalini V., Helen A. (2011).** Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF- κ B signaling pathway. *Immunobiology*, 216 (3), 367–373.
- Blache D. (1992).** Structure et fonctions des plaquettes sanguines. *Arch. Int. Physiol. Bio. Biophys*, 100, 17-24.
- Blachley J. D., Hill J. B. (1981).** Renal and electrolyte disturbances associated with cisplatin. *Annals of internal medicine*. 95 (5), 628-632.
- Bollée G., Dollinger C., Boutaud L., Guillemot D., Bensman A., Harambat J., Ceballos-Picot I. (2010).** Phenotype and genotype characterization of adenine phosphoribosyl-transferase deficiency. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21: 679 - 688.
- Boneu B., Cazenave J. P. (1997).** Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. 2ème édition révisée. *Boehringer Ingelheim France*, 8-15.
- Boonyarikpunchai W., Sukrong S., Towiwat P. (2014).** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 67-73.
- Borsini, F., & Meli, A. (1988).** Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?. *Psychopharmacology*, 94(2), 147-160.
- Brambilla F., Smeraldi E., Sachetti E., Negri F., Cochi D., Muller E.F., (1978).** Deranged anterior pituitary responsive to hypothalamic hormones in depressed patients. *Arch. Gen. Psychiat.*, 35, 1231-1238.
- Brooks J., Tracy I., (2005).** From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *J. Anat.*, 207, 19-33.
- Broos K., Feys H. B., De Meyer S.F., Vanhoorelbeke K., Deckmyn H. (2011).** Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* 25 (4), 155–167.
- Brunner L.S., Smeltzer S.C., Bare B., Suddarth D.S., (2006).** Soins infirmiers en médecine et en chirurgie: 4. Fonctions rénale et reproductrice Volume 4 de Soins infirmiers en médecine et en chirurgie. *Lillian S Brunner. Ed 2, De Boeck Université.* (5-6), 108.
- Burits M., Asres K. et Bucar F. (2001).** The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. *Phytotherapy Research*, 15(2), 103-108.
- Burnett A.R., Thomson R.H. (1968).** “Naturally occurring quinones. Part XV. Biogenesis of the anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. (madder)”. *Journal of the Chemical Society*, 2437-2441.

- Byun E.B., M.S. Yang, H.G. Choi, N.Y. Sung, D.S. Song, S.J. Sin, E.H. Byun. (2013).** Quercetin negatively regulates TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide through Tollip expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 431, 698–705.
- Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. (2004).**Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 74 (17), 2157-84.
- Calabrese V., Cornelius C., Dinkova-Kostova A. T., Calabrese E.J., Mattson M. P. (2010).** Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders. *Antioxidants & redox signaling*, 13 (11), 1763-1811.
- Cardon D. (2001).** Le monde des teintures naturelles. *Paris Belin*, 586.
- Carr G.V., Lucki I. (2011).** The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. *Psychopharmacology*, 23 (2-3), 265–287.
- Carroll B.J., (1978).** Neuroendocrine function in psychiatric disorders. In *Psychopharmacology: A generation of Progress*.
- Castaing D., Veilhan L. A. (2006).**Anatomie du foie et des voies biliaires. *Liver and biliary tract anatomy Techniques chirurgicales-Appareil digestif*, 740-760.
- Chait A. (1996).** Effets comportementaux de la calcitonine et du ketoprofène implication possible de la calcitonine dans la dépression?. Thèse de Doctorat d'état. Université Cadi Ayyad Marrakech50.
- Chang H. Y., Peng W. H., Sheu M. J., Huang G. J., Tseng M. C., Lai M. T., Ho Y. L., Yuan S. C. (2007).**Hepatoprotective and Antioxidant Effects of Ethanol Extract from *Phellinus merrillii* on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage. *Americ J of Chin Med*, 35 (5), 793–804.
- Chapado L., Linares-Palomino P.J., Salido S., Altarejos J., Rosado J.A., Salido G.M. (2010).** Synthesis and evaluation of the platelet antiaggregant properties of phenolic antioxidants structurally related to rosmarinic acid. *Bioorg. Chem*, 38 (3): 108–114.
- Charles A.C., Hales T.G., (2004).** From inhibition to excitation: functional effects of interaction between opioid receptors. *Life Sciences*, 76, 479-85.
- Chaussy C., Fuchs, G. (1986).** La lithotripsie extracorporelle dans le traitement de la lithiase rénale: cinq années d'expérience. *Journal d'urologie*, 92 (6), 339-343.

- Collège Enseignants Neurologie. (2005).** Neurologie, Abrégés. Connaissances et pratique. *Elsevier Masson, Paris*, 304.
- Cox B.M. (1982).** Endogenous opioid peptides: a guide to structures and terminology. *Life Sciences*, 31, 1645-1658.
- Cryan J.F., Valentino R.J., Lucki I. (2005).** Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29 (4-5), 547-569.
- Culpeper N. (2006).** Culpeper's complete herbal & English physician. *Applewood Books*.
- Dalal A., Tata M., Allegre G., Gekiere F., Bons N., Albe-Fessard D., (1999).** Spontaneous activity of rat dorsal horn cells in spinal segments of sciatic projection following transections of sciatic nerve or of corresponding dorsal roots. *Neuroscience*, 94, 217-228.
- Dallel R., Villanueva L., Woda A., Voisin, D. (2003).** Neurobiology of trigeminal pain. *Medical Science*, 19, 567-74.
- Daniel E. M., Ratnayake S., Kinstle T., Stoner G. D. (1991).** The effects of pH and rat intestinal contents on the liberation of ellagic acid from purified and crude ellagitannins. *Journal of natural products*, 54 (4), 946-952.
- Dantchev N., Widlocher D.J. (1998).** The measurement of retardation in depression. *J. Clin.Psychiatry.*, 59 (14), 19-25.
- Dantzler W. H. (1992).** Comparative physiology of the kidney. *Handbook of Physiology. Renal Physiology*, 415-474.
- Danziger N., Weil-Fugazza J., Le Bars D., Bouhassira D., (1999).** Alteration of descending modulation of nociception during the course of monoarthritis in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 19, 2394-2400.
- Daoudi A., Bammou M., Zarkani S., Slimani I., Ibijbijen J., Nassiri L. (2016).** Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la commune rurale d'Aguelmouss province de Khénifra (Maroc). *Phytothérapie*, 14 (4), 220-228.
- Daudon M. (1993).** Comment analyser un calcul et comment interpréter le résultat. *L'eurobiologiste*, 27 (203), 35-46.
- Daudon M., Bader CA. (1993).** Jungers, Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology, *Scanning Microscopy*, 7 (3), 1081-1106.
- Daudon M., Bazin D., Jungers P., André G., Cousson A., Chevallier P., Matzen G. (2009).** Opportunities offered by scanning electron microscopy, powder neutron

- diffraction and synchrotron radiation mX-ray fluorescence in the study of whewellite kidney stones. *J App Cryst*, 42, 109-115.
- Daudon M., Traxer O., Lechevallier E., Saussine C., (2008).** La lithogénèse, *Progrès en urologie*, 18, 815-827.
- Davies W.A., (1958).** The history of marsilid. *J. Clin. Clin. Exp. Psychopath.*, 1:1-10.
- Davis G.C., Buchsbaum M.S., Bunney W.E., (1979).** Analgesia to painful stimuli in affectives illeess. *Am. J. Psychiatry*, 136, 1148-1153.
- De Miranda G.F.B., Vilar J. C., Nunes Alves I.A., Cavalcanti S.C.H., Antonioli A.R., (2001).**Antinociceptive and anti-edematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellendae* lor. Ex griseb. inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacology*, 1 (1), 6.
- De Santis D., Moresi M. (2007).**“Production of alizarin extracts from *Rubia tinctorum* and assessment of their dyeing properties”. *Industrial Crops and Products*, 26, 151-162.
- Debuigne G. (1974).** Dictionnaire des plantes qui guérissent. *Larousse*.
- Dejana E., Villa S., Gaetano G. (1982).**Bleeding time in rats: a comparison of different experimental conditions. *Thrombosis and haemostasis*, 48 (01), 108-111.
- Depass L.R., Garman R.H., Woodside M.D., Giddens W.E., Maronpot R.R., Weil C.S., (1986).**Chronic toxicity and oncogenicity studies of ethylene glycol in rats and mice. *Fundan. Appl. Toxicol.* 7, 547-565.
- Derksen G. C., Van Beek T.A. (2002).** *Rubia tinctorum* L. *Studies in natural products chemistry*, 26, 629-684.
- Derksen G. H. (2001).** Analysis and isolation of anthraquinones from madder roots (*Rubia tinctorum*). *Thèse de doctorat*. Tese.WageningenUniversiteit
- Derksen G.C.H., van Beek T.A., de Groot Æ., Capelle A. (1998).** High-performance liquid chromatographic method for the analysis of anthraquinone glycoside and aglycones in madder root (*Rubia tinctorum* L.). *Journal of Chromatography*, 816, 277-281.
- Devi P. S., Shyamala D. C. (1999).**Protective effect of quercetin in cisplatin-induced cell injury in the rat kidney. *Indian journal of pharmacology*, 31(6), 422.
- Dickenson A.H., Sullivan A. F., (1987).** Subcutaneous formalin–induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain*, 30, 349-360.
- Dinçel Ç., Özdiler, E., Özenci H., Tazici N., Koşar A. (1998).** Incidence of urinary tract infection in patients without bacteriuria undergoing SWL: comparison of stone types. *Journal of endourology*, 12 (1), 1-3.

- Divakar K., Pawar A. T., Chandrasekhar S. B., Dighe S.B., Divakar G. (2010).** Protective effect of the hydro-alcoholic extract of *Rubiocordifolia* roots against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(4), 1013-1018.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97 (4), 654-66.
- Dorosz P., (1998).** Guide pratique des médicaments. 18^{ème} ed., *Maloine, Paris*.
- Dubuisson D., Dennis S.G. (1977).** The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4, 161-174.
- Dugan G.M., Gumbmann M.R., Friedman M. (1989).** Toxicological evaluation of Jimson weed (*Datura stramonium*) seed. *FD Chem.Toxic*, 27 (8), 501-510.
- Dutta-Roy A. K.; Kahn N. N., and Sinha A. K. (1991).** Interaction of receptors for prostaglandin E1/prostacyclin and insulin in human erythrocytes and platelets. *Life Sci*, 49(16), 1129-1139.
- Ebrahimzadeh M.A., Nabavi S.M., Nabavi S.F. (2013).** Antidepressant activity of *Hibiscus esculentus* L. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17, 2609-2612.
- Eddouki M., Maghrani M., Lemhadri A., Ouahidi M. L., Jouad H. (2002).** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilaleet). *Journal of Ethnopharmacology*, 82 (2-3), 97-103.
- El Haouari M., Jardin I., Mekhfi H., Rosado J.A., Salido G.M. (2007a)** . *Urtica dioica* extract reduces platelet hyperaggregability in type 2 diabetes mellitus by inhibition of oxidant production, Ca²⁺ mobilization and protein tyrosine phosphorylation, *J. Appl. Biomed*, 5, 105-113.
- El Haouari M., Lopez J. J., Mekhfi H., Rosado J. A., Salido G. M. (2007b).** Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *J Ethnopharmacol*. 113 (2), 325-331.
- Elhabazi, K., Aboufatima, R., Benharref, A., Ziad, A., Chait, A., & Dalal, A. (2006).** Study on the antinociceptive effects of *Thymus broussonetii* Boiss extracts in mice and rats. *Journal of ethnopharmacology*, 107(3), 406-411.

- Endale M., Lee W.M., Kamruzzama S.M., Kim S.D., Park J.Y., Park M.H., Rhee M.H. (2012).** Ginsenoside-Rp1 inhibits platelet activation and thrombus formation via impaired glycoprotein VI signalling pathway, tyrosine phosphorylation and MAPK activation. *Br. J. Pharmacol*, 167 (1), 109–127
- Falati S., Patil S., Gross P. L., Stapleton M., Merrill-Skoloff G., Barrett N. E., Newman P. J. (2006).** Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood*, 107 (2), 535-541.
- Fan J., Glass M.A., Chandhoke P.S. (1999).** Impact of ammonium chloride administration on a rat ethylene glycol urolithiasis model. *Scanning Microsc*, 13 (2-3), 299-306.
- Farouk, L., Laroubi, A., Aboufatima, R., Benharref, A., & Chait, A. (2008).** Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: possible mechanisms involved. *Journal of ethnopharmacology*, 115(3), 449-454.
- Feigin V. L., Lawes C. M., Bennet D. A., Anderson C. S. (2003).** Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *The lancet neurology*, 2 (1), 43-53.
- Feldmann G., Martin E. D. (1983).** Les hépatites alcooliques. Histopathologie du foie et des voies biliaires. *Elsevier Masson, Paris*, 165-70.
- Féline A., Hardy P., de Bonis M., (1991).** La Dépression: études. *Elsevier Masson, Paris*, 5.
- Fennell C. W., Lindsey K. L., McGaw L. J., Sparg S. G., Stafford G. I., Elgorashi E. E., Van Staden J. (2004).** Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *Journal of ethnopharmacology*, 94 (2-3), 205-217.
- Filho A.W., Filho V.C., Olinger L., Souza M.M. (2008).** Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Arch. Pharm. Res.* 31, 713–721.
- Finar L. (1956).** Organic chemistry: Stereochemistry and the chemistry of Natural Products. *Edition low-priced*, 718.
- Fleurentin J., Pelt J. M. (1990).** Les plantes médicinales. *La recherche*, 222, 810-818.
- Fossati P., Allilaire J.F. (2001).** Processus mnésiques et troubles des fonctions exécutives dans la dépression. *Thèse doctorat*. Université de Paris, France.
- Friedman S. L. (2003).** Liver fibrosis—from bench to bedside. *Journal of hepatology*, 38, 38-53.

- Fromenty B. (2010).** Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments: mécanismes et conséquences au niveau du foie. *Réanimation*, 19 (6), 552-567.
- Fuentes Q. E., Fuentes Q. F., Andres V., Pello O. M., Font de Mora J., Palomo G. I.(2013).** Role of platelets as mediators that link inflammation and thrombosis in atherosclerosis. *Platelets*, 24 (4), 255-262.
- Fuller R.W., (1990).** Therapy of osteoporosis in japan. In: Christiansen, C.Overgaard. K. Eds.
- Fundyus M.E. (2001).** Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS drugs*, 15, 29-58.
- Gadi D., Bnouham M., Aziz M., Ziyat A., Legssyer A., Bruel A., Mekhfi H. (2012).** Flavonoids purified from parsley inhibit human blood platelet aggregation and adhesion to collagen under flow. *J. Complement. Integr. Med.* 9 (1).
- Garidel P. J. (1715).** Histoire des plantes qui naissent aux environs d'Aix: et dans plusieurs autres endroits de la provence. J. David, imprimeur du roy.
- Garver D.L., Pandey G.N., Dekirmenjian H., De Leon-Jones F. (1975).** Growth hormone and catecholamines in affectives disease. *Am. J. Psychiat.* 132, 1149-1154.
- Gawaz M., Brand K., Dickfeld T., Pogatsa-Murray G., Page S., Bogner C., Neumann F. J. (2000).** Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*, 148 (1), 75-85.
- Gérard Debuigne. (1974).** Dictionnaire des plantes qui guérissent, Librairie Larousse, Paris, p. 130
- Ghelani H., Chapala M., Jadav P. (2016).** Diuretic and Antiurolithiasic activities of an ethanolic extract of *Acorus calamus* L rhizome in experimental animal models. *Journal of Traditional and Complement Medicine.* 6 (4): 431-436.
- Gibbins J. M.(2004).** Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci*, 117 (16), 3415-3425.
- Gilbert, K. G., & Cooke, D. T. (2001).** Dyes from plants: Past usage, present understanding and potential. *Plant growth regulation*, 34(1), 57.
- Gleim S., Kasza Z., Martin K., Hwa J. (2009).** Prostacyclin receptor/thromboxane receptor interactions and cellular responses in human atherothrombotic disease. *Current atherosclerosis reports*, 11 (3), 227-235.

- Gold P.W., Extein I., Pickar D., Rebar R., Ross R., Goodwin F.K. (1980).** Suppression of plasma cortisol in depressed patients by acute intravenous methadone infusion. *Am. J. Psychiat*, 137 (7), 862-863.
- Golinkoff M., Sweeney J.A., (1989).** Cognitive impairment in depression. *Journal of Affective Disorders*, 17, 105-112.
- Gómez-Caravaca A. M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis*, 41, 1220 - 34.
- Gougoux A. (2005).** Physiologie des reins et des liquides corporels. *Multimondes, Quebec*, 72-73 .
- Grases F., Prieto R. M., Fernandez-Cabot R. A., Costa-Bauzá A., Tur F., Torres J. J. (2015).** Effects of polyphenols from grape seeds on renal lithiasis. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 813-737.
- Grüner S., Prostedna M., Aktas B., Moers A., Schulte V., Krieg T., Nieswandt B. (2004).** Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced $\alpha 2\beta 1$ levels or concomitant aspirin therapy. *Circulation*, 110(18), 2946-2951.
- Gueguen M., Boniface O., Bernard O., Clerc F., Cartwright T., Alvarez F. (1991).** Identification of the main epitope on human cytochrome P450 IID6 recognized by anti-liver kidney microsome antibody. *Journal of autoimmunity*, 4 (4), 607-615.
- Guerrero J. A., Lozano M. L., Castillo J., Benavente-Garcia O., Vicente V., Rivera J. (2005).** Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *J Thromb Haemost.* 3 (2), 369-376.
- Guerrero J. A., Navarro-Nunez L., Lozano M. L., Martínez C., Vicente V., Gibbins J. M. Rivera, J. (2007).** Flavonoids inhibit the platelet TxA(2) signalling pathway and antagonize TxA(2) receptors (TP) in platelets and smooth muscle cells. *Br J Clin Pharmacol*, 64 (2), 133-144.
- Guinot P., Rogé A., Gargadennec A., Garcia M., Dupont D., Lecoœur E., ... & Andary C. (2006).** Dyeing plants screening: an approach to combine past heritage and present development. *Coloration Technology*, 122(2), 93-101.
- Guirimand F., Le Bars D. (1996).** Physiology of nociception. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 15, 1048-79.

- Gupta V. K., Arya V. (2011).** A review on potential diuretics of Indian medicinal plants. *J Chem Pharm Res*, 3(1), 613-620.
- Hakamata W., Nakanishi I., Masuda Y., Shimizu T., Higuchi H., Nakamura Y., Ikota N. (2006).** Planar catechin analogues with alkyl side chains: A potent antioxidant and an α -glucosidase inhibitor. *Journal of the American Chemical Society*, 128(20), 6524-6525.
- Halbreich U., Grunhaus L., Ben David M., (1979).** Twenty four hour rythme of prolactin in depressive patients. *Arch. Gen. Psychiat*, 36 (11), 1183-1186.
- Hall R.L. (2001).** Principles of clinical pathology for toxicology studies. In Hayes AW, editor. Principles and Methods of Toxicology. *Philadelphia: Taylor & Francis*, 1001–1038.
- Han Y.S., Van der Heijden R., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Verpoorte R. (2002).** Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of *Cinchona robusta* proceeds via the methylerythritol 4-phosphate pathway. *Phytochemistry*, 59, 45-55.
- Hannache, B. (2014).** La lithiase urinaire: Épidémiologie, rôle des éléments traces et des plantes médicinales (*Doctoral dissertation, Paris11*).
- Hannedouch,T. (2007).** Principales focntions du rein. Nephrolus Learning
- Harish R., Shivanandappa S. (2006).** Antioxidant activity and hépatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *F Chem*, 95, 180–185.
- Hartwig J. H., DeSisto, M. (1991).** The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *The Journal of cell biology*, 112(3), 407-425.
- Hassan S., Rizk M. Z., El-Sharkawi F., Badary O., Kadry M. O. (2009).** Hepatoprotective and antioxidant activity of phytic acid and/or catechin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology Letters*, (189), 265-266.
- Heapy C.G., Jamieson A., Russel N.J.W. (1987).**Afferent C-fibres and A-delta activity in models of inflammation. *British Journal of Pharmcology*, 90,164.
- Hechler B.; Cattaneo M.; Gachet C. (2005).** The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost*, 31 (2), 150-161.
- Hennequin C., Lacour B., Daudon M. (1993).** Les inhibiteurs de cristallisation. *L'Eurobiologiste*. XXVII, 47-53.
- Herpfer I., Lieb K., (2003).** Substance P and substance P receptor antagonists in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *World J. Biol. Psychiatry*, 2, 56-63.

- Hindorf H., Omondi C. O. (2011).** A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. *Journal of advanced research*, 2 (2), 109-120.
- Hmamouchi M., (1994).** La production des plantes médicinales et aromatiques. *Premier colloque national sur la chimie des substances naturelles*. 15-16, Novembre, Casablanca, Maroc.
- Hmamouchi M., (2001).** Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. Utilisation, biologie, écologie, chimie, pharmacologie, toxicologie, lexique. 2^e édition, 450.
- Hosseinzadeh H., Younesi H.M. (2002).** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology*, 2, 7.
- Hovaneissian M.(2005).** Différenciation de substances naturelles par diverses techniques analytiques : spectroscopie IRTF, CLHP- UV- Visible- Fluorimétrie et CPG-SM. Application à l'étude d'échantillons officinaux et archéologiques. *Thèse de doctorat*, Avignon.
- Hsiao G., Chang C. Y., Shen M. Y., Chou D. S., Tzeng S. H., Chen T. F., Sheu J. R. (2005).** Alpha-Naphthoflavone, a potent antiplatelet flavonoid, is mediated through inhibition of phospholipase C activity and stimulation of cyclic GMP formation. *J Agric Food Chem*, 53 (13), 5179-5186.
- Huang H. S, Ma M. C, Chen J, Chen C. F. (2002).** Changes in the oxidant-antioxidant balance in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. *J Urol*, 167(6), 2584-93.
- Hubbard G. P., Stevens J. M., Cicmil M., Sage T., Jordan P. A., Williams C. M., Lovegrove J. A., Gibbins J. M. (2003).** Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway (a). *J Thromb Haemost.* 1 (5), 1079-1088.
- Hubbard G. P., Wolfram S., Lovegrove J. A., Gibbins J. M. (2004).** Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J Thromb Haemost*, 2 (12), 2138-2145
- Hunskar S., Hole K., (1987).** The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30, 103-14.
- Huo Y., Ley K. F. (2004).** Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends in cardiovascular medicine*, 14(1), 18-22.

- Huo Y., Schober A., Forlow S. B., Smith D. F., Hyman M. C., Jung S., Ley, K. (2003).** Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nature medicine*, 9(1), 61.
- Ino N, Tanaka, T, Okumura A. (1995).** Acute and Subacute Toxicity Tests of Madder Root, Natural Colorant Extracted From Madder (*Rubia Tinctorium*), in (C57Bij6 x c3H) F1 Mice. *Toxicology and industrial health*, 11 (4), 449-460.
- Jackson S. P. (2011).** Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nature medicine*, 17 (11), 1423.
- Jain H. C., Bhardwaj K. K. (1982).** Indian Dyes and Industry During 18th-19th Century, *Indian Journal of History of Science*, 17 (11), 70-81.
- Jansen P., Cardon D. (2005).** Plant resources of tropical Africa 3. Dyes and tannins. *Programme Prota*, 159-162.
- Johnson R. J., Nakagawa T., Jalal D., Sánchez-Lozada L. G., Kang D. H., Ritz, E. (2013).** Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(9), 2221-2228.
- Joyeux M., Rolland A., Fleurentin J., Mortier F., Dorfman, P. (1990).** Tert-Butylhydroperoxide-induced injury in isolated rat hepatocytes: a model for studying anti-hepatotoxic crude drugs. *Planta Medica*, 56 (02) 171-174.
- Kalyoncu, F., Cetin, B., Saglam, H. (2006).** Antimicrobial activity of common madder (*Rubia tinctorum* L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(6), 490-492.
- Kamat J. P., Ghosh A., Devasagayam, T. P. (2000).** Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization. *Molecular and cellular biochemistry*, 209 (1-2), 47-53.
- Kang W. S., Chung, K. H., Chung J. H., Lee J. Y., Park J. B., Zhang Y. H., Yoo H. S., Yun Y. P. (2001).** Antiplatelet activity of green tea catechins is mediated by inhibition of cytoplasmic calcium increase. *J Cardiovasc Pharmacol*, 38 (6), 875-884.
- Kapase C. U., Bodhankar S. L., Mohan V., Thakurdesai P. A. (2013).** Therapeutic effects of standardized fenugreek seed extract on experimental urolithiasis in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (9), 29.

- Karakuş, A., Değer, Y., & Yıldırım, S. (2017).** Protective effect of *Silybum marianum* and *Taraxacum officinale* extracts against oxidative kidney injuries induced by carbon tetrachloride in rats. *Renal failure*, 39(1), 1-6.
- Karim A., Mekhfi H., Ziyat A., Legssyer A., Bnouham M., Amrani S., Aziz M. (2010).** Anti-diarrhoeal activity of crude aqueous extract of *Rubia tinctorum* L. roots in rodents. *Journal of Smooth muscle research*, 46 (2), 119-123.
- Kasote D. M., Jagtap S. D., Thapa D., Khyade M. S., Russell W. R. (2017).** Herbal remedies for urinary stones used in India and China: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 203, 55-68.
- Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. (2006).** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*. 94 (4), 550-557.
- Kataya H. A., Hamza A. A. (2008).** Red cabbage (*Brassica oleracea*) ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5 (3), 281-287.
- Katsube T., Tabata H., Ohta Y., Yamasaki Y., Anuurad E., Shiwaku K., Yamane Y. (2004).** Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Foline Ciocalteu assay. *J Agric Food Chem*, 52 (8), 2391-6.
- Kaur R., Singh D., Chopra K. (2005).** Participation of alpha2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin. *J. Med. Food*. 8, 529–532.
- Khan S. R. (1991).** Pathogenesis of oxalate urolithiasis: lessons from experimental studies with rats. *American journal of kidney diseases*, 17 (4), 398-401.
- Khan S. R., Hackett R. L. (1993).** Role of Organic Matrix in Urinary Stone Formation: An Ultrastructural Study of Crystal Matrix Interface of Calcium Oxalate Monohydrate Stones. *The Journal of urology*, 150 (1), 239-245.
- Khan S.R. (2010).** Nephrocalcinosis in animal models with and without stones. *Urological research*. 38, 429-438.
- Klee L. W., Brito C. G., Lingeman J. E. (1991).** Clinical Implications of Brushite Calculi. *The Journal of urology*, 145(4), 715-718.
- Kleftaras G., (2004).** La dépression: approche cognitive et comportementale. Editions L'Harmattan, 19-20.

- Kumar B. N., Wadud A., Jahan N., Sofi G., Bano H., Makbul S. A., Husain S. (2016).** Antilithiatic effect of *Peucedanum grande* C.B Clarke in chemically induced urolithiasis in rats. *J Ethnopharmacol*, 24 (194), 1122-1129.
- Kundu J.K., Shin Y.K., Kim S.H., Surh Y.J. (2006).** Resveratrol inhibits phorbol ester induced expression of COX-2 and activation of NF- κ B in mouse skin by blocking I κ B kinase activity. *Carcinogenesis*, 27 (7), 1465–1474.
- Kupfer D. J., Thase M. E., (1983).** The use of the sleep laboratory in the diagnosis of affective disorders. *Psychiatr.Clin.North. Am*, 6, 3-25.
- Lajkó E., Bányai P., Zámbo Z., Kursinszki L., Szóke É., Kóhidai, 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 international*, 15 (1), 119.
- Landolfi, R., Mower, R. L., & Steiner, M. (1984).** Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: structure-activity relations. *Biochemical pharmacology*, 33(9), 1525-1530.
- Landry Y., Gies J. P.(2008).** Molecular drug targets. *In The Practice of Medicinal Chemistry* (Third Edition) (85-105).
- Le Bail A., Bazin D., Daudon M., Brochot A., Robbez-Masson V., Maisonneuve V. (2009).** Racemic calcium tartrate tetrahydrate [form (II)] in rat urinary stones. *Acta Crystallographica Section B*, 65 (3), 350-354.
- Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W. (2001).** Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.*, 53, 597-652.
- Leclerc Albert Mathieu du Sablon .(1933).** Cours de botanique.
- Lee K. W, Kim Y. J, Lee H. J, Lee C. Y. (2003).** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food Chem*, 51, 7292–5.
- Leistner E., Zenk M.H. (1967).** Incorporation of shikimic acid into 1,2-dihydroxyanthraquinone by *Rubia tinctorum* L. *Tetrahedron Letters*. 5, 475-476.
- Lemke M.R., Hess A.C., (1998).** Psychomotor symptoms in depression. *Am. J. Psychiatry*, 155, 709-709
- Leroy, A. (2004).** Méthodes de recalage scanner/échographie. Application à la navigation chirurgicale des ponctions rénales percutanées, *thèse en Imagerie, Vision et Robotique. Institut national polytechnique de Grenoble.*

- Letavernier E., Traxer O., Haymann J. P., Bazin D., Daudon M. (2012).** Cystinurie. *Progrès en Urologie-FMC*, 22(4), 119-123.
- Leth P.M., Gregersen M. (2005).** Ethylene glycol poisoning. *Forensic Sci. int.* 155, 179-84.
- Lettéron P., Labbe G., Degott C., Berson A., Fromenty B., Delaforge M., Pessayre D. (1990).** Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice: evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochemical pharmacology*, 39(12), 2027-2034.
- Levin J. (2013).** The evolution of mammalian platelets. *In Platelets*, 3, 25.
- Lin S. Y., Wang Y. Y., Chen W. Y., Chuang Y. H., Pan, P. H., Chen C. J. (2014).** Beneficial effect of quercetin on cholestatic liver injury. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25 (11), 1183-1195.
- Lindemann S., Krämer B., Seizer P., Gawaz M. (2007).** Platelets, inflammation and atherosclerosis. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 5, 203-211.
- Liu C. M., Ma J. Q., Sun Y. Z. (2010).** Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environmental toxicology and pharmacology*, 30 (3), 264-271.
- Liu C. M., Sun Y. Z., Sun J. M., Ma J. Q. (2012).** Cheng C. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- κ B pathway. *Biochimica ET Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1820 (10), 1693-1703.
- Liu M., Wallmon A., Olsson-Mortlock C., Wallin R., Saldeen T. (2003).** Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 77: 700-706.
- Lullmann H., Mohr K., Ziegler A., (1991).** Atlas de Poche de Pharmacologie. (2^{ème} édition). Flammarion. Paris, 32.
- Ma J. Q., Li Z., Xie W. R., Liu C. M., Liu S. S. (2015).** Quercetin protects mouse liver against CCl₄-induced inflammation by the TLR2/4 and MAPK/NF- κ B pathway. *International immunopharmacology*, 28(1), 531-539.
- Mackman, N. (2004).** Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(6), 1015-1022.

- Makni M., Chtourou Y., Fetoui H., Garoui E. M., Barkallah M., Marouani C., Zeghal N. (2012).** Erythrocyte oxidative damage in rat treated with CCl₄: protective role of vanillin. *Toxicology and industrial health*, 28(10), 908-916.
- Malmberg A.B., Yaksh T.L., (1993).** Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H, And L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAIDS interaction. *Anesthesiology*, 79, 270-28.
- Mander, M. (1998).** Marketing of indigenous medicinal plants in South Africa: a case study in KwaZulu-Natal.
- Manka, D., Forlow, S. B., Sanders, J. M., Hurwitz, D., Bennett, D. K., Green, S. A., Sarembock, I. J. (2004).** Critical role of platelet P-selectin in the response to arterial injury in apolipoprotein-E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(6), 1124-1129.
- Manns M. P., Johnson E. F., Griffin K. J., Tan E. M., Sullivan K. (1989).** Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1. *The Journal of clinical investigation*, 83(3), 1066-1072.
- Marieb E., Hoehn K. (2014).** Anatomie et physiologie humaines: Livre+ eText+ plateforme numérique MonLab-Licence étudiant 60 mois. Pearson Education France.
- Mason K. D., Carpinelli M. R., Fletcher J. I., Collinge J. E., Hilton A. A., Ellis S., Huang D. C. (2007).** Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*, 128(6), 1173-1186.
- May A. E., Seizer P., Gawaz M. (2008).** Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28 (3), 5-10.
- Mehdioui R., Kahouadji A. (2007).** Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène: cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). *Bulletin de l'Institut scientifique, Rabat, section Sciences de la vie*, 29, 11-20.
- Mehrabian S., Majd A., MajdI. (2000).** Antimicrobial effects of three plants (*Rubia tinctorum*, *Carthamus tinctorius* and *Juglans regia*) on some airborne microorganisms. *Aerobiologia*, 16 (3-4), 455.
- Mekhfi H., El Haouari M., Legssyer A., Bnouham M., Aziz M., Atmani F., Ziyat A., (2004).** Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 94 (2-3), 317-322.

- Melnick, R.L., (1984).** Toxicities of ethylene glycol and ethylene glycol monoethyl ether in Fischer 344/N rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect.*, 57:147–155.
- Merskey H., Bogduk N. (1994).** Classification of chronic pain: Descriptions of chronic pain syndromes and definition of pain terms. IASP press. Seattle. USA. p.210.
- Meunier A., Braz J., Cesselin F., Hamon M., Pohl M. (2004).**Inflammation et douleur: thérapie génique expérimentale. *Médecine/Sciences*, 20, 325-30.
- Middleton E. J, Kandaswami C., Theoharides T. C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 52 (4), 673-751.
- Miliauskas G, Venskutonis P. R, Van Beek T. A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food Chem.* 85, 231–7.
- Molas Ribalta, P. (1994).** The politics of dyeing in eighteenth-century Spain.
- Mongrand S., Badoc A., Patouille B., Lacomblez C., Chavent M., Bessoule J. J. (2005).** Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry*, 66 (5), 549-559.
- Moon C. H., Jung Y. S., Kim M. H., Lee S. H., Baik E. J., Park S.W. (2000).** Mechanism for antiplatelet effect of onion: AA release inhibition, thromboxane A₂synthase inhibition and TXA₂/PGH₂ receptor blockade. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 62 (5), 277–283.
- Moore L. K., Dalley F. A. (2001).** Anatomie médicale. *Aspects fondamentaux et applications cliniques*, 351-355.
- Moura A.C.A., Silva E.L.F., Fraga M.C.A., Wanderley A.G., Afiatpour P., Maia M.B.S. (2005).**Antiinflammatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats. *Phytomedicine*, 12, 138–142.
- Mruk J. S., Webster M. W., Heras M., Reid J. M., Grill D. E., Chesebro J. H. (2000).** Flavone-8-acetic acid (Flavonoid) profoundly reduces platelet-dependent thrombosis and vasoconstriction after deep arterial injury In vivo. *Circulation*, 101(3): 324-328.
- Muanda N. F, Koné D, Dicko A, Soulimani R, Younos C. (2011).**Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian Medicinal plant parts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011.
- Naksuriya O, Okonogi S. (2015).** Comparison and combination effects on antioxidant power of curcumin with gallic acid, ascorbic acid, and xanthone. *Drug discoveries & therapeutics.* 9 (2) 136-141.

- Nardini M., Natella F. (2007).** Scaccini C. Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets*, 18 (3), 224-243.
- Naskar S., Islam A., Mazumder U.K., Saha N., Halder P.K., Gupta M. (2010).** In vivo and In vitro Antioxydant Potentiel of Hydromethanolic Extract of Phoenix dactylifera Fruits. *J of Sci Res*, 2(10), 144-157.
- Navarro-Nunez L., Rivera J., Guerrero J. A., Martinez C., Vicente V., Lozano M. L. (2009).** Differential effects of quercetin, apigenin and genistein on signalling pathways of protease-activated receptors PAR(1) and PAR(4) in platelets. *Br J Pharmacol.* 158 (6), 1548-1556.
- Niazi J., Kaur N., Sachdeva R. K., Bansal Y., Gupta V. (2014).** Anti-inflammatory and antinociceptive activity of vanillin. *Drug Development and Therapeutics*, 5(2), 145.
- Nielsen S., Kwon I-H., Fenton R. A., Praetorius J. (2012).** Anatomy of the kidney. In: Taal, Philadelphia: Elsevier Saunders.1 (9) 31–93.
- Nieswandt B., Aktas B., Moers A., Sachs, U. J. H. (2005).** Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), 1725-1736.
- Niyah Njike G., Watch P., Nguenefack T. B., Kamanyi A. (2005).** Hypoglycaemic activity of the leaves of *Bersama engleriana* in rat. *Afr J Trad*, 2 (3), 215-221.
- Normand, M. (2013).** Le traitement médical de la lithiase urique. *Progrès en Urologie-FMC*, 23(3), 77-83.
- Norton, S. A. (1998).** Useful plants of dermatology. IV. Alizarin red and madder. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 39(3), 484-485.
- Novotná P., Pacáková V., Bosáková Z., Tulik K. (1999).** High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles. *Journal of Chromatography*, 863, 235-241.
- Nurden, A., Nurden, P. (2011).** Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, 76-91.
- OCDE. (2008).** Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. In : *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. Paris: OCDE. P. 1-14.
- OCDE. (2008a).** Pharmacopée européenne. 6eme édition, Tome1, 178-568.
- OCDE. (2008b).** Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques 407.

- Odounga K. F. (2011).** *Rubia tinctorum* L (El foua) plante médicinale potentiellement dangereuse : mise à jour bibliographique et analyse phytochimique d'échantillons Marocains, *Thèse du Doctorat en pharmacie*. Université Mohamed V. Maroc.
- Okada Y., Copeland B. R., Fitridge R., Koziol J. A., Del Zoppo, G. J.(1994).** Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*, 25(9), 1847-1853.
- Okello S. V., Nyunja R. O., Netondo G. W., Onyango J. C. (2010).** Ethnobotanical study of medicinal plants used by Sabaots of Mt. Elgon Kenya. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 7(1).
- Okpo S.O., Fatokun F., Adeyemi O.O. (2001).** Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 78, 207-211.
- OMS (Organisation mondiale de la Santé). (2000).** Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. WOH/TRM/2000; annexe II, 31-35.
- OMS. (2002).** Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. Genève *WHO/EDM/TRM*.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). (2002).** OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14 Guidance notes for analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies. ENV/JM/MONO 2002, 19
Osteoporosis. Copenhagen: Osteopress., 2107-2112.
- Ozturk I. C., Ozturk F., Gul M., Ates B., Cetin A. (2009).** Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 27 (5), 309-315.
- Pace-Asciak C. R., Rounova O., Hahn S. E., Diamandis E. P., Goldberg D. M. (1996).** Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta*. 246(1-2), 163-182.
- Panche A. N., Diwan A. D., Et Chandra S. R. (2016).** Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
- Paris R.R., Moyse H. (1965).** Précis de matière médicale (Tome 1). *Edition Masson et Cie. Paris*.

- Park S. H., Sim Y. B., Choi S. M., Seo Y. J., Kwon M. S., Lee J. K., Suh H. W. (2009).** Antinociceptive profiles and mechanisms of orally administered vanillin in the mice. *Archives of pharmacal research*, 32(11), 1643.
- Park S., Kim Y., Lee S. (2009).** Establishment of hairy root culture of *Rubia akane* Nakai for alizarin and purpurin production. *Scientific Research and Essays*, 4(2), 94-97.
- Pawar A. T., Vyawahare N. S. (2017).** Protective effect of ethyl acetate fraction of *Biophytumsensitivum* extract against sodium oxalate-induced urolithiasis in rats. *J Tradit Complement Med*, 7(4), 476-486.
- Payen J.F., Bru O., Bosson J.L., Lagrasta A., Novel E., Deschaux I., Lavagne P., Jacquot C. (2001).** Assessing pain in critically ill sedated patients by using a behavioral pain scale. *Critical and Care Medicine*, 29, 2258-63.
- Peretti C. S., Ferreri F., (2006).** Troubles cognitifs dans la dépression. *La Lettre du psychiatre*, 2, 206-209.
- Pichon P. (1972).** Contribution à l'étude botanique et chimique d'*Epilobiumrosmarinifolium*. *Thèse de Doctorat de Pharmacie*, Lyon
- Piva G., Morlacchini M., Pietri A., Fusari A., Corradi A., Piva A. (1997).** Toxicity of dietary scopolamine and hyoscyamine in pigs. *Livestock Production Science*, 51(1997) 29-39.
- Plaa G. L. (1982).** Detection and evaluation of chemically induced liver injury. *Principles and methods of toxicology*, 407-440.
- Porsolt R.D., Bertin A., Jalere M., (1977).** Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn*, 229, 201-210.
- Prasad K. V., Bharathi K., Srinivasan K. K. (1994).** Evaluation of *Ammanniabaccifera* Linn for antiurolithic activity in albino rats. *Indian journal of experimental biology*, 32 (5), 311-313.
- Prasad K., Sujatha D., Bharathi K. (2007).** Herbal drugs in urolithiasis-a review. *Pharmacognosy reviews*, 1 (1), 175.
- Price D.D. (2002).** Central neural mechanisms that interrelate sensory and affective dimensions of pain. *Molecular interventions*, 2, 392-403.
- Prince, E. (2014).** Dyer plants.
- Proctor E., Chatamra K. (1982).** High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*, 83 (6), 1183-1190.

- Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., Lamantia A.S., McNamara J.O., Williams, S.M. (2000).** Neuroscience. (seconde édition). *Sinaute Associates. Inc.* Sunderland, Massachusettes. USA.
- Queneau P., Ostermann G. (1998).** Soulager la douleur. *Odile Jacob, Ed*, Paris.
- Queneau P., Ostermann G. (2004).** Le médecin, le malade et la douleur. *Ed 4. Elsevier Masson*, Paris, p.12.
- Qureshi M. N., Kuchekar B. S., Logade N. A., Haleem M. A. (2010).**In-vitro Antioxidant and In-vivo Hepatoprotective activity of *Leucas ciliata* leaves. *Rec Nat Prod*, 4 (2) 124-130
- Rahman, K., Billington D. (2000).** Dietary supplementation with aged garlic extract inhibits ADP-induced platelet aggregation in humans. *J. Nutr*, 130 (11), 2662–2665.
- Ramachandran V., Deepa Mol S. J., Raja B. (2010).** Combined effects of vanillic and syringic acids on hepatic markers, lipid peroxides and antioxidants in acetaminophen induced hepatotoxicity in wistar rats: Biochemical and histopathological evidences. *Pharmacologyonline*, 2, 475-86.
- Rathod N. R., Dipak B., Chitme H. R., Sanjeev R., Muchandi I. S., Ramesh C. (2012).** Anti-urolithiatic effects of *Punicagranatum* in male rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 140, 234–238.
- Ravindra D. H., Sunil S. J. (2016).**Effect of hydro-alcoholic extract of *Vernonia cinerea* Less against ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. *Indian J Pharmacol*, 48 (4), 434–440.
- Reisine T., Bell G. I. (1993).** Molecular Biology of Opioid Receptors. *Trends Neurosci*, 16, 506-510.
- Rhafouri R., Strani B., Zair T., Ghanmi M., Aafi A., El Omari M., Bentayeb A.(2014).**Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the *Cedrus atlantica* (Endl.) *Manetti ex Carrière* seeds essential oil. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 3 (5), 1034-1043.
- Riedel W., Neeck G., (2001).** Nociception pain and antinociception : current concepts. *Z. Reumatol*, 60, 404-15
- Robbins W. R., Staats P. S., Levine J., Fields H. L., Allen R. W., Campbell, J. N., Pappagallo M. (1998).** Treatment of intractable pain with topical large-dose capsaicin: preliminary report. *Anesthesia & Analgesia*, 86 (3), 579-583.

- Robinson M., Pond C.L., Laurie R.D., Bercz J.P., Henningsen G., Condie L.W., (1990).** Subacute and subchronic toxicity of ethylene glycol administered in drinking water to Sprague-dawley rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 13(1), 43-70.
- Rocha A.P., Carvalho L.C., Sousa M.A., Madeira S.V., Sousa P.J., Tano T., Schini-Kerth V.B., Resende A.C., Soares de Moura R. (2007).** Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascular Pharmacology*, 46 (2), 97-104.
- Rodgers R. P., Levin, J. A. (1990).** critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost.* 16 (1), 1-20.
- Ross R. (1999).** Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine*, 340 (2), 115-126.
- Ruggeri Z. M. (2002).** Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine*, 8 (11), 1227.
- Ruiz F. A., Lea C. R., Oldfield,E., Docampo, R. (2004).** Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (43), 44250-44257.
- Ryall R. L., Chauvet M. C., Grover P. K. (2005).** Intracrystalline proteins and urolithiasis: a comparison of the protein content and ultrastructure of urinary calcium oxalate monohydrate and dihydrate crystals. *BJU international*, 96 (4), 654-663.
- Saadaoui B., BEKIR J., AKROUT J., AMMAR S., MAHJOUB A., MARS M. (2007).** Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. *Revue des régionsarides*, 316-321.
- Sachar E.J., Hellman L., Roffwarg H., Halpern F.S., Fukushima D., Gallagher T., (1973).** Disrupted 24-hour patterns of cortisol secretion in psychotic depression. *Arch.Gen. Psychiat*, 28, 19-24.
- Samad N., Saleem A., Yasmin F., Shehzad M. A. (2018).** Quercetin protects against stress-induced anxiety-and depression-like behavior and improves memory in male mice. *Physiological research*, 67 (5), 795-808.
- Sanmugapriya E., Venkataraman S. (2006).** Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl₄-induced acute hepatic injury in experimental rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 105 (1-2), 154-160.
- Sarada K., Margret R. J., MohanV. R. (2012).** hepatoprotective and antioxidant activity of ethanol extracts of *naringi crenulata* (roxb) nicolson against CCL₄ induced

- hepatotoxicity in rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(3), 874.
- Sawadogo, L. (2007).** Adapter les approches de l'aménagement durable des forêts sèches aux aptitudes sociales, économiques et technologiques en Afrique: *le cas du Burkina Faso*. Cifor.
- Scalbert A.; Manach C.; Morand C.; Remesy C.; Jimenez L. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 45(4), 287-306.
- Scheid C. R., Cao L. C., Honeyman T., Jonassen J. A. (2004).** How elevated oxalate can promote kidney stone disease: changes at the surface and in the cytosol of renal cells that promote crystal adherence and growth. *Front Biosci*. 9, 797-808.
- Scherrer A. M., Motti R., Weckerle C. S. (2005).** Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 97 (1), 129-143.
- Schnitzler A., Ploner M. (2000).** Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *Journal of Clinic Neurophysiology*, 17, 592-603.
- Schrijvers D., Hulstijn W., Sabbe B.G. C., (2008).** Psychomotor symptoms in depression: A diagnostic, pathophysiological and therapeutic tool. *Journal of affective disorders*, 109, 1-20.
- Schwepe H. (1992).** Anthrachinonfarbstoffe. Handbuch der Naturfarbstoffe: Vorkommen, Verwendung, Nachweis. Ecomed, Hamburg.
- Selvam R., Kalaiselvi P., Govindaraj A., Murugan V. B., Kumar A. S. (2001).** Effect of *A. lanata* leaf extract and Vediuppuchunnam on the urinary risk factors of calcium oxalate urolithiasis during experimental hyperoxaluria. *Pharmacological Research*. 43 (1), 89-93.
- Seo E. J., Ngoc T. M., Lee S. M., Kim Y. S., Jung Y. S. (2012).** Chrysophanol-8-O-glucoside, an anthraquinone derivative in rhubarb, has antiplatelet and anticoagulant activities. *Journal of pharmacological sciences*. 1202020654
- Seo E.J., Lee S.Y., Kang S.S., Jung Y.S. (2013).** Zizyphus jujuba and its active component jujuboside B inhibit platelet aggregation. *Phytother Res*. 27 (6), 829–834.
- Shah P. A., Parmar M. Y., Thakkar, V. T. (2009).** Protective effect of *Hordeum vulgare* linn. on acetaminophen-induced liver damage. *Journal of Young Pharmacists*, 1 (4), 336-340

- Sharifzadeh M., Ebadi N., Manayi A., Kamalinejad M., Rezaeizadeh H., Mirabzadeh M., Khanavi M. (2014).** Effect of *Rubia tinctorum* L. Extract on Carrageenan-Induced Paw Edema in Rats. *Journal of Medicinal Plants*, 3 (51), 62-70.
- Sheu J. R., Hsiao G., Chou P. H., Shen M. Y., Chou D. S. (2004).** Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. *J Agric Food Chem.* 52 (14), 4414-4418.
- Shibata M., Ohkubo T., Takahashi H., Inoki R., (1989).** Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38, 347-352
- Shirley R., & Sutor D. J. (1968).** Anhydrous uric acid: nature and occurrence of a new form in urinary calculi. *Science*, 159 (3814), 544-550.
- Shopsin B., Gershon S., (1971).** Plasma cortisol response to dexamethasone suppression in depressed and control patients. *Arch.Gen.Psychiat*, 24, 320-326.
- Siegers C. P., Völpel M., Scheel G., Younes M. (1982).** Effects of dithiocarb and (+)-catechin against carbon tetrachloride-alcohol-induced liver fibrosis. *Agents and actions*, 12 (5), 743-748.
- Sies H. (2010).** Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch Biochem Biophys.* 501, 2-5.
- Sikka P., Bindra V.K. (2010).** Newer antithrombotic drugs. Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed. Off. Publ. *Indian Soc. Crit. Care Med.* 14 (4), 188.
- Simon D. I., Chen Z., Xu H., Li C. Q., Dong J. F., McIntire L. V., López J. A. (2000).** Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Journal of Experimental Medicine*, 192 (2), 193-204.
- Singh B., Saxena A. K., Chandan B. K. (1998).** Hepatoprotective activity of verbenalin on experimental liver damage in rodents. *Fitoterapia-Milano*, 69, 135-140.
- Soundararajan P., Mahesh R., Ramesh T., Begum V. H. (2006).** Effect of Aervalanata on calcium oxalate urolithiasis in rats. *Indian J Exp Biol.* 44, 981-986.
- Spitzer R.L., Endicott J., Robins E., (1985).** Critères de diagnostic pour la recherche en psychiatrie: RDC (Research. Diagnostic. Criteria) Traduction et adaptation française par Anseau M. *Acta. Psychiatr. Belg*, 85, 253-324.
- StanelyMainzen Prince P., Rajakumar S., Dhanasekar K. (2011).** Protective effects of vanillic acid on electrocardiogram, lipid peroxidation, antioxidants, proinflammatory markers and histopathology in isoproterenol induced cardiotoxic rats. *Eur J Pharmacol.* 668 (1-2), 233-40.

- Steiger A., Holsboer F., (1997).** Nocturnal secretion of prolactin and cortisol and the sleep EEG in patients with major endogenous depression during an acute episode and after full remission. *Psychiatry Res*, 72 (2), 81-88.
- Steinman D. A., Poepping T. L., Tambasco M., Rankin R. N., Holdsworth, D. W. (2000).** Flow patterns at the stenosed carotid bifurcation: effect of concentric versus eccentric stenosis. *Annals of biomedical engineering*, 28(4), 415-423.
- Steru L., Chermat R., Thierry B., Simon P. (1985).** The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.
- Stoll G., Kleinschnitz C., Nieswandt B. (2008).** Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood*, 112(9), 3555-3562.
- Subash P, Gurumurthy P, Sarasabharathi A, Cherian KM. (2010).** Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and total antioxidant status in essential hypertension with South Indian population. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 25 (2): 127-132.
- Suja S. R., Latha P. G., Pushpangadan P., Rajasekharan S. (2004).** Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook against carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. *Journal of ethnopharmacology*, 92 (1), 61-66.
- Tai A., Sawano T., Yazama F., Ito H. (2011).** Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810 (2), 170–177.
- Takahachi R.N., Paz M.M., (1987).** Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 20, 607-610.
- Teselkin Y.O., Babenkova I.V., Kolhir V.K., Baginskaya A.I., Tjukavkina N.A., Kolesnik Y.A., Selivanova, I.A., Eichholz, A.A. (2000).** Dihydroquercetin as a means of antioxidative defence in rats with tetrachloromethane hepatitis. *Phytother Res*, 14, 160-162.
- Thamilselvan S., Khan S. .R, Menon M. (2003).** Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. *Urological research*, 31(1): 3-9.
- Thangarathinam N., Jayshree N., Metha A. V., Ramanathan L. (2013).** Effect of polyherbal formulation on ethylene glycol induced urolithiasis. *International J Pharm Pharm sci.* 5, 994-997.

- Thiele C. (2010).** Anatomie et physiopathologie humaines de poches; 1ere Editin., *De Boeck université, Bruxelles*, 712 pp.
- Tjolsen A., Berge O.G., Hunskaar S., Rosland J.H., Hole K., (1992).** The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51, 5-17.
- Toll T.R., Schadrack J., Castro-Lopez J.M., Evan G., Roques B.P., Ziglgansberger W., (1994).** Effects of Kelatorphan and morphine before and after noxious stimulation on immediate-early gene expression in rat spinal cord neurons. *Pain*, 56, 103-12.
- Touhami M., (2008).** Étude de l'effet inhibiteur de certaines substances naturelles et de la qualité de quelques eaux de boisson sur la formation de la lithiase calcique. *Thèse de doctorat*, option Physiologie, Pharmacologie et Biochimie, faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc, p. 19.
- Tu C.T., Yao Q.Y., Xu B.L., Wang J.Y., Zhou C.H., Zhang, S.C. (2012).** Protective effects of curcumin against hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride: modulation of high-mobility group box 1, Toll-like receptor 4 and 2 expression, *Food Chem. Toxicol.* 50, 3343–3351
- Van Praag H.M., Korf J., (1971).** Retarded depressions and the dopamine metabolism. *Psychopharmacologia*, 19, 199-203.
- Varga-Szabo D., Pleines I., Nieswandt B. (2008).** Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28 (3), 403-412.
- Vaughan C. W., Connor M., Bagley E. E., Christie M. J. (2000).** Acations of cannabinoids of membrabe properties and synaptic transmision in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol*, 57, 288-295
- Vaughan C.W., Mcgregor I. S., Christie M. J. (1999).** Cannabinoid receptor activation inhibits GABAergic neurotransmission in rostral ventromedial medulla neurons in vitro. *J Pharmacol*, 127, 935-940
- Vion-Dury T., Cupo, A., (1988).** La transmission enképhalinerigique: caractéristiques fonctionnelles et rôle physiologique. *Rev. Neurol*, 144:1-10.
- Von Gadow A., Joubert E., Hansmann C. F. (1997).** Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 632-638.
- Wallace MA. (1998).** Anatomy and physiology of the kidney. *AORN journal*, 68 (5), 800-824.

- Watts F.N. (1993).** Problems of memory and concentrations. In C.G. Costello (ed), symptoms of depression. John Wiley, New York.
- Watts F.N. (1995).** Depression and anxiety. In Handbook of memory disorders. Edited by Baddeley A.D., Wilso B.A. and Watts F.N. John Wiley and sons.
- Watts F.N., MacLeod A.K., Morris L., (1988).** A remedial strategy for memory and concentration problems in depressed patients. *Cognitive Therapy and Research*. 12, 185-193.
- Watts FN., Dagleish T., Bourk P., Healy D., (1990).** Memory deficit in clinical depression: processing resources and the structure of materials. *Psychological Medecine*, 20, 345-349.
- Weber C. (2005).** Killing two birds with one stone: targeting chemokine receptors in atherosclerosis and HIV infection.
- Weber C. (2005).** Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circulation research*, 96 (6), 612-616.
- Wijnsma R., Verpoorte R. (1986).** Anthraquinones in the Rubiaceae. In Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer, Vienna, 79-149.
- William-Olsson, T. (1986).** α -Glucosidase inhibition in obesity. *Acta Medica Scandinavica*, 219(S706), 1-39.
- Williams Jr, J. C., Hameed T., Jackson M. E., Aftab S., Gambaro A., Pishchalnikov Y. A., McAteer J. A. (2012).** Fragility of brushite stones in shock wave lithotripsy: absence of correlation with computerized tomography visible structure. *The Journal of urology*, 188 (3), 996-1001.
- Willis W.D., Wislund K.N. (1997).** Neuroanatomy of the pain system that modulate pain. *Journal of Clinic Neurophysiology*, 14, 2-31.
- Wolf, B. W., & Weisbrode, S. E. (2003).** Safety evaluation of an extract from *Salacia oblonga*. *Food and chemical toxicology*, 41(6), 867-874.
- World Health Organization (1993).** WHO QoL Study Protocol. WHO (MNH/PSF/93.9).
- Wouters J. (2001).** The dye of *Rubia peregrina*. Preliminary investigations. *Dyes History and Archaeol*, 16 (17), 145-157.
- Wright B., Moraes L. A., Kemp C. F., Mullen W., Crozier A., Lovegrove J. A., Gibbins J. M. (2010).** A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function

- by quercetin and structurally related flavonoids. *British journal of pharmacology*, 159 (6), 1312-1325.
- Xiao J., Kai G., Yamamoto K., Chen X. (2013).** Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: a review on structure-activity relationship aspect. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53 (8), 818-836.
- Xu B. J., Chang, S. K. C. (2007).**A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of food science*, 72 (2), 159-166.
- Xu J., Xu H., Liu Y., He H., Li G. (2015).** Vanillin-induced amelioration of depression-like behaviors in rats by modulating monoamine neurotransmitters in the brain. *Psychiatry research*, 225 (3), 509-514.
- Yamamoto A. M., Cresteil D., Boniface O., Clerc F. F., Alvarez F. (1993).** Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1). *European journal of immunology*, 23(5), 1105-1111.
- Yeh S.Y. (1985).** Potentiation of pentazocine antinociception by tripeleminamine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 235, 683-689.
- Zanetta G., Maurice-Esteva L., Mousson C., Justrabo E., Daudon M., Rifle G., Tanter Y. (1999).**Foscarnet-induced crystalline glomerulonephritis with nephrotic syndrome and acute renal failure after kidney transplantation. *Transplantation*, 67 (10), 1376-1378.
- Zeller J. A., Tschoepe D., Kessler C. (1999).** Circulating platelets show increased activation in patients with acute cerebral ischemia. *Thrombosis and haemostasis*, 81 (03), 373-377.
- Zerssen von D., Doerr P. (1980).** The role of the hypothalamo-pituitary-adreno-cortisol system in psychiatric disorders. *Advances.Biological.Psychiatry*, 5, 85-106.
- Zhai W., Zheng J., Yao X., Peng B., Liu M., Huang J., Xu Y. (2013).** Catechin prevents the calcium oxalate monohydrate induced renal calcium crystallization in NRK-52E cells and the ethylene glycol induced renal stone formation in rat. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 1-11.
- Zheng R., Shi Y., Jia Z., Zhao C., Zhang Q., Tan X. (2010).** Fast repair of DNA radicals. *Chem Soc Rev*, 39, 2827-2834.

- Zhishen J., Mengcheng T., EtJianming W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64 (4), 555-559.
- Zhou L., Schmaier A.H. (2005).** Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am. J. Clin. Pathol.* 123 (2), 172–183.
- Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M., Benjelloun W. (1997).** Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of ethnopharmacology*, 58 (1), 45-54.