

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des
Sciences Agronomiques
Département de
Biochimie et Microbiologie



THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat
EN SCIENCES BIOLOGIQUES
Spécialité : Sciences Biologiques
Option : Biochimie

THEME

Etude phytochimique et activités biologiques d'extraits aqueux
d'une plante du sud Algérien : *Cistanche phelipaea* (L.) Cout.

Présenté par : RAHIM Meriem Zohra

Devant le jury composé de :

Mme SADOUDI-ALI-AHMED Djamila	Professeur	UMMTO	Présidente
Mr HOUALI Karim	Professeur	UMMTO	Directeur de thèse
Mme AIT SLIMANE-AIT KAKI Sabrina	Professeur	UMBB	Examinatrice
Mme OUZID Yasmina	MCA	UMBB	Examinatrice
Mme BEDOUHENE Samia	MCA	UMMTO	Examinatrice
Mr AIT OUZZOU Abdenour	MCA	U. Alger1	Examineur
Mr BENABDELKADER Tarek	MCA	UMBB	Invité

2022/2023

Remerciements

*Mes remerciements vont tout d'abord à mon Directeur de thèse **Pr HOUALI Karim** pour m'avoir ouvert les portes de la réussite lorsque ces dernières étaient fermées.*

Je vous suis infiniment reconnaissante de votre dévouement et votre disponibilité ainsi que pour la liberté d'action que vous m'avez accordée. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance pour m'avoir fait bénéficier de votre rigueur scientifique et professionnelle.

*À la mémoire de mon défunt Co-directeur de thèse **Pr NABIEV Mohammed** qui m'a toujours aidé et soutenu et pour les acquis scientifiques qu'il m'a appris.*

*Je tiens particulièrement à remercier les membres du jury : **Pr SADOUDI-ALI-AHMED Djamila**, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury, **Pr AIT SLIMANE-AIT KAKI Sabrina**, **Dr OUZID Yasmina**, **Dr BEDOUHENE Samia** et **Dr AIT OUAZZOU Abdenour** qui m'ont honoré en acceptant de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et ma profonde reconnaissance. Je remercie également **Dr BENABDELKADER Tarek**, d'avoir répondu à l'invitation dans le jury et pour son précieux apport scientifique dans ce travail.*

*Je remercie mes collaborateurs de l'université de Milan **Dr Bhakti PRINSI** et **Pr Luca Espen** pour leur disponibilité et leur précieuse aide.*

*Je remercie tout particulièrement mes collègues : **Pr RIBA Amar**, **Pr AMGHAR Fateh**, **Dr MESSAOUDENE Djamel**, **Dr LAOUFI Razika** et **Dr RAAF Lamia** pour leur aide inappréciable dans l'accomplissement de ce travail.*

*Je tiens à remercier sincèrement **Dr GHOZALI Nour el houda** qui m'a aidée à réaliser l'étude statistique.*

*Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à toute l'équipe du laboratoire (LABAB) en particulier l'ingénieur Mme **RABHI Houria**.*

Mes sincères remerciements à toutes les techniciennes des laboratoires du département de biologie de l'Université M'hamed Bougara de Boumerdès pour m'avoir facilité la réalisation de ce travail.

*Je remercie profondément Mme **DIAF Loundja**, ingénieur du laboratoire de Biodiversité, biotechnologie, environnement et développement durable de l'université de Boumerdès pour son assistance et sa disponibilité inestimable.*

*Mes vifs remerciements vont à : **Dr BENMAHDJOUR Meriem**, **AISSAOUI Ghania**, **ZOUAOUI Khawla**, **REZZOUG Hamida** et **LOTMANI Zineb** pour leur soutien et de m'avoir aidé à remonter la pente dans les moments les plus difficiles.*

Enfin, j'exprime mes sentiments de reconnaissance et ma plus sincère gratitude à toute personne ayant participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*À mes très chers parents **Ahmed Rachid et Zahia.***

Ce travail est le fruit de vos sacrifices, de votre amour et vos encouragements continus.

Vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours afin d'accomplir ce travail.

*À mes chères sœurs **Faiza et Ouafa**, mes frères **Redha et Noureddine.***

*À mes chères amies **Oudahmane Samira et Remana Soumia.***

À toute personne ayant cru en moi.

Résumé

Les espèces appartenant au genre *Cistanche* sont bien connues pour leurs effets nutritionnels et thérapeutiques, cependant très peu de rapports scientifiques sont disponibles sur l'espèce *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. Ce travail vise principalement à élucider l'impact des méthodes d'extraction aqueuse comprenant la décoction, l'infusion et la macération à froid des racines de *C. phelypaea* sur la composition phytochimique, l'activité antioxydante *in vitro* et celle anti-inflammatoire *in vivo*. L'étude phytochimique a été réalisée par des tests de criblage phytochimique au niveau de la poudre végétale. De plus, des dosages du contenu total en composés phénoliques, en flavonoïdes et en sucres suivis de l'analyse par chromatographie liquide (LC/ESI-QTOF-MS et LC/ESI-QTOF-MS/MS) ont été réalisés pour les trois extraits aqueux. L'activité antioxydante de ces extraits a été étudiée et comparée par les tests de piégeage du radical DPPH, le pouvoir réducteur du fer ferrique et l'activité antioxydante totale. La toxicité aiguë a été évaluée par l'administration orale des doses de 2 et 5g/kg de poids corporel des extraits aqueux à des souris BalbC mâles et femelles et le potentiel anti-inflammatoire a été étudié par le modèle d'œdème plantaire induit par la carragénine chez les souris BalbC. Les résultats du criblage phytochimique ont indiqué la présence de flavonoïdes libres, tanins galliques hydrolysables, coumarines, triterpènes, caroténoïdes, oses/holosides, stérols et saponosides. La décoction a permis d'obtenir un meilleur rendement d'extraction et des contenus plus élevés en composés phénoliques et en sucres totaux. Concernant les flavonoïdes, la décoction et l'infusion ont montré des contenus plus élevés que la macération. Les données obtenues à partir des analyses chromatographiques ont montré des profils qualitatifs similaires avec 14 pics chromatographiques caractéristiques en mode négatif et 6 en mode positif, ce qui a permis l'identification de la syringine, 14 glycosides phényléthanoïdes et 5 iridoïdes. Des variations ont été enregistrées pour l'abondance relative de certains composés en fonction du procédé d'extraction employé. Tous les extraits ont présenté des propriétés antioxydantes similaires dans les trois systèmes étudiés à l'exception du macérât qui a montré un pouvoir réducteur moins puissant du fer ferrique. Ce pouvoir a été corrélé au taux de flavonoïdes. L'administration orale des trois extraits n'a produit aucun effet toxique. Une réduction significative dans le pourcentage d'augmentation de l'œdème plantaire a été enregistrée chez les souris traitées par les trois extraits aqueux avec une réduction plus remarquable chez celles traitées par le décocté. A la lumière des résultats obtenus, l'utilisation des jeunes racines de *C. phelipaea* sous forme d'extraits aqueux dans la modulation et la prévention des états pathologiques liés au stress oxydatif et à l'inflammation est très favorable en terme de balance bénéfices-risques et la décoction serait la forme la plus efficace.

Mots clés : *Cistanche phelypaea*, décoction, infusion, macération, phytochimie, antioxydant, toxicité aiguë/ anti-inflammatoire.

Abstract

Species belonging to the genus *Cistanche* are well known for their nutritional and therapeutic effects, however very few scientific reports are available on the species *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. This work mainly aims to elucidate the impact of aqueous extraction methods including decoction, infusion and cold maceration of the roots of *C. phelypaea* on the phytochemical composition, the antioxidant activity *in vitro* and anti-inflammatory activity *in vivo*. Phytochemical studies were carried out by phytochemical screening tests of the vegetable powder. In addition, determination of the total phenolic, flavonoid and sugar contents followed by the analysis of the extracts by liquid chromatography (LC/ESI-QTOF-MS and LC/ESI-QTOF-MS/MS) were performed in the different water extracts. The antioxidant activity of these extracts was studied and compared by DPPH radical scavenging test, ferric iron reducing power and total antioxidant activity. Acute toxicity was evaluated by oral administration of doses of 2 and 5g/kg of body weight of the aqueous extracts to male and female BalbC mice and the anti-inflammatory potential was studied by the plantar edema model induced by carrageenan in BalbC mice. Phytochemical screening results indicated the presence of free flavonoids, hydrolysable gallic tannins, coumarins, triterpenes, carotenoids, saccharides/holosides, sterols and saponosides. The decoction resulted in a higher extraction yield and higher content of total phenolic compounds and sugars. Regarding flavonoids, decoction and infusion showed higher contents than maceration. Data obtained from chromatographic analyzes showed similar qualitative profiles for all aqueous extracts with 14 characteristic chromatographic peaks in negative mode and 6 in positive mode, which allowed the identification of syringin, 14 phenylethanoid glycosides and 5 iridoids. Variations have been recorded for the relative abundance of some compounds depending on the extraction process used. All extracts exhibited similar antioxidant properties in the three systems studied with the exception of the macerate which showed a less powerful reducing power of ferric iron. This power was correlated with the level of flavonoids. Oral administration of the three extracts produced no toxic effects. A significant reduction in the percentage increase in plantar edema was recorded in mice treated with the three aqueous extracts with a more remarkable reduction in those treated with the decoction. In the light of the results obtained, the use of young roots of *C. phelipaea* in the form of aqueous extracts in the modulation and prevention of pathological states linked to oxidative stress and inflammation is very favorable in terms of benefit-risk balance and the decoction would be the most effective form.

Key words: *Cistanche phelypaea*, decoction, infusion, maceration, phytochemical, antioxidant, acute toxicity, anti-inflammatory.

ملخص

تشتهر الأنواع التي تنتمي إلى جنس *Cistanche* بخصائصها الغذائية والعلاجية، غير أن عددا قليلا جداً من التقارير العلمية اهتم بدراسة هذه الأنواع و منها *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. الهدف الرئيسي من هذا العمل هو توضيح تأثير طرق الاستخلاص المائي بما فيها طريقة الاستخلاص بالإغلاء والتسريب والنقع البارد لجذور *Cistanche phelypaea* وذلك على التركيب الكيميائي النباتي والنشاط المضاد للأكسدة في المختبر وكذا النشاط المضاد للالتهابات في الجسم الحية . بداية، تم إجراء اختبارات الفحص الكيميائي للنبات من أجل البحث عن الفئات الكيميائية النباتية الرئيسية في مسحوق النبات. على مستوى المستخلصات المائية الثلاثة، تم تحديد المحتوى الكلي للمركبات الفينولية والفلافونويد متبوعاً بتحليل المستخلصات باستعمال الكروماتوغرافيا السائلة LC/ESI-QTOF- MS/MS. تمت دراسة ومقارنة النشاط المضاد للأكسدة لهذه المستخلصات باختبارات احتجاز الجذور الحرة DPPH ، والقوة الاختزالية لشاردة الحديد الثلاثي والنشاط المضاد للأكسدة الكلي. إضافة الى ذلك، تم تقييم السمية الحادة عن طريق إعطاء 2 و 5 جرام/كجم من المستخلصات المائية عن طريق الفم حسب وزن الجسم لذكور وإناث فئران BalbC، متبوعاً باختبار النشاط المضاد للالتهابات عن طريق قياس الوذمة الأخرسية المستحدث بالكاراجينين في فئران BalbC. أشارت نتائج الفحص الكيميائي للنبات إلى وجود الفلافونويد الحر، و الدباغ الغاليي القابل للتحلل في الماء، والكومارين، والتريبتيرين، والكاروتينات، والأوز/الهولوسيدات، والستيرولات، والصابونوسيدات. كفاءة الاستخراج التي تم الحصول عليها من التغليف أعلى بكثير من تلك التي تم الحصول عليها من قبل التسريب. علاوة على ذلك ، أظهرت الدراسات أن جميع المستخلصات تحتوي على مستويات كبيرة من إجمالي المحتوى الفينولي، ولكن تم الحصول على أعلى تركيز عن طريق التفكيك. فيما يتعلق بالفلافونويد، أظهر التغليف والتسريب محتويات أعلى. أظهرت البيانات المستقاة من تحليلات الكروماتوغرافيا السائلة ملامح نوعية مماثلة لجميع المستخلصات المائية مع 14 قمة كروماتوغرافية مميزة في الوضع السلبي و 6 في الوضع الإيجابي، مما أدى إلى تحديد السيرينجينجينينات، من 14 من جليكوسيدات الفينيلثانويد و من 5 إيريديويدات. أظهرت نتائجنا اختلافات للوفرة النسبية لبعض المركبات اعتماداً على عملية الاستخراج المستخدمة. كما أظهرت جميع المستخلصات خصائص مماثلة لمضادات الأكسدة في الأنظمة الثلاثة التي تمت دراستها باستثناء مقاييس الفاعلية الاختزالية لشاردة الحديد الثلاثي حيث أظهر الاستخلاص بالنقع نشاطاً أقل فاعلية بشكل ملحوظ. يشير هذا إلى أن جذور *Cistanche phelypaea* لها إمكانات مضادة للأكسدة مثيرة للاهتمام مرتبطة بالتأثيرات التآزرية للعديد من المركبات المضادة للأكسدة. من المثير للاهتمام أنه لم يكن للإعطاء الفموي أي آثار سامة و ذلك بالنسبة لجميع المستخلصات الثلاثة. كما لوحظ انخفاض كبير في النسبة المئوية للوذمة الأخرسية في الفئران المعالجة بالمستخلصات المائية الثلاثة مع انخفاض ملحوظ في تلك المعالجة بالاستخلاص بالإغلاء. في ضوء النتائج التي تم الحصول عليها، فإن استخدام الجذور الصغيرة ل *Cistanche phelypaea* في شكل مستخلصات مائية في تعديل ووقاية الحالات المرضية المتعلقة بالإجهاد والتهاب الأكسدة هو أمر إيجابي للغاية من حيث الفوائد والمخاطر المتوازنة و حيث كان الاستخلاص بالإغلاء هو الشكل الأكثر فعالية.

الكلمات الرئيسية: *Cistanche phelypaea* ، الاستخلاص بالإغلاء، الاستخلاص بالتسريب، الاستخلاص بالنقع، مضادات الأكسدة، الكيمياء النباتية، سمية حادة، مضادة للالتهابات.

SOMMAIRE

	Liste des abréviations	
	Liste des figures	
	Liste des tableaux	
	Introduction générale	01
1.	Synthèse bibliographique.....	04
1.1.	Présentation de <i>Cistanche phelipaea</i> L. Cout.....	04
1.1.1	Généralités sur le genre <i>Cistanche</i>	04
1.1.2	Classification et description botanique.....	05
1.1.2.1	Classification	05
1.1.2.2.	Description botanique	05
1.1.3.	Répartition géographique	07
1.1.4.	Utilisations alimentaires et médicinales.....	07
1.1.5.	Effets biologiques	08
1.1.6.	Composition phytochimique.....	08
1.2	Stress oxydatif et antioxydants.....	09
1.2.1	Le stress oxydatif.....	09
1.2.2	Définition et production des espèces réactives dans l'organisme.....	09
1.2.3	Types d'espèces réactives.....	10
1.2.4.	Rôles physiologiques des espèces réactives.....	10
1.2.5.	Rôles physiopathologiques des espèces réactives.....	11
1.2.5.1	Oxydation des protéines et des acides aminés.....	11
1.2.5.2	Oxydation des lipides.....	12
1.2.5.3	Oxydation des carbohydrates	12
1.2.5.4.	Oxydation de l'ADN	12
1.2.6.	Les systèmes antioxydants	12
1.2.6.1.	Définition.....	12
1.2.6.2	Les types d'antioxydants.....	14
1.2.6.2.1	Systèmes antioxydants enzymatiques	14
1.2.6.2.2	Systèmes antioxydants non enzymatiques	14
1.2.6.2.2.1	Systèmes antioxydants non enzymatiques endogènes.....	14
1.2.6.2.2.2	Systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes.....	15
1.2.6.2.2.2.1	Systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes synthétiques.....	15
1.2.6.2.2.2.2	Systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes naturels.....	19
1.3.	Toxicité des plantes médicinales.....	19
1.3.1.	Evaluation de la toxicité	20
1.3.1.1.	Toxicité aiguë.....	20
1.3.1.2.	Toxicité subaiguë	21
1.3.1.3.	Toxicité subchronique	21
1.3.1.4.	Toxicité chronique	21
1.3.2.	Pharmacocinétique et pharmacodynamique des toxiques.....	22
1.3.3.	Facteurs de variation de la sensibilité à la toxicité des plantes médicinales.....	22
1.3.4.	Altérations physiopathologiques suite à l'intoxication par les plantes médicinales	23
1.3.5.	Données toxicologiques du genre <i>Cistanche</i>	24

1.4.	Inflammation et phytothérapie.....	24
1.4.1.	La réaction inflammatoire.....	24
1.4.2.	Les différents types de l'inflammation.....	25
1.4.2.1.	Inflammation aiguë.....	25
1.4.2.2.	Inflammation chronique.....	25
1.4.3.	Traitement de l'inflammation	26
1.4.3.1.	Les anti-inflammatoires stéroïdiens AIS (Glucocorticoïdes)	26
1.4.3.2.	Les anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS.....	27
1.4.3.2.1.	Mécanisme d'action des AINS.....	27
1.4.3.3.	Anti-inflammatoires d'origine végétale	28
1.4.4.	Études antérieures sur l'effet anti-inflammatoire du genre <i>Cistanche</i>	28
2.	Matériel et méthodes.....	30
2.1.	Présentation de la région de récolte	30
2.2.	Récolte et séchage du matériel végétal.....	30
2.3.	Criblage phytochimique de la poudre végétale des racines de <i>C. phelipaea</i>	31
2.4.	Etude phytochimique des extraits aqueux de <i>C. phelipaea</i>	35
2.4.1.	Préparation des extraits aqueux.....	35
2.4.1.1	Préparation de la décoction	35
2.4.1.2	Préparation de l'infusion.....	35
2.4.1.3	Préparation de la macération	36
2.4.2.	Calcul du rendement d'extraction	36
2.4.3.	Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux	37
2.4.4.	Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux.....	37
2.4.5.	Dosage des sucres totaux.....	37
2.4.6.	Analyse LC-ESI-QTOF-MS.....	38
2.4.6.1.	Principe de la LC-MS.....	38
2.4.6.2.	Mode d'ionisation (Electrospray ionisation) ESI	39
2.4.6.2.1.	Principe de l'ionisation ESI.....	39
2.4.6.2.2.	Mécanismes d'ionisation en mode ESI.....	40
2.4.6.3	Analyseur QTOF.....	41
2.4.6.3.1.	Analyseur quadripolaire	41
2.4.6.3.2.	Analyseur à de temps de vol (TOF)	41
2.4.6.4.	Protocole expérimental de la LC-ESI-QTOF-MS.....	42
2.4.7.	Analyse statistique.....	43
2.5.	Etude <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante de <i>C. phelipaea</i>	43
2.5.1.	Essai de Piégeage du radical DPPH.....	43
2.5.2.	Essai du pouvoir antioxydant réducteur ferrique.....	44
2.5.3.	Détermination de l'activité antioxydante totale.....	45
2.5.4.	Analyse statistique.....	45
2.6.	Etude de la toxicité aiguë et de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	45
2.6.1.	Animaux	45
2.6.2.	Evaluation de la toxicité aiguë	45
2.6.2.1.	Traitements des animaux par les extraits aqueux de la racine de <i>C.phelipaea</i>	46
2.6.2.2.	Suivi de la mortalité et du comportement	46

2.6.2.3.	Etude des variations pondérales.....	46
2.6.2.4.	Etude statistique.....	47
2.6.3.	Etude de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	47
2.6.3.1.	Prétraitement des animaux par les extraits aqueux de la racine de <i>C. phelipaea</i> ...	47
2.6.3.2.	Suivi de l'évolution de l'inflammation après prétraitement	48
2.6.3.3.	Etude statistique.....	48
3.	Résultats et discussions.....	49
3.1.	Criblage phytochimique de la poudre végétale des racines de <i>C. phelipaea</i>	49
3.2.	Etude phytochimique des extraits aqueux de <i>C. phelipaea</i>	52
3.2.1.	Calcul du rendement d'extraction.....	52
3.2.1.1.	Discussion.....	53
3.2.2.	Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux	55
3.2.3.	Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux.....	56
3.2.4.	Dosage des sucres totaux.....	56
3.2.5.	Analyse LC-ESI-QTOF-MS.....	57
3.2.6.	Discussion	69
3.3.	Etude <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante de <i>C. phelipaea</i>	70
3.3.1.	Essai de piégeage du radical DPPH.....	70
3.3.2.	Essai du pouvoir antioxydant réducteur ferrique.....	72
3.3.2.1.	Etude de la corrélation entre le pouvoir antioxydant réducteur ferrique et le contenu en composés phénoliques, flavonoïdes et sucres totaux.....	73
3.3.3.	Détermination de l'activité antioxydante totale.....	75
3.3.4.	Discussion	76
3.4.	Etudes <i>in vivo</i> de la toxicité aiguë et de l'activité anti-inflammatoire	79
3.4.1.	Evaluation de la toxicité aiguë	79
3.4.1.1.	Suivi de la mortalité et du comportement	79
3.4.1.2.	Etude des variations pondérales	80
3.4.2.	Etude de l'activité anti-inflammatoire	85
3.4.3.	Discussion.....	86
	Conclusion et perspectives.....	92
	Références bibliographiques.....	94
	Annexes	
	Publication	

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

AAS : Acide ascorbique

AAT : Activité anti-oxydante totale

AC : Acide caféique

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens

ALAT : Alanine transaminase

ANOVA: Analysis of Variance

ASAT : Aspartate transaminase

BHA : Butylhydroxyanisol

BHT : Butylhydroxytoluene

COX: Cyclo-oxygénase

CPT : Composés phénoliques totaux

DEC: Décoction

DL50 : Dose létale 50

DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

EAG : Equivalents en acide gallique

EC : Energie de collision

EC50 : Effective Concentration 50

EQ : Equivalents en quercétine

EsAAS : Equivalents en acide ascorbique

ESI : Electrospray ionisation

FRAP : Ferric reducing antioxidant power

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GSR : Glutathion réductase

IC50 :Inhibitory Concentration 50

IL : Interleukine

INF: Infusion

iNOS : NO synthase inductible

LC- MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

LC-MS-MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LOX : Lipoxygénase

LPS : Lipopolysaccharides

MAC: Macération

MS : Spectrométrie de masse

m/z: Ratio masse sur charge

NO : Monoxyde d'azote

NOS: NO synthase

OECD : Organization for Economic Cooperation and Development

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PC: Poids corporel

PGs: Prostaglandines

PhGs: Phénylthanoïdes glycosides

PM : Poids moléculaire

Prxs : Peroxiredoxins

QTOF: Combinaison de l'analyseur quadripolaire à celui a temps de vol

RNS : Reactive nitrogen species

ROS : Reactive oxygen species

RSA: Activité anti-radicalaire

SEM: Erreur standards à la moyenne

SO: Stress oxydatif

SOD : Superoxyde dismutase

TBHQ : Tert-butyl-hydroquinone

TFT: Teneur en flavonoïdes totaux

TNF α : Tumor necrosis factor

TOF : Time of flight analyser

Tr: Temps de rétention

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Liste des figures

Figure 01:	Photo de <i>Cistanche phelipaea</i> L.cout (Beladjila, 2020).....	06
Figure 02:	Les différentes parties de <i>Cistanche phelipaea</i> (Gast, 2000).....	06
Figure 03:	Structures chimiques de certains composés de <i>C. phelipaea</i> (Deyama et al., 1995).....	09
Figure 04 :	Mécanisme d'action des AINS (Burke et al., 2006).....	28
Figure 05 :	Carte de localisation de la région de Béni Abbès (Bachir et Aouar, 2019).....	30
Figure 06 :	Photo des racines de <i>C. phelipaea</i> récoltées et mises à sécher (Janvier, 2015).....	31
Figure 07 :	Photos de l'inflorescence de <i>C. phelipaea</i> dans le site de récolte à Béni Abbès (Avril, 2015).....	31
Figure 08 :	Rendement d'extraction des différents extraits aqueux de <i>C.phelipaea</i>	52
Figure 09 :	Abondance relative des composés identifiés au niveau des extraits aqueux des racines de <i>C. phelipaea</i> par analyse LC-ESI-QTOF-MS en mode d'acquisition négative	65
Figure 10 :	Abondance relative des composés identifiés au niveau des extraits aqueux des racines de <i>C. phelipaea</i> par analyse LC-ESI-QTOF-MS en mode d'acquisition positif	65
Figure 11 :	Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS des molécules 01 et 04....	66
Figure 12 :	Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS des molécules 06 et 08....	66
Figure 13 :	Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS des molécules 11 et 12...	66
Figure 14 :	Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS des molécules 13 et 14...	67
Figure 15 :	Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS des molécules 15 et 16...	67
Figure 16 :	Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS de la molécule 17.....	67
Figure 17 :	Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS de la molécule 18.....	68

Figure 18 :	Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS de la molécule 19.....	68
Figure 19 :	Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS de la molécule 20.....	68
Figure 20 :	Activité anti-radicalaire RSA exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de différentes concentrations des extraits aqueux des racines de <i>C. phelipaea</i>	72
Figure 21 :	Analyse de la corrélation entre le pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP et le contenu en composés phénoliques totaux CPT...	74
Figure 22 :	Analyse de la corrélation entre le pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP et la teneur en flavonoïdes totaux TFT.....	74
Figure 23 :	Analyse de la corrélation entre le pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP et le contenu en sucres totaux.....	75
Figure 24:	Evolution du poids corporel des souris mâles témoins et traitées par les extraits DEC, INF et MAC aux doses de 2 et 5g/kg de PC durant 14 jours de traitement.....	80
Figure 25 :	Evolution du poids corporel des souris femelles témoins et traitées par les extraits DEC, INF et MAC aux doses de 2 et 5g/kg de PC durant 14 jours de traitement.....	81
Figure 26 :	Effet de l'administration orale de la DEC des racines de <i>C. phelipaea</i> (2 et 5g/kg de PC) sur le poids moyen des organes (g) des souris mâles (a) et femelles (b).....	82
Figure 27 :	Effet de l'administration orale de l'INF des racines de <i>C. phelipaea</i> (2 et 5g/kg de PC) sur le poids moyen des organes (g) des souris mâles (a) et femelles (b).....	83
Figure 28 :	Effet de l'administration orale de la MAC des racines de <i>C. phelipaea</i> (2 et 5g/kg de PC) sur le poids moyen des organes (g) des souris mâles (a) et femelles (b).....	84
Figure 29 :	Cinétique d'augmentation de l'œdème induit par la carragénine	85

Liste des tableaux

I.	Principales espèces réactives produites dans l'organisme.....	13
II.	Principaux systèmes antioxydants enzymatiques dans l'organisme humain.....	17
III.	Principaux systèmes antioxydants non enzymatique endogènes.....	18
IV.	Types d'extraits utilisés pour le screening des différentes classes phytochimiques.....	32
V.	Principes des tests de caractérisations utilisés dans le screening phytochimique.....	33
VI.	Différents mécanismes chimiques impliqués en spectrométrie de masse en mode ESI	40
VII.	Résultats du criblage phytochimique de la poudre des racines de <i>C.phelipaea</i> ...	49
VIII.	Rendement d'extraction des extraits aqueux des racines de <i>C. phelipaea</i>	52
IX.	Teneurs en composés phénoliques totaux (CPT), en flavonoïdes (TFT) et en sucres totaux dans les différents extraits aqueux des racines de <i>C. phelypaea</i>	57
X.	Composés identifiés par LC-ESI-QTOF-MS au niveau des extraits aqueux des racines de <i>C. phelypaea</i>	63
XI.	Composés identifiés par LC-ESI-MS /MS en mode négatif au niveau des extraits aqueux des racines de <i>Cistanche phelypaea</i>	64
XII.	Activités antioxydantes des différents extraits aqueux des racines de <i>C. phelipaea</i>	76

INTRODUCTION GENERALE

Selon l'Organisation mondiale de la santé OMS, 80 % des populations des régions éloignées utilisent la phytothérapie. L'utilisation de cette dernière est devenue universelle dans les soins de santé primaires et la gestion de maladies chroniques en particulier dans les pays en développement du fait que les composés bioactifs isolés à partir de plantes médicinales sont considérées comme inoffensifs. Les plantes médicinales sont donc largement utilisées comme médicaments en vente libre et ont reçu un grand intérêt dans la recherche comme une source alternative de médicaments pharmaceutiques allopathiques.

Les études qualitatives et quantitatives des composés bioactifs à partir de matières végétales reposent principalement sur la sélection de la méthode d'extraction. En effet, cette dernière présente un impact crucial et significatif sur les résultats obtenus à partir de l'analyse phytochimique et des essais de bio-activité. De plus, malgré le progrès des méthodes chromatographiques et spectroscopiques modernes, leur performance demeure étroitement liée à la méthode d'extraction employée (**Azmir et al., 2013 ; Pisoschi et al., 2016**).

La décoction et l'infusion sont deux méthodes d'extraction classiques qui utilisent le chauffage à différents temps de contacts. Leurs produits sont largement consommés et tolérés en alimentation humaine. Cependant, la décomposition thermique peut réduire la bioactivité des extraits obtenus. La macération est une autre méthode d'extraction classique sans chauffage qui nécessite un temps de contact beaucoup plus long. Dans ce cas également, l'obtention de certains composés actifs dont l'extraction nécessite le chauffage serait limitée (**Pisoschi et al., 2016**).

Comme tout xénobiotique, les plantes médicinales ne sont pas dépourvues de toxicité vis-à-vis de l'organisme humain. En général, la connaissance de leurs effets toxiques est acquise à partir de l'expérience de leur administration. Peu de connaissances sur la toxicité des médicaments traditionnels sont disponibles à cause de la limite des techniques et méthodes d'évaluation (**Yihang et al., 2016**). Des études toxicologiques ont rapporté que certaines plantes montrent des effets toxiques en particulier hépatiques et rénaux. Cependant ces effets toxiques restent dépendants de la dose administrée, d'où l'importance de déterminer le seuil d'innocuité d'une plante médicinale.

Le genre *Cistanche*, appartenant à la famille des *Orobanchaceae*, contient 27 espèces qui sont des plantes parasites vivaces principalement distribuées dans les zones arides et semi-

arides ainsi que les déserts de l'hémisphère nord (**Jiang et Tu, 2009**). En raison de leurs excellentes applications dans la médecine traditionnelle et leurs bienfaits nutritionnels, *Cistanches herba* ont été qualifiées comme « Ginseng du désert » (**Wang et al., 2012**). Ce genre est représenté en Algérie par trois espèces : *C. phelypaea* (L.) Cout. (Syn. *C. lutea* (Hoffm.) Link.), *C. violacea* (Desf.) Beck. et *C. mauritanica* (Coss. Et Dur.) Beck. (**Quezel et Santa, 1963**).

Une multitude d'études menées sur le genre *Cistanche* et s'inscrivant dans différentes disciplines scientifiques soulignent d'une part leur richesse particulière en métabolites de types phénylétanoïdes glycosides, iridoïdes et polysaccharides. D'autre part, plusieurs activités biologiques et pharmacologiques ont été attribuées à ces métabolites.

Cistanche phelypaea (L.) Cout. est une espèce saharo-méditerranéenne appréciée pour ses propriétés nutritionnelles et médicinales. Cette espèce était l'une des sources nutritionnelles les plus précieuses largement utilisées par les populations nomades et sédentaires du Sahara algérien pendant les périodes de famine et de sécheresse (**Gast, 2000**). De nos jours, elle est utilisée comme condiment alimentaire et comme remède contre le diabète, les douleurs abdominales, la diarrhée, les douleurs musculaires et l'agalactie (**Hamliche et Maiza, 2006**). Très peu de rapports scientifiques ont été consacrés à l'espèce *C. phelypaea*. Ce constat a suscité notre intérêt pour la contribution à l'étude phytochimique, l'évaluation du potentiel antioxydant et anti-inflammatoire de même que la toxicité aiguë d'extraits aqueux préparés par décoction, infusion et macération à partir des racines de cette plante médicinale.

Pour ce faire, nous avons suivi les démarches suivantes :

- Étude phytochimique par le criblage initial des principales classes phytochimiques au niveau de la poudre végétale des racines. Ce criblage est suivi par une étude quantitative visant à déterminer le rendement d'extraction brut, le contenu en composés phénoliques, flavonoïdes et sucres totaux au niveau de trois extraits aqueux obtenus par les procédés de décoction, infusion et macération. Ces mêmes extraits ont fait l'objet d'une analyse qualitative et quantitative par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse LC/ESI/QTOF-MS.
- Evaluation de l'effet antioxydant des trois extraits aqueux via trois systèmes *in vitro*.

- Etude de la toxicité aiguë des trois extraits chez les souris BalbC mâles et femelles.
- Evaluation du potentiel anti-inflammatoire *in vivo* des extraits aqueux à travers le modèle expérimental d'œdème plantaire induit chez les souris BalbC par la carragénine

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne via l'étude phytochimique, l'évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire et l'étude de la toxicité aiguë des racines de *C. phelipaea* de la wilaya de Béni Abbès (ex commune de la Wilaya de Bechar). Cette étude sera échelonnée sur trois chapitres. Dans le premier chapitre, les données bibliographiques sur la plante *C. phelipaea*, le stress oxydatif et les systèmes antioxydant, la toxicité et l'inflammation seront développées. Le second chapitre présente le matériel végétal ainsi que les différentes méthodes utilisées. Le troisième chapitre renferme les résultats obtenus et leurs discussions. Enfin, nous concluons le travail en exposant les principaux résultats obtenus et les perspectives à envisager.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Présentation de *Cistanche phelipaea* (L.) Cout.

1.1.1. Généralités sur le genre *Cistanche*

C. phelipaea est une espèce appartenant au genre *Cistanche* dont les différentes espèces sont communément nommées « *Cistanches herba* ». Ce genre appartient aux angiospermes *eudicotylédones* de la famille des *Orobanchaceae* comprenant près de 27 espèces holoparasites à travers le monde. *Cistanches herba* sont des herbes parasites vivaces dépourvues de chlorophylle, qui s'attachent généralement aux racines des plantes fixatrices de sable, telles que *Haloxylon ammodendron*, *Heracleum persicum*, *Kalidium foliatum* et le genre *Tamarix* (Jiang et Tu, 2009 ; Li *et al.*, 2013b).

Le genre *Cistanche* est distribué dans les zones arides ou semi-arides à travers la Péninsule Ibérique, Afrique du Nord, Arabie Saoudite, Iran, Afghanistan, Pakistan, Inde du Nord, Mongolie et la Chine du nord-ouest (Jiang et Tu, 2009). Certaines espèces de ce genre ont été cultivées en Chine (Nan *et al.*, 2016). En Algérie, il est représenté par trois espèces : *C. phelypaea* (L.) Cout. (Syn. *C. lutea* (Hoffm.) Link.), *C. violacea* (Desf.) Beck., et *C. mauritanica* (Coss. and Dur.) Beck. (Quezel et Santa, 1963). La croissance et la culture des espèces de *Cistanche* nécessitent des conditions environnementales extrêmes : climat aride, sols appauvris, grande variation de température, ensoleillement intense et moins de 250 mm de précipitations annuelles (Qiao *et al.*, 2007).

« *Cistanches herba* » sont appelées ginseng du désert en raison de leurs excellentes vertus thérapeutiques et de leur effet nourrissant (Wang *et al.*, 2012). En médecine traditionnelle chinoise, elles sont utilisées comme tonique dans le traitement de l'insuffisance rénale, de l'impuissance, de l'infertilité, des métrorragies abondantes et de la constipation chronique. Par ailleurs, certaines de ces espèces sont utilisées comme condiment alimentaire (Li *et al.*, 2016c).

Les études phytochimiques du genre *Cistanche* ont révélé que les composés non volatils comprenant les phényléthanoïdes glycosides (PhGs), les iridoïdes, les lignanes, les alditols, les oligosaccharides et les polysaccharides sont les principaux constituants (Ebringerova *et al.*, 1997 ; Jiang et Tu, 2009 ; Wang *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2013). Une fraction volatile de moindre importance comprenant l'huile essentielle et des acides gras a également été révélée (Jiang et Tu, 2009 ; Ramadan *et al.*, 2011).

Les principales espèces étudiées du genre *Cistanche* sont : *C. tubulosa*, *C. deserticola*, *C. Salsa*, *C. violacea* et *C. phelipaea*.

1.1.2. Classification et description botanique

1.1.2.1. Classification

La taxonomie de *C. phelipaea* est présentée selon la classification de **Quezel et Santa (1963)** :

Règne : Plantae

Sous-règne : Eucaryotes

Embranchement : Spermatophyta

Sous-Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Subclasse : Mangnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Orobanchaceae

Genre : *Cistanche*

Espèce : *Cistanche phelypaea* (L.) Cout., 1913

1.1.2.2. Description botanique

Cistanche phelipaea est connue sous le nom vernaculaire amazigh de *Ahliou/Ahelwan/Ahahal* et arabe de *Danoune* (**Gast, 2000**). C'est une plante haute de 50-150 cm avec un calice de 15-11 mm et une corolle de 4-5 cm dont le tube s'évase brusquement au-dessus de l'insertion des étamines. Les tiges sont souvent en touffes et les fleurs sont jaunes et réparties sur toute la plante dans des tons bruns, du clair au foncé (figure 01). Elle ne présente pas de feuilles mais seulement des sortes d'écailles le long de la tige (**Ozenda, 1991**). Trois parties peuvent être distinguées au niveau de cette plante (figure 02) :

- La partie aérienne représentée par la tige florale connue localement sous le nom ***Tahalahet***.
- La partie peu verticale, du sol jusqu'à la racine mère.
- La racine mère où ***Akounef (Ikounefen)*** comme elle est appelée par les Sahariens, elle est de couleur brunâtre, horizontale au sol au-dessus et aux racines de la plante hôte où elle pompe sa sève avec ses extrémités appelé ***Dori***, elle peut atteindre jusqu'à 1m de profondeur (**Gast, 2000**).

C. phelipaea pousse à partir du mois de décembre et atteint sa maturité en avril (Gast, 2000). Elle sort de terre après la pluie et on voit alors de petits bourrelets à la surface du sable (Benchelah *et al.*, 2000).



Figure 01 : Photo de *Cistanche phelipaea* L.cout. (Beladjila, 2020).

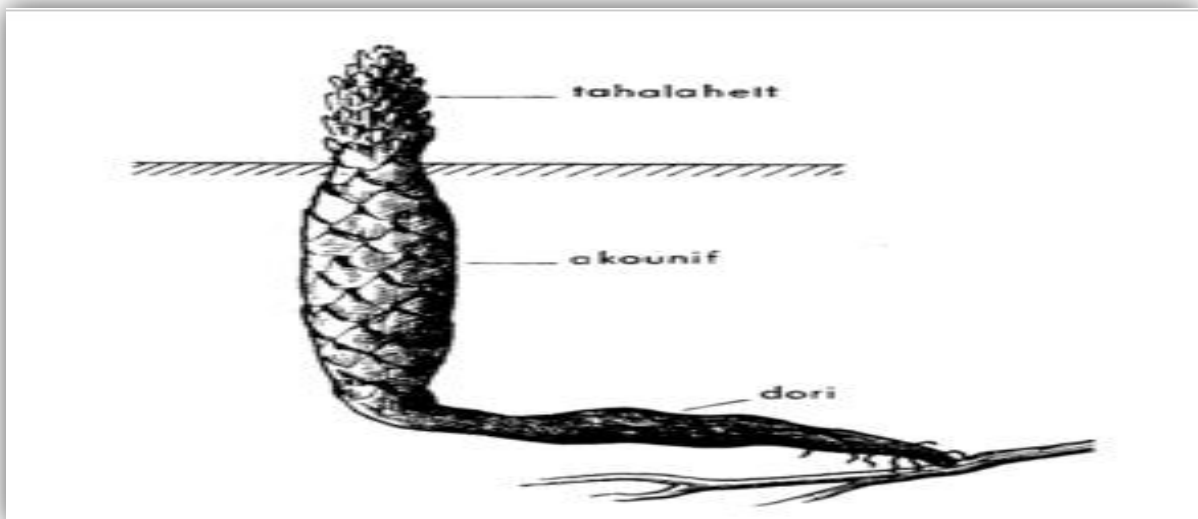


Figure 02 : Les différentes parties de *Cistanche phelipaea* (Gast, 2000).

1.1.3. Répartition géographique

Le genre *Cistanche* est très commun en Asie à l'exception de deux espèces *C. phelypaea* et *C. violacea* qui se localisent dans la partie chaude de la Méditerranée et dans les pays arides voisins, plus particulièrement dans les sols sableux ou limoneux et peu salins du littoral ou de l'intérieur (**Ozenda et Capdepon, 1977**). *C. phelypaea* est une espèce saharo-méditerranéenne retrouvée dans les dunes sablonneuses du Portugal, de l'Espagne, de la Turquie et de la partie orientale de la région méditerranéenne et au sud du Sinaï en Égypte (**Tackholm, 1974 ; Ramadan et al., 2011**). En Algérie, elle se trouve dans les zones sablonneuses, comme dans les larges lits d'oueds au nord de Djanet, Assandilen, Tanagh, El Goléa et Béni Abbès (**Hammiche et Maiza, 2006 ; Benchelah et al., 2011**).

1.1.4. Utilisations alimentaires et médicinales

De nombreux usages comestibles et médicinaux sont attribués à *C. Phelypaea*. Grâce à son abondance constante quel que soit le niveau pluviométrique, elle est connue depuis longtemps comme moisson du désert. *C. phelipaea* était utilisée comme aliment par les populations sédentaires et nomades de l'Ahaggar et du Tassili N'ajer (**Gast, 2000 ; Hammiche et Maiza, 2006**).

Les racines sont consommées comme un légume, bouillies dans l'eau, ou rôties, mais le plus souvent après un rouissage qui dure plusieurs jours, en raison de la forte amertume de leur pulpe. L'usage le plus courant concerne la racine (*Akounef*) avant flétrissement (**Gast, 2000**). Les jeunes pousses, de la partie souterraine, sont cuites sous la cendre, réduites en poudre et sont alors mélangées à la farine de céréales. Quand elles sont coupées en rondelles et mises à sécher, elles seront utilisées en médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée, le diabète, la stérilité féminine et la constipation et comme diurétique. La racine de *C. phelypaea* est utilisée comme tonique pour le traitement de l'insuffisance rénale. Dans la région de Tissint (Maroc), la poudre est appliquée pour les blessures comme homéostat (**Namba, 1994 ; Bellakhdar, 1997 ; Mabblerley, 1997 ; Benchelah et al., 2011**).

En Algérie, les études ethnobotaniques ont rapportées l'utilisation de *C. phelipaea* dans le Tassili N'ajer, El Goléa et Béni abbès contre divers troubles : douleurs abdominales, diarrhée, douleurs musculaires, l'agalactie, diabète et myalgies. Cette plante possède également des propriétés aphrodisiaques (**Maiza et Hammiche, 1993 ; Hammiche et Maiza, 2006 ; Benchelah et al., 2011**).

1.1.5. Effets biologiques

De nombreuses activités biologiques ont été rapportées pour certaines espèces du genre *Cistanche* en particulier *C. tubulosa* et *C. desertiola*. Elles jouent un rôle anti-apoptotique (Wat *et al.*, 2016), hypoglycémiant et hypolipidémique (Xiong *et al.*, 2013), hépatoprotecteur (Guo *et al.*, 2016), augmentation de la production de testostérone (Wang *et al.*, 2016), anti-âge (Chen *et al.*, 2018a), neuroprotecteur, antidépresseur, retarde les troubles cognitifs, maintient une capacité d'apprentissage et de mémoire plus efficace avec l'âge (Lin *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2017b), immuno-modulateur (Zhang *et al.*, 2018a) et anti-tumoral (Arast *et al.*, 2022).

Concernant *C. phelipaea*, les extraits méthanolique et aqueux de la partie aérienne ont montré de puissantes activités antioxydantes *in vitro* (Elkamali et Hamed, 2015). Par ailleurs, différents extraits de la racine et de la tige ont montré une activité antioxydante, des effets neuroprotecteurs, antidiabétiques et anti-mélanogènes (Trampetti *et al.*, 2018). Les travaux de Beladjila *et al.* (2018) ont isolé 04 nouveaux composés à partir de la partie aérienne de la plante récoltée au sud-ouest Algérien. Ces composés ont montré une activité inhibitrice des enzymes lactate déshydrogénase humaine et la monoacylglycérol lipase qui sont fortement impliquées dans le métabolisme glucidique et lipidique particulier aux cellules cancéreuses.

1.1.6. Composition phytochimique

Les analyses phytochimiques de *C. phelypaea* ont révélé la présence des composés echinacoside (1), tubuloside A (2) tubuloside E (3), acteoside (4), 2-acétylactéoside (5) qui sont des PhGs et les composés glucoside (7), ajugol (8), phelypaeside (11) et le 6-déoxycatalpol (6) qui sont des iridoïdes. Par ailleurs, la syringine (9) et le β -sitostérol (10) appartenant respectivement aux lignanes et aux oligosaccharides ont été isolés (figure 03) (Kobayashi *et al.*, 1985 ; Deyama *et al.*, 1995). Comme nous l'avons précédemment cité, les travaux de Beladjila *et al.* (2018) ont permis l'isolement de 04 nouveaux PhGs à partir de l'extrait butanolique des parties aériennes de *C. phelypaea* récoltée dans le sud-ouest Algérien. Il s'agit du 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-O-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside, 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-pcoumaroyl- β -D-glucopyranoside, and 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside.

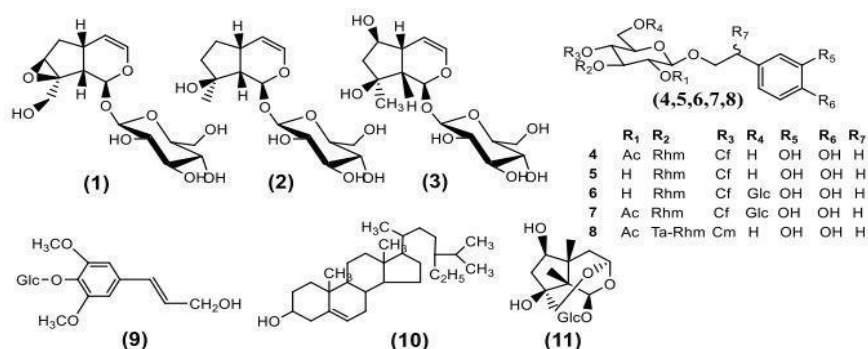


Figure 03: Structures chimiques de certains composés de *C. philippaea* (Deyama *et al.*, 1995).

1.2. Stress oxydatif et antioxydants

1.2.1. Le stress oxydatif

La notion de stress oxydatif (SO) représente un nouveau concept largement employé en science médicale durant les trois dernières décennies (Munteanu et Apetrei, 2021). Le SO est défini comme un état dans lequel la production des radicaux libres par l'organisme surpasse les capacités antioxydantes de ce dernier (Dontha, 2016). En d'autres termes, il s'agit de la rupture de l'équilibre de la balance entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants (Badarinath *et al.*, 2010 ; Munteanu et Apetrei, 2021). De ce fait, la quantification du SO est estimée par les paramètres pro-oxydants (De Sousa *et al.*, 2017). Le SO provoque l'altération et la destruction des biomolécules (acides nucléiques, lipides, protéines et carbohydrates) et des cellules se répercutant ainsi sur l'intégrité de l'organisme (Ďuračková, 2010). Il est impliqué dans la pathogenèse de plusieurs maladies (Wood *et al.*, 2006) comme l'athérosclérose (Pratico *et al.*, 1997), le cancer (Klaunig, 2018), les maladies neurodégénératives (Christen, 2000) et les pathologies inflammatoires du tube digestif (Tüzün *et al.*, 2002).

1.2.2. Définition et production des espèces réactives dans l'organisme

Un radical libre est défini comme étant une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons libres au niveau de son orbitale externe (Badarinath *et al.*, 2010). Il s'agit d'une molécule instable et hautement réactive ayant la capacité de réagir avec d'autres molécules qu'elles soient radicalaires ou non, soit en cédant son électron libre ou au contraire en captant un électron. De même, deux radicaux libres peuvent réagir entre eux par collision de leur électron libre en formant une liaison covalente (Aslani et Ghobadi, 2016 ; Dontha, 2016).

La génération des espèces réactives peut se produire dans les cellules animales et humaines dans des conditions physiologiques et également pathologiques. Dans l'organisme humain, une production continue d'espèces réactives, comprenant en grande partie des radicaux libres mais aussi des espèces réactives non radicalaires, a lieu en réponse à la fois à des facteurs physiologiques endogènes (sources intracellulaires) et à des facteurs exogènes (sources extracellulaires) (Aslani et Ghobadi, 2016). Dans le premier cas, la source intracellulaire majeure est la mitochondrie qui permet la production de certaines de ces entités lors du métabolisme énergétique et cela à partir de l'oxygène (Dontha, 2016). De plus, le métabolisme du cytochrome P450, les lysosomes, les peroxisomes et l'activation de certaines cellules immunitaires (neutrophiles, autres phagocytes et cellules inflammatoires) représentent d'autres sources intracellulaires. Il est à noter que les activités de certaines enzymes ; les oxidase, cycloxygénase (COX), lipoxygénase (LOX), déshydrogénase et peroxydase peuvent également conduire à la production de radicaux libres (Sachdev et Davies, 2008 ; Aslani et Ghobadi, 2016).

Plusieurs facteurs externes physiques, chimiques ou encore alimentaires peuvent aussi provoquer la formation de radicaux libres tels que les radiations ionisantes, la longue exposition au soleil, le tabac, les polluants, les pesticides, la prise de certains médicaments ainsi qu'une mauvaise hygiène alimentaire (Mathew *et al.*, 2011).

1.2.3. Types d'espèces réactives

Généralement dans les classifications les plus courantes, les espèces réactives sont divisées en deux catégories : les ROS (*Reactive Oxygen Species*) ou espèces réactives d'oxygène et les RNS (*Reactive Nitrogen Species*) ou espèces réactives d'azote (Badarinath *et al.*, 2010 ; Gupta, 2015 ; Dontha, 2016). Cependant, dans certaines classifications, en plus de ces deux classes, figurent également les RSS (*Reactive Sulphur Species*) ou espèces réactives de sulphate (Mathew *et al.*, 2011 ; Aslani et Ghobadi, 2016).

Les principales espèces réactives ainsi que leur production et leurs effets dans l'organisme sont données dans le tableau I.

1.2.4. Rôles physiologiques des espèces réactives

Les espèces réactives jouent des rôles importants aussi bien dans la régulation de certains processus physiologiques que dans la transduction des signaux extracellulaires (Mathew *et al.*, 2011 ; Aslani et Ghobadi, 2016). Parmi ces rôles, l'un des plus remarquables est l'efficacité des ROS et des RNS dans la médiation de la réponse

immunitaire grâce à leur pouvoir microbicide contre les antigènes phagocytés (**Nordberg et Arner, 2001**).

Plusieurs études ont montré l'implication des ROS dans plusieurs phénomènes physiologiques. Nous citons à titre d'exemple leur rôle fondamental dans le déclenchement de la signalisation cellulaire au niveau des muscles squelettiques (**Powers *et al.*, 2011**) et la régulation de l'activité de la guanylate cyclase soluble (**Fang *et al.*, 2002**). Le monoxyde d'azote NO est également bien étudié pour ses rôles physiologiques notamment sa fonction de neuromédiateur.

1.2.5. Rôles physiopathologiques des espèces réactives

A côté de leurs rôles physiologiques, on retrouve également des effets délétères des espèces réactives qui sont étroitement liés à plusieurs voir même à la majorité des états pathologiques. Ces effets traduisent des dommages cellulaires issus de l'altération de biomolécules par les espèces réactives (**Dontha, 2016**). En effet, un radical libre peut attaquer une molécule voisine stable en captant son électron la rendant ainsi instable en la transformant en un radical libre (**Patil *et al.*, 2003**). Une chaîne de réactions en cascade est ainsi déclenchée par les radicaux libres suite à leur réaction avec des molécules environnantes pour lesquelles ils présentent une bonne affinité comme les protéines (enzymatiques ou non), les lipides membranaires, les carbohydrates et les acides nucléiques (**Mathew *et al.*, 2011 ; Velavan, 2011 ; Dontha, 2016**). Les dommages causés par les radicaux libres augmentent avec l'âge et peuvent conduire à l'affaiblissement du système immunitaire et au développement de pathologies chroniques (**Percival, 1998**).

1.2.5.1. Oxydation des protéines et des acides aminés

L'oxydation des protéines par les radicaux libres peut engendrer leur inactivation, dénaturation ou dégradation. De même, les enzymes sont inactivées en particulier celles à fonction thiol (**Halliwell *et al.*, 1997 ; Cecarini, 2007**). La cellule possède des mécanismes lui permettant de reconnaître et de dégrader les protéines oxydées, cependant certaines d'entre elles ne sont pas détruites et s'accumulent progressivement en induisant un dysfonctionnement cellulaire (**Cecarini, 2007**). Les acides aminés peuvent également présenter des cibles d'oxydation des ROS. Il a été rapporté que les acides aminés aromatiques et ceux contenant le sulfate sont plus susceptibles à cette oxydation (**Aslani et Ghobadi, 2016**).

1.2.5.2. Oxydation des lipides

L'oxydation des lipides membranaires ou la peroxydation lipidique est l'oxydation par les ROS et des ions de transitions métalliques des lipides polyinsaturés qui par leur accumulation au niveau de la membrane cellulaire sont plus enclins à cette oxydation. Suite à cette peroxydation, l'intégrité de la membrane plasmique est détériorée engendrant ainsi la mort cellulaire (**Badarinath et al., 2010**).

Des produits cytotoxiques sont produits au cours de ce processus chimique tel que le malondiadehyde, le 4 hydroxynonemal, des conjugués diènes, des alcanes, des alcynes et des hydroperoxydes (**Aslani et Ghobadi, 2016**). Le cerveau de par sa richesse en lipides polyinsaturés représente une cible potentielle de la peroxydation lipidique qui peut provoquer l'apoptose et la dégénérescence des neurones (**Dontha, 2016**).

1.2.5.3. Oxydation des carbohydrates

Peut résulter en l'altération des fonctions des récepteurs aux hormones et aux neuromédiateurs, des interleukines (IL) et de la formation de prostaglandines (PGs) (**Dontha, 2016**).

1.2.5.4. Oxydation de l'ADN

Les différents radicaux libres peuvent endommager l'ADN de différentes manières comme le clivage de l'ADN, perturbation de la duplication, altération de la structure et en réagissant avec les bases de l'ADN comme l'oxydation des purines qui sont les plus susceptibles à l'oxydation en particulier par le radical hydroxyle (**Nordberg et Arner, 2001**).

1.2.6. Les systèmes antioxydants

1.2.6.1. Définition

De manière générale, un antioxydant est défini comme une substance qui lorsqu'elle est présente dans l'alimentation ou l'organisme à faible concentration par rapport à un substrat oxydable, permet de retarder, contrôler ou inhiber l'oxydation de ce dernier (**Wood, 2006 ; Munteanu et Apetrei, 2021**).

Tableau I: Principales espèces réactives produites dans l'organisme.

Type	Espèce réactive	Production	Effets néfastes
Espèces réactives Oxygénées	Anion superoxide $O_2^{\cdot -}$	<ul style="list-style-type: none"> Réduction de l'oxygène dans différents systèmes <i>in vivo</i> (métabolisme énergétique, système immunitaire, certaines activités enzymatiques et oxydations moléculaires (Aslani et Ghobadi, 2016) : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$ Dans les systèmes alimentaires (Gupta, 2015) 	Endommage la mitochondrie, l'ADN et d'autres molécules (Gupta, 2015)
	Radical hydroxyle OH^{\cdot}	Formé par la réduction d'une molécule d' O_2 : <ul style="list-style-type: none"> Par la réaction de Fenton : $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^{\cdot} + OH^-$ Par la réaction de type Fenton : $H^+ + Cl^- + H_2O_2 \rightarrow HOCl + H_2O$ (Aslani et Ghobadi, 2016) 	Oxydation des molécules organiques: carbohydrates, protéines et lipides ; Altérations/ modifications au niveau de l'ADN (Young et Woodside, 2001; Battin et Brumaghim, 2009; Gupta, 2015)
	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	<ul style="list-style-type: none"> Résulte de l'activité de la superoxide dismutase SOD: $2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ Peut résulter de l'activité de la glycolate oxidase, urate oxidase et l'acide aminé oxidase (Battin et Brumaghim, 2009) 	Traverse la membrane plasmique et donne naissance au radical extrêmement toxique OH^{\cdot} et au $HOCl$ (Aslani et Ghobadi, 2016)
	Oxygène singulet 1O_2	Formé par le système immunitaire (Gupta, 2015)	Oxydation des lipoprotéines de faible densité LDL (Gupta, 2015)
	Peroxyde ROO^{\cdot}	Résulte des peroxydations lipidique et protéique.	Peroxydation lipidique, Modification de certaines protéines, Clivage de l'ADN (Gupta, 2015)
	Alkoxyde RO^{\cdot}	Détérioration oxydative ou peroxydation lipidiques (Gupta, 2015)	Peut provoquer la mutation de l'ADN et l'apoptose (Gupta, 2015)
Espèces réactives Azotées	Monoxyde d'azote NO	Produit par l'enzyme NO Synthase NOS (Mathew <i>et al.</i> , 2011)	Endommage les carbohydrates, protéines, lipides et nucléotides en provoquant l'inflammation et l'altération tissulaire (Mathew <i>et al.</i> , 2011)
	Peroxynitrites $ONOO^{\cdot}$	Dans certains processus tel que l'inflammation : $2O_2^{\cdot -} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^{\cdot}$ (Aslani et Ghobadi, 2016)	Oxydation des lipoprotéines LDL Libération des ions de cuivre (Nordberg et Arner, 2001) Peut générer des dérivés nocifs qui provoquent : la déplétion des systèmes antioxydants, l'oxydation et la nitration des protéines, lipides et ADN, l'altération des systèmes enzymatiques, du cytosquelette et de la transduction cellulaire (Beckman <i>et al.</i> , 1994 ; Pacher <i>et al.</i> , 2007)
	Acide nitrique HNO_2		
Espèces réactives sulfurées	Disulfides, acide sulfénique et radicaux thiyl (Mathew <i>et al.</i> , 2011).	Oxydation de fonctions thiols et disulfides (Mathew <i>et al.</i> , 2011)	Provoquent l'inhibition des protéines et enzymes à fonction thiol et l'oxydation des sulfhydryles et des lipides (Mathew <i>et al.</i> , 2011)

1.2.6.2. Les types d'antioxydants

Les cellules de l'organisme sont dotées de systèmes antioxydants de défense pouvant les protéger contre les dommages qui seraient provoqués par les espèces réactives. Ces systèmes sont qualifiés d'endogènes et peuvent être soit de nature enzymatique ou non enzymatiques. À côté de ces systèmes, s'ajoutent d'autres qui sont issus de l'alimentation et sont dits : les systèmes antioxydants exogènes, ces derniers ne sont pas enzymatiques (**Mathew et al., 2011 ; Munteanu et Apetrei, 2021**).

1.2.6.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Selon leur mécanisme antioxydant, ils sont subdivisés en deux catégories, les enzymes primaires et secondaires. Les enzymes antioxydantes primaires sont plus performantes en terme d'efficacité, elles opèrent soit en bloquant la formation des radicaux libres soit en les neutralisant. Il s'agit de la Glutathion peroxydase (GPx), catalase, Peroxiredoxins (Prxs) et la Superoxyde dismutase (SOD) (tableau II). La deuxième catégorie comprend les enzymes secondaires telles que la Glutathion réductase (GSR) et la glucose -6-phosphatase qui ne neutralisent pas de façon directe les radicaux libres, mais plutôt jouent un rôle de support pour d'autres antioxydants (tableau II) (**Aslani et Ghobadi, 2016**).

Généralement, les produits dangereux issus de l'oxydation par les radicaux libres sont convertis par les enzymes antioxydantes à travers une chaîne de réactions aboutissant à la molécule d'eau. Ce processus réactionnel requiert des cofacteurs métalliques (zinc, magnésium, fer et cuivre) (**Dontha, 2016**). Ces principales enzymes à activité antioxydante dans l'organisme citées sont décrites dans le tableau II.

1.2.6.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques incluent des systèmes endogènes dits métaboliques et des systèmes exogènes dits nutritifs (**Pham-Huy et al., 2008 ; Sudhakar et Fukai, 2014**). Ils exercent leur effets antioxydants par l'interruption de la chaîne réactionnelle de formation des espèces réactives (**Gupta, 2015**).

1.2.6.2.2.1. Systèmes antioxydants non enzymatiques endogènes

Les antioxydants endogènes sont produits par l'organisme suite aux différentes voies métaboliques. Ils comprennent les composés thiols (glutathion, thioredoxin (Trx),

glutaredoxin (Grx) et acide lipoïque), mélatonine, coenzyme Q10, acide urique, bilirubine, protéines chélatrices de métaux etc. (tableau III).

1.2.6.2.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes

L'appellation exogène se réfère à un antioxydant n'appartenant pas à l'organisme. Les antioxydants exogènes sont classés selon leur origine en antioxydant synthétiques et naturels (Gupta, 2015).

1.2.6.2.2.2. 1. Systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis longtemps en industrie alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et pétrochimique (De Oliveira Pateis *et al.*, 2018). La majorité d'entre eux sont de nature phénolique. Les plus disponibles et commercialisés sont le Butylhydroxyanisol BHA, le butylhydroxytoluène BHT, le TBHQ tert-Butylhydroquinone et les antioxydants esters dérivants du gallate comprenant le propyl- (Pg), octyl- (Og) et lauryl- (Dg) (Wang *et al.*, 2021).

La différence de l'activité antioxydante entre ces antioxydants est liée aux différences au niveau de leurs structures et propriétés physiques (Madhavi *et al.*, 1996). Ils présentent plusieurs avantages comme leur stabilité structurale et thermique, leur forte capacité antioxydante et peuvent être synthétisés en grande quantité (Zhang *et al.*, 2009). Toutefois, ces antioxydants pourraient être associés à des risques pour la santé. En effet, des études ont rapporté que le BHT qui exerce son rôle antioxydant par l'interruption de la chaîne réactionnelle de peroxydation lipidique, exercerait des effets toxiques sur différents organes à travers l'étude de différents systèmes d'expérimentations *in vitro* et *in vivo* (Witschi, 1989).

Chez la souris, des doses égales et supérieures à 150mg/kg de poids corporel (PC) provoquent une pneumotoxicité réversible qui est observée via la formation de nécroses alvéolaires (Adamson *et al.*, 1977) et la manifestation d'un état inflammatoire (Bauer *et al.*, 2001). Cette pneumotoxicité peut promouvoir une carcinogenèse pulmonaire (Rostron, 1982).

Les travaux de Faine *et al.* (2006) ont rapporté des effets toxiques métaboliques du BHT chez le rat par altération de certains paramètres lipidiques sériques (triglycérides, LDL et VLDL). Ces altérations sont accompagnées d'une toxicité cardiaque.

D'autres organes présentent des cibles de la toxicité du BHT, citons l'hépatotoxicité observée chez le rat (**Reed *et al.*, 2001**) et la néphrotoxicité chez le rat et la souris (**Nakagawa et Tayama, 1988 ; Takahashi, 1992**). Par ailleurs, le BHT induit une surproduction de peroxydes chez les souris et les rats ce qui engendre des dommages au niveau de l'ADN provoquant le cancer (**Olaniyan *et al.*, 1998**).

Récemment, il a été rapporté que le BHT est associé au cancer et à l'asthme chez les enfants (**Wang *et al.*, 2021**). Par ailleurs, il a été rapporté que les deux produits, le 2-tert-butyl-1,4-benzoquinone (TBQ) et le tert-butyl-hydroquinone (TBHQ) issus de la transformation du BHT présentent une écotoxicité vis-à-vis des systèmes aquatiques (**Wang *et al.*, 2022**).

En 1987, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé le BHA comme carcinogène de type 2B. Depuis, des travaux ont montré plusieurs effets toxiques et néfastes du BHA à travers des modèles expérimentaux d'animaux tels que la dérégulation des hormones de reproduction (**Kang *et al.*, 2005**), la génotoxicité (**Lin et Fung, 2006**), la perturbation du métabolisme suite à la déplétion en ATP qui est suivie de l'inhibition de la néoglucogenèse et de la détoxification de l'ammonium favorisant ainsi une acidose et une production de ROS au niveau de mitochondries isolées (**De Oliveira Pateis *et al.*, 2018**).

Les autres antioxydants synthétiques TBHQ et gallate, moins utilisés que les deux précédents, exerceraient également des effets toxiques, cancérigène et tératogène (**Yang *et al.*, 2018 ; Wang *et al.*, 2021**).

Tableau II : Principaux systèmes antioxydants enzymatiques dans l'organisme humain

Type	Enzyme	Mode d'action	Références
Antioxydants enzymatiques primaires	Superoxide dismutase (SOD)	<ul style="list-style-type: none"> - Représente la première ligne de défense contre les ROS - Elle permet la dismutation du superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. Son activité nécessite les cofacteurs zinc, cuivre, magnésium et fer selon l'isoforme 	(Aslani et Ghobadi, 2016 ; Dontha, 2016)
	Catalase	<ul style="list-style-type: none"> - Elle permet de finaliser le processus de détoxification entamée par la SOD en convertissant le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène en présence des cofacteurs fer et magnésium 	(Dontha, 2016)
	Glutathion peroxidase (GPx)	<ul style="list-style-type: none"> - Comme la catalase, elle permet la catalyse de la réduction et l'élimination du peroxyde d'hydrogène et les peroxydes ROOH en eau par oxydation du glutathion réduit GSH : $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$ <ul style="list-style-type: none"> - Recyclage du GSH par le NADPH apporté via la voie des pentoses phosphate : $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{GSH}$	(Rahman, 2007) (Young et Woodside, 2001)
	Peroxi-redoxins (Prxs)	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction des peroxydes comme le H_2O_2 et différents Hydroperoxydes alkyls - Les résidus cystéines contenus dans son site actif permettent la réduction de ces molécules 	(Goncalves et al., 2012)
Antioxydants enzymatiques secondaires	Glutathion réductase (GSR)	<ul style="list-style-type: none"> - Catalyse la réduction du GSH disulfide GSSG en sulfhydryle de GSH 	(Carocho et Ferreira, 2013; Sudhahar et Fukai, 2014)
	Glucose -6-phosphatase	<ul style="list-style-type: none"> - Permet la régénération du NADPH 	(Carocho et Ferreira, 2013; Sudhahar et Fukai, 2014)

Tableau III : Principaux systèmes antioxydants non enzymatique endogènes

Système antioxydant non enzymatique endogène	Caractéristiques et action
<p style="text-align: center;">Composés thiol Glutathion (GSH/GSSG)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Tripeptide appelé (antioxydant contenant la cystéine) - Considéré comme “master antioxydant” - Le groupement thiol de la cystéine du glutathion réduit (GSH) cède son électron au radical instable - La forme oxyde GSSG est obtenue par la réaction de deux molécules de GSH (Pompella et al., 2003)
<p style="text-align: center;">Système thioredoxine Trxs</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Composé de NADPH, thioredoxine reductase (TrxR) et thioredoxine (Trx) - Réduction des disulfides au niveau de protéines et peptides - La Trx oxydée Trx-S2 est réduite par l’activité TrxR $Trx-S_2 + NADPH + H^+ \rightarrow Trx-(SH)_2 + NADP^+$ $Prxox/Protein-S_2 + Trx-(SH)_2 \rightarrow Prxred/Protein-(SH)_2 + Trx-S_2$ (Nordberg et Arner, 2001; Holmgren et al., 2005)
<p style="text-align: center;">Système glutaredoxine</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Composé de la protéine Grx, GSH de NADPH, thioredoxine reductase (TrxR) et thioredoxine (Trx) - Réduction des disulfides au niveau de protéines (Holmgren et al., 2005)
<p style="text-align: center;">Acide lipoiique</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxydant présent au niveau des membranes et du cytosol - Rôle scavenger des espèces réactives - Chélation de métaux et réparation de protéines oxydées - Régénération de certains antioxydants (Valko et al., 2006 ; Rahman, 2007)
<p style="text-align: center;">Mélatonine</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Protection des membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique - Effet scavenger du radical hydroxyle - Protection et stimulation de certains antioxydants enzymatiques - Réduction de la formation des radicaux libres au niveau de la mitochondrie (Watson et al., 1998 ; Reiter et al., 2003)
<p style="text-align: center;">Coenzyme Q10</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxydant intracellulaire - Protection des membranes et des LDL contre les dommages oxydatifs (Lee et al., 2012)

1.2.6.2.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes naturels

Les antioxydants naturels sont présents dans les fruits et légumes. Certains d'entre eux sont qualifiés de phytonutriments, il s'agit principalement des vitamines, acide ascorbique (VIT C) et α tocophérol (VIT E) (Aslani et Ghobadi, 2016), des composés soufrés isothyanates et allyl sulphides (Mathew, 2011). D'autres, ne présentent pas de propriétés nutritives mais possèdent d'importants potentiels antioxydants, ce sont majoritairement des métabolites secondaires tels que les acides phénoliques, lignanes, flavonoïdes, iso flavonoïdes, tanins et coumarines (Craft *et al.*, 2012).

Les composés phénoliques sont largement distribués chez les plantes et présentent la contribution majeure des métabolites secondaires dans l'activité antioxydante des aliments (Tuberoso *et al.*, 2013). En effet, une association inverse entre la consommation de polyphénols et le risque de développement de maladies chroniques a été rapportée. Les polyphénols acceptent un électron et forment des radicaux phenoxy stables ce qui interrompt la chaîne de réactions d'oxydation au niveau des cellules (Mathew *et al.*, 2011).

D'autre part, les métabolites primaires de type polysaccharides isolés à partir de plusieurs espèces végétales ont également été rapportés pour leur important pouvoir antioxydant. Les travaux de Zhang *et al.* (2012) ont montré que la majorité des fractions de polysaccharides obtenues à partir des racines de *Sanguisaba officinalis* exerçaient des activités antioxydantes dans des systèmes d'étude *in vitro*. Des résultats similaires ont été obtenus par des travaux menés sur des polysaccharides appartenant à d'autres espèces végétales, citons par exemple *Tamariudus indica* L. et *Sepia esculenta* (Samal et Dangi, 2014 ; Li *et al.*, 2022).

1.3. Toxicité des plantes médicinales

La toxicité indique l'état des effets indésirables induits par l'interaction entre les substances toxiques et les cellules (Olaniyan *et al.*, 2016). On distingue la toxicité directe qui est due à l'effet de la substance toxique absorbée et la toxicité indirecte due aux métabolites de la substance toxique absorbée (Chavéron, 1999).

Les médicaments traditionnels occupent une place importante dans les applications thérapeutiques en raison de leurs négligeables effets indésirables (Das *et al.*, 2015). Peu de connaissances sur la toxicité des médicaments traditionnels sont disponibles à cause de la limite des techniques et méthodes d'évaluation (Yihang *et al.*, 2016).

Suite à ce manque de validation scientifique, les études de la toxicité des plantes médicinales sont nécessaires afin d'identifier la gamme de concentrations présentant des indices thérapeutiques qui pourraient être utilisés sans risque de toxicité, mais aussi pour pouvoir révéler d'éventuels signes provoqués par ces plantes (**Mopuri et Meriga, 2014 ; Das et al., 2015**).

La toxicité des plantes est principalement exercée par les coumarines qui peuvent provoquer une hépatotoxicité (**Pitaro et al., 2022**) et les monoterpènes qui exercent des effets toxiques sur le système nerveux (**El jemli et al., 2017**). Les saponosides sont aussi connus pour leur effet hémolytique qui leur confère une toxicité sur le système hématopoïétique (**Yuldasheva et al., 2005**). Plusieurs effets toxiques ont été attribués aux alcaloïdes comme la génotoxicité, la neurotoxicité et la tératogenité (**Rajput et al., 2022**). De même, les huiles essentielles pourraient être extrêmement toxiques pour les humains et les animaux même à très faible dose (**Lanzerstorfer et al., 2021**).

1.3.1. Evaluation de la toxicité

Les études de toxicité réalisées sur des modèles animaux appropriés sont généralement utilisées pour évaluer le risque potentiel des médicaments pour la santé humaine. De telles données fournissent des informations sur les risques pouvant survenir lors d'une exposition répétée à la substance d'essai. Selon la durée d'exposition des animaux aux médicaments, les études toxicologiques peuvent être réparties en quatre catégories ; études aiguës, subaiguës, subchroniques et chroniques (**Ansah et al., 2016**).

1.3.1.1. Toxicité aiguë

Elle se manifeste rapidement, voire immédiatement, après une prise unique ou à court terme après plusieurs prises rapprochées (**Ruckebusch, 1981**). La toxicité aiguë d'une substance peut être estimée par le calcul de la DL50 (dose létale 50). Cette dernière est définie comme étant la dose (habituellement exprimée en mg, g ou ml par kg de poids corporel PC) qui tue 50% des animaux d'une espèce particulière (**Dhamodharan et Mirunalini, 2013**). Bien que l'effet le plus souvent recherché soit la mortalité, la détermination de la toxicité aiguë implique aussi la description de la symptomatologie induite par l'administration de doses croissantes du produit (**Lauwerys, 2003**).

1.3.1.2. Toxicité subaiguë

La durée de l'expérimentation est supérieure au 1/10^e de la durée de vie de l'animal. Il est possible dans ce cas d'avoir une idée plus précise de la toxicité en effectuant un ensemble de tests tel que l'évolution pondérale, histologie des organes, examens hématologiques, localisation du produit et de ses métabolites (fluorescence, autoradiographie ou scintigraphie), la toxicité métabolique, tests de sensibilisation et d'accoutumance (**Chavéron, 1999**).

1.3.1.3. Toxicité subchronique

Elle résulte d'une exposition, répétée ou continue, au cours d'une période assez brève (trois mois en général) (**OECD, 2009**).

1.3.1.4. Toxicité chronique

Elle implique la détermination des effets d'une substance d'essai, chez une espèce de mammifères donnée, à la suite d'une exposition prolongée et répétée (**OECD, 1979**). La substance est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives (**OECD, 2009**). Les effets de l'ingestion de doses répétées, s'étendant sur la plus grande partie de la vie de l'animal sont examinés sur le plan de la croissance, de la reproduction et de la mortalité. Les animaux sont suivis pendant 3 générations. Cette étude implique des tests d'accoutumance, de sensibilisation, de blocage de systèmes enzymatiques, de cancérogenèse et de mutagenèse (**Chavéron, 1999**).

En plus des tests *in vivo* d'évaluation de la toxicité, il existe aussi des tests toxicologiques basés sur la culture cellulaire et tissulaire qui sont des outils essentiels dans l'évaluation de la sécurité. Leur introduction et leur validation ont considérablement réduit le nombre d'animaux utilisés pour l'évaluation de la toxicité. Cependant, ces tests présentent des limites majeures et ne peuvent fournir qu'un premier aperçu des conditions *in vivo*, car ils ne modélisent pas complètement la physiologie complexe présente dans un organisme (**Lanzerstorfer et al., 2021**). Parmi ces techniques nous pouvons citer le test d'exclusion des cellules mortes au bleu de trypan et la méthode rapide de numération des cellules vivantes aux sels de tétrazolium (Test MTT) (**Sinha et al., 2014**).

1.3.2. Pharmacocinétique et pharmacodynamique des toxiques

A l'exception des effets locaux sur les sites de pénétration, un produit toxique ne peut provoquer des lésions que s'il est absorbé par l'organisme via la peau, le tube digestif ou encore les poumons et quelques autres voies minoritaires. Cette absorption implique sa traversée des membranes plasmiques selon quatre mécanismes incluant la diffusion passive, la filtration à travers les pores cellulaires et des capillaires, le transport actif et l'endocytose (**Lu, 1992**). La distribution du toxique dans les tissus, organes et liquides organiques dépend de sa disponibilité toxicologique qui est en relation directe avec ses propriétés physicochimiques.

Les toxiques subissent généralement des biotransformations au niveau du foie en métabolites qui dans certains cas peuvent être eux même très toxiques.

Les principaux systèmes de métabolisation hépatique incluent les mono-oxygénases à cytochrome P450, les epoxydéhydratases et les glucoryltransférases. L'élimination se fait principalement par la voie rénale, cependant certains toxiques peuvent être éliminées par voie enterohépatique ou aérienne. Sur le plan pharmacodynamique, les entités toxicodisponibles ont pour cibles, les constituants cellulaires et peuvent induire des atteintes biochimiques qui sont caractéristiques de la phase pharmacodynamique. L'intoxication pouvant aller d'une réaction allergique à une mort cellulaire ou voir même des mutations irréversibles (**Chavéron, 1999**).

1.3.3. Facteurs de variation de la sensibilité à la toxicité des plantes médicinales

La toxicité d'une substance varie suivant l'espèce, la dose ainsi que la voie d'administration. La variabilité liée à cette dernière peut s'expliquer par le fait que différentes voies d'administration impliquent des variations dans la biodisponibilité des composants susceptibles de provoquer une toxicité, l'absorption par le tractus gastro-intestinal ou encore la biotransformation en métabolites non toxiques (**Madingou et al., 2016**).

Des variations de DL50 en fonction de la voie d'administration et de l'espèce ont été rapportées par différents auteurs tel que **Lahlou et al. (2008)** avec l'extrait aqueux lyophilisé de *Tanacetum vulgare* et par **Al-Ali et al. (2008)** avec la thymoquinone, principe actif issu de *Nigella sativa*.

Un autre facteur susceptible de faire varier la sensibilité à la toxicité est le sexe. Selon l'OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*, 2001), les femelles sont plus sensibles aux traitements par certains xénobiotiques et de ce fait elles sont normalement utilisées pour les tests de toxicité (**Lipnick et al., 1995**).

1.3.4. Altérations physiopathologiques suite à l'intoxication par les plantes médicinales

Diverses études de toxicité aiguë ont rapporté que des extraits de plantes en particulier les huiles essentielles (*Agaricus bisporus*, *Drimys angustifolia*, *Drimys brasiliensis*, *Pericampylus glaucus*, *Tetraclinis articulata*) provoquaient des troubles du comportement général et des atteintes physiologiques. Parmi ces atteintes on peut citer, somnolence et léthargie, apathie, sédation, salivation, perte d'appétit, affaiblissement général, ptosis, diarrhée, polyurie, changement de l'activité physique parfois accompagnée d'une perte de mobilité, difficulté respiratoire, convulsion et coma (**Dhamdharam et Mirunalini, 2013 ; Gomes et al., 2013 ; Amani et al., 2015 ; Kifayatullah et al., 2015 ; El jemli et al., 2017**).

Les effets toxiques des substances peuvent atteindre tous les systèmes et organes. Cependant, le foie et les reins sont les organes les plus fréquemment touchés car les reins sont les organes responsables de l'excrétion des déchets métaboliques et du contrôle de l'homéostasie et le foie est le principal organe du métabolisme et de la détoxification des médicaments (**De Lima-saraiva et al., 2012**).

La toxicité hépatique est potentiellement marquée par des altérations macroscopiques, microscopiques et l'augmentation des transaminases alanine transaminase (ALAT) et aspartate transaminase (ASAT) qui sont des enzymes hépatiques utilisées comme marqueurs biochimiques de toxicité, car leurs valeurs biochimiques sont élevées lorsqu'une lésion survient dans le parenchyme hépatique (**Rahman et al., 2001**). De nombreuses études ont confirmé que des taux sériques élevés d'enzymes ASAT et ALAT ne sont pas directement liés aux lésions hépatiques, mais plutôt à une inflammation, une fuite cellulaire et des dommages de la membrane cellulaire au niveau des cellules hépatiques (**Kifayatullah et al., 2015**).

Un autre système cible de la toxicité est le système hématopoïétique qui constitue un indice important de l'état physiologique et pathologique de l'homme et des animaux (**Diallo et al., 2010**). Les changements hématologiques tels que l'anémie sont souvent accompagnés d'une toxicité au niveau de la moelle osseuse (**Verbelen et al., 2015**).

D'autres paramètres notamment ceux métaboliques tels que glycémie, triglycérides et cholestérol ou encore de taux de protéines total et la gamma glutamyl transferase peuvent témoigner d'une toxicité (Gome *et al.*, 2011 ; Alnajar *et al.*, 2012 ; Lagnika *et al.*, 2016).

1.3.5. Données toxicologiques du genre *Cistanche*

Les données de la recherche sur la toxicité et l'évaluation de la sécurité des plantes du genre *Cistanche* ont révélé qu'elles ne présentent pas de danger particulier. Plus de données de toxicité et de sécurité axées sur *Cistanches Herba* et ses produits doivent être collectées pour garantir leur sécurité et efficacité. La majorité des études expérimentales de la toxicité sur des modèles animaux ont été réalisées sur *C. desertiola* et *C. tubulosa* (Lei *et al.*, 2020).

1.4. Inflammation et phytothérapie

1.4.1. La réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire est une réponse physiologique aux infections et lésions tissulaires (Calder *et al.*, 2009) dont la fonction principale est la résolution de l'infection ou la réparation des dommages afin de retrouver l'homéostasie. Elle implique un ensemble de mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme est capable de reconnaître, détruire et éliminer toute substance étrangère en faisant intervenir un ensemble complexe d'interactions entre des facteurs solubles et des cellules (Nathan, 2002 ; Barton, 2008).

La réponse inflammatoire débute par la reconnaissance des signaux de danger. Ces derniers peuvent être exogènes appelés PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) qui sont exprimés par les microorganismes ou endogènes, libérés par les cellules agressées. Ce sont les protéines HSP (*Heat shock proteins*), la cytokine CXCL8 et des enzymes dégradant la matrice extracellulaire (Bianchi, 2007).

Cette reconnaissance se fait par les cellules immunitaires résidentes à savoir les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes et conduit alors à l'initiation de la cascade inflammatoire et la libération de plusieurs médiateurs comme les cytokines IL-1, IL-6, tumor necrosis factor α (TNF α) et CXCL8, produits de dégradation des phospholipides membranaires, histamine et les anaphylotoxines du complément (Barton, 2008 ; Medzhitov, 2008). À la suite, le recrutement de cellules sur le site d'infection aboutit à l'élimination du pathogène et la résolution de l'inflammation conduisant au retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé (Barton, 2008 ; Aymeric et Lefranc, 2009).

1.4.2. Les différents types de l'inflammation

Selon la durée et la cinétique du processus inflammatoire, on distingue principalement deux types d'inflammation : aiguë et chronique.

1.4.2.1. Inflammation aiguë

Elle représente une réponse immédiate de courte durée du système immunitaire face à une agression, elle est caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses et une forte présence des polymorphonucléaires au niveau du foyer inflammatoire (**Dallegri et Ottonello, 1997 ; Whyte, 2000 ; Peter et al., 2010**). Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (**Peter et al., 2010**).

1.4.2.2. Inflammation chronique

La persistance de la réaction inflammatoire et la perturbation de son contrôle physiologique conduisent à la chronicité de l'inflammation (**Bodamyali et al., 2000**). En effet, certains pathogènes qui peuvent échapper à la clairance par le système immunitaire induisent souvent une réponse inflammatoire chronique qui se traduit par une lésion tissulaire importante (**Kindt et al., 2008**). L'inflammation chronique est également provoquée dans le cas de certaines maladies auto-immunes, où des antigènes du soi activent continuellement le système immunitaire. Elle peut aussi contribuer aux lésions et aux destructions tissulaires associées à de nombreux types de cancer (**Anzai et al., 2004 ; Kindt et al., 2008**).

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages et plasmocytes dans les tissus. Les macrophages produisent des cytokines qui stimulent la prolifération des fibroblastes pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour libérer des médiateurs responsables des réponses inflammatoires.

L'inflammation chronique est déclenchée par des réponses vasculaires impliquant l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Les lymphocytes et les monocytes adhèrent ainsi à l'endothélium ce qui permet leur transmigration vers le compartiment extravasculaire (**Kindt et al., 2008 ; Peter et al., 2010**).

1.4.3. Traitement de l'inflammation

Le traitement d'une inflammation dépend de sa cause et de sa gravité, mais vise généralement à en diminuer les symptômes, notamment par des anti-inflammatoires. Ces derniers sont catégorisés en deux grandes classes : les anti-inflammatoires stéroïdiens et les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

1.4.3.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens AIS (Glucocorticoïdes)

Le terme corticoïde désigne communément les glucocorticoïdes, un certain type de corticostéroïdes. Ces derniers tirent leur nom du fait qu'ils exercent un effet prépondérant sur le métabolisme du glucose au niveau du foie mais c'est leur importante propriété anti-inflammatoire qui est utilisée en médecine. Le terme "corticoïde" signifie donc un anti-inflammatoire stéroïdien (AIS) (**Kenth, 1994**). En plus de leur action anti-inflammatoire, Ils ont aussi des actions antiallergique et immunosuppressive (**Guilpain et Le Jeune, 2012**).

Les AIS exercent divers effets dont il en résulte principalement une réduction du nombre et de l'activité des cellules du système immunitaire (**Kindt et al., 2008**) ce qui conduit ainsi à l'inhibition de nombreux mécanismes de la réaction inflammatoire (**Alexandre et al., 2009**). Les AIS stimulent la synthèse intraleucocytaire de la lipocortine qui inhibe l'enzyme membranaire la phospholipase A2, celle-ci est activée dans les cellules endommagées et est responsable de la formation d'acide arachidonique. Ce dernier est métabolisé en médiateurs inflammatoires comprenant les prostaglandines (PGs), les leucotriènes et le facteur d'agrégation plaquettaire PAF sous l'action des enzymes cyclo-oxygénases COX-1/2 et lipoxygénases LOX. Par ailleurs, les AIS dépriment les gènes codant pour la phospholipase A2, la COX-2 et les récepteurs pour l'IL-2. Ces gènes sont normalement activés par le NF- κ B mais les AIS induisent la synthèse du I κ B qui se lie au NF- κ B et l'inhibe en bloquant son accès au noyau.

Les AIS diminuent la fonction des monocytes/macrophages et réduisent le nombre des lymphocytes T circulants de même que la libération des IL-1 et IL-2 (nécessaires à l'activation et à la stimulation de la prolifération des lymphocytes). Les AIS se diffusent dans les cellules et se lient à leur récepteur cytoplasmique. Le complexe activé récepteur-glucocorticoïde entre dans le noyau et se lie au niveau de certaines régions cibles de l'ADN ce qui induit soit la synthèse d'ARNm spécifique, soit la répression des gènes (**Neal, 2007**).

Du fait que les AIS interfèrent avec de nombreux métabolismes (hydrosodé, phosphocalcique, lipidique, glucidique, azoté), leur usage est associé à de nombreux effets indésirables qui s'accroissent avec le prolongement de la durée du traitement conduisant à des troubles aigus tels que l'hypertension artérielle, l'ulcères gastro-duodénaux, l'hyperglycémie, la perte de protéines musculaires, l'ostéoporose et la suppression surrénalienne (**Henzen, 2003 ; Neal, 2007 ; Alexandre *et al.*, 2009**).

1.4.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont largement utilisés et possèdent des effets analgésiques, antipyrétiques et à forte dose des effets anti-inflammatoires (**Neal, 2007**).

1.4.3.2.1. Mécanisme d'action des AINS

Les AINS exercent leur effet anti-inflammatoire via leur capacité à inhiber les COX et donc la production des PGs. Il existe deux isoformes de la COX connues depuis longtemps ; la COX-1 qui est constitutive et présente dans tous les tissus. La COX-2 est la deuxième isoforme induite par l'inflammation dont l'inhibition est probablement responsable de l'effet anti-inflammatoire des AINS. L'inhibition de la COX-1 serait responsable de leur toxicité gastro-intestinal. En effet, la COX-1 induit dans l'estomac la production des PGs de type PGE2 et PGI2, qui stimulent la sécrétion de mucus et de bicarbonate ainsi qu'une vasodilatation ce qui engendre une cytoprotection de la muqueuse gastrique (figure 04) (**Neal, 2007**).

Les AINS, en inhibant la synthèse des PGs, peuvent aggraver l'insuffisance cardiaque congestive et augmenter la pression artérielle. Ils sont liés à des événements cardiovasculaires indésirables, tels que l'infarctus du myocarde et l'ischémie (**Risser *et al.*, 2009**).

Récemment, une variante d'épissage de COX-1 a été décrite comme COX-3 (**Shehata, 2010**). Elle est pleinement exprimée dans le cerveau, la moelle épinière et le cœur. Sa fonction principale est la régulation des réponses à la douleur et la fièvre. Cette isoforme a été postulée comme étant le site d'action de l'acétaminophène (**Resnik, 2018**).

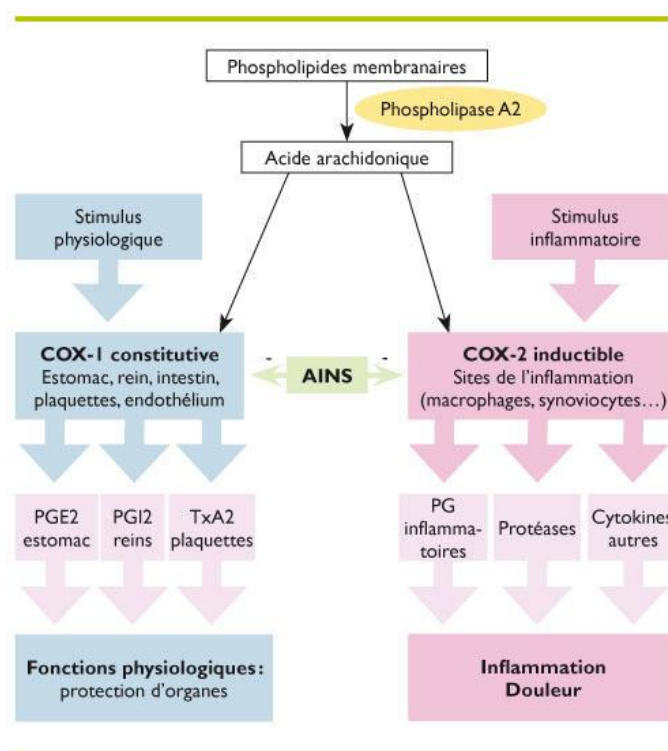


Figure 04 : Mécanisme d'action des AINS (Burke *et al.*, 2006)

1.4.3.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Plusieurs travaux *in vivo*, *in vitro* et *in silico* ont rapporté des propriétés anti-inflammatoires exercées par des extraits végétaux (Kupelie *et al.*, 2007 ; Orhan *et al.*, 2007 ; Rege *et al.*, 2021). Ces recherches ont mis l'accent sur les composés phytochimiques qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Beaucoup sont présumés d'agir en bloquant les voies de la COX ainsi que par d'autres mécanismes (Xin *et al.*, 2012 ; Dhote *et al.*, 2021).

1.4.4. Etudes antérieures sur l'effet anti-inflammatoire du genre *Cistanche*

Plusieurs études ont été menées sur l'activité anti-inflammatoire du genre *Cistanche* aussi bien à l'échelle *in vitro* qu'*in vivo*. L'ensemble de ces études a rapporté des effets anti-inflammatoires d'extraits obtenus à partir de différentes espèces de *Cistanche*. Ces effets seraient étroitement liés aux composés de type PhGs, iridoïdes et les polysaccharides.

En 2000, des chercheurs japonais ont montré que 07 PhGs (2'-acétylactéoside, actéoside, cistanoside A, echinacoside, isoactéoside, tubuloside A et tubuloside B) extraits à partir des tiges de *C. deserticola* ont exercé des activités de piégeage du radical NO, ce qui serait lié à leurs effets anti-inflammatoires (Xiong *et al.*, 2000).

Les travaux de **Lin et al. (2002)** sur cette même espèce ont rapporté une diminution de l'œdème induit par la carragénine chez des rats par les couches butanolique et aqueuse. Par ailleurs, **Nan et al. (2013)** ont trouvé que les composés de type PhGs tubuloside B et cistanoside K inhibent de manière hautement significative la production du NO induite par les lipopolysaccharides LPS dans les cellules microgliales de souris (cellules BV-2).

D'autre part, les iridoïdes exerceraient aussi un effet anti-inflammatoire. **Ze-Dong et al. (2016)** ont rapporté que l'iridoïde acide 8- epiloganique extrait à partir de la tige de *C. deserticola* a exercé un effet inhibiteur remarquable sur la production du NO par les cellules microgliales de souris BV-2 induite par les LPS.

Il a été démontré que l'extrait aqueux des tiges de *C. tubulosa* a provoqué une inhibition de la production du NO par les macrophages murins RAW 264.7 après traitement par l'IFN γ et LPS (**Lee et al., 2005**).

Les travaux de **Bougandoura et al. (2016)** ont montré une importante activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux méthanolique de *C. violacea* récoltée en Algérie. Cette étude a porté sur les modèles de la stabilisation de la membrane des globules rouges humains et l'inhibition de la dénaturation de l'albumine. Elle suggère que *C. violacea* pourrait présenter une bonne source de nouveaux agents anti-inflammatoires.

MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation de la région de récolte

La wilaya de Béni Abbès (ex commune de la wilaya de Bechar) est localisée au sud-ouest de l'Algérie ($30^{\circ} 4' 48''$ N, $2^{\circ} 6' 0''$ W) (figure 05). Cette région s'étend sur la rive gauche du lit de l'oued Saoura en bordure ouest du grand erg occidental. Elle regroupe différents paysages typiquement sahariens : l'Erg, la Hamada et l'oued. C'est une région caractérisée par un climat aride et renferme les formations caractéristiques du désert (**Zatra, 2008**).

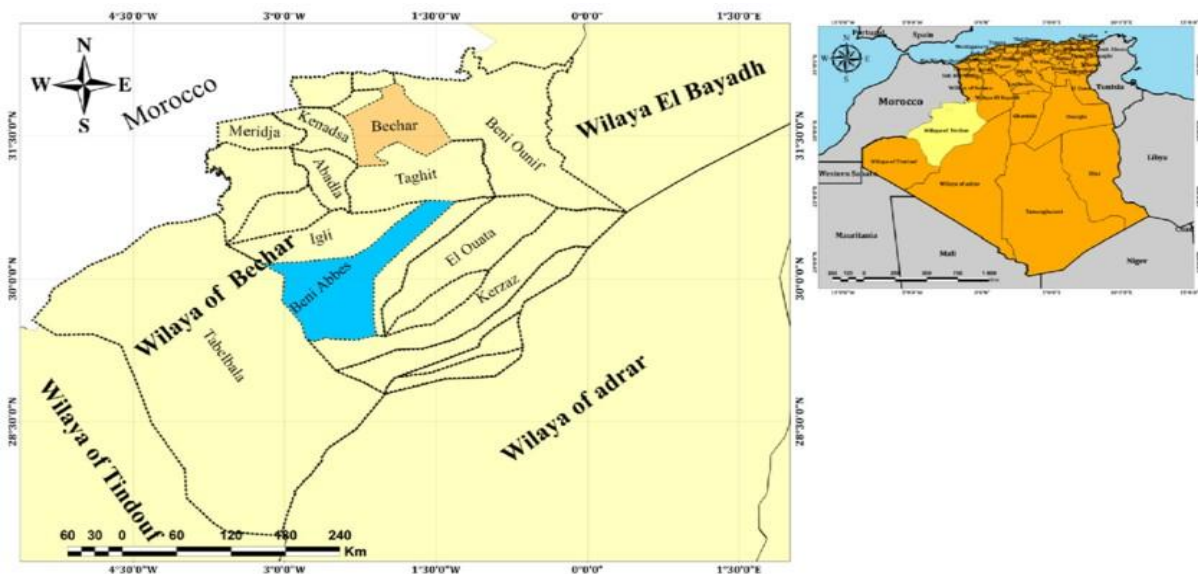


Figure 05 : Carte de localisation de la région de Béni Abbès (**Bachir et Aouar, 2019**).

2.2. Récolte et séchage du matériel végétal

Les jeunes pousses de racines de *C. phelipaea* (figure 06) ont été récoltées en matinée et en hiver au mois de Janvier, 2015 sur sol sableux. Ces racines sont des parasites de l'arbre *Tamatix*. Au mois d'avril, 2015, une récolte de l'inflorescence au même site a été faite afin d'assurer l'identification taxonomique (figure 07). Cette dernière a été établie par le professeur Rachid Amirouche, spécialiste en botanique systémique à l'université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger. Un spécimen a été déposé au niveau de l'herbier de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA), Alger, Algérie (Annexe 1).

Le matériel végétal a été lavé et coupé en de fines rondelles, ces dernières ont été mises à sécher dans un endroit aéré à l'abri de la lumière et de l'humidité. Après séchage, le matériel végétal a été conservé et le broyage en poudre fine n'a été effectué qu'au moment de la préparation des extraits afin d'éviter toute altération.



Figure 06: Photo des racines de *C. phelipaea* récoltées et mises à sécher (Janvier, 2015).

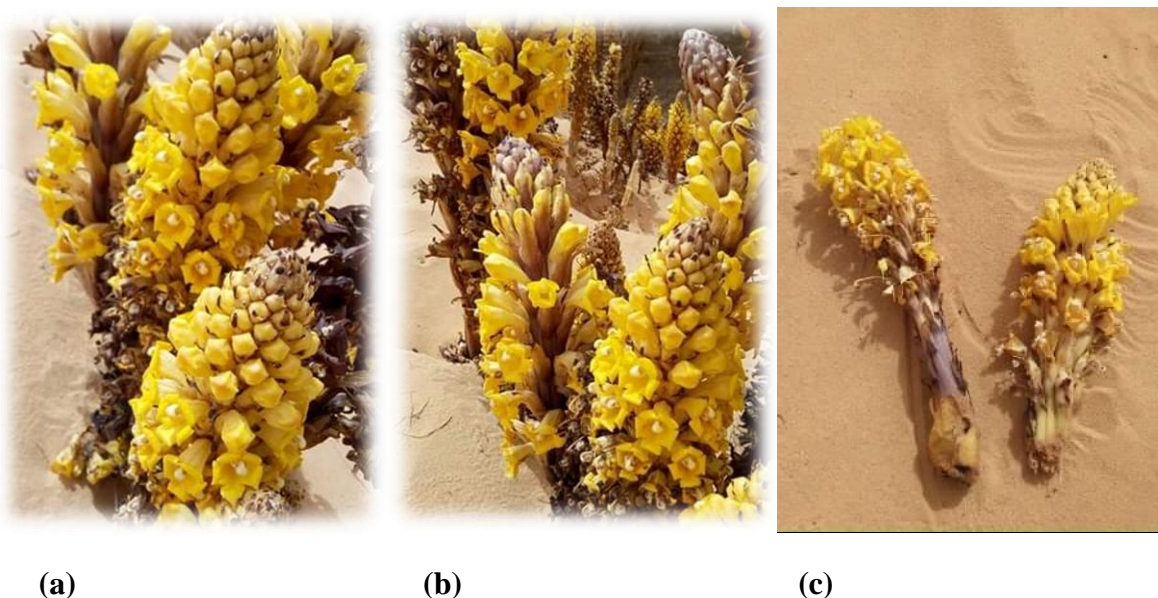


Figure 07 : Photos de l'inflorescence (tiges et fleurs) de *C. phelipaea* dans le site de récolte à Béni Abbès (Avril, 2015).

(a) et (b) : photos de l'inflorescence avant récolte. (c) : photo de l'inflorescence après récolte.

2.3. Criblage phytochimique de la poudre végétale des racines de *C. phelipaea*

Le criblage ou screening phytochimique est un ensemble de réactions de caractérisation phytochimique d'ordre qualitative visant à indiquer la présence relative de différentes familles chimiques de molécules. Globalement, ces réactions sont basées sur deux principes, le premier étant la précipitation due à la formation de complexes insolubles et le deuxième est la

formation de complexes colorés à la suite d'une conjugaison ou instauration dans une molécule (**Badiaga, 2011**).

Afin d'effectuer les tests de screening phytochimiques, différents extraits ont été préparés à partir du matériel végétal en fonction de la spécificité physico-chimique et réactionnelle des différentes classes de molécules recherchées (tableau IV). Les protocoles de préparations de ces extraits sont rapportés en annexes (Annexe 02).

Tableau IV: Types d'extraits utilisés pour le screening des différentes classes phytochimiques (**Qzinvecht, 1983**)

Extrait	Classes phytochimiques recherchées
Infusé à 5%	Tanins Flavonoïdes
Décocté a 10%	Oses et holosides Mucilages
Extrait aqueux obtenu par extraction à reflux	Saponines Amidon
Extrait chloroformique	Dérivés anthracéniques libres O- hétérosides C-hétérosides
Extrait éthéré	Stérols et triterpènes Caroténoïdes
Extrait éthanolique	Coumarines
Extrait obtenu en milieu acide	Alcaloïdes

Les différentes classes de molécules recherchées ainsi que les principes des différents tests utilisés dans cette étude sont présentés dans le tableau V. La caractérisation des composés chimiques s'est faite, en se référant aux protocoles de **Badiaga (2011)**.

Tableau V : Principes des tests de caractérisations utilisés dans le screening phytochimique

Classe phytochimique	Protocole	Caractérisation
Saponines	La détection des saponines est réalisée sur le décocté, ce dernier est fortement agité pendant 15 secondes puis, il est laissé pendant 15min	Pas de mousse = test négatif Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif Mousse de 1-2 cm = test positif Mousse plus de 2 cm = test très positif
Tanins Galliques hydrolysables	30ml d'infusé + 15ml du réactif de Stiasny puis chauffage à 90C pendant 15min au bain marie, la solution est filtrée et saturée par 5g d'acétate de sodium et 1ml de FeCl ₃ a 10% est ajouté	Apparition d'une coloration bleue-noire
Catéchiques non hydrolysables	5ml d'infusé + 1ml HCl concentré, le tout est porté à ébullition pendant 15min	Formation d'un précipité rouge insoluble dans l'alcool iso-amylique
Amidon	Chauffer 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition. Après ébullition, quelques gouttes d'amidon sont ajoutées	Apparition d'une coloration bleue violacée
Flavonoïdes Flavonoïdes libres	Réaction à la cyanidine : 5ml d'infusé + 5ml HCl (50% dans l'éthanol) = alcool chlorhydrique puis ajout de 1mL d'alcool iso-amylique et quelques copeaux de magnésium.	Coloration : rose-orange = flavones rose-violacée = flavanones
Leucoanthocyanes	Réaction à la cyanidine sans ajout de copeaux de magnésium et avec chauffage pendant 15min au bain-marie	Coloration : rouge-cerise=flavonols et flavanonols
Anthocyanes	5ml d'infusé + 5ml H ₂ SO ₄ (10%) + 5ml NH ₄ OH (50%)	Coloration accentuée par acidification puis vire au bleu en milieu basique
Dérivés anthracéniques libres	1ml extrait chloroformique + 1ml NH ₄ OH diluée	Coloration plus ou moins rouge

Matériel et méthodes

O-hétérosides	1ml extrait chloroformique + 10ml H ₂ O + 1ml HCl, ce mélange réactionnel est chauffé pendant 15min, après refroidissement le filtrat est récupéré 5ml de filtrat + 5ml CHCl ₃ sont agités et 1ml de NH ₄ OH diluée est rajouté à la phase organique	Coloration plus ou moins rouge
C-hétérosides	La phase aqueuse obtenue est mélangée avec 10 ml d'eau et 1ml de Fe Cl ₃ (10%), chauffage pendant 30min et refroidissement. 5ml de filtrat + 5ml CHCl ₃ sont agités et 1ml de NH ₄ OH diluée est rajoutée a la phase organique	Coloration plus ou moins rouge
Stérols et tri terpènes	1ml de CHCl ₃ est ajouté à l'extrait étheré puis ajout du H ₂ SO ₄	Formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides
Caroténoïdes	3 gouttes d'une solution de SbCl ₃ saturée dans du CHCl ₃ sont ajoutées à l'extrait étheré	Coloration bleue devenant rouge
Coumarines	0,5 ml de KOH dilué (10%) a été ajouté à 5ml de l'extrait éthanolique. L'ensemble a été chauffé puis la neutralisation est faite par l'ajout de quelques gouttes de HCl à 10%	L'observation d'un milieu réactionnel trouble indique la présence des coumarines
Mucilage	1ml de décocté a 10% + 5ml d'éthanol	Formation d'un précipité floconneux
Oses et holosides	Décocté a 10% + H ₂ SO ₄ + thymol saturé dans de l'éthanol	Coloration rouge
Alcaloïdes	5 gouttes de réactif de Dragendorff (annexe 2) ont été ajoutées à 1 ml du macérât acide	La présence d'une turbidité après 15 min indique la présence d'alcaloïdes

2.4. Etude phytochimique des extraits aqueux de *C. phelipaea*

2.4.1. Préparation des extraits aqueux

En phytothérapie, il existe de nombreuses formes d'utilisation des plantes médicinales. Les tisanes représentent l'une de ces formes, ce sont des préparations traditionnelles d'herboristerie à partir d'une seule plante ou d'un mélange. La préparation de tisanes requiert 3 modes possibles généralement choisis en fonction de la partie de la plante (drogue) utilisée, il s'agit de la décoction DEC, infusion INF et macération MAC (Perry, 2013). Les extraits bruts initiaux obtenus par les différents procédés d'extraction contiennent un mélange complexe de nombreux métabolites végétaux, tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes, les glycosides et les terpènes (Azwanida, 2015).

Nous nous proposons d'étudier l'impact de différentes techniques classiques d'extraction à partir des racines de *C. phelypaea* sur la composition phytochimique ainsi que sur l'activité antioxydante et anti-inflammatoire. Les méthodes de décoction et infusion seront réalisées avec la chaleur alors que la macération sera réalisée à froid.

2.4.1.1. Préparation de la décoction

Dans ce procédé, le matériel végétal est porté à ébullition dans un volume spécifié d'eau pendant un temps défini, il est ensuite refroidi et égoutté ou filtré (Perry, 2013). Cette technique convient à l'extraction de constituants solubles dans l'eau et thermostables. Ce processus est généralement utilisé dans la préparation d'extraits ayurvédiques appelés « quath » ou « kawath » (Handa, 2008).

Afin de préparer la décoction (DEC), 200 ml d'eau distillée ont été portés à ébullition puis 5g de poudre végétale ont été rajoutés et la mixture obtenue a été laissée frémir à petit bouillon et sous agitation pendant 30min.

2.4.1.2. Préparation de l'infusion

C'est la méthode la plus courante de préparation de tisanes, elle est généralement employée dans le cas où les drogues à intérêt thérapeutiques sont des feuilles, fleurs ou fruits à huiles essentielles (Perry, 2013). Ce procédé consiste à faire macérer le matériel végétal avec l'eau froide ou bouillante pendant une courte durée. Il est souvent mentionné que les infusions concentrées sont le résultat d'une procédure de percolation ou de macération modifiée (Handa, 2008).

L'infusion (INF) a été préparée par mélange de 200 ml d'eau distillée qui ont été portés à ébullition avec 5g de poudre végétale. Cette mixture a été soumise à une agitation pendant 30 min à température ambiante.

2.4.1.3. Préparation de la macération

Cette méthode d'extraction fut utilisée depuis longtemps pour la préparation domestique de toniques. À l'heure actuelle, elle représente un moyen populaire et économique d'obtention des composés bioactifs. Cette méthode peut être utilisée pour toute partie de plante, fragile ou non. Dans ce procédé, le matériel végétal broyé est mis en contact avec le solvant d'extraction. Le tout est laissé au repos pendant un certain temps (allant jusqu'à plusieurs jours) à température ambiante et sous agitation. Le traitement est destiné à adoucir et briser la paroi cellulaire de la plante pour libérer les composés phytochimiques solubles. À la fin du procédé, le résidu sec ou marc est pressé et le liquide est récupéré par filtration après une décantation (Azmir *et al.*, 2013; Perry, 2013; Azwanida *et al.*, 2015 ; Pisoschi *et al.*, 2016).

L'extraction par macération (MAC) a été réalisée par ajout de 5g de poudre végétale à 200 ml d'eau distillée et la mixture obtenue est laissée macérer sous agitation à température ambiante pendant 24h.

Chaque procédé d'extraction a été répété 3 fois sur différents échantillons. Les extraits obtenus ont été récupérés par filtration des fractions liquides et centrifugation de ces dernières à 3000g pendant 30min. Les surnageants récupérés ont été lyophilisés puis conservés à -20°C.

2.4.2. Calcul du rendement d'extraction

Le pourcentage en extrait brut sec a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M: Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal utilisé.

Le rendement a été présenté sous forme de la moyenne de trois extractions indépendantes.

2.4.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques totaux (CPT) a été déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu avec des modifications mineures (Singleton *et al.*, 1999). Le réactif de Folin est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm dont l'intensité est proportionnelle au taux de composés phénoliques. Brièvement, des aliquotes de 0,2 ml, préparées par la dissolution de chaque extrait sec dans de l'eau distillée à une concentration de 1 mg/ml ont été mélangées avec 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10 et 0,8 ml d'une solution de carbonate de sodium (7,5 %). Après 30 min d'incubation dans l'obscurité, l'absorbance de chaque mélange réactionnel a été lue contre un blanc à 765 nm. Une courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant l'acide gallique comme étalon (Annexe 3, figure 1) et la teneur moyenne en phénols totaux a été exprimée en mg équivalents en acide gallique par gramme d'extrait brut (mg EAG /g d'extrait).

2.4.4. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La teneur totale en flavonoïdes (TFT) a été déterminée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium selon le protocole de Subedi *et al.* (2014) avec de légères modifications. Pour cela, des aliquotes de 0,5 ml, préparées en dissolvant chaque extrait sec dans de l'eau distillée à une concentration de 0,5 mg/ml ont été mélangées avec 1,5 ml d'eau distillée puis avec 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (5 %). Après 5 min d'incubation à température ambiante, 150 µl d'une solution de trichlorure d'aluminium (5 %) ont été ajoutés et laissé reposer pendant 6 min puis 500 µl d'une solution d'hydroxyde de sodium (4 %) ont y été ajoutés. L'absorption du mélange réactionnel contre le blanc est immédiatement lue à 510 nm.

Une courbe d'étalonnage de la quercétine a été réalisée dans les mêmes conditions (Annexe 3, figure 2) et la teneur totale en flavonoïdes a été exprimée en mg équivalents en quercétine /g d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

2.4.5. Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux au niveau des trois extraits aqueux des racines de *C.phelipaea* a été réalisé selon le protocole de de Dubois *et al.* (1956). Un volume de 500µl de chaque extrait aqueux a été mélangé avec 1ml d'une solution de phénol à 5% et 5ml

d'acide sulfurique (96%). Après refroidissement du milieu réactionnel, les échantillons sont incubés à 30°C pendant 30min. Les mesures d'absorbances ont été effectuées à une longueur d'onde de 485 nm. Le contenu en sucres totaux exprimé en mg/g d'extrait a été déterminé pour chaque extrait à partir d'une courbe étalon de glucose.

2.4.6. Analyse LC- ESI-QTOF -MS

L'analyse de la composition phytochimique des différents extraits aqueux des racines de *C. phelypaea* a été réalisée par Chromatographie liquide–electrospray ionisation–couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-ESI-QTOF-MS et MS/MS).

2.4.6.1. Principe de la LC- MS

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ou chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) est une technique hautement sensible combinant la séparation chromatographique de haute résolution avec la détection sensible et spécifique de la spectrométrie de masse (MS). Elle permet l'analyse des composés volatils et thermolabiles par la détermination de leur structure, composition élémentaire ainsi que leur poids moléculaire PM (**Parasuraman et al., 2014 ; Akash et Rehman, 2020**).

Le système LC-MS typique est une combinaison de la HPLC avec la MS à l'aide d'une interface représentée par une source d'ionisation. Initialement l'échantillon est séparé par la LC, puis les molécules séparées sont pulvérisées dans une source d'ions à pression atmosphérique, où ils sont alors transformés en ions en phase gazeuse. L'analyseur de masse est ensuite utilisé pour trier les ions en fonction de leur rapport masse sur charge m/z et le détecteur compte ces ions sortant de l'analyseur. En conséquence, le spectre de masse obtenu représente un tracé du signal ionique en fonction du rapport m/z (**Lim et Lord, 2002 ; Korfmacher, 2005**).

La spectrométrie de masse en tandem, également connue sous le nom de MS/MS ou MS2, est une technique d'analyse instrumentale où deux ou plusieurs analyseurs de masse sont couplés ensemble en utilisant une étape de réaction supplémentaire pour augmenter leurs capacités à analyser des échantillons chimiques (**IUPAC, 2006**).

2.4.6.2. Mode d'ionisation (Electrospray ionisation) ESI

En spectrométrie de masse, il existe plusieurs types de sources ioniques qui représentent les différents dispositifs utilisés pour ioniser l'échantillon opérant selon différents processus d'ionisation. L'état physique de chaque échantillon détermine le dispositif le plus adéquat à l'analyse (**Akash et Rehman, 2020**). Le système d'ionisation utilisé dans notre étude est la source Electrospray ionisation (ESI).

Cette technique dite « douce » a été décrite pour la première fois en 1984 par Masamichi Yamashita et John Fenn (**Yamashita et Fenn, 1984**). Le prix Nobel de chimie a été attribué à ce dernier en 2002 pour le développement de la technique dans l'analyse des biomolécules (**Markides et Gräslund, 2002**). Depuis son développement, elle représente la technique d'ionisation la plus utilisée en biologie pour l'analyse des molécules neutres et de haut PM (**Pitt, 2009 ; Akash et Rehman, 2020**).

2.4.6.2.1. Principe de l'ionisation ESI

Le principe de la technique repose sur la création d'une fine pulvérisation de gouttelettes hautement chargées en présence d'un fort champ électrique qui permet la production de molécules ionisées à partir d'une solution liquide. Une très haute tension (2 à 6 kV) est appliquée à la pointe du capillaire métallique relative au cône d'échantillonnage de la source ou au capillaire chauffé. Ce fort champ électrique provoque la dispersion de la solution d'échantillon dans un aérosol en électrospray hautement chargé en gouttelettes. Ces dernières sont ensuite attirées électrostatiquement vers l'entrée du spectromètre de masse. Un gaz sec, de la chaleur ou les deux sont appliqués aux gouttelettes avant qu'elles n'entrent dans le vide du spectromètre de masse, provoquant ainsi l'évaporation du solvant de surface. Le transfert des ions de la solution à la phase gazeuse n'est pas un processus énergétique, mais plutôt de désolvatation. Ainsi, les ions des échantillons à faibles énergies internes sont autorisés à entrer dans le spectromètre de masse à partir de la sonde électrospray, et la structure des échantillons reste généralement intacte (pas de fragmentation) lorsque les conditions instrumentales appropriées sont utilisées (**Banerjee et Mazumdar, 2012**).

Au fur et à mesure que la taille de la gouttelette diminue, la densité du champ électrique à sa surface augmente, la répulsion mutuelle entre des charges similaires sur cette surface devient si grande qu'elle dépasse les forces de tension superficielle et les ions commencent à quitter la gouttelette à travers ce qu'on appelle un «taylorcone» ou cône de Taylor.

Les ions sont alors dirigés dans un orifice à travers des lentilles électrostatiques menant à l'analyseur de masse au niveau duquel, les ions sont séparés en fonction de leur rapport m/z (Siuzdak, 2006). Une fois séparés, les ions sont transmis au détecteur afin de mesurer leur concentration et les résultats sont affichés sur un graphique appelé spectre de masse (Banerjee et Mazumdar, 2012).

2.4.6.2.2. Mécanismes d'ionisation en mode ESI

Lorsque le spectromètre est réglé en mode ions positifs en maintenant la buse de pulvérisation à un potentiel positif, la charge se produit généralement par protonation, mais en mode ions négatifs (buse de pulvérisation maintenue à un potentiel négatif), la charge se produit par déprotonation de l'échantillon. Cependant il existe d'autres mécanismes qui peuvent être impliqués dans ce processus d'ionisation (tableau VI).

Il est à signaler que les espèces ioniques détectées ne sont pas les vrais ions moléculaires formés par la perte ou le gain de l'électron, mais ce sont plus préférentiellement des molécules protonées ou déprotonées (Todd, 1991).

Les principaux mécanismes d'ionisation sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VI: Différents mécanismes chimiques impliqués en spectrométrie de masse en mode ESI (Pitt, 2009 ; Akash et Rehman, 2020).

Mécanisme	Description	Forme ionique obtenue
Protonation	Addition d'un proton Concernent les molécules de faible PM possédant un groupement fonctionnel capable de porter une charge électrique	$M+H^+ \rightarrow M-H^+$
Déprotonation	Perte d'un proton Concernent les molécules de faible PM possédant un groupement fonctionnel capable de porter une charge électrique	$M-H^+ \rightarrow (M-H)^+$
Addition d'un cation Addition d'un anion	Peuvent se dérouler en présence de sels	$M^+NH_4^+$, M^+Na^+ , M^+K^+ M^+ formate ⁻ M^+ acetate ⁻
Désorption	Conversion de l'échantillon de l'état liquide en état gazeux	$M^+(Solution) \rightarrow M^+$
Transfert de charge	Molécules de haut PM avec plusieurs groupements fonctionnels portant des charges comme les protéines et les peptides	Charges multiples Tel que : M^+2H^{+2} M^+3H^{+3}

2.4.6.3. Analyseur QTOF

En MS plusieurs analyseurs ont été développés, La sélection appropriée de l'analyseur de masse dépend de la résolution, de la plage de masse, de la vitesse de balayage et de la limite de détection requises pour l'analyse (**Banerjee et Mazumdar, 2012**).

La combinaison des analyseurs de masse a permis le développement de spectromètres en tandem dits hybrides, citons comme exemple la combinaison de l'analyseur quadripolaire à celui du piégeage ionique (QTrap), ou encore la combinaison (QTOF) utilisée au cours de notre étude et dans laquelle le troisième quadripôle de l'analyseur quadripolaire est remplacé par l'analyseur TOF (**Pitt, 2009**).

2.4.6.3.1. Analyseur quadripolaire

Ce mode d'analyse permet l'obtention d'une bonne qualité de résultats quantitatifs. L'analyseur de masse de type quadripolaire Q est constitué de quatre tiges métalliques avec section hyperbolique ou circulaire. Chaque paire de tiges opposées possède une charge positive ou négative. Au niveau de l'espace entre ces tiges, l'application d'un champ électrique provoque le déplacement des ions oscillants entre les tiges appariées du quadripôle, la trajectoire de ces ions détermine ainsi leur rapport m/z (**Akash et Rehman, 2020**).

Il est important de noter que les collisions des ions avec un gaz inerte induisent la fragmentation de ces derniers, ce phénomène est appelé la « dissociation par collision ». Des dispositifs de quadripôles ont été spécifiquement conçus afin d'induire ce phénomène, parmi eux nous citons le spectromètre triple quadripôle dans lequel une cellule de collision est placée entre deux analyseurs de masse quadripôles. Cet exemple de spectrométrie de masse en tandem permet l'application de deux ou plusieurs analyses de manière indépendante, ce qui augmente ainsi la spécificité de l'analyse. L'analyse des produits ioniques permet d'une part l'obtention d'informations sur la structure des composés analysés et d'autre part, elle est qualifiée d'empreinte digitale qui permet la confirmation de l'identité moléculaire (**Pitt, 2009**).

2.4.6.3.2. Analyseur à temps de vol (TOF)

Dans ce mode d'analyse TOF pour *Time of Flight Analyzer*, l'application d'une haute tension induit l'accélération des ions qui parcourent ainsi un tube de vol afin d'atteindre le

détecteur. La vitesse et le temps de ce parcours déterminent le rapport m/z de chaque ion. Les avantages de l'analyse par le TOF sont la rapidité, la haute sensibilité et une bonne exactitude qui permet la détermination des formules moléculaires de petites molécules (**Bristow, 2006**). Cependant cet analyseur est utilisé uniquement pour l'analyse MS simple, pour la configuration MS/MS il doit être associé à un quadripôle (QTOF), ou à un autre TOF (TOF-TOF) ou encore à un piège à ions (QIT/TOF) (**Parasuraman et al., 2014**).

2.4.6.4. Protocole expérimental de la LC-ESI-QTOF-MS/MS

Les poudres des extraits lyophilisés ont été dissoutes dans de l'acide formique à 0,1% (v/v) puis filtrées sur une membrane hydrophile stérilisée PVDF avec des pores de 0,45 μm (Millipore®). Après dilution, les échantillons ont été analysés par une pompe capillaire Agilent Technologies®1200 couplée avec une double source ESI sur un spectromètre de masse 6520 Q-TOF. Les analyses ont été effectuées en phase inverse sur une colonne C18-XDB ZORBAX Eclipse (Rapid Resolution HT, 2.1×50 mm, 1.8 μm , Agilent Technologies®) dans des conditions acides (acide formique 0.1%, v/v) suivant un gradient linéaire de 5 à 55% (v/v) d'acétonitrile avec un débit de 150 $\mu\text{l min}^{-1}$ pendant 43 min. L'analyse a été réalisée en modes négatif et positif. La source ESI a été réglée à 350°C et à 3500 V et 3000 V en modes positif et négatif respectivement. L'acquisition des données a été réalisée dans une plage allant de 125 à 1500 rapportée au rapport de la masse sur charge (m/z).

L'interprétation des pics chromatographiques a été effectuée à l'aide du logiciel MassHunter Workstation (version B.03.01, Agilent Technologies®). Les affectations des composés en mode négatif étaient vérifiées par des analyses MS/MS ciblées avec une largeur d'isolement d'un rapport m/z 4 et une énergie de collision fixée à 30 ou 40 V. Les spectres MS et MS/MS ont été interprétés selon la littérature. La quantification relative des composés identifiés a été basée sur des analyses MS en extrayant le EIC individuel (Extracted Ion Current, ± 20 ppm) en mode négatif et positif. La quantité de chaque composé a été exprimée en pourcentage relatif d'abondance par rapport à la valeur moyenne des échantillons. Trois échantillons ont été analysés pour chaque type d'extraction aqueuse ($n = 3$).

2.4.7. Analyse statistique

L'analyse statistique pour le calcul du rendement d'extraction et l'analyse chromatographique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0 (San Diego, USA). La normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. La comparaison des moyennes a été faite par le test d'analyse des variances ANOVA1 (Analysis of Variance) suivi du test de Tukey pour la comparaison multiple. Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm Erreur Standards à la Moyenne SEM. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

2.5. Etude *in vitro* de l'activité antioxydante de *C. phelipaea*

Plusieurs méthodes conventionnelles et innovantes sont utilisées dans l'évaluation de la capacité antioxydante à travers des systèmes réactionnels particuliers (**Badarinath et al., 2010**). Chacune de ces méthodes doit inclure un initiateur ou déclencheur de l'oxydation, un substrat et un moyen de mesure approprié du point final. La capacité antioxydante peut être estimée selon différents aspects comme l'aptitude à contrôler le degré d'oxydation, le pouvoir de piégeage du radical peroxyde (ORAC, TRAP et FRAP) ou de radicaux organiques (DPPH), la capacité de réduire des métaux (FRAP, CUPRAC) ou sur la quantification des produits formés lors de la peroxydation lipidique (TBARS). L'activité antioxydante ne peut être conclue à la base d'un seul test car les antioxydants agissent selon différents mécanismes et il n'existe pas de consensus pour une méthode standard plus pratique que d'autres (**Karadag et al., 2009 ; Dontha, 2016**).

L'impact de trois méthodes conventionnelles d'extraction aqueuse sur l'activité antioxydante des racines de *C. phelypaea* à l'échelle *in vitro* a été estimé par trois essais impliquant différents mécanismes antioxydants. Il s'agit des tests : de piégeage du radical DPPH, du pouvoir antioxydant réducteur ferrique et de la détermination de l'activité antioxydante totale.

2.5.1. Essai de Piégeage du radical DPPH

Cet essai se base sur le mécanisme de transfert d'électron, il détecte l'aptitude d'un antioxydant à transférer un électron afin de réduire le radical libre 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle DPPH (**Wright et al., 2001**). Une fois réduit, l'oxydant change de couleur ce qui implique une décoloration. Le degré de changement de couleur est proportionnel à la

concentration de l'antioxydant (**Huang et al., 2005**). Il se traduit par une diminution de l'absorbance ce qui est corrélé à la concentration en échantillon (**Gupta, 2015**).

Une solution de radicaux DPPH de concentration (0,004 %, p/v) a été fraîchement préparée puis 1 ml de cette solution a été ajouté à 1 ml de différentes concentrations allant de 3,9 à 125 µg/ml des extraits aqueux. Les mélanges ont été secoués et incubés à température ambiante pendant 30 min dans l'obscurité. Après incubation, l'absorbance a été mesurée à 517 nm et l'activité anti-radicalaire (RSA) exprimée en pourcentage d'inhibition de la formation du radical libre a été calculée à l'aide de l'équation (**Gurnani et al., 2016**) :

$$\text{RSA (\%)} = [(\text{DO DPPH} - \text{DO échantillon}) / \text{DO DPPH}] \times 100.$$

Des graphiques représentant les pourcentages RSA en fonction de différentes concentrations de chaque extrait ont été tracés et les résultats sont exprimés en valeurs IC50 (*Inhibitory Concentration 50*) qui sont calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0 à partir de ces graphiques. Les IC50 correspondent à la concentration de chaque extrait assurant 50% de l'activité anti-radicalaire. L'acide ascorbique (AAS) a été utilisé comme standard.

2.5.2. Essai du pouvoir antioxydant réducteur ferrique

De la même manière que pour le DPPH, ce test implique aussi un transfert d'électrons, mais il détecte cette fois-ci l'aptitude d'un antioxydant à transférer un électron afin de réduire un ion métallique ce qui se traduit par une coloration bleue-verdâtre (**Wright et al., 2001 ; Gupta, 2015**).

L'estimation du pouvoir réducteur ferrique FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) a été réalisée selon les protocoles décrits par **Gavamukulya et al. (2014)** et **Liao et al. (2015)**. Des aliquotes de 0,2 ml ont été prélevées de chaque extrait dans une gamme de concentration allant de 3,9 à 125 µg/ml et ont été mélangées avec 500 µl de tampon phosphate de sodium (200 mM, pH 6,6) et 500 µl d'une solution de ferricyanure de potassium (1 %). Les mélanges ont été incubés à 50°C dans un bain-marie pendant 20 min, et 500 µl d'une solution d'acide trichloroacétique (10%) ont été ajoutés. Par la suite, les mélanges ont été centrifugés à 3000 g pendant 16 min et 700 µl d'eau distillée ont été ajoutés à 700 µl de surnageant obtenu, puis 140 µl de chlorure ferrique (0,1 %) ont été ajoutés aux mélanges réactionnels. Après 10 min, l'absorbance a été lue à 700 nm. La concentration de l'extrait qui a donné une absorbance de 0,5 appelée EC50 (*Effective Concentration 50*) a été calculée à partir d'une analyse de régression linéaire. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard.

2.5.3. Détermination de l'activité antioxydante totale

L'activité antioxydante totale (AAT) des extraits aqueux a été déterminée par l'essai au phosphomolybdène selon le protocole modifié de **Do et al. (2014)**. En bref, des aliquotes (0,2 ml) des différents extraits aqueux ont été ajoutées à 1,8 ml d'une solution réactionnelle constituée d'un mélange d'acide sulfurique 0,6 M, phosphate de sodium 28 mM et de molybdate d'ammonium 4 mM. Les mélanges ont été incubés dans un bain-marie à 90°C pendant 90 min, après leur refroidissement à température ambiante l'absorbance a été mesurée à 695nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée par l'AAS et l'activité antioxydante totale a été exprimée en mg d'équivalents en acide ascorbique /g d'extrait (mg EsAAS/g extrait).

2.5.4. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0 (San Diego, USA). La normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. La comparaison des moyennes a été faite par le test d'analyse des variances ANOVA1 (Analysis of Variance) suivi du test de Tukey pour la comparaison multiple. L'analyse de la corrélation a été étudiée par le test de Pearson. Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm Erreur Standards à la Moyenne SEM. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

2.6. Etude de la toxicité aiguë et de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

2.6.1. Animaux

Des souris BalbC de sexe mâles et femelles à statut holoxénique dont le poids varie entre 20-30g ont été utilisées dans l'évaluation de la toxicité aiguë. Ces animaux ont été obtenus à partir du centre animalier de l'institut Pasteur d'Algérie. Ils proviennent d'un élevage de type conventionnel et ne présentent aucun signe clinique de pathologies. Ils ont été identifiés individuellement et placés dans des cages quelques jours avant le début de l'étude afin de leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire (température ambiante, disposés de granules d'aliments standard et un cycle de lumière/obscurité de 12/12h).

2.6.2. Evaluation de la toxicité aiguë

La toxicité aiguë des extraits aqueux de la racine de *C. phelipaea* a été recherchée à travers un modèle murin selon le protocole établi par l'Organisation pour la Coopération Economique et de Développement OECD, 2004 (*Organization for Economic Cooperation and Development*).

2.6.2.1. Traitements des animaux par les extraits aqueux de la racine de *C.phelipaea*

Les souris ont été mises à jeun pendant 12h avec accès libre à l'eau. Elles ont été subdivisées pour les deux sexes en 7 lots, constitués chacun de 6 souris. Les lots ont été arbitrairement attribués pour l'administration par gavage intragastrique des doses de 2 et 5g/kg de poids corporel (PC) des extraits aqueux. Le volume administré est de 10 ml/Kg de PC.

Les souris ayant subi une mauvaise manipulation lors du gavage ont été exclues de l'étude et remplacées par d'autres afin de compléter l'effectif des lots.

Les animaux des différents lots ont été traités comme suit:

Lot 1 : représente le lot témoin, gavage intragastrique de NaCl à 0.9%.

Lot 2 : gavage intragastrique du décocté a une concentration de 2g/kg de PC.

Lot 3 : gavage intragastrique du décocté a une concentration de 5g/kg de PC.

Lot 4 : gavage intragastrique de l'infusé a une concentration de 2g/kg de PC.

Lot 5 : gavage intragastrique de l'infusé a une concentration de 5g/kg de PC.

Lot 6 : gavage intragastrique du macérât a une concentration de 2g/kg de PC.

Lot 7 : gavage intragastrique du macérât a une concentration de 5g/kg de PC.

2.6.2.2. Suivi de la mortalité et du comportement

Après administration des extraits aqueux DEC, INF et MAC des racines de *C. phelipaea* aux doses de 2 et 5g/kg de PC chez les souris des deux sexes, toute mortalité ou déviation du comportement général associées à l'administration de ces doses ont été recherchées pendant les 5 heures qui ont suivi le traitement et intermédiairement pendant les premières 24 heures. Ce suivi a été prolongé quotidiennement durant les 14 jours de traitement.

2.6.2.3. Etude des variations pondérales

L'étude de la variation du poids corporel des animaux a été évaluée par le suivi du poids des animaux au 7^{ème} et 14^{ème} jour après le traitement. Après ce dernier, les animaux ont été sacrifiés et les poids des organes : foie, reins, rate, poumons et cœur ont été mesurés.

Les variations pondérales entre les animaux témoins non traités et ceux traités par les deux doses des trois extraits ont été estimées via la comparaison des moyennes du PC et celui des organes.

2.6.2.4. Etude statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0 (San Diego, USA). La normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Selon la normalité des populations, la comparaison des moyennes a été étudiée soit par les tests d'analyse des variances à un facteur ANOVA 1 et à deux facteurs ANOVA 2 soit par le test Kruskal-Wallis. La comparaison multiple a été étudiée par les tests de Holm-Sidak's ou de Tukey (post ANOVA) et le test de Dunn (post Kruskal-Wallis). Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm Erreur Standards. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

2.6.3. Etude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux de *C. phelipaea* a été menée par le modèle inflammatoire de l'œdème induit par la carragénine tel que décrit par **Winter et al. (1962)**. Dans ce modèle, l'inflammation est induite par injection de la carragénine au niveau de la patte arrière droite de la souris. Cet agent phlogogène provoque la formation d'un œdème caractéristique d'une réaction inflammatoire aiguë dont l'évaluation est réalisée par la mesure du diamètre de la patte en fonction du temps permettant ainsi de suivre l'évolution du processus inflammatoire.

2.6.3.1. Prétraitement des animaux par les extraits aqueux de la racine de *C. phelypaea*

Des souris BalbC mâles ont été réparties en 04 lots et mises à jeun pendant 12h avant l'expérimentation. Le diamètre de la patte arrière droite a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse à T_0 .

Les souris des 04 lots ont subi les traitements suivants :

Lot 1 : représente le lot témoin ($n= 5$). Les animaux de ce lot ont reçu une solution de NaCl à 0,9% via un gavage intragastrique.

Lot 2 : représente le lot traité par le décocté ($n= 5$). Les animaux de ce lot ont reçu le décocté de la racine de *C. phelypaea* à une dose de 250mg/kg de PC via un gavage intragastrique.

Lot 3 : représente le lot traité par l'infusé ($n= 5$). Les animaux de ce lot ont reçu l'infusé de la racine de *C. phelypaea* à une dose de 250mg/kg de PC via un gavage intragastrique.

Lot 4: représente le lot traité par le macérât ($n= 5$). Les animaux de ce lot ont reçu le macérât de la racine de *C. phelypaea* à une dose de 250mg/kg de PC via un gavage intragastrique.

Une heure après le prétraitement, l'œdème a été induit chez les souris des 04 lots par injection de 50 µl de carragénine à 1% au niveau de leurs pattes arrière droites.

2.6.3.2. Suivi de l'évolution de l'inflammation après prétraitement

Après induction de l'œdème, Le diamètre de la patte arrière droite des 04 lots a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse à des intervalles réguliers pendant 5 heures.

Le pourcentage de l'augmentation de l'œdème a été calculé pour chaque heure selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'augmentation de l'œdème} = [(D_n - D_0) / D_0] \times 100$$

Avec :

D_n : diamètre de la patte arrière droite à chaque heure après injection de la carragénine.

D₀ : diamètre de la patte arrière droite avant l'injection de la carragénine.

2.6.3.3. Etude statistique





L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0 (San Diego, USA). La normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. La comparaison des moyennes a été faite par les tests d'analyse des variances ANOVA 1(Analysis of Variance) et Kruskal-Wallis. Ces tests sont suivis respectivement par les tests de Tukey et de Dunn pour la comparaison multiple. Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± Erreur Standards à la Moyenne. Le seuil de significativité a été fixé à p <0,05.

RESULTATS ET DISCUSSIONS


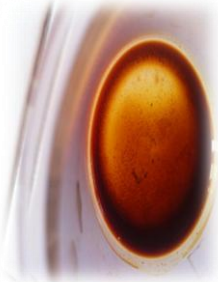


3.1. Criblage phytochimique de la poudre végétale des racines de *C. phelipaea*

Les résultats expérimentaux des tests de criblage phytochimique réalisés sur le matériel végétal broyé de la racine de *C. phelipaea* sont regroupés dans le tableau VII.

Tableau VII : Résultats du criblage phytochimique de la poudre des racines de *C. phelipaea*

Classes de composés		Caractérisation réactionnelle	Photo
Saponines	+	Formation d'une mousse de plus de 2cm indiquant une forte teneur en saponines	
Flavonoïdes			
Libres	+	Coloration rose-orange	
Leucoanthocyanes anthocyanes	- -	Absence de coloration Absence de coloration	
Tanins			
Galliques hydrolysables	+	Apparition d'une coloration bleue noire	
Catéchiques non hydrolysables	-	Absence de coloration	
Amidon	-	Absence de coloration	
Stérols et triterpènes	+	Formation d'un anneau rouge brunâtre à la surface entre les deux liquides	

Résultats et discussions

Caroténoïdes	+	Apparition d'une légère coloration rouge	
Oses et holosides	+	Apparition d'une coloration rouge brique	
Mucilage	-	Absence de précipité	
Coumarines	+	Milieu réactionnel trouble	
Dérivés anthracéniques libres	-	Absence de coloration	
O-hétérosides	-	Absence de coloration	
C-hétérosides	-	Absence de coloration	
Alcaloïdes	-	Pas de milieu trouble	

Les signes (+) (-) indiquent respectivement la présence et l'absence des classes phytochimiques.

Le criblage phytochimique est un ensemble de tests qualitatifs préliminaires qui sont menés afin de détecter la présence à la fois des métabolites primaires et secondaires (**Abubakar et Haque, 2020**). Les résultats illustrés dans le tableau VII, indiquent la présence de plusieurs métabolites de type secondaires.

Dans la classe des composés phénoliques, les tests de screening phytochimique témoignent d'une part, de la présence des flavonoïdes libres, des tanins galliques hydrolysables et des coumarines, et d'autre part, de l'absence des flavonoïdes de type anthocyanes, leucoanthocyanes et des tanins catéchiques non hydrolysables.

Concernant la classe des terpènes, des résultats positifs sont retrouvés pour les triterpènes et les caroténoïdes. Par contre la présence des alcaloïdes n'a pas été détectée.

Par ailleurs, les résultats ont révélé la présence de certains métabolites primaires et d'autres composés phytochimiques à savoir, les oses/holosides, les stérols et les saponosides. Enfin, des résultats négatifs ont été notés pour l'amidon, les mucilages, les dérivés anthracéniques libres et glycosylés. Cette caractérisation phytochimique préliminaire demeure peu spécifique, cependant elle pourrait orienter vers une identification plus approfondie des différents métabolites.

Les arguments scientifiques des utilisations thérapeutique et nutritionnelle des racines de *C. phelipaea* sont potentiellement liés à leur composition phytochimique en termes de phényléthanoïdes glycosides (PhGs), polysaccharides et iridoïdes (**Fu et al., 2018**). Cependant, les classes phytochimiques révélées positives par le présent criblage (flavonoïdes, tanins galliques hydrolysables, coumarines, saponosides, triterpènes stérols et caroténoïdes) sont connues pour leur diverses propriétés bioactives et thérapeutiques telles-que anti-inflammatoire, antidiabétique, anti-tumorale, immunomodulatrice, anti-neurodégénérative et digestives (**Harun et al., 2020 ; Caprarulo et al., 2021 ; Abou Baker, 2022 ; Ghosh et al., 2022 ; Rostom et al., 2022 ; Sharma et al., 2022 ; Xu et al., 2022**). Ces classes phytochimiques n'ont fait l'objet d'aucune étude préalable chez le genre *Cistanche*.

3.2. Etude phytochimique des extraits aqueux de *C. phelipaea*

3.2.1. Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction exprimé en % des trois extraits aqueux a été calculé à partir de trois extractions indépendantes pour chaque procédé d'extraction. Les résultats sont représentés dans le tableau VIII et la figure 08.

Tableau VIII: Rendement d'extraction des extraits aqueux des racines de *C. phelipaea*.

Extrait	DEC	INF	MAC
Rendement (%)	32,45±2,32	20,67±5,22	23,01±4,43

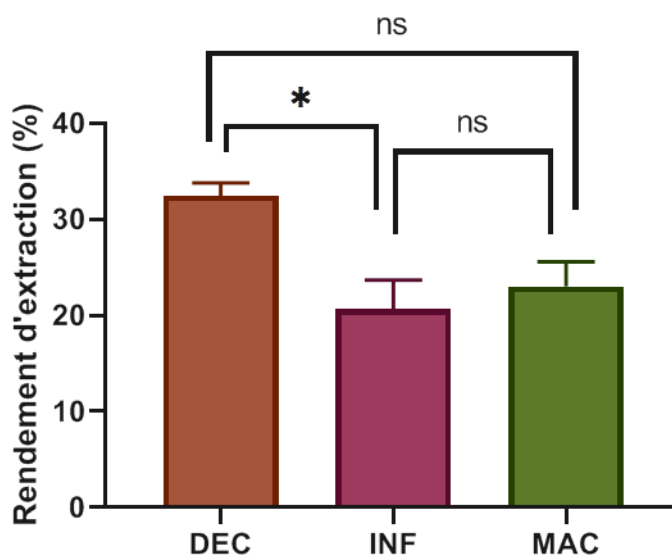


Figure 08 : Rendement d'extraction des différents extraits aqueux de *C.phelipaea*.

DEC: décoction; INF: infusion; MAC: macération. Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM (n = 3). ns : différence non significative, différence significative (*) : p<0,05.

Les résultats obtenus montrent que le rendement d'extraction obtenu à partir du décocté est plus élevé que ceux obtenus par l'infusé et le macérât. Ce rendement est significativement plus élevé pour le décocté par rapport à l'infusé (p<0,05) avec un facteur d'augmentation de 1,57. Cependant, bien qu'un rendement plus élevé soit observable pour le décocté par rapport au macérât, cette variation reste non significative (p>0.05). De même, aucune différence

significative n'est notée entre les rendements obtenus à partir de l'infusé et le macérât ($p > 0.05$).

3.2.1.1. Discussion

Les extraits bruts sont souvent un réservoir de différentes classes de composés solubles dans le solvant utilisé, ils sont généralement préparés avec la méthode d'extraction par solvant (**Alara et al., 2021**). Cette méthode conventionnelle implique la pénétration du solvant dans la matrice solide, la dissolution du soluté emportant les molécules solubles dans le solvant puis ce soluté diffuse à partir de la matrice solide. Ainsi, l'optimisation de l'extraction par solvant implique tout facteur capable d'augmenter les paramètres solubilité et diffusion. L'efficacité de l'extraction est affectée par : la nature du solvant, la taille des particules à extraire, le ratio solvant/solide, la température et le temps d'extraction (**Zhang et al., 2018b**). Au cours de notre étude, nous avons opté pour le solvant aqueux qui représente le solvant typique de la médecine traditionnelle. Les paramètres mouvants des extractions réalisées sont la température et le temps de chauffage.

Le rendement de l'extraction est un paramètre important dans la mesure où il permet de prévoir la quantité de matière active exploitable à partir d'une méthode d'extraction donnée. Il permet également de prévoir la quantité de matière sèche active exploitable d'un organe donné issu d'une même plante ou de plantes différentes. De manière générale, plusieurs facteurs peuvent influencer le rendement d'extraction. En effet il varie en fonction de l'espèce et des organes végétaux, de la composition phytochimique, des conditions de récolte ainsi que celle du séchage. Par ailleurs le solvant et la technique d'extraction influence le rendement d'extraction (**Isidore et al., 2019**).

Dans la présente étude, le rendement d'extraction peut être interprété comme l'efficacité du solvant aqueux dans l'extraction des composés bioactifs de *C. philipaea* selon différents procédés d'extraction employés. Il s'agit d'un indicateur des effets de la température et du temps sur l'extraction des composés polaires à partir de la matrice végétale. Ce rendement montre une augmentation significative liée à l'augmentation du temps de chauffage dans le procédé de DEC par rapport à celui de l'INF. La température et le temps de chauffage augmentent la solubilité des particules ainsi que le coefficient de diffusion (**Ennaifer et al., 2018**). Les hautes températures augmentent l'efficacité de l'extraction en rendant les parois cellulaires plus perméables au solvant et aux molécules, ce qui fait augmenter ces deux coefficients (**Saklar et al., 2015**).

Par ailleurs, l'utilisation d'un solvant à sa température d'ébullition réduit sa viscosité et sa surface de tension lui permettant ainsi d'atteindre plus facilement la matrice solide et d'entrer en contact avec les molécules solubles à extraire (**Mezzomo et al., 2011**).

Le temps d'extraction prolongé augmente la capacité du solvant de traverser le tissu et les parois, de même qu'une augmentation du taux de transfert de masse afin d'augmenter la perméabilité et la diffusion des métabolites. Il permet par ailleurs, la déprotonation de molécules induisant l'augmentation du poids en rendement (**Kim et al., 2014**).

Plusieurs travaux ont montré que la température élevée et un temps d'extraction prolongé augmentent le rendement de l'extraction en particulier dans les décoctions. Une série de travaux de **Kim et al. (2013, 2014)** sur différentes décoctions de plantes ont montré que la prolongation du temps d'extraction permettait d'obtenir un meilleur rendement d'extraction, du contenu total en solides solubles et de certaines molécules phytochimiques comme les coumarines. De même, les travaux de **Naima et al. (2015)** ont montré que l'augmentation de la température de 40°C à 80 °C de l'infusion de *Acacia mollissima* augmente le rendement en polyphénols et en tanins hydrolysables. **Lopes et al. (2019)** ont rapporté que la température est un paramètre qui permet d'obtenir un meilleur rendement d'extraction de plusieurs composés y compris les sucres à partir du café. Ils ont montré par ailleurs, que le rendement d'extraction des polysaccharides galactomannane augmente avec la température alors que celui de l'arabinogalactane augmente plus avec le temps.

Cependant, notre étude ne révèle pas de différence significative entre le rendement du décoté et celui du macérât. Cela peut être expliqué par le fait que l'augmentation du temps de chauffage implique la dégradation de certaines molécules thermosensibles et qui seraient donc mieux extraites à température ambiante (**Pisoschi et al., 2016**).

3.2.2. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux

Les valeurs de la teneur en composés phénoliques totaux (CPT) des différents extraits aqueux déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu et rapportée en équivalents d'acide gallique sont représentées dans le tableau IX. Ces résultats montrent que le procédé de DEC a permis d'extraire une quantité significativement plus élevée de composés phénoliques totaux ($92,45 \pm 0,73$ mg EAG /g d'extrait) par rapport aux procédés d'INF et de MAC ($79,12 \pm 1,27$ et $78,59 \pm 4,56$ mg EAG /g d'extrait) ($p < 0,05$). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre ces deux derniers ($p > 0,05$) suggérant ainsi que le court traitement thermique appliqué pendant l'infusion n'augmenterait pas directement la libération des composés phénoliques.

D'autre part, le temps de contact au chauffage pourrait être un facteur prédominant en permettant une meilleure extraction du fait que le procédé DEC impliquant un temps d'ébullition plus long a permis l'extraction d'une plus grande quantité de composés phénoliques très stables par rapport à l'INF. Dans ce sens, plusieurs travaux ont montré une augmentation linéaire du contenu phénolique en fonction de la température et du temps de chauffage, cela peut être expliqué par le fait que l'augmentation de la solubilité et de la diffusion des composés phénoliques à de hautes températures améliore le transfert de masse (**Lazar *et al.*, 2016 ; El hassani *et al.*, 2019**).

Les quantités similaires retrouvées dans ces deux extraits INF et MAC, suggèrent que d'autres types de composés phénoliques pourraient être plus extractibles par le processus de macération à froid et seraient des composés phénoliques thermosensibles. En effet, des températures élevées généralement au-delà de 60°C peuvent provoquer la dégradation thermique de certains polyphénols (**Naima *et al.*, 2015 ; El hassani *et al.*, 2019**) tel que les catéchines qui sont dégradées à partir de $80-85^{\circ}\text{C}$ (**Saklar *et al.*, 2015**).

À notre connaissance, aucune étude n'est disponible sur le contenu en composés phénoliques de *C. phelypaea*.

3.2.3. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

Les résultats de la teneur en flavonoïdes totaux (TFT, tableau IX) révèlent que les extraits obtenus par les procédés de DEC et INF montrent des quantités similaires en flavonoïdes ($14,26 \pm 0,54$ et $14,71 \pm 0,30$ mg QE/g d'extrait). Par contre, l'extrait obtenu par MAC présente une valeur de $09,85 \pm 0,55$ mg QE/g d'extrait. Cette dernière est significativement plus faible par rapport aux deux extraits DEC et INF ($p < 0,01$ et $p < 0,001$ respectivement). Des niveaux plus élevés de TFT ont été obtenus lorsque les extraits ont été préparés à chaud par rapport à ceux obtenus à température ambiante. Cela peut être lié à la haute solubilité des flavonoïdes à haute température.

Contrairement au CPT, il semblerait que le temps de chauffage n'aurait pas influencé le rendement d'extraction en flavonoïdes. De plus, vu que l'infusé contient plus de flavonoïdes que le macérât, il semblerait donc que l'augmentation du temps d'extraction à température ambiante n'a pas compensé l'absence de chauffage.

Au meilleur de nos connaissances, il n'y a pas de rapports concernant la composition en flavonoïdes de *C. phelypaea*, d'où un intérêt particulier serait souhaitable pour l'étude des flavonoïdes dans cette plante notamment au niveau de la partie aérienne. En effet, les organes aériens comme les fleurs et les feuilles sont généralement plus riches en flavonoïdes. Cette dominance est expliquée par le fait que cette partie est plus exposée au soleil, nécessitant ainsi une forte production de flavonoïdes ayant un rôle protecteur contre les radiations solaires (Chirinos *et al.*, 2013 ; Lezoul *et al.*, 2020).

3.2.4. Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux (saccharose, glucose, fructose, leurs dérivés méthyles et les polysaccharides) au niveau des trois extraits aqueux a montré une augmentation significative ($p < 0,05$) du contenu en sucres contenus dans le décocté par rapport à celle de l'infusé et du macérât (tableau IX). Ce résultat indique que l'augmentation du temps de chauffage permet une extraction plus importante des sucres. En effet, l'extraction des polysaccharides connus comme étant des constituants majeurs de *Cistanches herba* est influencé par la température. Zhang *et al.* (2016) ont démontré que l'augmentation de la température entre 30 et 50 °C pendant 40 min augmente le rendement en polysaccharides des tiges de *C. tubulosa*.

Tableau IX : Teneurs en composés phénoliques totaux (CPT), en flavonoïdes (TFT) et en sucres totaux dans les différents extraits aqueux des racines de *C. phelypaea*.

Extrait	CPT (mg EAG /g d'extrait)	TFT (mg EQ /g d'extrait)	Sucres totaux (mg/g d'extrait)
DEC	92.45±0.73 ^a	14.26±0.54 ^a	130.8 ±4.91 ^a
INF	79.12±1.27 ^b	14.71±0.30 ^a	103.2±7.06 ^b
MAC	78.59±4.56 ^b	9.85±0.55 ^b	99.72±0.88 ^b

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois essais indépendants utilisant 3 échantillons dans chaque essai (n=3). Les différentes lettres en exposant dans la même colonne indiquent des différences significatives (p<0,05). EAG, équivalents en acide gallique; EQ, équivalents en quercétine.

3.2.5. Analyse LC-ESI-QTOF-MS

L'étude phytochimique LC-ESI-QTOF -MS des différents extraits aqueux des racines de *C. phelypaea* a été réalisée à la fois en mode d'acquisition négatif et positif. Les ions séparés sur la base du rapport m/z sont déterminés proportionnellement à leur abondance. Ce résultat est obtenu sous forme de spectre de masse qui représente le tracé entre l'abondance des ions et le rapport m/z. Les composés détectés dans les profils chromatographiques ont été attribués suivant les données de la littérature (tableau X).

La quantification des composés caractérisés a été exprimée en pourcentage d'abondance relative pour chaque composé dans les trois extraits aqueux, détectés dans les modes d'acquisition négatif et positif (figures 09 et 10, Annexe 4/ tableau 1 et 2). Ces résultats nous permettent de mettre en évidence certaines variations quantitatives dans les profils chimiques des trois extraits aqueux, DEC, INF et MAC.

Dans notre étude, l'analyse par spectrométrie de masse en mode négatif a révélé un profil complexe constitué de 14 composés, alors qu'en mode positif 6 composés ont été détectés. D'un point de vue qualitatif, les analyses ont montré des compositions similaires des composés identifiés au niveau des trois extraits aqueux. Il s'agit de composés de type PhGs et iridoïdes glycosides. Cette observation est cohérente avec les différents travaux de l'analyse phytochimique de *Cistanches herba*, indiquant que ces composés, avec les lignanes, les alditols, les oligosaccharides et les polysaccharides sont les principaux constituants

phytochimiques de ce genre (**Jiang et Tu, 2009; Liu et al., 2013; Bougandoura et al., 2016; Song et al., 2016; Ahn et al., 2017; Yan et al., 2017; Fu et al., 2018**).

Les spectres MS des PhGs et des iridoïdes glycosides indiquent que les analytes sont détectables en mode positif en tant qu'adduits avec des ions inorganiques, tels que $[\text{MNH}_4]^+$, $[\text{MNa}]^+$ and $[\text{MK}]^+$ (tableau X), cela a déjà été souligné pour les PhGs par d'autres auteurs (**Jiang et Tu, 2009**). Probablement, ce comportement peut avoir été encore renforcé par les procédures d'extraction à base d'eau adoptées dans notre étude. Par contre, dans le mode négatif, les signaux importants ont été observés sous forme de $[\text{M} - \text{H}]^-$ (tableau X), comme il a été précédemment rapporté (**Song et al., 2019**).

Les profils chimiques obtenus en mode négatif ont révélé la présence de certains composés avec les mêmes ions moléculaires mais avec différents temps de rétention (T_r , tableau X). Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur ces profils, nous avons effectué une analyse LC-ESI-MS/MS (tableau XI, figure 09). Ainsi, il a été possible de détecter 05 couples d'isomères (composés 1-4, 6-8, 11-12, 13-14 et 15-16) dont chacun de ces couples possède le même profil moléculaire ionique et de fragmentation. Cependant l'analyse LC-ESI-MS/MS n'a révélé aucune différence structurale entre ces isomères, ce qui implique que d'autres stratégies, telles que des analyses MS multiples, la résonance magnétique nucléaire RMN ou l'utilisation d'étalons spécifiques seront nécessaires pour une caractérisation plus précise de ces molécules.

Les PhGs sont des composés hydrosolubles appartenant à la classe de polyphénols dont la structure chimique est caractérisée par un groupement alcool phénéthylque ($\text{C}_6\text{-C}_2$) lié au β -glucopyranose/ β -allopyranose. De plus, les substituants tels que des acides aromatiques et des sucres sont souvent liés à la structure centrale par des liaisons ester ou glycosidique (**Xue et Yang, 2016**). Généralement, les PhGs de *Cistanches herba* se trouvent sous forme de glycosides monosaccharidiques, disaccharidiques ou trisaccharidiques. L'une des caractéristiques particulières de ce genre est que la forme disaccharidique comprend généralement une liaison Glucose (3 \rightarrow 1) Rhamnose, où le glucose lié à l'aglycone est généralement substitué en C_4 ou C_6 par un groupement caféoyle ou coumaroyle, tandis qu'en position C_6 , un glucose supplémentaire, ou rhamnose, apparaît dans le cas des glycosides trisaccharidiques (**Jiang et Tu, 2009**). Actuellement, 69 PhGs ont été identifiés par HPLC-LTQ-orbitrap-MS grâce à l'analyse de trois espèces différentes (**Fu et al., 2018**).

La présente analyse nous a permis d'identifier deux PhGs de type monoglycosides en mode positif, correspondant au salidroside (composé 3) et à la syringine (composé 9) (tableau X). De plus, 4 paires de PhGs de type disaccharides caféoylés ont été identifiées en mode négatif, chacune d'elles correspondant à une paire d'isomères (composé 6-8, 11-12, 13-14 et 15-16). Le profil MS/MS de ces composés est marqué par la présence d'au moins un des fragments à 179, 161 et 135 m/z qui dérivent respectivement, du clivage d'un fragment d'acide caféique (AC), de sa déshydratation et de sa décarboxylation (tableau. XI, figure 12, 13, 14, 15) (Wang *et al.*, 2009).

Par conséquent, les composés 6 et 8 ont été identifiés comme étant le cistanoside F et son isomère. Cependant, il nous a été possible de discriminer la deuxième paire d'isomères, en attribuant le composé 11 à l'actéoside et le composé 12 à l'isoactéoside sur la base de leurs Tr (tableau XI) et de leur abondance relative. En effet, selon ce qui a été montré par différents auteurs grâce à l'utilisation d'étalons authentiques en chromatographie en phase inverse, le premier s'élue en premier et est l'un des principaux PhGs retrouvé dans le genre *Cistanche* (Han *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016a). De plus, la paire 13-14 est attribuée au campnéoside II et à son isomère. Cette molécule est une forme β -hydroxylée d'actéoside qui suit le mode de fragmentation typique des PhGs de type actéoside, à l'exception d'un ion distinctif à 151 m/z (figure 14) correspondant à une fraction déshydrophénéthanol (Shi *et al.*, 2013). Les composés 15-16 sont attribués au 2' acétylactéoside/tubuloside B. Selon l'étude de Li *et al.* (2016b), sur la base des différents Tr, il nous est possible de supposer que le premier pic chromatographique corresponde au 2'-acétylactéoside et le second au tubuloside B. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Par ailleurs, quatre PhGs trisaccharides ont été également identifiés en mode négatif (tableau XI, figures 16 et 19). Le premier correspond à l'échinacoside (composé 17) qui est un autre PhG majeur avec l'actéoside chez les espèces de *Cistanche*, le composé 20 est attribué à un dérivé acétylé de l'échinacoside qui est le tubuloside A. Le composé 19 est attribué au kankanoside H₁/H₂ sur la base d'une substitution acétylée et d'un fragment coumaroyl indiqué dans le profil MS/MS par les pertes séquentielles de -42 m/z et par l'ion diagnostique à 145 m/z, respectivement (tableau XI, figure 18) (Morikawa *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Le composé 18 est attribué au pheliposide. Ce dernier diffère par rapport au tubuloside A en étant substitué par du xylose au lieu du glucose (Andary *et al.*, 1985). Sur la base du

mécanisme de fragmentation classique des PhGs, nous pouvons supposer que le pheliposide pendant la fragmentation a produit l'ion à 635 m/z en perdant sa fraction AC, et l'ion à 593 m/z par les pertes simultanées de l'AC et de l'acétyle en position C₂ (tableau XI, figure 17). Un dernier trisaccharide caféoylé est identifié comme étant le cistantubuloside C₁/C₂ (composé 10) en mode positif (tableau X).

En plus des PhGs, nos résultats ont également permis la caractérisation de cinq iridoïdes. Cette famille est considérée comme l'un des dérivés cyclopentanoïdes monoterpéniques les plus nombreux et peut se présenter soit sous forme glycoside ou aglycoside notamment dans le genre *Cistanche* (Bianco, 1994; Jiang et Tu, 2009).

Trois iridoïdes glycosides ont été identifiés en mode positif par l'analyse LC/MS, il s'agit du 6-désoxycatalpol (composé 2), bartsioside (composé 5) et le gluroside (composé 7) (tableau X). De plus, un iridoïde et son isomère ont été caractérisés en mode négatif LC-MS/MS en tant qu'acide 8-épiloganique (composés 1-4) en raison des pertes neutres de résidus de glucose (213 m/z) et de CO₂ (169 m/z) (tableau XI et figure 11).

La majorité des études phytochimiques de *Cistanches herba* se sont focaliser sur les espèces *C. tubulosa*, *C. deserticola* et *C. sinensis*, mais seules quelques données sont disponibles sur l'espèce *phelypaea*. Nos résultats corroborent avec les études montrant principalement les mêmes composés (Melek et al., 1993; Deyama et al., 1995; Trampetti et al., 2019). De plus, le cistanoside F, le campnéoside II, le kankanoside H₁/H₂, le cistantubuloside C₁/C₂ et l'acide 8-épiloganique sont rapportés ici pour la première fois chez cette espèce.

Jusqu'à présent et au meilleur de notre connaissance, le pheliposide n'a été retrouvé que chez l'espèce *C. phelypaea* (Melek et al., 1993). Néanmoins, Deyama et al. (1995) ainsi que Trampetti et al. (2019), qui ont étudié respectivement les parties aériennes de la plante récoltée au Qatar et l'ensemble de la plante à fleurs récoltée au Portugal, n'ont pas signalé son identification chez *C. phelypaea*. Il est à signaler que ces études ont utilisé du matériel végétal issu de différentes périodes de récolte, différents solvants et différentes méthodes d'extraction et d'analyse.

Globalement et compte tenu du fait que malgré le grand nombre d'études phytochimiques menées sur différentes espèces du genre *Cistanche*, le pheliposide n'a pas été isolé ou identifié chez ces dernières (**Fu et al., 2018**), il est donc possible de proposer l'utilisation de cette molécule comme marqueur chimiotaxonomique typique de *C. phelypaea* au sein du genre *Cistanche*, du moins pour l'organe racinaire.

Par contre, dans notre étude, nous n'avons pas identifié les composés tubuloside E et ajugol, tel que précédemment décrits par **Deyama et al. (1995)**; cela peut être dû à plusieurs facteurs, notamment la méthode d'extraction et le solvant utilisé, les organes végétaux et/ou la période de récolte. En effet, ces deux composés ont été identifiés dans l'extrait méthanolique des parties aériennes de *C. phelypaea* récoltée au Qatar durant le mois de mars. Il serait par ailleurs intéressant de noter que cette différence suggère une possible variabilité dans la synthèse de ces métabolites secondaires, selon l'organe et le stade de croissance de la plante.

A l'appui de cette hypothèse, **Trampetti et al. (2019)** ont rapporté une variation de la composition en métabolites secondaires des extraits aqueux de différents organes de *C. phelypaea*, montrant que les PhGs, dominés par l'échinacoside, se trouvaient principalement dans les racines tandis que les iridoïdes, comprenant le bartsioside, l'ajugol et le glucoside, étaient plus abondants dans les fleurs. Ils ont également mentionné que les tiges de *C. phelypaea* contenaient à la fois des PhGs (essentiellement du tubuloside A et du 2'-acétylactéoside) et des iridoïdes. Récemment, quatre nouveaux PhGs trisaccharidiques portant des substituants coumaroyl ont été isolés à partir d'un extrait butanolique de la partie aérienne de *C. phelypaea*, poussant dans le sud-ouest de l'Algérie (**Beladjila et al., 2018**).

Comme nous l'avons décrit, dans notre étude, le même schéma chromatographique qualitatif a été retrouvé pour les trois types d'extraction. Cependant, une différence évidente a été observée dans l'abondance relative de certains composés. Ces composés comprennent l'acide 8-épiloganique et son isomère, le cistanoside F et son isomère, ainsi que l'actéoside, l'isoactéoside, les deux isomères du 2'-acétylactéoside/tubuloside B et la syringine (figures 09 et 10).

Les composés actéoside, isoactéoside et 2'-acétylactéoside/tubuloside B sont significativement plus abondants dans la DEC et/ou l'INF que dans la MAC (figure 09). Ceci pourrait être attribué à leur grande solubilité dans l'eau chaude. De plus, l'isoactéoside et l'un des deux isomères du 2'-acétylactéoside/tubuloside B ont été extraits plus efficacement par la DEC que par l'INF (figure 09). Ces résultats suggèrent la nécessité d'un temps de contact plus long dans l'eau à température d'ébullition pour une meilleure extraction de ces PhGs disaccharides. Fait intéressant, dans ce cas, est que tous ces composés, ayant un comportement identique dans les procédures d'extraction à température modifiée, sont structurellement homologues. Leurs structures chimiques sont similaires, constituées de trois fractions chimiques : CA, hydroxytyrosol (3,4 alcool dihydroxyphénéthylque), phényléthanoïde aglycone et rhamnose.

Cependant, la procédure MAC a montré plus d'efficacité dans l'extraction de l'acide 8-épiloganique et du cistanoside F, avec leurs isomères respectifs (figure 09) et la syringine (figure 10). Ces résultats suggèrent d'une part que l'acide 8-épiloganique, le cistanoside F et la syringine seraient principalement plus extractibles à température ambiante en raison de leur instabilité thermique ou que d'autre part, la durée prolongée du traitement thermique ait dégradé une partie de ces composés.

Tableau X : Composés identifiés par LC-ESI-QTOF-MS au niveau des extraits aqueux des racines de *C. phelypaea*.

N.	Composé	Formule	Mode de formation	Tr (min)	m/z	Référence
1	Acide 8-epiloganique (isomère A)	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	4.69 ± 0.10	375.13	Yoshizawa <i>et al.</i> , 1990
2	6-deoxycatalpol	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	[MNH ₄] ⁺ [MNa] ⁺ [MK] ⁺ [2MNa] ⁺	4.76 ± 0.10	364.16 369.11 385.09 715.24	Yoshizawa <i>et al.</i> , 1990
3	Salidroside	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	[MNH ₄] ⁺ [MNa] ⁺ [MK] ⁺	5.36 ± 0.08	318.15 323.11 339.08	Yuejie <i>et al.</i> , 2017
4	Acide 8-epiloganique (isomère B)	C ₂₆ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	5.88 ± 0.12	375.13	Yoshizawa <i>et al.</i> , 1990
5	Bartsioside	C ₁₅ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺ [MNH ₄] ⁺ [MNa] ⁺ [MK] ⁺ [2MNa] ⁺	7.24 ± 0.08	331.14 348.16 353.12 369.09 683.25	Yuejie <i>et al.</i> , 2017
6	Cistanoside F (isomère A)	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	8.01 ± 0.17	487.15	Kobayashi <i>et al.</i> , 1985
7	Glucoside	C ₁₅ H ₂₄ O ₈	[MNH ₄] ⁺ [MNa] ⁺ [MK] ⁺ [2MNa] ⁺	8.06 ± 0.13	350.18 355.14 371.11 687.28	Yuejie <i>et al.</i> , 2017
8	Cistanoside F (isomère B)	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	8.35 ± 0.15	487.15	Tao <i>et al.</i> , 2018 Quirantes-piné <i>et al.</i> , 2009
9	Syringine	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	[MNH ₄] ⁺ [MNa] ⁺ [MK] ⁺ [2MNa] ⁺	11.10 ± 0.06	390.17 395.13 411.10 767.27	Yuejie <i>et al.</i> , 2017
10	Cistantubuloside C ₁ /C ₂	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₁	[MNH ₄] ⁺ [MNa] ⁺	15.68 ± 0.11	820.28 825.24	Yuejie <i>et al.</i> , 2017
11	Acteoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	19.74 ± 0.10	623.20	Kobayashi <i>et al.</i> , 1985
12	Isoacteoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	20.85 ± 0.09	623.20	Kobayashi <i>et al.</i> , 1985
13	Campneoside II (isomère A)	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	[M-H] ⁻	16.97 ± 0.13	639.19	Imakura <i>et al.</i> , 1985
14	Campneoside II (isomère B)	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	[M-H] ⁻	17.15 ± 0.13	639.19	Imakura <i>et al.</i> , 1985
15	2'-acetylacteoside/Tubuloside B	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	[M-H] ⁻	22.58 ± 0.10	665.21	Li <i>et al.</i> , 2016b
16	2'-acetylacteoside/Tubuloside B	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	[M-H] ⁻	24.09 ± 0.12	665.21	Li <i>et al.</i> , 2016b
17	Echinacoside	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	[M-H] ⁻	17.41 ± 0.13	785.25	Kobayashi <i>et al.</i> , 1985
18	Pheliposide	C ₃₆ H ₄₆ O ₂₀	[M-H] ⁻	21.85 ± 0.10	797.25	Jedrejek <i>et al.</i> , 2020
19	Kankanoside H ₁ /H ₂	C ₃₇ H ₄₈ O ₂₀	[M-H] ⁻	21.25 ± 0.08	811.27	Morikawa <i>et al.</i> , 2010
20	Tubuloside A	C ₃₇ H ₄₈ O ₂₁	[M-H] ⁻	19.93 ± 0.10	827.26	Tao <i>et al.</i> , 2018 Chen <i>et al.</i> , 2018b

N.: nombre du pic chromatographique. **Mode de formation:** ions sélectionnés en mode d'acquisition négatif (−) ou positif (+). **Tr:** temps de rétention (min). **m/z:** ratio masse sur charge de l'ion sélectionné.

Tableau XI : Composés identifiés par LC-ESI-MS /MS en mode négatif au niveau des extraits aqueux des racines de *Cistanche phelypaea*.

N.	Composé	Tr (min)	[M-H] ⁻ m/z	EC (V)	Fragments ioniques (m/z)	Référence
1	Acide 8-epiloganique (isomère A)	4.69 ± 0.10	375.13	30	213.07 - 169.08 - 151.07	Li <i>et al.</i> , 2016b Song <i>et al.</i> , 2016
4	Acide 8-epiloganique (isomère B)	5.88 ± 0.12	375.13	30	213.07 - 169.08 - 151.07	Li <i>et al.</i> , 2016b Song <i>et al.</i> , 2016
6	Cistanoside F (isomère A)	8.01 ± 0.17	487.15	30	179.03 - 161.02 - 135.04	Li <i>et al.</i> , 2016b
8	Cistanoside F (isomère B)	8.35 ± 0.15	487.15	30	179.03 - 161.02 - 135.04	Li <i>et al.</i> , 2016b
11	Acteoside	19.74 ± 0.10	623.20	40	461.16 - 161.02 - 135.04	Cui <i>et al.</i> , 2016 Li <i>et al.</i> , 2016a
12	Isoacteoside	20.85 ± 0.09	623.20	40	461.16 - 161.02 - 135.04	Cui <i>et al.</i> , 2016 Li <i>et al.</i> , 2016a
13	Campneoside II (isomère A)	16.97 ± 0.13	639.19	30	621.17 - 529.14 - 459.14 - 179.03 - 161.02 - 151.03	Song <i>et al.</i> , 2016 Shi <i>et al.</i> , 2013
14	Campneoside II (isomère B)	17.15 ± 0.13	639.19	30	621.17 - 529.14 - 459.14 - 179.03 - 161.02 - 151.03	Song <i>et al.</i> , 2016 Shi <i>et al.</i> , 2013
15	2'-acetylacteoside/ Tubuloside B	22.58 ± 0.10	665.21	30	503.16 - 461.16 - 161.02	Li <i>et al.</i> , 2016b Shi <i>et al.</i> , 2013
16	2'-acetylacteoside/ Tubuloside B	24.09 ± 0.12	665.21	30	503.16 - 461.16 - 161.02	Li <i>et al.</i> , 2016b Shi <i>et al.</i> , 2013
17	Echinacoside	17.41 ± 0.13	785.25	40	623.21 - 161.02	Li <i>et al.</i> , 2016b
18	Pheliposide	21.85 ± 0.10	797.25	40	635.21 - 593.20 - 161.02	Jedrejek <i>et al.</i> , 2020
19	Kankanoside H ₁ /H ₂	21.25 ± 0.08	811.27	40	769.25 - 665.22 - 647.21 - 623.21 - 605.20 - 477.16 145.03	Zhang <i>et al.</i> , 2015
20	Tubuloside A	19.93 ± 0.10	827.26	40	665.22 - 623.21 - 161.02	Li <i>et al.</i> , 2016b Song <i>et al.</i> , 2016

Tr: temps de rétention (min). [M-H]⁻: ratio masse sur charge (m/z) de l'ion précurseur. EC: énergie de collision.

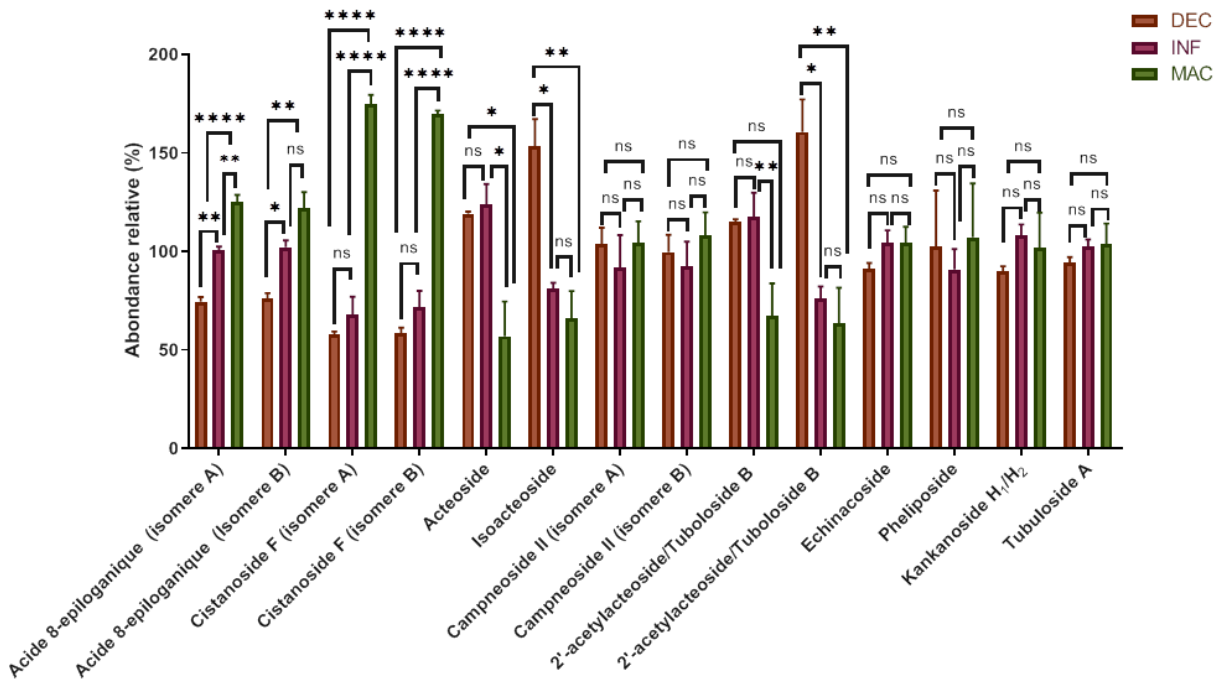


Figure 09 : Abondance relative des composés identifiés au niveau des extraits aqueux des racines de *C. phelipaea* par analyse LC-ESI-QTOF-MS en mode d'acquisition négative. DEC: décoction; INF: infusion; MAC: macération. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM (n = 3). Différentes lettres indiquent des différences significatives selon le test ANOVA suivi du test Tukey. ns : différence non significative, différence significative (*) : $p < 0,05$, différence hautement significative (**): $p < 0,01$, (***) : $p < 0,0001$.

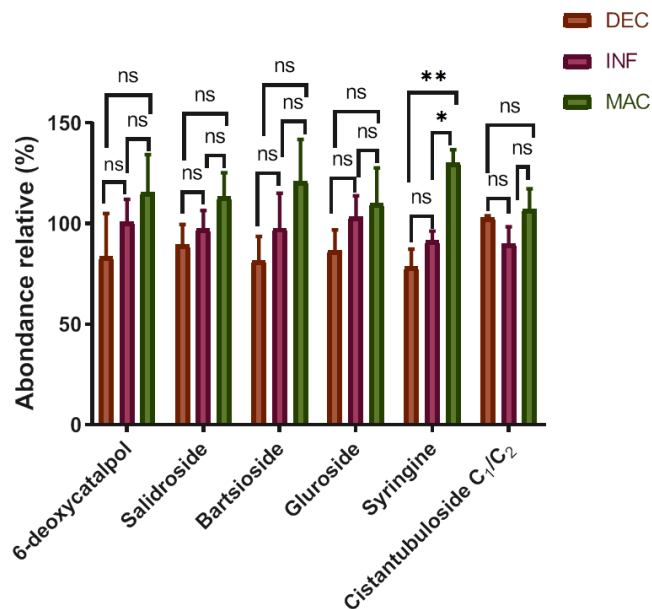


Figure 10 : Abondance relative des composés identifiés au niveau des extraits aqueux des racines de *C. phelipaea* par analyse LC-ESI-QTOF-MS en mode d'acquisition positif. DEC: décoction; INF: infusion; MAC: macération. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM (n = 3). Différentes lettres indiquent des différences significatives selon le test ANOVA suivi du test Tukey. ns : différence non significative, différence significative (*) : $p < 0,05$, différence hautement significative (**): $p < 0,01$.

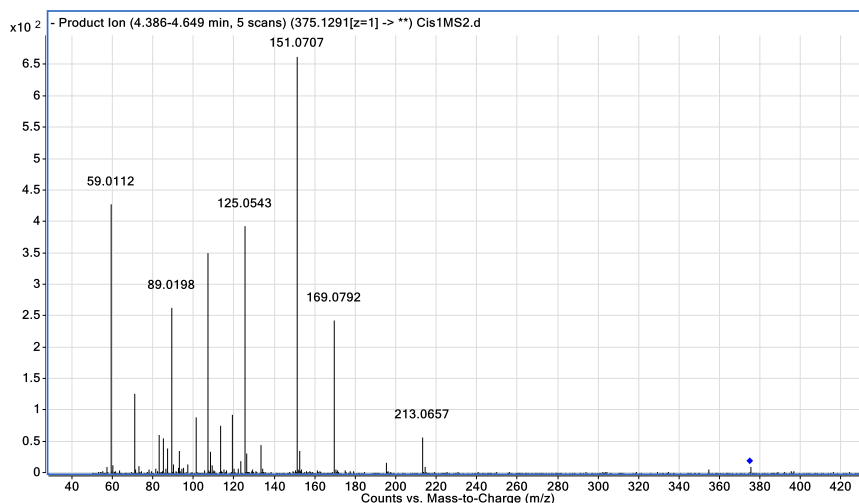


Figure 11 : Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS des molécules 01 et 04

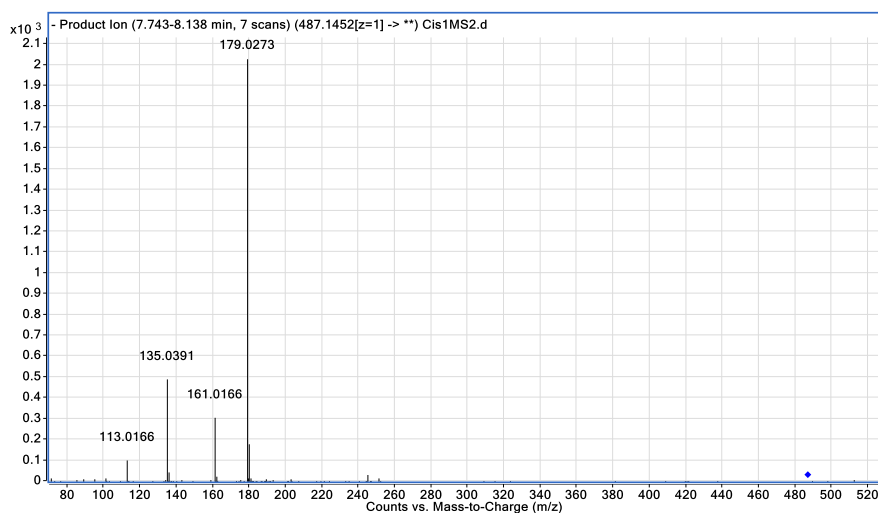


Figure 12: Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS des molécules 06 et 08

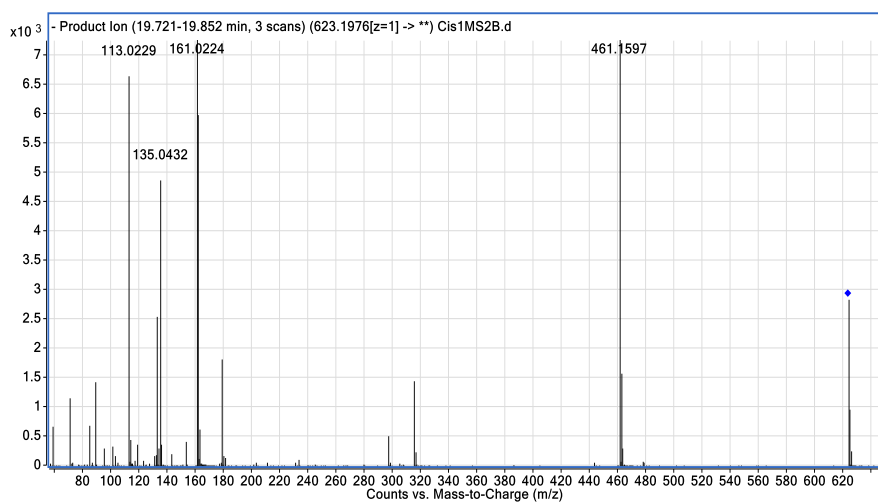


Figure 13 : Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS des molécules 11 et 12

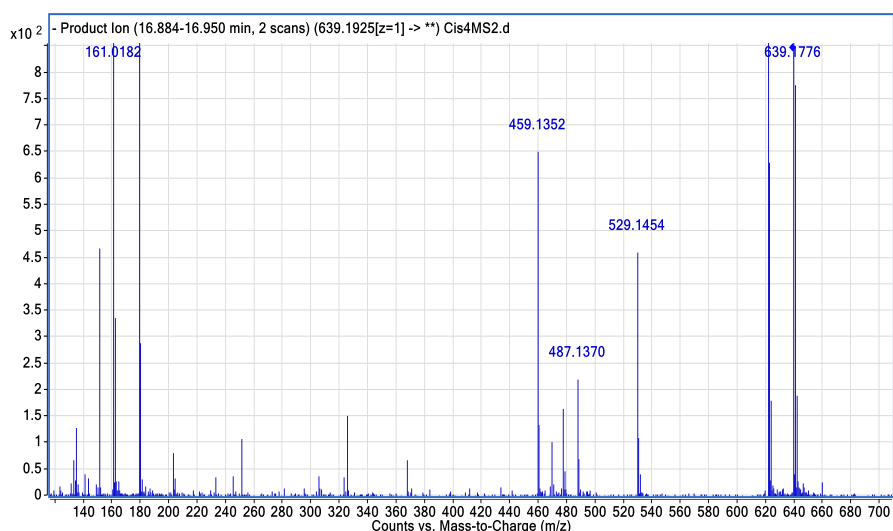


Figure 14 : Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS des molécules 13 et 14

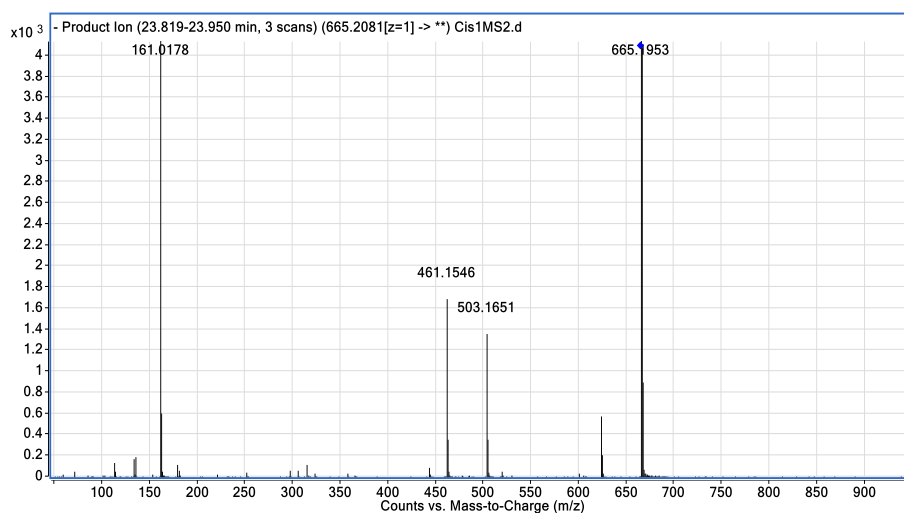


Figure 15 : Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS des molécules 15 et 16

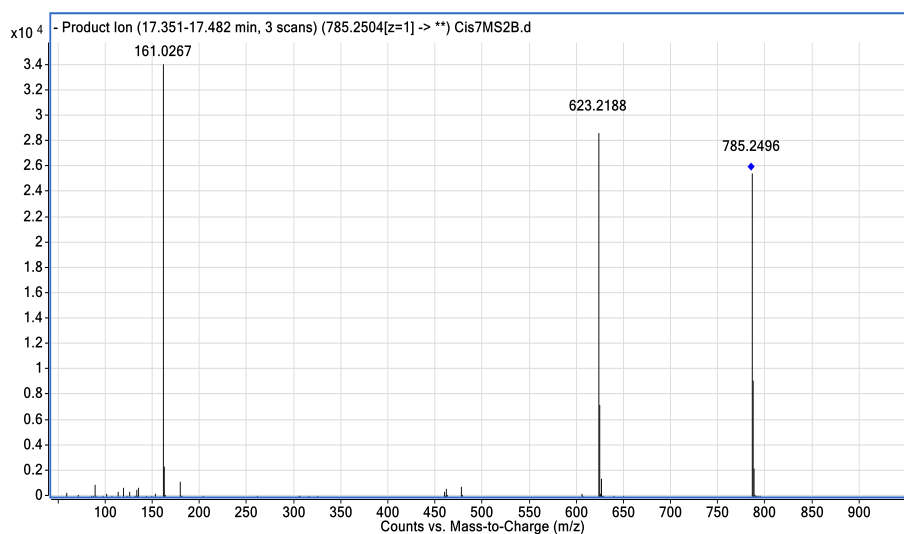


Figure 16 : Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS de la molécule 17

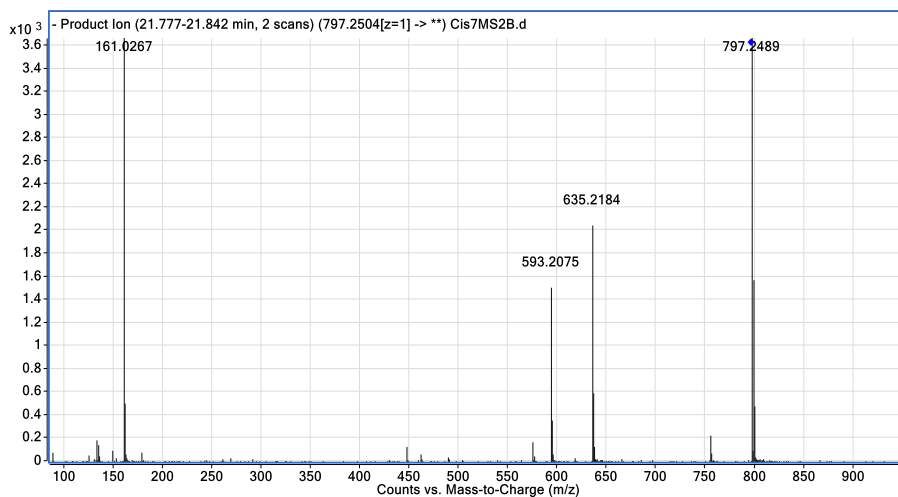


Figure 17 : Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS de la molécule 18

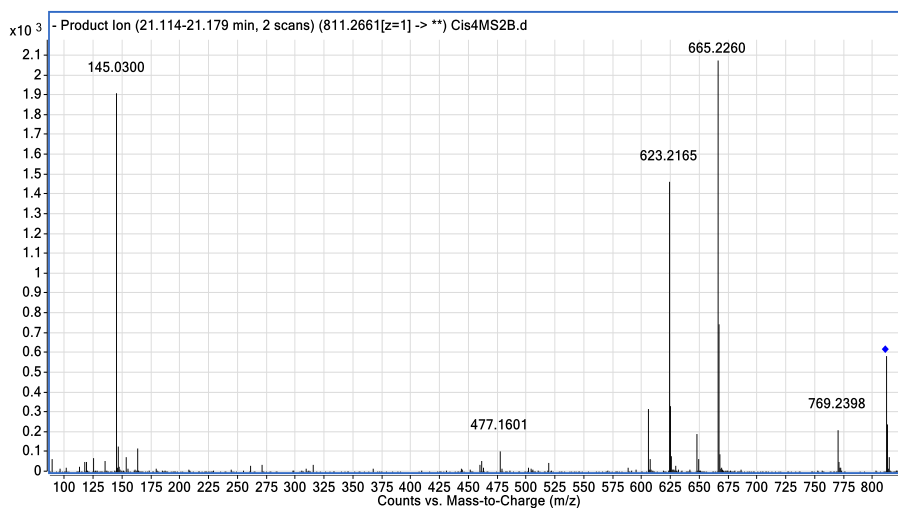


Figure 18 : Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS de la molécule 19

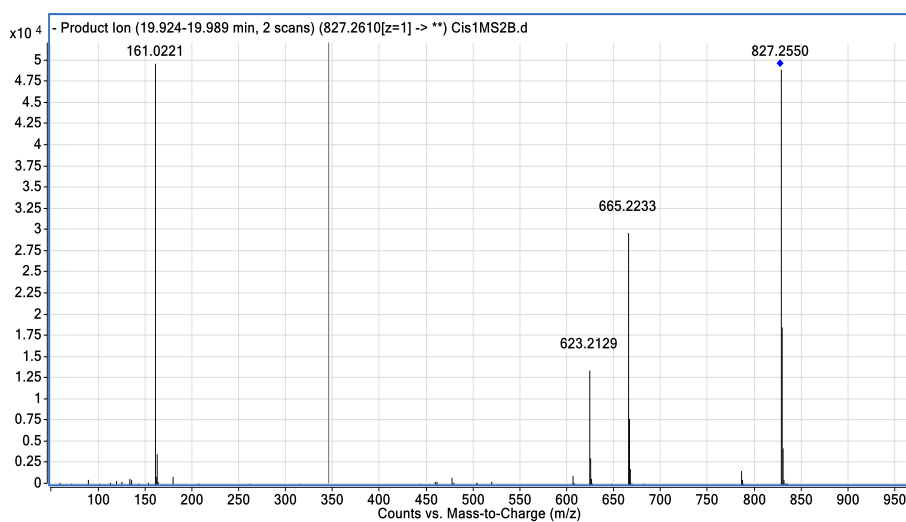


Figure 19 : Spectre de masse LC-ESI-QTOF-MS/MS de la molécule 20

3.2.6. Discussion

Au cours de notre étude nous avons utilisé comme solvant d'extraction l'eau, cette dernière est considérée comme solvant universel qui permet de dissoudre un plus grand nombre de substances par rapport aux autres solvants chimiques (Machmudah *et al.*, 2022). Elle permet d'extraire les molécules polaires appartenant à différentes classes phytochimiques comprenant les composés phénoliques, les terpènes, les saponines, les tanins, les PhGs, les sucres et les iridoïdes (Azmir *et al.*, 2013). Deux paramètres ont été variés à travers trois procédés d'extraction aqueuse DEC, INF et MAC. Ces paramètres sont la température et le temps de chauffage.

La synthèse des résultats obtenus à partir de l'étude phytochimique des extraits aqueux DEC, INF et MAC des racines de *C. philipaea* nous mènent à discuter deux aspects : qualitatif et quantitatif.

Sur le plan qualitatif, nos résultats indiquent que ces trois extraits aqueux représentent une importante source en composés phénoliques y compris les flavonoïdes et les PhGs ainsi qu'en iridoïdes et en sucres. La présence de ces composés ne semble pas varier dans ces trois processus ce qui souligne que la température et la durée de chauffage n'influence pas la composition en terme qualitatif.

D'un point de vue quantitatif, les résultats montrent globalement que la DEC permet d'obtenir une quantité plus importante de composés par rapport aux procédés INF et MAC. En effet, la DEC a permis l'obtention d'un contenu plus important en composés phénoliques totaux, en sucres totaux et en PhGs de type isoactéoside et l'un des isomères 2'-acetyllactéoside/tubuloside B. Cela explique que ces molécules phénoliques thermostables et les sucres sont plus extractibles avec l'augmentation du temps de chauffage. Cependant, d'autres composés phénoliques qui sont les flavonoïdes et les PhGs de type acteoside et l'un des isomères 2'-acetyllactéoside/tubuloside B ont été mieux extraits à la fois par la DEC et l'INF par rapport à la MAC indiquant que l'extraction de ces molécules nécessite le chauffage sans tenir compte du facteur temps.

Bien que la DEC et l'INF présentent un meilleur pouvoir extracteur de ces molécules citées, la MAC est un procédé qui a permis d'autre part l'extraction d'une quantité plus importante de l'iridoïde acide 8-epiloganique, les PhGs de type cistanoside F et son isomère

ainsi que la syringine. De même, malgré que le rendement d'extraction globale de la DEC soit significativement plus élevé que l'INF, il n'existe pas de différence significative de ce rendement entre la DEC et la MAC. De ce fait, nous pouvons déduire qu'il existe une compensation entre ces deux procédés ; alors que la première permet une meilleure extraction des composés thermostables, la MAC présente une meilleure extraction des composés thermosensibles.

3.3. Etude *in vitro* de l'activité antioxydante de *C. phelipaea*

Les antioxydants intéressent de plus en plus les scientifiques du domaine alimentaire et les professionnels de la santé en raison de leurs rôles protecteurs dans les produits alimentaires contre la détérioration oxydative et dans l'organisme contre les processus pathologiques médiés par le stress oxydatif. La recherche efficace des sources d'antioxydants naturels et la conception de nouveaux composés antioxydants nécessitent des méthodes fiables d'évaluation de l'activité antioxydante (Munteanu et Apetrei, 2021).

L'étude du pouvoir antioxydant d'un extrait végétal par un protocole fiable requiert au minimum deux tests (Jamkhande *et al.*, 2016) afin de considérer les différents mécanismes réactionnels impliqués dans le pouvoir antioxydant exercés par les constituants phytochimiques (Wong *et al.*, 2006 ; Iqbal *et al.*, 2015). Ceci est dû au fait que les composés antioxydants agissent de différentes manières contre les radicaux libres (Prior *et al.*, 2005). A cet effet, nous avons utilisé dans la présente recherche trois tests afin d'évaluer le potentiel antioxydant des décocté, infusé et macérât obtenus à partir de la racine de *C. phelipaea*.

3.3.1. Essai de piégeage du radical DPPH

L'évaluation du potentiel de piégeage des radicaux libres a été réalisée dans notre étude par le système le plus répandu qui est celui du radical DPPH. Cette méthode colorimétrique standard et facile reflète la propriété de piégeage d'une molécule antioxydante, par sa capacité à transférer à la fois l'atome d'hydrogène ou l'électron au radical azoté stable DPPH de couleur violette qui est ainsi réduit en DPPH₂ de couleur jaune, entraînant ainsi un changement d'absorbance. La mesure de la quantité de DPPH n'ayant pas réagi est corrélée à la capacité antioxydante.

Nos résultats ont montré que le test DPPH a révélé un remarquable potentiel de piégeage des différents extraits aqueux DEC, INF et MAC. En effet, des concentrations

croissantes de ces extraits allant de 3,9 à 125µg/ml induisent des augmentations de l'activité anti-radicalaire RSA qui est exprimée en pourcentages d'inhibition du radical DPPH de manière dose dépendante (figure 20). Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui ont rapporté des activités élevées de piégeage du radical DPPH de différents extraits de *Cistanches herba* (Elkamali et Hamed, 2015 ; Peng *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2017a).

L'estimation et la comparaison des activités de piégeage du radical DPPH par les trois extraits ont été effectuées par le calcul des IC50. Comme le montre le tableau XII, aucune différence significative $p > 0,05$ n'a été retrouvée entre les valeurs des IC50 des trois extraits aqueux, ce qui indique que ces derniers présentent le même potentiel de piégeage dans le système DPPH.

Les études comparatives de l'extraction par différents solvants à partir de différentes parties et de la plante entière *C. phelypaea* ont montré que le meilleur potentiel de piégeage des radicaux DPPH est exercé par les extraits aqueux (Aboul-Enein *et al.*, 2012 ; Trampetti *et al.*, 2019). De plus, les travaux réalisés par Trampetti *et al.* (2019) concernant l'activité de piégeage de différents radicaux par les tiges, les racines et les fleurs de *C. phelypaea* ont révélé que les extraits aqueux des racines présentaient le meilleur potentiel de piégeage du DPPH avec une valeur IC50 de 0,37 mg/ml. Cette dernière est supérieure aux valeurs IC50 retrouvées dans notre étude pour les trois extraits aqueux, indiquant un potentiel de piégeage plus faible.

Différents travaux ont rapporté que certains composés identifiés au cours de notre étude, en particulier les PhGs, exercent des potentiels de piégeage du radical DPPH allant d'une capacité modérée à puissante. Ces composés ont été isolés à partir du genre *Cistanche* et d'autres plantes. Certains d'entre eux ont montré des valeurs IC50 égales ou inférieures à celles obtenues par des standards comme l' α -tocophérol et le BHT (Xiong *et al.*, 1996; Si *et al.*, 2013).

Cependant, la force du potentiel de piégeage de ces composés varie selon les études. Par exemple, Xiong *et al.* (1996) ont isolé 9 PhGs à partir de *C. deserticola*, parmi lesquels le tubuloside B qui s'est avéré le plus puissant piégeur du DPPH. Par ailleurs, le 2'-acétyllactéoside a été signalé comme présentant le meilleur potentiel de piégeage parmi 6 autres PhG isolés à partir de *C. salsa* (Yang *et al.*, 2009). Dans ces études, le potentiel de

piégeage des molécules a été lié à la présence de groupements catéchols, le nombre et la position des groupements hydroxyles, la présence du groupement 2-acétyle au milieu du glucopyranose et l'encombrement stérique. **Jedrejek et al. (2020)** ont également rapporté que les PhGs possédant la fraction caféoylole dans leur structure ont montré des activités de piégeage plus fortes que ceux contenant des fractions féruloyl et p-coumaroyl.

Il a également été rapporté que les iridoïdes exercent un potentiel de piégeage du DPPH qui augmente avec la présence des substitutions dihydroxybenzoylole et caféoylole au niveau de leur structure (**Jensen et al., 2010**).

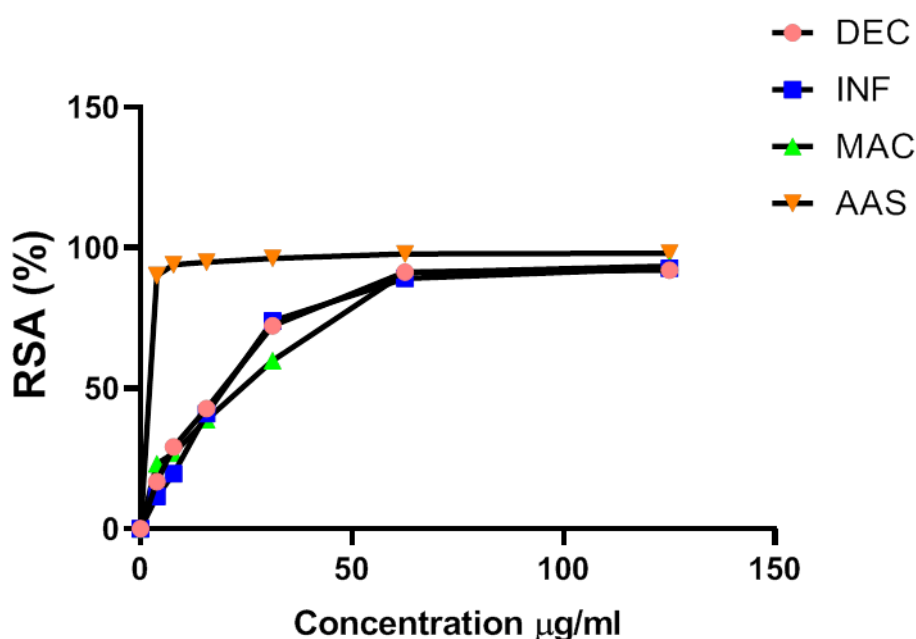


Figure 20 : Activité anti-radicalaire RSA exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de différentes concentrations des extraits aqueux des racines de *C. phelipaea*. DEC: décoction; INF: infusion; MAC: macération, AAS : acide ascorbique.

3.3.2. Essai du pouvoir antioxydant réducteur ferrique

Le test FRAP a été réalisé afin d'évaluer la capacité des différents extraits aqueux à réduire l'ion ferrique (Fe^{+3}) en ferreux (Fe^{+2}). De la même manière que dans le système DPPH, l'activité réductrice augmente de manière dose dépendante indiquant ainsi un bon pouvoir réducteur des analytes. Comme nous pouvons le voir à partir des valeurs EC50 affichées dans le tableau XII, aucune différence significative $p > 0,05$ n'a été observée entre les

valeurs EC50 de DEC et INF, indiquant ainsi des potentiels de réduction similaires pour ces deux extraits.

Cependant, l'extrait MAC montre un pouvoir réducteur significativement plus faible par rapport aux deux extraits précédents ($p < 0,05$), suggérant de ce fait que certaines molécules antioxydantes pourraient être mieux extraites à l'eau chaude. Le pouvoir réducteur des extraits végétaux est lié à l'oxydabilité des composés chimiques capables de transférer des électrons et il a été rapporté que la capacité de réduction la plus efficace est obtenue par des composés extraits par l'eau à partir de différentes plantes (Wong *et al.*, 2006 ; Akhtar *et al.*, 2018).

Des études antérieures ont révélé un bon pouvoir réducteur du fer ferrique de différents extraits de *Cistanches herba* (Xiong *et al.*, 2013 ; Peng *et al.*, 2016 ; Piwowarczyk *et al.*, 2020). Néanmoins, les données de ces études ne peuvent être comparées aux nôtres, car les valeurs sont exprimées différemment. Pour l'instant, au meilleur de notre connaissance, il n'existe pas d'études qui ont été menées sur le pouvoir réducteur du fer ferrique de l'espèce *C. phelipaea*.

3.3.2.1. Etude de la corrélation entre le pouvoir antioxydant réducteur ferrique et le contenu en composés phénoliques, flavonoïdes et sucres totaux

La différence significative retrouvée dans le pouvoir FRAP des extraits aqueux DEC, INF et MAC des racines de *C. phelipaea* nous a mené à étudier la corrélation entre ce pouvoir et le CPT/TFT/sucres totaux. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 21, 22 et 23.

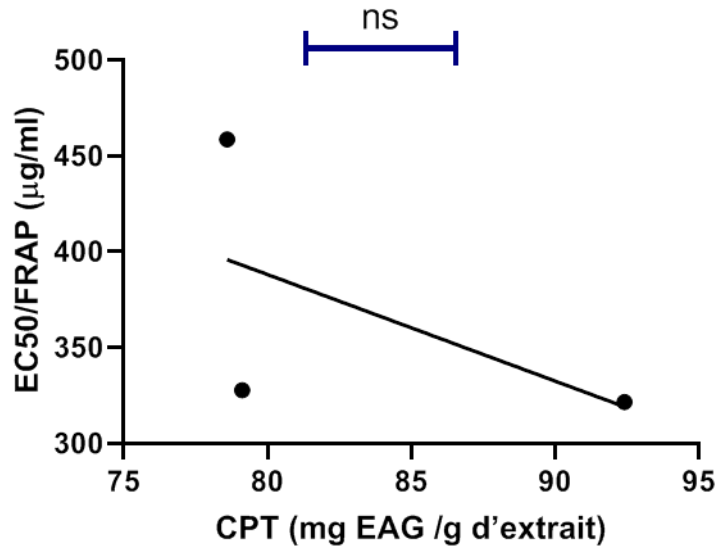


Figure 21 : Analyse de la corrélation entre le pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP et le contenu en composés phénoliques totaux CPT. ns : différence non significative.

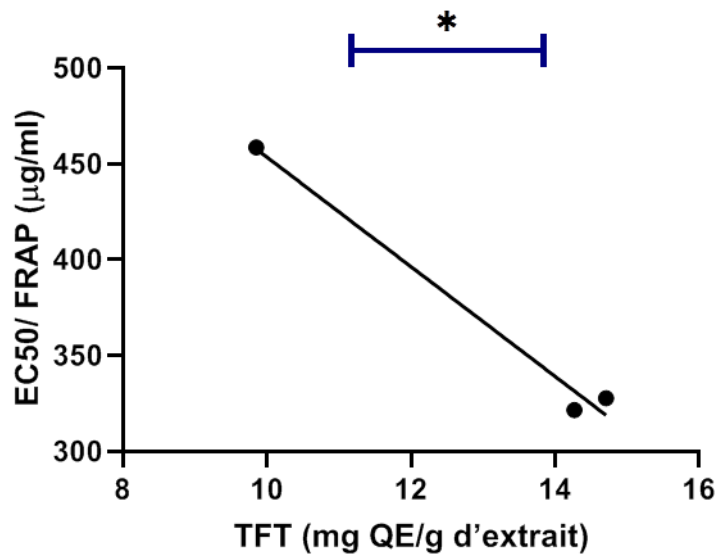


Figure 22 : Analyse de la corrélation entre le pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP et la teneur en flavonoïdes totaux TFT. (*) : différence significative ($p < 0,05$).

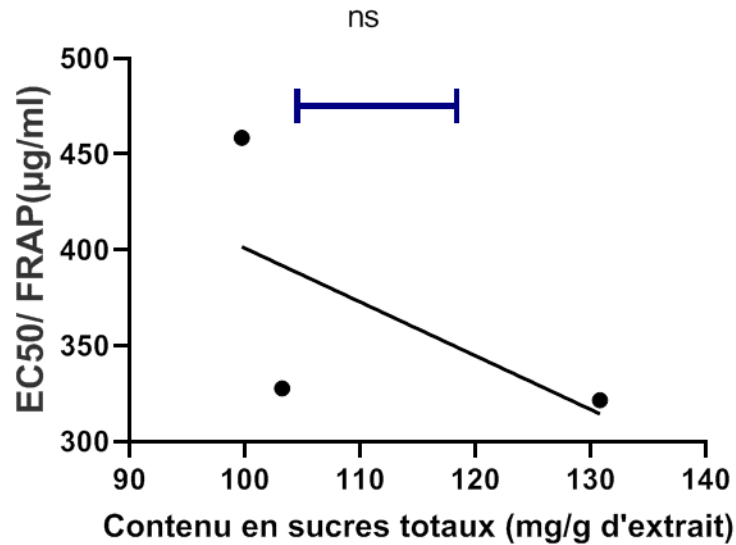


Figure 23 : Analyse de la corrélation entre le pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP et le contenu en sucres totaux. (ns) : différence non significative ($p>0,05$).

Ces résultats ne montrent aucune corrélation significative entre le pouvoir antioxydant FRAP et le CPT des trois extraits aqueux ($p>0,05$, $r = - 0,56$). De même, aucune corrélation n'a été retrouvée entre le pouvoir antioxydant FRAP et la concentration en sucres totaux ($p>0,05$, $r = - 0,61$). Par contre une corrélation significative a été retrouvée entre le pouvoir antioxydant FRAP et la TFT des trois extraits aqueux ($p<0,05$, $r = - 0,99$). Cette corrélation négative entre l'EC50 et la TFT montre que la concentration effective 50 évolue inversement au taux de flavonoïdes contenus dans les trois extraits aqueux. De ce fait, il semblerait que le pouvoir réducteur ferrique de ces extraits n'est pas lié au contenu en composés phénoliques totaux. Cependant, ce pouvoir réducteur serait fortement dépendant du taux de flavonoïdes au niveau des extraits aqueux.

3.3.3. Détermination de l'activité antioxydante totale

Ce test évalué par la méthode au phosphomolybdène qui est basée sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) par l'extrait à pH acide. Tous les extraits testés ont montré une grande capacité antioxydante sans différence significative de leurs valeurs ($p>0,05$) (tableau XII). Au meilleur de notre connaissance, aucune valeur de l'AAT n'a été rapportée auparavant pour le genre *Cistanche*.

Notre étude montre des résultats similaires obtenus par les tests AAT et DPPH. Cependant, bien que les tests FRAP et AAT sont tous les deux basés sur les propriétés de réduction des composés, différents pouvoir antioxydants ont été obtenus par ces deux tests, indiquant que les différentes conditions de réaction et les différents ions métalliques réductibles, impliquent différentes molécules antioxydantes contenues dans ces extraits.

Tableau XII : Activités antioxydantes des différents extraits aqueux des racines de *C. phelipaea*

Extrait	Activité de piégeage du radical DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	Pouvoir antioxydant réducteur ferrique EC ₅₀ (µg/ml)	Activité antioxydante totale mg EsAAS /g extrait
DEC	19,545 ± 0,993 ^a	321,6± 6,87 ^a	319,93 ± 3,26 ^a
INF	19,061 ± 0,211 ^a	327,8± 16,01 ^a	326,92 ± 10,64 ^a
MAC	22,748 ± 1,498 ^a	458,6± 20,56 ^b	324,21 ± 5,78 ^a
AAS	02,20 ± 0,068 ^b	100± 01,05 ^c	–

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois expériences séparés, utilisant chacune 03 échantillons (n=9). Les différentes lettres en exposant dans la même colonne indiquent des différences significatives ($p < 0.05$). DPPH, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil ; IC₅₀, concentration d'inhibition de 50% ; EC₅₀, concentration effective correspondant à une absorbance de 0.5; mg d'équivalents en acide ascorbique /g d'extrait, EsAAS, équivalents en acide ascorbique.

3.3.4. Discussion

Plusieurs données émanant des études de la composition phytochimique et du potentiel antioxydant d'extraits aqueux préparés par les procédés d'infusion et de décoction à partir de différentes plantes, indiquent que pour une même plante le meilleur pouvoir antioxydant ne dépend pas obligatoirement de l'un de ces deux procédés mais plutôt du test effectué (**Dias *et al.*, 2013 ; Martins *et al.*, 2015 ; Silva *et al.*, 2019 ; Zengin *et al.*, 2019**). Cependant la décoction présente souvent un meilleur pouvoir antioxydant (**Martins *et al.*, 2014 ; Asghari *et al.*, 2019 ; Baessa *et al.*, 2019**).

Au cours de notre étude du potentiel antioxydant, trois systèmes *in vitro* impliquant à la fois différents mécanismes antioxydants et différentes molécules antioxydantes ont été utilisés. Les résultats obtenus par ces essais ont montré globalement un bon potentiel antioxydant des trois extraits étudiés. De manière générale, ce potentiel est étroitement lié à la

composition phytochimique des extraits végétaux en particulier les composés phénoliques y compris les flavonoïdes, les coumarines et les tanins (**Pietta, 2000 ; Wu et al., 2007 ; Martins et al., 2016 ; Benzidia et al., 2019**). En effet, il est bien admis que les composés phénoliques représentent l'un des constituants les plus actifs contribuant aux activités antioxydantes des plantes (**Kim et al., 2013**). Ceci est attribué à la présence de un ou plusieurs groupements OH acides attachés au cycle aromatique phényl (arène) au niveau de leurs structures, ce qui leur confère une haute réactivité en tant que donneurs d'hydrogène ou d'électron. De même, ils peuvent agir comme chélateurs des ions métalliques (**Stefanovic et al., 2015**). Un bon pouvoir antioxydant a été également rapporté à la famille des flavonoïdes appartenant aux composés phénoliques, qui agissent par le piégeage de différentes espèces oxydantes (**Subedi et al., 2014**).

Dans l'ensemble, plusieurs auteurs ont rapporté que les composés phénoliques ne sont pas associés de façon permanente au potentiel antioxydant d'un échantillon et que d'autres composés sont également de bons antioxydants (**Li et al., 2013a ; Wong-paz et al., 2015 ; Wang et al., 2017a**). Parmi ces composés les polysaccharides et les triterpènes sont bien connus pour leur bon pouvoir antioxydant (**Zhang et al., 2016 ; Zheng et al., 2020**).

En se basant sur nos résultats obtenus à partir des dosages phytochimiques et ceux du criblage phytochimique, ces molécules à pouvoir antioxydant sont susceptibles d'être extraites par l'eau et seraient responsables du pouvoir antioxydant des extraits DEC, INF et MAC.

Le pouvoir antioxydant du genre *Cistanche* est fortement lié à la famille des composés phénoliques principalement dominée par les PhGs (**Wang et al., 2017a**) et plus particulièrement les composés acteoside (**Wat et al., 2016**) et echinacoside (**Chen et al., 2018a**). **Wang et al. (2017a)** ont montré une corrélation positive entre la teneur totale en PhGs et l'activité antioxydante de *C. deserticola*. Cependant, certains échantillons présentant de hautes teneurs en PhGs, comme les extraits de l'inflorescence, de l'axe et de la corolle, n'ont pas montré un haut pouvoir antioxydant. Les oligosaccharides et les polysaccharides ont également été rapportés pour leur puissant pouvoir antioxydant dans ce genre (**Wang et al., 2017a ; Zhang et al., 2019**).

De manière générale, nos résultats suggèrent que les différences quantitatives dans l'abondance de certains PhGs et iridoïdes déterminées par LC-ESI-QTOF-MS (figures 09 et 10) ainsi que dans les teneurs totales en composés phénoliques, flavonoïdes et en sucres totaux (tableau IX) au niveau des trois extraits DEC, INF et MAC n'ont pas influencé leur potentiel antioxydant, sauf pour le test FRAP. Dans ce dernier, une forte corrélation a été retrouvée entre le pouvoir réducteur ferrique et la teneur en flavonoïdes dans les extraits.

Trois facteurs peuvent influencer le contenu en composés phénoliques et les activités antioxydantes ; il s'agit de la matrice végétale, le solvant utilisé et les conditions d'extraction (Robards, 2003 ; Dahham *et al.*, 2018). Seules ces dernières ont été modifiées en termes de température et temps de chauffage dans les trois procédés d'extraction qui ont été appliqués dans notre étude et représentent ainsi le facteur variable qui conditionne les résultats obtenus.

Malgré les différences quantitatives mises en évidence par l'analyse LC-ESI-QTOF-MS pour certains composés (acide 8-épiloganique et son isomère, isoacteoside, et 2'-acétylactéoside ou isomère tubuloside B, figure 09) et dans le CPT et les sucres totaux (tableau IX), des comportements similaires ont été observés pour les méthodes d'extraction à chaud (DEC et INF) à travers tous les systèmes antioxydants testés suggérant ainsi que le temps de chauffage n'a eu aucun effet sur la capacité antioxydante.

Cependant, lorsque nous considérons le paramètre température pour l'extraction aqueuse, nous avons pu constater que le procédé MAC présente une moindre capacité à extraire certaines molécules (actéoside, isoacteoside, 2'-acétylactéoside/tubuloside B et TFT, tableau IX et figure 09) que les procédés à chaud. De même, la MAC a également montré une capacité de réduction ferrique plus faible, un résultat probablement indiquant que l'activité antioxydante plus élevée des extraits obtenus avec de l'eau chaude peut être principalement attribuée aux composés thermostables nécessitant de la chaleur afin d'être extraits y compris les flavonoïdes. Néanmoins, la MAC a montré le même potentiel que les procédures à chaud dans l'essai de piégeage du radical DPPH et le test AAT.

Ces résultats reflètent très probablement que les composés antioxydants de l'extrait agissent de manière complémentaire et synergique. En fait, bien que le procédé de MAC ne soit pas aussi efficace que les méthodes à chaud dans l'extraction des composés précédemment mentionnés, il semblerait par contre que d'autres composés (acide 8-épiloganique et son isomère, cistanoside F et son isomère et la syringine) sont plus

extractibles par cette méthode. Ces composés ont été tous décrits comme de bons piègeurs du radical DPPH (**Pan et Hori, 1996 ; Us *et al.*, 2015**).

Il est possible aussi que d'autres composés bioactifs contenus dans ces extraits aqueux bruts et qui n'ont pas été identifiés dans notre analyse aient été extraits de manière différentielle au cours des trois procédures testées. Ces composés pourraient par ailleurs contribuer à la capacité antioxydante.

Le synergisme entre les différents composés phénoliques dans la mixture rend l'activité antioxydante non seulement dépendante de la concentration mais aussi de la structure et les interactions entre ces composés (**Rice-Evans *et al.*, 1997**). L'isolement et la purification ultérieurs des composés antioxydants ne sont pas forcément nécessaires car les bénéfices thérapeutiques et nutritionnels des extraits seraient très probablement associés à des effets additifs et synergiques des composés phytochimiques contenus dans ces derniers. Dans ces conditions, les extraits peuvent être directement utilisés dans la consommation à domicile et peuvent également être utilisés comme composants d'aliments fonctionnels ou de médicaments traditionnels dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

3.4. Etudes *in vivo* de la toxicité aiguë et de l'activité anti-inflammatoire

3.4.1. Evaluation de la toxicité aiguë

3.4.1.1. Suivi de la mortalité et du comportement

Après le traitement des souris par les extraits aqueux DEC, INF et MAC aux doses de 2 et 5g/kg de PC, aucun décès n'a été enregistré durant les 14 jours d'observation physique ce qui indique que la DL50 est supérieure à 5g/kg de PC. Le comportement général de même que l'apparence physique (fourrure, yeux et peau) n'ont montré aucune modification chez les animaux traités par les extraits aqueux en comparaison avec ceux représentant les témoins. Par ailleurs, aucun signe clinique qui témoignerait d'une toxicité tel que vomissements, tremblements, convulsion, diarrhée, constipation, hémorragies et coma n'a été noté. Nous notons d'autre part, que nos observations ne montrent aucune sensibilité entre les deux sexes. En effet, les études des tests conventionnels de détermination de la DL50 montrent qu'il y a généralement peu de différence de sensibilité entre les sexes. Dans le cas d'observation de différences, les femelles sont généralement peu sensibles (**Gomes *et al.*, 2013**).

3.4.1.2. Etude des variations pondérales

Les résultats obtenus dans la mesure du poids moyen des animaux (Annexe 5, tableau 1 et 2) durant les 14 jours de l'étude de la toxicité aiguë n'ont montré aucune différence significative ($p > 0.05$) entre le poids corporel moyen des souris contrôles et celles traitées par les extraits DEC, INF et MAC aux doses de 2 et 5g/kg de PC. Ces résultats observés à la fois chez les animaux mâles et femelles (figures 24 et 25) montrent qu'il n'existe aucun effet de l'administration orale des extraits aqueux sur le poids corporel.

Une différence significative ($p < 0.05$) dans l'évolution pondérale en fonction du temps de traitement a été retrouvée à la fois chez le lot témoin et les lots traités par les extraits aqueux chez les deux sexes (figures 24 et 25). Cependant, la comparaison de cette évolution pondérale entre les différents lots n'a montré aucune différence significative ($p > 0.05$). De ce fait, nous ne pouvons établir aucun lien entre l'administration orale des extraits aqueux de *C. philipaea* et la variation du poids corporel durant les 14 jours de traitement.

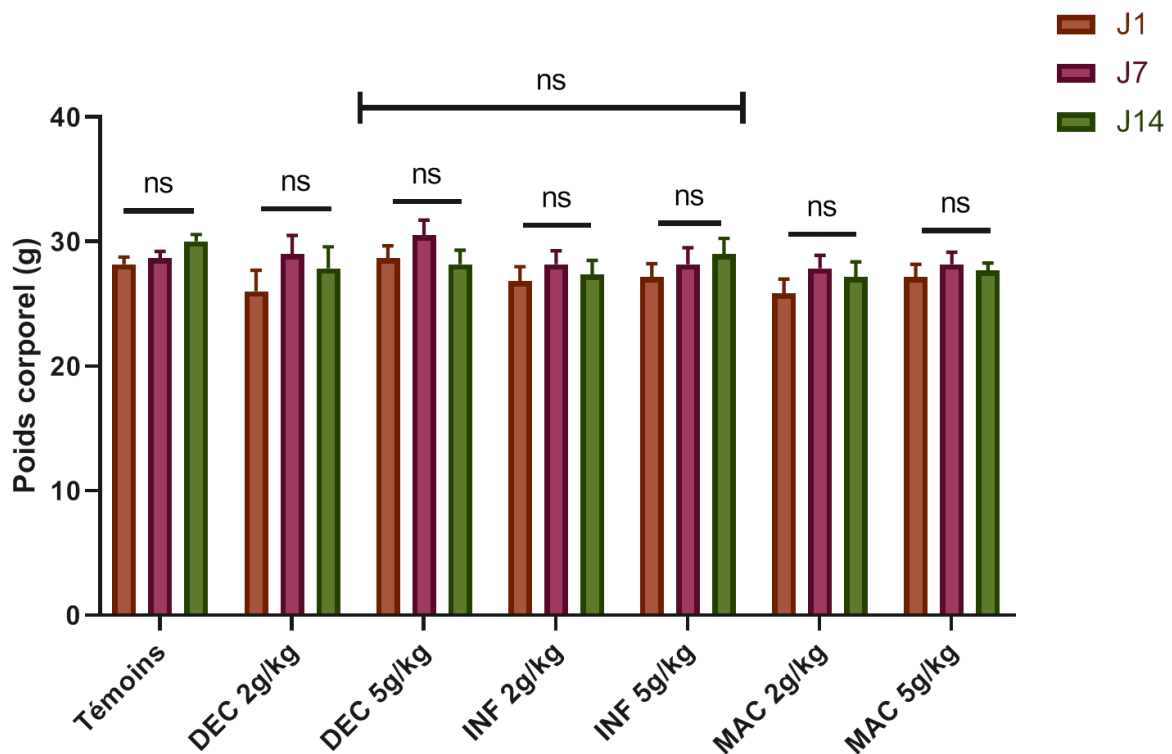


Figure 24 : Evolution du poids corporel des souris mâles témoins et traitées par les extraits DEC, INF et MAC aux doses de 2 et 5g/kg de PC durant 14 jours de traitement. ns : différence non significative, ($p > 0.05$). J : jours.

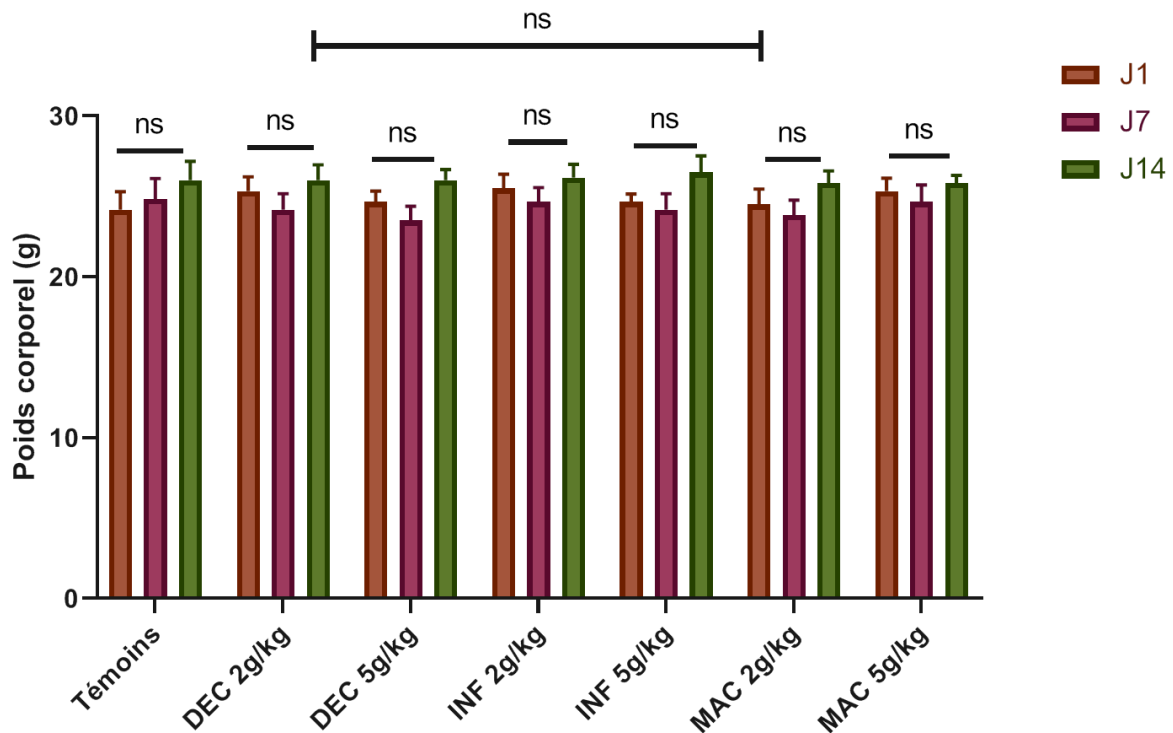
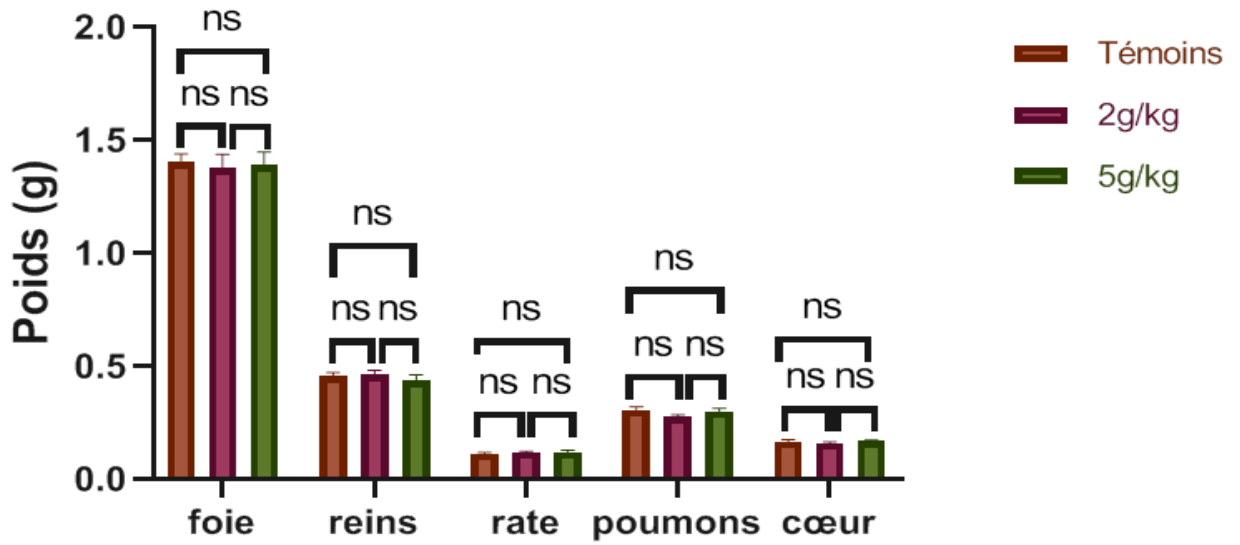


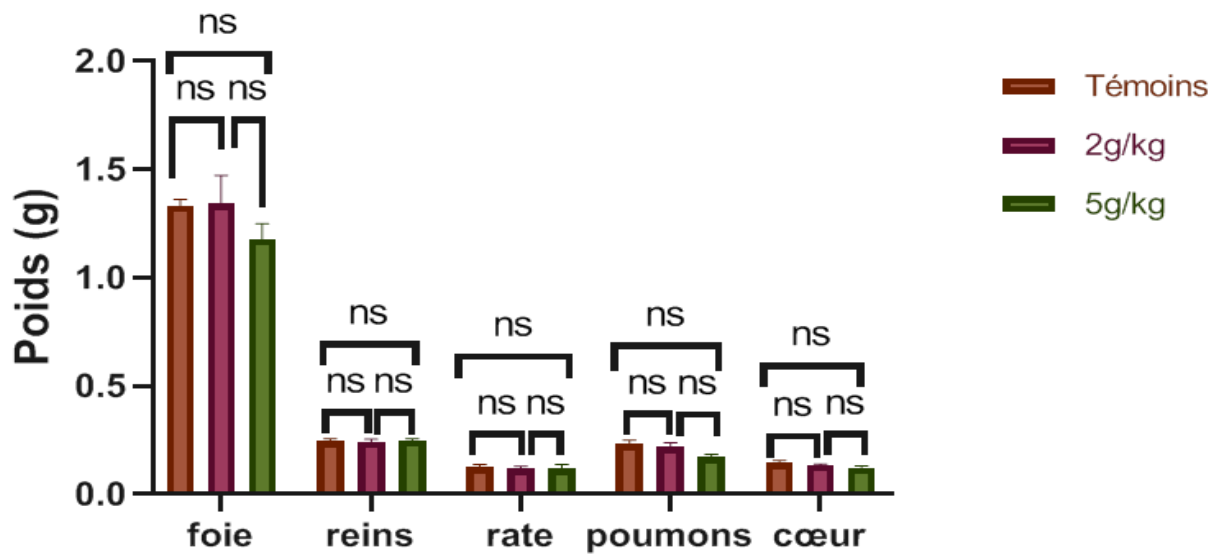
Figure 25 : Evolution du poids corporel des souris femelles témoins et traitées par les extraits DEC, INF et MAC aux doses de 2 et 5g/kg de PC durant 14 jours de traitement. ns : différence non significative, ($p > 0.05$). J : jours.

Les poids moyens des organes (foie, reins, rate, poumons et cœur) prélevés au 14^{ème} jour de traitements à partir des souris témoins et celles traitées par les doses de 2 et 5g/kg de PC des extraits DEC, INF et MAC sont rapportés en Annexe 5, tableau 3 et 4. Il est à noter que les organes des souris traitées par ces extraits aqueux n'ont présenté aucune modification significative notable dans leur aspect et couleur en comparaison avec ceux des souris témoins (figures 26, 27 et 28).

La mesure pondérale des différents organes n'a montré aucune différence significative ($p > 0,05$) entre ceux prélevés à partir des témoins et ceux des lots traités par les extraits DEC, INF et MAC aux doses de 2 et 5g/kg de PC. Les mêmes résultats ont été retrouvés chez les mâles et les femelles suggérant ainsi qu'il n'existe pas de sensibilité entre les deux sexes (figures 26, 27 et 28).

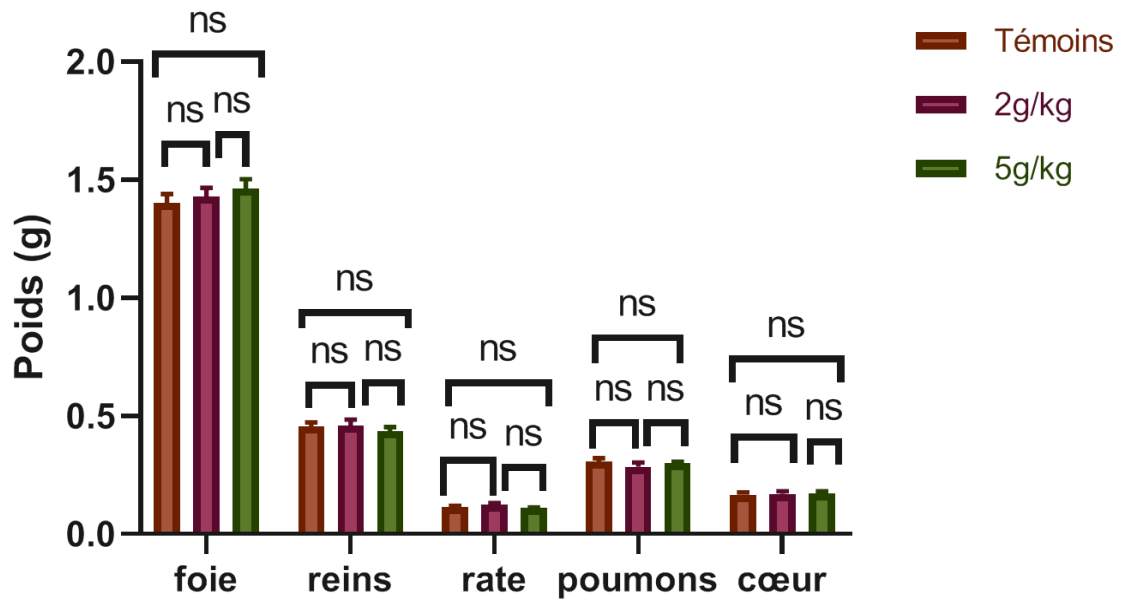


(a)

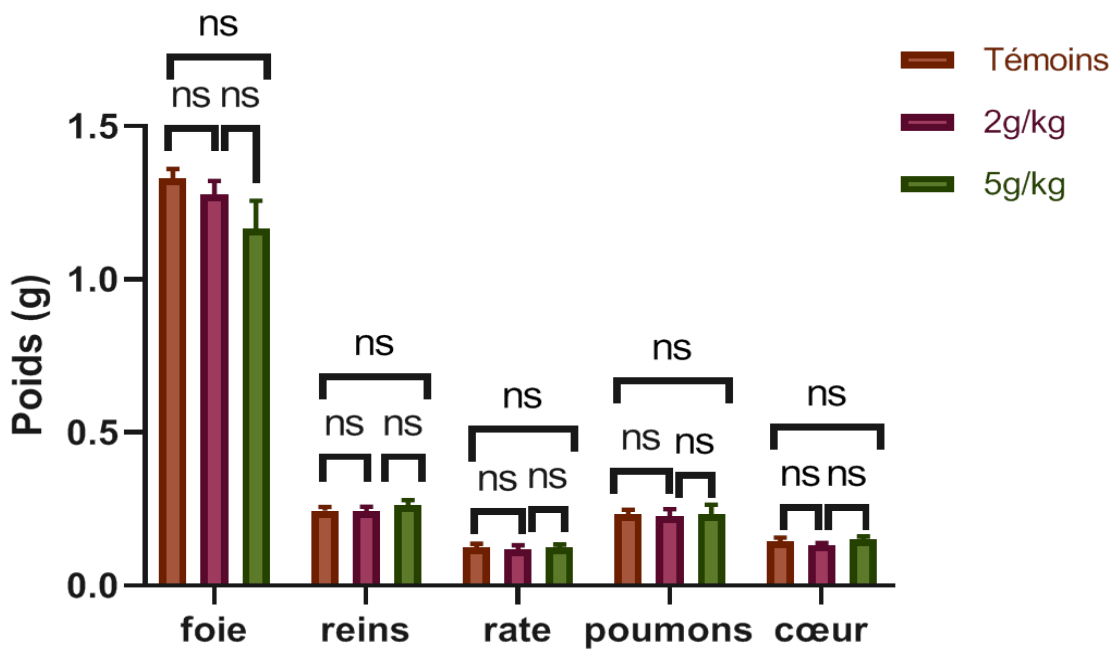


(b)

Figure 26 : Effet de l'administration orale de la DEC des racines de *C. philipaea* (2 et 5g/kg de PC) sur le poids moyen des organes (g) des souris mâles (a) et femelles (b). ns : différence non significative, ($p > 0.05$).

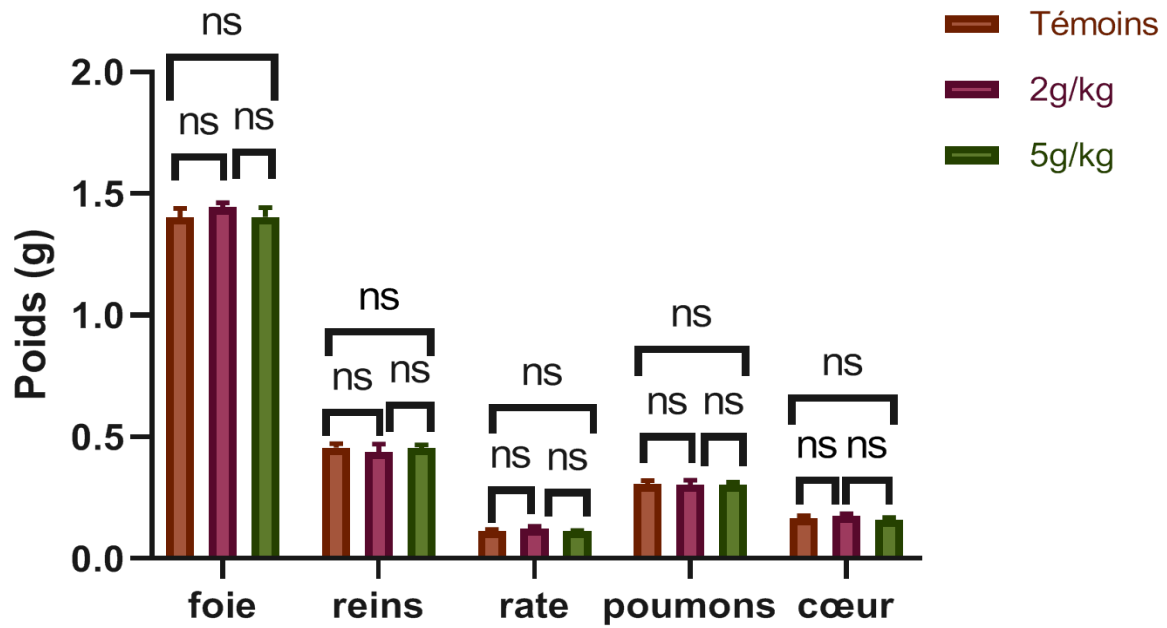


(a)

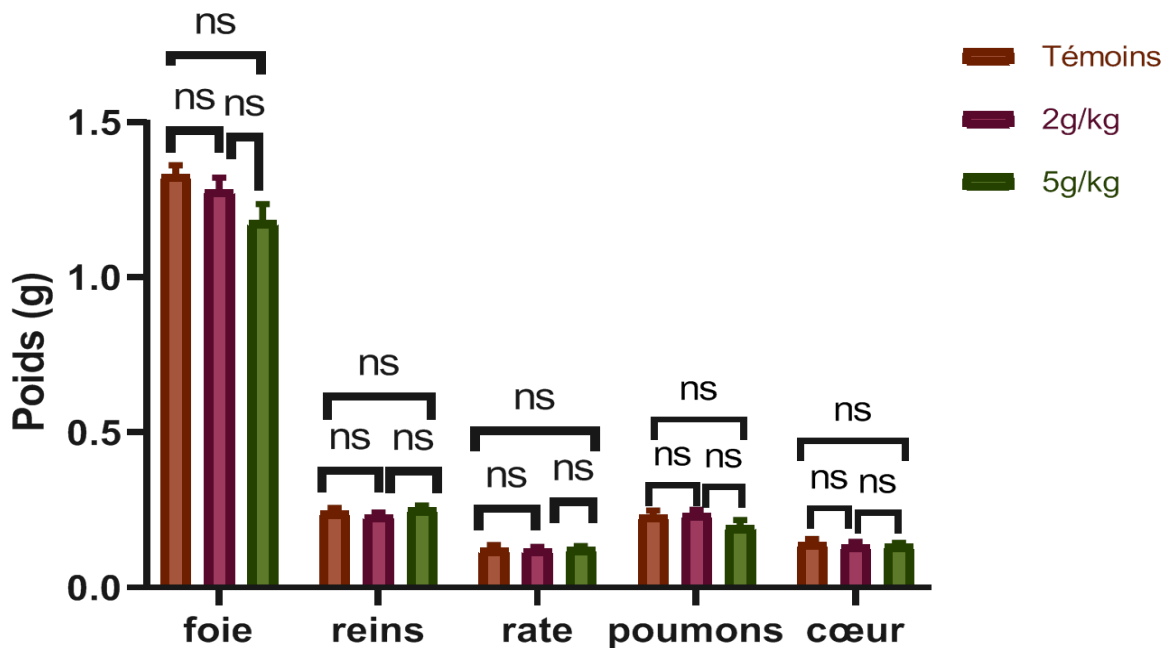


(b)

Figure 27: Effet de l'administration orale de l'INF des racines de *C. phelipaea* (2 et 5g/kg de PC) sur le poids moyen des organes (g) des souris mâles (a) et femelles (b). ns : différence non significative, ($p > 0.05$).



(a)



(b)

Figure 28 : Effet de l'administration orale de la MAC des racines de *C. philipaea* (2 et 5g/kg de PC) sur le poids moyen des organes (g) des souris mâles (a) et femelles (b). ns : différence non significative, ($p > 0.05$).

3.4.2. Etude de l'activité anti-inflammatoire

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux DEC, INF et MAC de la racine de *C. phelypaea* a été menée par la méthode de la carragénine, cette dernière va induire un œdème au niveau de la patte arrière droite des souris. Le diamètre de la patte a été mesuré durant les 05 premières heures de l'injection et le pourcentage d'augmentation de l'œdème a été calculé à la fois chez les souris témoins et celles prétraitées par les extraits aqueux. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 29.

L'injection de la carragénine provoque une augmentation dans le diamètre de la patte arrière des souris des 04 lots avec le même profil cinétique. Cette augmentation correspond à un œdème formé suite à une réaction inflammatoire aiguë. Elle est progressive au cours du temps et atteint son maximum à la troisième heure de l'injection.

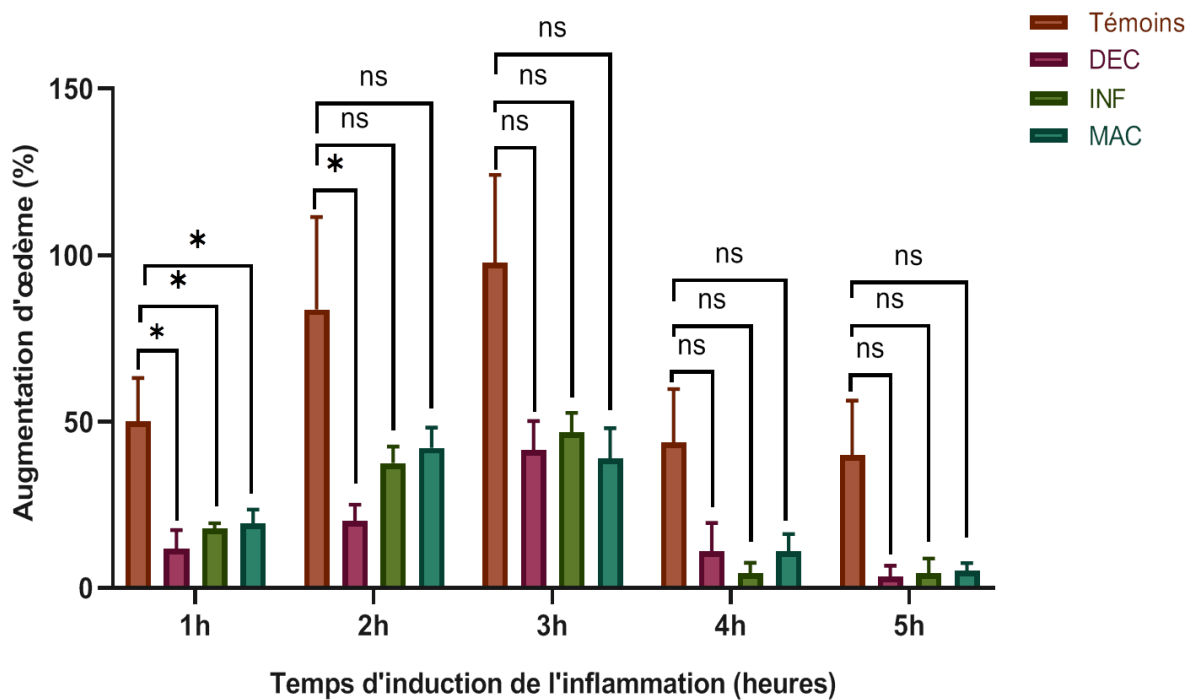


Figure 29 : Cinétique d'augmentation de l'œdème induit par la carragénine. ns : différence non significative, ($p > 0.05$).
 (*) : différence significative, ($p < 0,05$).

Au cours des cinq heures de traitement, le pourcentage d'augmentation de l'œdème calculé chez le lot témoin est supérieur à ceux retrouvés chez les lots traités par le décocté, l'infusé et le macérât (figure 29). Cette élévation dans le pourcentage d'augmentation de l'œdème chez le témoin par rapport aux autres lots est significative ($p < 0.05$) durant la première heure. Par contre, durant cette heure, il existe aucune différence significative ($p > 0,05$) dans le pourcentage d'augmentation entre les lots traités par les extraits aqueux. Durant la deuxième heure, l'élévation dans le pourcentage d'augmentation de l'œdème chez le témoin reste significative ($p < 0.05$) que par rapport au lot traité par le décocté.

À partir de la troisième heure (4h et 5h), une diminution dans le pourcentage d'augmentation de l'œdème est retrouvée chez les 04 lots et aucune différence significative n'est statistiquement retrouvée entre les 04 lots ce qui reflète ainsi l'atténuation du processus inflammatoire. Ces résultats suggèrent ainsi un pouvoir anti-inflammatoire exercé par les trois extraits aqueux des racines de *C. phelipaea* qui est très prononcé durant la première heure. Ce pouvoir demeure plus important pour le décocté durant la deuxième heure.

3.4.3. Discussion

L'étude de la toxicité aiguë par voie orale des différents extraits aqueux DEC, INF et MAC de la racine de *C. phelipaea* a été entreprise à travers un modèle murin dans le but d'évaluer leur innocuité chez ce modèle animal servant à étudier l'éventuel potentiel anti-inflammatoire de ces extraits. Les résultats obtenus ont révélé que l'administration orale des doses de 2 et 5g/kg de PC des trois extraits précédents n'a produit aucun cas de décès ou effet toxique notable chez tous les groupes de souris.

Selon le système de classification générale harmonisé SGH du protocole de l'OECD qui a été suivi par la présente étude, les extraits aqueux des racines de *C. phelipaea* sont classés dans la catégorie 5 correspondant à une DL50 supérieure ou égale à 5g/kg de PC. Selon l'OECD, ces extraits sont classés comme non toxiques car la dose limite pour la toxicité aiguë est considérée comme étant 5g/kg de PC (Delonges *et al.*, 1983 ; Assam *et al.*, 2010). Si aucune mortalité n'est observée à cette dose, une posologie plus élevée n'est pas nécessaire (Wallace, 1989). Ainsi la marge de sécurité de nos extraits est très large aussi bien pour le choix des doses d'études chez l'animal que pour la consommation humaine.

Le changement du PC et des poids des organes des animaux suite aux traitements par des xénobiotiques, représente un indice interne simple et sensible de toxicité (**Traesel *et al.*, 2014 ; Madingou *et al.*, 2016**). Cette variation est le plus souvent reflétée par une réduction dans les poids (**De Lima-saraiva *et al.*, 2012 ; Lagnika *et al.*, 2016**). La toxicité est d'autant plus prononcée dans le cas où la perte dans le PC représente plus de 10% du poids initial de la souris (**Subramanion *et al.*, 2011**). Cependant, la variation pondérale suite à l'exposition à un toxique peut aussi être traduite par une augmentation du poids. Les organes ont tendance à gonfler ou à s'endommager suite à une toxicité (**Lagnika *et al.*, 2016**).

Nos résultats montrent que les indices de PC et celui des organes n'ont pas été significativement modifiés par rapport aux témoins suite aux traitements par les extraits aqueux DEC, INF et MAC aux doses de 2 et 5g/kg de PC. De plus aucune différence n'a été notée entre les deux sexes ce qui indique l'absence de sensibilité d'un sexe donné par rapport à l'autre. Ces résultats obtenus pourraient indiquer l'innocuité de ces extraits sur les organes. Cependant, ces résultats ne peuvent être exhaustifs pour pouvoir se prononcer définitivement sur la toxicité des extraits. En effet, l'étude histopathologie des organes ainsi que des dosages biochimiques et hématologiques doivent être réalisés dans le volet de la toxicité aiguë afin d'affiner nos résultats. De plus, nous avons mené un test de toxicité aiguë sur une période relativement courte d'où la nécessité de réaliser des tests supplémentaires pour l'étude de la toxicité subaiguë et chroniques avec des doses répétées afin de chercher des effets toxiques cumulatifs.

Au meilleur de notre connaissance aucune étude n'a été publiée sur la toxicité de l'espèce *C. philipaea*. Par contre, la toxicité des espèces *C. tubulosa* et *C. deserticola* est bien documentée. Nos résultats rejoignent globalement les données rapportées par ces études. Cependant l'étendue de l'étude de la toxicité n'est pas la même en terme de type de toxicité.

L'étude de **Liao *et al.* (2018)**, qui a porté sur l'évaluation des effets génotoxiques et toxiques par voie orale de la Memoregain® qui est un complément alimentaire de *C. tubulosa* n'a montré aucune mortalité ni signe clinique de toxicité chez les rats mâles et femelles traités oralement par des doses croissantes de 0,15, 0,3 et 0,5g/kg de PC. Une diminution du PC a été retrouvée entre la deuxième et la troisième semaine et à la quatrième semaine de traitement respectivement chez les souris mâles traités par 0,15 et 0,3g/kg de PC. Concernant les poids relatifs des tissus qui ont été enregistrés après un traitement avec Memoregain® pendant 28

jours. Chez le lot femelle, aucun changement significatif n'a été retrouvé. En revanche, chez les mâles, des différences significatives ont été trouvées dans le cerveau, les testicules et le foie.

Il a été rapporté par ailleurs que la dose orale aiguë maximale tolérée de *C. deserticola* par les souris était supérieure à 20 g/kg de PC, ce qui était plus de 600 fois supérieur à la dose humaine recommandée, indiquant que *C. deserticola* n'était pas toxique (Huang *et al.*, 2014). L'étude récente de la toxicité aiguë de l'extrait de *C. mongolica* par voie orale a indiqué que les faibles doses n'ont pas provoqué des effets secondaires. Cependant lorsque la dose dépasse 8 g/kg de PC, une respiration rapide, un rythme cardiaque rapide ainsi qu'une mobilité réduite ont été initialement observés. Toutefois l'augmentation de la dose n'a provoqué aucune létalité au cours des 3-4 premières heures. À la suite de l'expérimentation, la DL50, était supérieure à 10 g/kg de PC. Les auteurs ont conclu que du point de vue toxicité aiguë, la substance est pratiquement inoffensive et appartient à la classe 5 (Mukhtorovna, 2022).

Cistanches Herba était généralement considérée comme une médecine traditionnelle sûre en Chine pendant 1000 ans (*Herbal Classic de ShenNong*). Les réactions cliniques indésirables courantes des préparations sont légères et comprennent des nausées et des vomissements, des douleurs abdominales et des étourdissements. Cependant, des enquêtes récentes ont indiqué que les extraits de *Cistanches Herba* ne présentent aucune toxicité évidente (Peng *et al.*, 2011 ; Jiang *et al.*, 2013 ; Huang *et al.*, 2014 ; Qin *et al.*, 2015). La toxicologie peut être une future nouvelle direction de recherche (Gu *et al.*, 2016).

Nos résultats de l'étude de la toxicité aiguë nous mène à utiliser une large gamme de concentrations afin d'évaluer diverses activités biologiques *in vivo* et notamment l'activité anti-inflammatoire chez les souris BalbC sans risque d'effets délétères.

L'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux des racines de *C. philipaea* a été évaluée via l'induction d'un œdème plantaire avec le modèle de la carragénine. Ce dernier est l'un des plus utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire. Le processus inflammatoire impliqué dans ce modèle fait intervenir 3 phases distinctes. La première phase fait intervenir l'histamine et la sérotonine qui favorisent la vasodilatation et la transudation plasmatique. De ce fait, l'extravasation du fluide et des protéines plasmatiques induit la formation de l'œdème (Gao *et al.*, 2009). La seconde phase, fait appel aux kinines qui augmentent la perméabilité vasculaire (Pradash Babu *et al.*, 2009). Ces deux premières phases caractérisent les trois premières heures qui correspondent à une augmentation croissante de l'œdème plantaire.

La dernière phase intervient de 3 à 6h après injection de la carragénine, elle implique la libération des protéases, lysosomes et PGs qui sont associés à la migration des leucocytes vers le foyer inflammatoire (**Sanogo et al., 2006 ; Marzouk et al., 2011**). La réponse vasculaire maximale, étroitement liée à cette migration, atteint son niveau maximale durant cette phase (**Pradash Babu et al., 2009 ; Li et al., 2011**).

L'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux de *C. phelypaea* retrouvée dans la présente étude est en accord avec plusieurs travaux ayant rapportés une activité anti-inflammatoire de certaines espèces du genre *Cistanche*. Au meilleur de notre connaissance aucune étude n'a été menée sur le potentiel anti-inflammatoire de *C. phelipaea*. Cette activité serait associée à la présence de certains composés phytochimiques comprenant des polysaccharides, oligosaccharides, PhGs et iridoïdes. En effet, des études ont montré que ces composés extraits à partir du genre *Cistanche* possèdent des activités anti-inflammatoires (**Nan et al., 2013 ; Ze-Dong et al., 2016 ; Xue et al., 2016 ; Zhang et al., 2019 ; Wu et al., 2020**).

Notre étude phytochimique réalisée par LC-ESI-QTOF-MS a révélé la présence de 20 composés de type PhGs et iridoïdes dont certains comme l'actéoside et l'échinacoside ont déjà été rapportés pour leur remarquable potentiel anti-inflammatoire (**Chen et al., 2018c ; Trampetti et al., 2018**). Le PhG le plus notable par rapport à son effet anti-inflammatoire est l'actéoside. Ce dernier, est bien connu pour son activité anti-inflammatoire qui serait associée à son pouvoir inhibiteur de la production des PGs de type PGE2, du NO et du tumor necrosis factor (TNF α) (**Motojima et al., 2013**). **Lee et al. (2005)** ont montré que l'acide 8-épiloganique pouvait inhiber l'expression de la NO synthase induite par les LPS dans la lignée cellulaire de macrophages RAW264.7.

Plus tard, l'étude de **Ze-Dong et al. (2016)** portant sur l'évaluation des activités anti-inflammatoires de certains iridoïdes isolés à partir de *C. deserticola* en termes d'inhibition de la production de NO (induite par les LPS dans les cellules microgliales de souris BV-2) ont montré que l'acide 8-épiloganique identifié par notre étude a exercé un puissant effet inhibiteur sur la production du NO. L'analyse préliminaire de la relation structure-activité a indiqué que la présence d'un groupe carboxyle en position C₄ dans ce composé pourrait être liée à son importante activité anti-inflammatoire.

De nombreux travaux montrent que les polysaccharides présentent de nombreuses activités biologiques telles que l'activité anti-inflammatoire. En effet, des travaux ont montré que les polysaccharides exercent une importante activité anti-inflammatoire, en induisant une augmentation des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) et une importante diminution des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) (**Chen et al., 2018c ; Zhang et al., 2019 ; Hou et al., 2020**). Par ailleurs, ils induisent une réduction dans la migration leucocytaire au site d'inflammation (**Sousa et al., 2018**).

De même, les oligosaccharides de *C. deserticola* exercent un effet anti-inflammatoire via la diminution de l'expression de l'ARN messager de la COX-2, i NOS (NOS inductible), IL-6 et du TNF α (**Zhang et al., 2019**).

Notre étude a également montré une intéressante teneur en composés phénoliques connus pour leur puissant effet anti-inflammatoire (**Zhang et al., 2018a**) et en flavonoïdes, qui sont aussi de bons anti-inflammatoires. Ils peuvent inhiber les facteurs de transcription et des enzymes ayant un rôle dans le contrôle des médiateurs pro-inflammatoires. De plus ils peuvent agir par l'inhibition de la synthèse des PGs, leucotriènes, NOS et TNF α ou par la modulation de voies de signalisation (**Abou baker, 2022**).

Par ailleurs, nos résultats obtenus à partir du screening phytochimique de la poudre végétale ont révélé la présence de certains groupes de molécules chimiques susceptibles d'être extraites par l'eau et qui ont été rapportées pour leur potentiel anti-inflammatoire. Parmi eux les triterpènes et les saponosides qui sont connus pour leur effet anti-inflammatoire (**Akkol et al., 2007**). Cet effet peut être médié via l'inhibition de certaines voies de signalisation telle que celle du récepteur Toll Like Receptor 4 (TLR4) (**Xu et al., 2022**) ou par l'atténuation de l'induction de gènes pro-inflammatoires codant pour les IL-1 β , IL-6, iNOS, COX2, ou encore par la suppression des ROS et des RNS (**Rho et al., 2020**).

Le potentiel anti-inflammatoire plus prononcé du décocté durant la deuxième heure de l'évolution de l'œdème plantaire pourrait être attribué à une plus forte teneur en sucres, composés phénoliques, composés phytochimiques tel que l'isoactéoside et l'un des deux isomères du 2'-acétylactéoside/tubuloside B. En effet, ces composés ont été extraits plus efficacement par la DEC et pourraient donc contribuer au meilleur pouvoir anti-inflammatoire noté par notre étude.

Compte tenu de ces résultats émanant de l'étude de la toxicité aiguë et de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*, il s'avère que la consommation des racines de *C. philipaea* en médecine traditionnelle serait efficace afin de soulager les états inflammatoires liés aux pathologies. Cette consommation serait envisageable comme traitements mineurs ou en thérapeutique d'appoint.

A cet effet, la décoction serait la meilleure forme d'application dans laquelle la balance bénéfices-risques est favorable.

De plus, des études plus poussées sur le potentiel anti-inflammatoire de composés isolés à partir des racines de *C. philipaea* sont à envisager dans le but de développement de nouveaux phyto-composés dans les indications thérapeutiques majeures.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Ce travail rentre dans le cadre de la valorisation de la flore végétale algérienne et ce à travers la contribution à l'investigation de la composition phytochimique, la toxicité et les potentiels bioactifs des racines de *Cistanche phelipaea*, récoltées au niveau de la wilaya de Béni Abbès.

Le criblage phytochimique initial de la poudre végétale des racines de *C. phelipaea* a révélé que ces dernières représentent une bonne source de plusieurs familles de composés bioactifs.

La suite de l'étude a porté sur trois procédés d'extraction aqueuse qui sont la décoction, l'infusion et la macération. Ces procédés diffèrent principalement par la température d'extraction et le temps de chauffage.

Sur le plan quantitatif, tous les extraits ont présenté un bon rendement d'extraction ainsi que des contenus intéressants en composés phénoliques, en flavonoïdes et en sucres. La décoction a permis d'extraire une quantité plus importante de composés phénoliques et de sucres. Par ailleurs, il en ressort de l'analyse par LC-ESI-QTOF-MS que les trois extraits montrent le même profil qualitatif en phénylétanoïdes glycosides et en iridoïdes avec cependant certaines variations quantitatives dans l'abondance de certains composés. De ce fait, aucune des méthodes étudiées ne permettrait une extraction optimale de tous les composés. Globalement, le décocté a présenté un meilleur pouvoir extracteur sur le plan quantitatif ce qui montre que le temps de chauffage joue un rôle prépondérant dans l'extraction de certains composés.

Concernant l'étude du potentiel antioxydant *in vitro*, les différents tests ont montré un bon potentiel pour les trois extraits. L'influence de la température d'extraction et du temps de chauffage n'étaient pas liés à des variations de ce potentiel à l'exception du macérât à froid qui a montré une plus faible capacité réductrice de fer. Cette dernière a été corrélée au taux de flavonoïdes. Ces résultats suggèrent fortement que ces extraits aqueux représentent des mélanges complexes au niveau desquels il existe une synergie d'action entre les différents composés phytochimiques.

L'étude de la toxicité aiguë des extraits aqueux administrés oralement aux doses de 2 et 5g/kg de poids corporel chez des souris BalbC mâles et femelles n'a révélé aucun signe de toxicité sur le comportement, mortalité, poids corporel et celui des organes (foie, rein, cœur, rate et poumons).

Pour ce qui est de l'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*, les différents extraits aqueux ont montré un très bon pouvoir anti-inflammatoire traduit par une réduction significative dans le pourcentage d'augmentation de l'œdème plantaire induit par la carragénine. Dans ce cas, le décocté a présenté un meilleur effet anti-inflammatoire.

Au terme de cette contribution à aspect phytochimique et biologique, il ressort des résultats obtenus que :

- En phytothérapie et en nutrition préventive, l'utilisation des jeunes racines de *C. phelipaea* sous forme d'extraits aqueux dans la modulation et la prévention des états pathologiques liés au stress oxydatif et à l'inflammation est très favorable en terme de balance bénéfices-risques. La décoction serait la forme la plus efficace.
- Il serait intéressant de poursuivre l'étude de la toxicité chronique de même que l'identification et la purification de composés présentant des effets antioxydant et anti-inflammatoire optimaux pour la formulation de formes galéniques.

Ainsi, en Algérie, un grand intérêt devrait être porté à l'exploitation de *C. phelipaea* (*Ginseng of desert*) notamment pour ses bienfaits comme complément alimentaire et ses retombées économiques pour le pays.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abou Baker, D. H. (2022). An ethnopharmacological review on the therapeutical properties of flavonoids and their mechanisms of actions: A comprehensive review based on up to date knowledge. *Toxicology Reports*, 9, 445-469.

Aboul-Enein, A. M., El-Ela, F. F. A., Shalaby, E. A., & El-Shemy, H. A. (2012). Simultaneous analysis of eight phenolic compounds in *Phyllanthus simplex* Retz by HPLC-DAD-ESI/MS. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(9), 689–703.

Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1.

Adamson, I. Y., Bowden, D. H., Cote, M. G., & Witschi, H. P. (1977). Lung injury induced by butylated hydroxytoluene: cytodynamic and biochemical studies in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 36(1), 26-32.

Ahn, J., Chae, H. S., Chin, Y. W., & Kim, J. (2017). Dereplication-guided isolation of new phenylpropanoid-substituted diglycosides from *Cistanche salsa* and their inhibitory activity on NO production in macrophage. *Molecules*, 22(7), 1138.

Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2020). *Essentials of pharmaceutical analysis* (pp. 29-56). Singapore: Springer.

Akhtar, N., Haq, I.U., & Mirza, B. (2018). Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(8), 1223–1235.

Akkol, E. K., Tatli, I. I., & Akdemir, Z. S. (2007). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Saponin and Iridoid Glycosides from *Verbascum pterocalycinum* var. *mutense* Hub.-Mor. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 62(11–12), 813–820.

Al-Ali, A., Alkhawajah, A. A., Randhawa, M. A., & Shaikh, N. A. (2008). Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 20(2), 25-27.

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214.

Alexandre, J., Balian, A., Bensoussan, L., Chaïb, A., Gridel, G., Kinugawa, K., Lamazou, F., Lim-Sabbah, I., Mink, V., Planquette, B., Rouprêt, M., Rousseau, M.-A., Roze, E., Salama, S., Schiff, M., Simon, D., Skurnik, D., Soria, A. (2009). Le tout en un révisions IFSI, Elsevier Masson, (p1598-1599), ISBN 9782294706332.

Alnajar, Z. A. A., Abdulla, M. A., Ali, H. M., Alshawsh, M. A., Hamid, A., & Hadi, A. H. A. (2012). Acute toxicity evaluation, antibacterial, antioxidant and immunomodulatory effects of *Melastoma malabathricum*. *Molecules*, 17(3), 3547-3559.

Amani, K. N., Kouassi, K., Bouagnon, R., Bidie, A. D. P., Djaman, A. J., & N'guessan, J. D. (2015). Antioxidant activity and acute toxicity of a recipe used in traditional medicine for the treatment of high blood pressure. *International Journal of Phytomedicine*.

Andary, C., Privat, G., Wylde, R., & Heitz, A. (1985). Pheliposide et arenarioside, Deux nouveaux esters heterosidiques de l'acide cafeique isolés de *Orobancha arenaria*. *Journal of Natural Products*, 48(5), 778-783.

Ansah, C., Adinortey, M. B., Asiedu-Larbi, J., Aboagye, B., Asante, D., & Nyarko, A. K. (2016). In vivo assessment of the toxic potential of *Dissotis rotundifolia*

whole plant extract in Sprague–Dawley rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(7), 574–579.

Anzai, T., Yoshikawa, T., Kaneko, H., Maekawa, Y., Iwanaga, S., Asakura, Y., & Ogawa, S. (2004). Association Between Serum C-Reactive Protein Elevation and Left Ventricular Thrombus Formation After First Anterior Myocardial Infarction. *Chest*, 125(2), 384–389.

Arast, Y., Heidary, M., Tanbakousazan, F.F., Behnamipour, S., Vazirizadeh, A., & Pourahmad, J. (2022). Selective toxicity of *Cistanche tubulosa* root extract on cancerous skin mitochondria isolated from animal model of melanoma. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 41(3), 243–249.

Asghari, B., Mafakheri, S., Zarrabi, M. M., Erdem, S. A., Orhan, I. E., & Bahadori, M. B. (2019). Therapeutic target enzymes inhibitory potential, antioxidant activity, and rosmarinic acid content of *Echium amoenum*. *South African Journal of Botany*, 120, 191–197.

Aslani, B. A., & Ghobadi, S. (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sciences*, 146, 163–173.

Assam J.P, A., Dzoyem, J. P., Pieme, C. A., & Penlap, V. B. (2010). In vitro antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn.(Malvaceae). *BMC complementary and alternative medicine*, 10, 1-7.

Aymeric, J. L., & Lefranc, G. (2009). *Immunologie humaine*. pp (131).De Boeck Supérieur.

Azmir, J ., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A. Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., & Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.

Azwanida, N.N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*, 4(196), 2167-0412.

Bachir, S., Aouar, A. (2019). Study of the impact of consanguinity on abortion and mortality in the population of Beni Abbes (southwestern Algeria). *Egypt J Med Hum Genet* 20, 1.

Badarinath, A. V., Rao, K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S. T. V. S. R., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.

Badiaga, M. (2011). *Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).

Baessa, M., Rodrigues, M.J., Pereira, C., Santos, T., da Rosa Neng, N., Nogueira, J.M.F., Barreira, L., Varela, J., Ahmed, H., Asif, S., Boukhari, S.A., Kayani, W.K., Ahmad, K.S., Zengin, G., Mollica, A., Custódio, L., & Custódio, L. (2019). A comparative study of the in vitro enzyme inhibitory and antioxidant activities of *Butea monosperma* (Lam.) Taub. and *Sesbania grandiflora* (L.) Poiret from Pakistan: New sources

of natural products for public health problems. *South African Journal of Botany*, 120, 146–156.

Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 1–40.

Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 413–420.

Battin, E. E., & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(1), 1–23.

Bauer, A. K., Dwyer-Nield, L. D., Hankin, J. A., Murphy, R. C., & Malkinson, A. M. (2001). The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. *Toxicology*, 169(1), 1–15.

Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H., & Crow, J. P. (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite. In *Methods in Enzymology*. 233, 229-40. Academic Press.

Beladjila, K. A., Berrehal, D., De Tommasi, N., Granchi, C., Bononi, G., Braca, A., & De Leo, M. (2018). New Phenylethanoid Glycosides from *Cistanche phelypaea* and Their Activity as Inhibitors of Monoacylglycerol Lipase (MAGL). *Planta Medica*, 84(09/10), 710–715.

Beladjila, K. A. (2020). Etude phytochimique et pharmacologique des espèces *Salvia buehneri* Hedge (Lamiaceae), *Cistanche phelypaea* (L.) Coutinho (Orobanchaceae) et *Anarrhinum pedatum* Desf. (Scrophulariaceae). (p.375). Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri - Constantine.

Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaire. (p 764), IBIS Press.

Benchelah, A.-C., Bouziane, H., Maka, M., Ouahes, C., Monod, T. (2011). Fleurs du Sahara: Voyage Ethnobotanique avec les Touaregs du Tassili, (p. 255), Second ed. Ibis Press, Paris.

Benzidia, B., Barbouchi, M., Hammouch, H., Belahbib, N., Zouarhi, M., Erramli, H., Ait Daoud, N., Badrane, N., & Hajjaji, N. (2019). Chemical composition and antioxidant activity of tannins extract from green rind of Aloe vera (L.) Burm. F. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 1175–1181.

Bianchi, M.E., (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), 1–5.

Bianco, A. (1994). Recent developments in iridoids chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 66(10–11), 2335–2338.

Bodamyali, T., Stevens, C. R., Blake, D. R., & Winyard, P. G. (2000). Reactive oxygen/nitrogen species and acute inflammation: a physiological process. *Free radicals and inflammation*, 11-16.

Bougandoura, A., D'Abrosca, B., Ameddah, S., Scognamiglio, M., Mekkiou, R., Fiorentino, A., Benayache, S., & Benayache, F. (2016). Chemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. *Fitoterapia*, 109, 248–253.

Bristow, A. W. T. (2006). Accurate mass measurement for the determination of elemental formula—A tutorial. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(1), 99–111.

Burke, A., Smyth, E., & FitzGerald, G. A. (2006). Analgesic-antipyretic agents; pharmacotherapy of gout. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 11, 671-715.

Calder, P. C., Albers, R., Antoine, J., Blum, S. E., Bourdet-Sicard, R., Ferns, G. A., Folkerts, G., Friedmann, P. S., Frost, G. J., Guarner, F., Løvik, M., MacFarlane, S. A., Meyer, P. D., M'rabet, L., Serafini, M., Van Eden, W., Van Loo, J., Dias, W. V., Vidry, S. O., . . . Zhao, J. (2009). Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101(S1), 1–45.

Caprarulo, V., Giromini, C., & Rossi, L. P. (2021). Review: Chestnut and quebracho tannins in pig nutrition: the effects on performance and intestinal health. *Animal*, 15(1), 100064.

Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25.

Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A. M., & Keller, J. N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1773(2), 93–104.

Chavéron, H. (1999). Introduction à la toxicologie nutritionnelle. (p214), Ed TEC & DOC.

Chen, W., Lin, H.R., Wei, C.M., Luo, X.H., Sun, M.L., Yang, Z.Z., Chen, X.Y., & Wang, H.B., (2018a). Echinacoside, a phenylethanoid glycoside from *Cistanche deserticola*, extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* and protects from A β -induced toxicity. *Biogerontology*, 19(1), 47–65.

Chen, X., Deng, Z., Huang, X., Geng, C., & Chen, J. (2018b). Liquid chromatography–mass spectrometry combined with xanthine oxidase inhibition profiling for identifying the bioactive constituents from *Cistanche deserticola*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 430, 1–7.

Chen, X., Lai, Y., Song, X., Wu, J., Wang, L., Zhang, H., Liu, Z., & Wang, Y. (2018c). Polysaccharides from *Citrus grandis* associate with luteolin relieves chronic pharyngitis by anti-inflammatory via suppressing NF- κ B pathway and the polarization of M1 macrophages. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 32, 2058738418780593.

Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, 47, 145–152.

Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American journal of clinical nutrition*, 71(2), 621S-629S.

Costamagna, M.S., Ordóñez, R. M., Zampini, I. C., Sayago, J. E., & Isla, M. I. (2013). Nutritional and antioxidant properties of *Geoffroea decorticans*, an Argentinean fruit, and derived products (flour, arropo, decoction and hydroalcoholic beverage). *Food Research International*, 54(1), 160–168.

Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2012). Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148-173.

Cui, Q., Pan, Y., Xu, X., Zhang, W., Wu, X., Qu, S., & Liu, X. (2016). The metabolic profile of acteoside produced by human or rat intestinal bacteria or intestinal enzyme in vitro employed UPLC-Q-TOF-MS. *Fitoterapia*, 109, 67–74.

Dahham, S. S., Al-Rawi, S. S., Ibrahim, A. H., Abdul Majid, A. S., & Majid, A. M. S. A. (2018). Antioxidant, anticancer, apoptosis properties and chemical composition of black truffle *Terfezia clavaryi*. *Saudi journal of biological sciences*, 25(8), 1524-1534.

Dallegri, F., & Ottonello, L. (1997). Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflammation Research*, 46(10), 382–391.

Das, N., Goshwami, D., Hasan, M. S., & Raihan, S. Z. (2015). Evaluation of acute and subacute toxicity induced by methanol extract of *Terminalia citrina* leaves in Sprague Dawley rats. *Journal of Acute Disease*, 4(4), 316–321.

De Lima-Saraiva, S. R. G., Guimarães, A. L., Ana Paula de Oliveira, A. P., Costa Saraiva, H. C. C., de Oliveira-Júnior, R. G., de Barros, V. R. P., Menezes, V.G., Roniere Alencar de Oliveira, R.A., Silva, F.S., de Lima, R.S., de Matos, M.H.T., Amorim, E.L.C., & da Silva Almeida, J. R. G. (2012). Antioxidant activity and acute toxicity of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *African Journal of Biotechnology*, 11(75), 13998-14006.

Delongas, J. L., Burnel, D., Netter, P., Grignon, M., Mur, J. M., Royer, R. J., & Grignon, G. (1983). Toxicity and pharmacokinetics of zirconium oxychloride in mice and rats. *Journal de pharmacologie*, 14(4), 437-447.

De Oliveira Pateis, V., Bracht, L., dos Santos Castro, L., Salla, G. B. F., Comar, J. F., Parizotto, A. V., Peralta, R.M., & Bracht, A. (2018). The food additive BHA modifies energy metabolism in the perfused rat liver. *Toxicology letters*, 299, 191-200.

De Sousa, C. V., Sales, M. M., Rosa, T. S., Lewis, J. E., de Andrade, R. V., & Simões, H. G. (2017). The antioxidant effect of exercise: a systematic review and meta-analysis. *Sports medicine*, 47, 277-293.

Deyama, T., Yahikozawa, K., Al-Easa, H. S., & Rizk, A. M. (1995). Constituents of plants growing in Qatar: part xxviii. Constituents Of *cistanche phelypaea*. *Qatar University Science Journal*. 15, 51–55.

Deyama, T., Kobayashi, H., Nishibe, S., Tu, P. (2006). Isolation, structure elucidation and bioactivities of phenylthanoïd glycosides from *Cistanche*, *Forsythia* and *Plantago* plants. *Studies in Natural Products Chemistry*, 33, 645-674.

Dhamodharan, G., & Mirunalini, S. (2013). A detail study of phytochemical screening, antioxidant potential and acute toxicity of *Agaricus bisporus* extract and its chitosan loaded nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research*, 6(8), 818–822.

Dhote, V., Dangi, U., Mandloi, A. S., Soni, M., Shukla, D. N., Kawadkar, M., & Ganeshpurkar, A. (2021). Preferential cyclooxygenase inhibition by *Jasminum sambac*: A possible relationship with potent anti-arthritis activity. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 11(3), 217.

Diallo, A., Eklugadegkeku, K., Agbonon, A., Aklikokou, K., Creppy, E. E., & Gbeassor, M. (2010). Acute and subchronic (28-day) oral toxicity studies of hydroalcoholic

extract of *Lanea kerstingii* Engl. and *K. Krause* (Anacardiaceae) stem bark. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 5(7), 343-349.

Dias, M. I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A. M., Alves, R.C., Oliveira, M. B. P., Santos-Buelga, C., Oliveira, M. B. P., Ferreira, I. C., & Ferreira, I. C. (2013). Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chemistry*, 141(4), 4152–4160.

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.

Dontha, S. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 14-32.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

Đuračková, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological research*, 59(4).

Ebringerova, A., Hromádková, Z., Machová, E., Naran, R., & Hříbalová, V. (1997). Isolation and characterization of mitogenic pectic polysaccharides from *Cistanche deserticola* YC Ma. *Chemical Papers*, 51(5), 289-294.

El Hassani, S. E. A., Driouich, A., Mellouk, H., Bejjany, B., Dani, A., & Digua, K. (2019). Extraction of phenolic from Moroccan grape pomace: Optimization of decoction extraction of phenolic compounds using response surface methodology. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 7(6), 423-432.

El Jemli, M., Kamal, R., Marmouzi, I., Doukkali, Z., Boudida, E. H., Touati, D., Nejari, R., El Guessabi, L Cherrah, Y., & Alaoui, K. (2017). Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetraclinis articulata* L. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(3), 281-287.

El-Kamali, H. H., & Hamed, S. E. M. (2015). Antioxidant potential of some Sudanese medicinal plants used in traditional medicine. *International Journal of Scientific World*, 3(2), 192.

Ennaifer, M., Bouzaiene, T., Chouaibi, M., & Hamdi, M. (2018). *Pelargonium graveolens* Aqueous Decoction: A New Water-Soluble Polysaccharide and Antioxidant-Rich Extract. *BioMed Research International*, 2018, 1–11.

Faine, L. A., Rodrigues, H. G., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Diniz, Y. S., Fernandes, A. A. H., & Novelli, E. L. B. (2006). Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(3), 221-226.

Fang, Y., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879.

Fu, Z., Fan, X., Wang, X., & Gao, X. (2018). *Cistanches Herba*: an overview of its chemistry, pharmacology, and pharmacokinetics property. *Journal of Ethnopharmacology*, 219, 233-247.

Gao, Y., Li, G., Li, C., Zhu, X., Li, M., Fu, C., & Li, B. (2009). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of sophocarpine. *Journal of ethnopharmacology*, 125(2), 324-329.

Gast, M. (2000). *Moissons du désert : utilisation des ressources naturelles en période de famine au Sahara central.* (p. 160), Ibis Press.

Gavamukulya, Y., Abou-Elella, F., Wamunyokoli, F., & AEl-Shemy, H. (2014). Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, S355–S363.

Ghosh, S., Ghosh, A., Rajanan, A., Suresh, A. J., Raut, P. S., Kundu, S., & Sahu, B. D. (2022). Natural coumarins: Preclinical evidence-based potential candidates to alleviate diabetic nephropathy. *Phytomedicine Plus*, 2(4), 100379.

Gome, M. B., Kouakou, K., Toure, A., & Traore, F. (2011). Étude de la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Passiflora foetida* Linn.(Passifloraceae) chez les rats et les souris. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 1777-1789.

Gomes, M. R. F., Schuh, R. S., Jacques, A. L. B., Dorneles, G. G., Montanha, J., Roehe, P. M., Roehe, P.M., Bordignon, S., Dallegrave, E., Mirna B. Leal, M.B., & Limberger, R. P. (2013). Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(2), 284-290.

Goncalves, K., Sullivan, K., & Phelan, S. (2012). Differential expression and function of peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 6 in cancerous MCF-7 and noncancerous MCF-10A breast epithelial cells. *Cancer investigation*, 30(1), 38-47.

Gu, C., Yang, X., & Huang, L. (2016). Cistanches Herba: A Neuropharmacology Review. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 289.

Guilpain, P., & Le Jeune, C. (2012). Effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs des glucocorticoïdes. *La Presse Médicale*, 41(4), 378-383.

Guo, Y., Cao, L., Zhao, Q., Zhang, L., Chen, J., Liu, B., & Zhao, B. (2016). Preliminary characterizations, antioxidant and hepatoprotective activity of polysaccharide from *Cistanche deserticola*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 678–685.

Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546.

Gurnani, N., Gupta, M., Mehta, D., & Mehta, B. K. (2016). Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 462–470.

Halliwell, B., Zentella, A., Gomez, E. O., & Kershenobich, D. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews*, 55(1), S44.

Hamliche, V., & Maiza, K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3), 358–367.

Han, L., Boakye-Yiadom, M., Liu, E., Zhang, Y., Li, W., Song, X., Fu, F., & Gao, X. (2012). Structural Characterisation and Identification of Phenylethanoid Glycosides

from *Cistanches deserticola* Y.C. Ma by UHPLC/ESI-QTOF-MS/MS. *Phytochemical Analysis*, 23(6), 668–676.

Handa, S., Khanuja, S.P., Longo, G. and Rakesh, D.D. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. (p. 260), United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology.

Harun, N. H., Septama, A. W., Ahmad, W. A. N. W., & Suppian, R. (2020). Immunomodulatory effects and structure-activity relationship of botanical pentacyclic triterpenes: A review. *Chinese Herbal Medicines*, 12(2), 118-124.

Henzen, C. (2003, May). Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. In *Forum Med. Suisse* (Vol. 19, pp. 442-446).

Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M. E., Hudemann, C., & Lillig, C. H. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions*, 33(6), 1375-1377.

Hou, C., Chen, L., Yang, L., & Ji, X. (2020). An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 153, 248-255.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53, 1841–1856.

Huang, Z. X., Chen, G. M., Zhao, K. T., Chen, R., & Lin, C. F. (2014). Study on toxicity of *Cistanche Deserticola*. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 24, 1098-1100.

Imakura, Y., Kobayashi, S., & Mima, A. (1985). Bitter phenyl propanoid glycosides from *Campsis chinensis*. *Phytochemistry*, 24(1), 139-146.

Iqbal, E., Salim, K. A., & Lim, L. B. (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University-Science*, 27(3), 224-232.

Isidore, S. A., Kouabenan, A. B. O., Etienne, O. K., & Noël, Z. G. (2019). Étude botanique, tri phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antifongique des extraits de feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geisel.) Müll. Arg. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 41(2), 6903-6915.

IUPAC (1997). *Compendium of Chemical Terminology* 2nd ed. (the "Gold Book"). Online corrected version: (2006) "tandem mass spectrometer".

Jamkhande, P. G., Suryawanshi, V. A., Kaylankar, T. M., & Patwekar, S. L. (2016). Biological activities of leaves of ethnomedicinal plant, *Borassus flabellifer* Linn. (Palmyra palm): An antibacterial, antifungal and antioxidant evaluation. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 54(1), 59-66.

Jedrejek, D., Pawelec, S., Piwowarczyk, R., Pecio, Ł., & Stochmal, A. (2020). Identification and occurrence of phenylethanoid and iridoid glycosides in six Polish broomrapes (*Orobancha* spp. and *Phelipanche* spp., *Orobanchaceae*). *Phytochemistry*, 170, 112189.

Jensen, S. R., Gotfredsen, C. H., Harput, U. S., & Saracoglu, I. (2010). Chlorinated iridoid glucosides from *Veronica longifolia* and their antioxidant activity. *Journal of natural products*, 73(9), 1593-1596.

Jiang, Y., & Tu, P. (2009). Analysis of chemical constituents in *Cistanche* species. *Journal of Chromatography A*, 1216(11), 1970–1979.

Jiang, Z.R., Xu, W., Liu, K.L., Jin, W., Wang, R., & Lu, R.S., (2013). Subchronic toxicity of *Cistanche tubulosa* extract on SD rat. *Journal of Preventive Medicine Information*, 4, 315–318.

Kang, H. G., Jeong, S. H., Cho, J. H., Kim, D. G., Park, J. M., & Cho, M. H. (2005). Evaluation of estrogenic and androgenic activity of butylated hydroxyanisole in immature female and castrated rats. *Toxicology*, 213(1-2), 147-156.

Karadag, A. S., Özçelik, B., & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41–60.

Karas, M., Bahr, U., & Dülcks, T. (2000). Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366(6–7), 669–676.

Kent, D., 1994. «Arthrose » Principe de médecine interne. 15^e édition Médecine science Flammarion Paris.

Kifayatullah, M., Mustafa, M. S., Sengupta, P., Sarker, M. M. R., Das, A., & Das, S. K. (2015). Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. *Journal of Acute Disease*, 4(4), 309-315.

Kim, J. H., Seo, C. S., Kim, S. S., & Shin, H. K. (2013). Compositional differences of Bojungikgi-tang decoctions using pressurized or non-pressurized extraction methods with variable extraction times. *The Korea Journal of Herbology*, 28(4), 1-6.

Kim, J. H., Lee, N., Shin, H. K., & Seo, C. S. (2014). Investigation of difference of Gwakyangjeonggi-san decoctions produced by different pressure levels and various extraction times. *Herbal Formula Science*, 22(2), 15-24.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A., & Osborne, B.A., (2008). *Immunologie. Le cours de Janin Kuby* : avec questions de révision. (p 573), 6^{ème} édition DUNOD.

Klaunig, J. E. (2018). Oxidative stress and cancer. *Current pharmaceutical design*, 24(40), 4771-4778.

Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T., & Fukushima, S. (1985). Studies on the constituents of *Cistanche Herba*. V. Isolation and structures of two new phenylpropanoid glycosides, cistanosides E and F. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 33(4), 1452–1457.

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650.

Korfmacher, W. A. (2005). Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discovery Today*, 10(20), 1357–1367.

Küpel, E., Şahin, F. P., Çalış, İ., Yeşilada, E., & Ezer, N. (2007). Phenolic compounds of *Sideritis ozturkii* and their in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities. *Journal of ethnopharmacology*, 112(2), 356-360.

- Lagnika, L., Amoussa, A. M. O., Adjileye, R. A., Laleye, A., & Sanni, A. (2016).** Antimicrobial, antioxidant, toxicity and phytochemical assessment of extracts from *Acmella uliginosa*, a leafy-vegetable consumed in Bénin, West Africa. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(1), 1-11.
- Lahlou, S., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2008).** Acute and chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Tanacetum vulgare* leaves in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, *117*(2), 221–227.
- Lanzerstorfer, P., Sandner, G., Pitsch, J., Mascher, B., Aumiller, T., & Weghuber, J. (2021).** Acute, reproductive, and developmental toxicity of essential oils assessed with alternative in vitro and in vivo systems. *Archives of Toxicology*, *95*(2), 673–691.
- Lawreys, R.R. (2003).** Commission de la santé et de la sécurité di travail. *Toxicologie*. 2, 1620.
- Lazar, L., Talmaciu, A. I., Volf, I., & Popa, V. I. (2016).** Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Picea abies* bark. *Ultrasonics Sonochemistry*, *32*, 191–197.
- Lee, J. Y., Woo, E. R., & Kang, K. W. (2005).** Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. *Journal of Ethnopharmacology*, *97*(3), 561–566.
- Lee, B., Lin, Y., Huang, Y., Ko, Y. W., Hsia, S., & Lin, P. (2012).** The Relationship between Coenzyme Q10, Oxidative Stress, and Antioxidant Enzymes Activities and Coronary Artery Disease. *The Scientific World Journal*, *2012*, 1–8.
- Lei, H., Wang, X., Zhang, Y., Cheng, T., Mi, R., Xu, X., Zu, X., & Zhang, W. (2020).** Herba Cistanche (Rou Cong Rong): A Review of Its Phytochemistry and Pharmacology. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *68*(8), 694–712.
- Lezoul, N. E. H., Belkadi, M. A., Habibi, F., & Guillén, F. (2020).** Extraction Processes with Several Solvents on Total Bioactive Compounds in Different Organs of Three Medicinal Plants. *Molecules*, *25*(20), 4672.
- Li, Y. C., Xian, Y. F., Ip, S. P., Su, Z. R., Su, J. Y., He, J. J., Xie, Q. F., Lai, X. P., & Lin, Z. X. (2011).** Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from *Pogostemonis Herba* in animal models. *Fitoterapia*, *82*(8), 1295-1301.
- Li, S., Li, S., Gan, R., Song, F., Kuang, L., & Li, H. (2013a).** Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, *51*, 289–298.
- Li, X., Zhang, T., Qiao, Q., Ren, Z., Zhao, J., Yonezawa, T., Hasegawa, M., Crabbe, M. J. C., Li, J., & Zhong, Y. (2013b).** Complete Chloroplast Genome Sequence of Holoparasite *Cistanche deserticola* (Orobanchaceae) Reveals Gene Loss and Horizontal Gene Transfer from Its Host *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae). *PLOS ONE*, *8*(3), e58747.
- Li, C. T., Liu, Y., Abdulla, R., Aisa, H. A., & Suo, Y. (2014).** Characterization and identification of chemical components in *Neopicrorhiza scrophulariiflora* roots by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, *6*(11), 3634–3643.

Li, Y., Peng, Y., Wang, M., Zhou, G., Zhang, Y., & Li, X. (2016a). Rapid screening and identification of the differences between metabolites of *Cistanche deserticola* and *C. tubulosa* water extract in rats by UPLC-Q-TOF-MS combined pattern recognition analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *131*, 364-372.

Li, Y., Zhou, G., Peng, Y., Tu, P., & Li, X. (2016b). Screening and identification of three typical phenylethanoid glycosides metabolites from *Cistanches Herba* by human intestinal bacteria using UPLC/Q-TOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *118*, 167-176.

Li, Z., Lin, H., Gu, L., Gao, J., & Tzeng, C. (2016c). Herba *Cistanche* (Rou Cong-Rong): One of the Best Pharmaceutical Gifts of Traditional Chinese Medicine. *Frontiers in Pharmacology*, *7*, 41.

Li, F., Lin, Z., Wu, Y., Luo, P., Wu, J., & Liu, H. (2022). Antioxidant, anticoagulant and thrombolytic properties of SIP-IV, a sulfated polysaccharide from *Sepia esculenta* ink, and its derivatives. *Food Bioscience*, *49*, 101959.

Liao, D. Y., Chai, Y. C., Wang, S. H., Chen, C. W., & Tsai, M. S. (2015). Antioxidant activities and contents of flavonoids and phenolic acids of *Talinum triangulare* extracts and their immunomodulatory effects. *Journal of Food and Drug Analysis*, *23*(2), 294-302.

Liao, P. L., Li, C. H., Tse, L. S., Kang, J. J., & Cheng, Y. W. (2018). Safety assessment of the *Cistanche tubulosa* health food product Memoregain®: genotoxicity and 28-day repeated dose toxicity test. *Food and Chemical Toxicology*, *118*, 581-588.

Lim, C. K., & Lord, G. (2002). Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *25*(5), 547-557.

Lin, C. C. S., & Fung, D. Y. C. (1983). Effect of BHA, BHT, TBHQ and PG on growth and toxigenesis of selected *Aspergilli*. *Journal of Food Science*, *48*(2), 576-580.

Lin, L. W., Hsieh, M. T., Tsai, F. H., Wang, W. H., & Wu, C. R. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory activity caused by *Cistanche deserticola* in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, *83*(3), 177-182.

Lin, Z., Wen, J., Zhu, T., Fang, Y., Gu, Q., & Zhu, W. (2008). Chrysogenamide A from an endophytic fungus associated with *Cistanche deserticola* and its neuroprotective effect on SH-SY5Y cells. *The Journal of Antibiotics*, *61*(2), 81-85.

Lin, W. Y., Yao, C., Cheng, J., Kao, S. T., Tsai, F. J., & Liu, H. P. (2017). Molecular pathways related to the longevity promotion and cognitive improvement of *Cistanche tubulosa* in *Drosophila*. *Phytomedicine*, *26*, 37-44.

Lipnick, R. L., Cotruvo, J. A., Hill, R. E., Bruce, R. D., Stitzel, K. A., Walker, A. S., Chu, I., Goddard, M. E., Segal, L., Springer, J., & Myers, R. H. (1995). Comparison of the up-and-down, conventional LD50, and fixed-dose acute toxicity procedures. *Food and Chemical Toxicology*, *33*(3), 223-231.

Liu, X. M., Li, J., Jiang, Y., Zhao, M. B., & Tu, P. F. (2013). Chemical constituents from *Cistanche sinensis* (Orobanchaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, *47*, 21-24.

Lopes, G. R., Passos, C. P., Rodrigues, C., Teixeira, J. A., & Coimbra, M. A. (2019). Modulation of infusion processes to obtain coffee-derived food ingredients with distinct composition. *European Food Research and Technology*, *245*, 2133-2146.

Lu, F. C., & Lu, F. C. (1992). *Toxicologie: données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque* (p. 265). Paris: Masson.

Mabberley, D. J. (1997). *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge university press.

Machmudah, S., Fitriana, M. W., Fatbamayani, N., Kanda, H., Winardi, S., & Goto, M. (2022). Phytochemical compounds extraction from medicinal plants by subcritical water and its encapsulation via electrospraying. *Alexandria Engineering Journal*, 61(3), 2116-2128.

Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., & Salunkhe, D. K. (1995). *Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives*. CRC Press.

Madingou, N. O. K., Traore, A., Souza, A., Mounanga, M. M. B., Samseny, R. R. A., Ouedraogo, S., & Traore, A. S. (2016). Preliminary studies of acute and sub-chronic toxicity of the aqueous extract of *Guibourtia tessmannii* (Harms) J. Leonard stem barks (Caesalpiniaceae) in mice and rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(6), 506-510.

Maiza, K., De La Perriere, R. B., & Hammiche, V. (1993). Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie et de la 11e Conférence Internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg. *Mars*, 24-27.

Markides, K., Gräslund, A. (2002). Informations avancées sur le prix Nobel de chimie.

Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food chemistry*, 158, 73-80.

Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Silva, S., Henriques, M., & Ferreira, I. C. (2015). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. *Food chemistry*, 167, 131-137.

Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2016). In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 1-12.

Marzouk, B., Marzouk, Z., Haloui, E., Turki, M., Bouraoui, A., Aouni, M., & Fenina, N. (2011). Anti-inflammatory evaluation of immature fruit and seed aqueous extracts from several populations of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. *African Journal of Biotechnology*, 10(20), 4217-4225.

Mathew, B. B., Tiwari, A., & Jatawa, S. K. (2011). Free radicals and antioxidants: A review. *Journal of Pharmacy Research*, 4(12), 4340-4343.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.

Melek, F. R., El-Shabrawy, O. A., El-Gindy, M., & Miyase, T. (1993). Pharmacological activity and composition of ethyl acetate extract of *Cistanche phelypaea*. *Fitoterapia*, 64, 11-11.

Mezzomo, N., Maestri, B., dos Santos, R. L., Maraschin, M., & Ferreira, S. R. (2011). Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. *Talanta*, 85(3), 1383-1391.

Mopuri, R., & Meriga, B. (2014). In vitro anti oxidant activity and acute oral toxicity of Terminalia paniculata bark ethanolic extract on Sprague Dawley rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(4), 294-298.

Morikawa, T., Pan, Y., Ninomiya, K., Imura, K., Matsuda, H., Yoshikawa, M., Yuan, D., & Muraoka, O. (2010). Acylated phenylethanoid oligoglycosides with hepatoprotective activity from the desert plant Cistanche tubulosa1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(5), 1882–1890.

Motojima, H., Villareal, M. O., Iijima, R., Han, J., & Isoda, H. (2013). Acteoside inhibits type I allergy through the down-regulation of Ca/NFAT and JNK MAPK signaling pathways in basophilic cells. *Journal of Natural Medicines*, 67(4), 790–798.

Mukhtorovna, M. N. (2022). Study Of General Pharmacological Properties And Acute Toxicity Of Cistanche Mongolica Extract. *Texas Journal of Medical Science*, 13, 12-14.

Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.

Naima, R., Oumam, M., Hannache, H., Sesbou, A., Charrier, B., Pizzi, A., & Charrier–El Bouhtoury, F. (2015). Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan Acacia mollissima barks. *Industrial Crops and Products*, 70, 245-252.

Nakagawa, Y., & Tayama, K. (1988). Nephrotoxicity of butylated hydroxytoluene in phenobarbital-pretreated male rats. *Archives of Toxicology*, 61(5), 359–365.

Namba, T. (1994). The Encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese Medicines) with color picture (p16-17), vol II. Hoiku- sha, Tokyo.

Nan, Z. D., Zeng, K. W., Shi, S. P., Zhao, M. B., Jiang, Y., & Tu, P. F. (2013). Phenylethanoid glycosides with anti-inflammatory activities from the stems of Cistanche deserticola cultured in Tarim desert. *Fitoterapia*, 89, 167-174.

Nan, Z. D, Zhao, M. B, Zeng, K. W, Tian, S. H, Wang, W. N, Jiang, Y, Tu, P. F.(2016). Anti-inflammatory iridoids from the stems of Cistanche deserticola cultured in Tarim Desert. *Chin J Nat Med*.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846–852.

Ndiaye, M., Sy, G., Dièye, A., Touré, M., & Faye, B. (2006). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'annona reticulata (annonaceae) sur l'œdème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 15, 179-186.

Neal, M. (2007). Pharmacologie médicale.(p 104), 3eme Edition de boeck .

Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287–1312.

OECD. (1979). Résumé des considérations du rapport des groupes d'expert de l'OECD sur la toxicologie à court et à long terme. In : lignes directrice de l'OECD pour les essais de produits chimiques. (p. 1-15).

OECD. (2001). 425 (adopted) Guideline for testing of chemicals Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure. (p 1-26).

OECD. (2004) 433 (2nd Version) Guideline for testing of chemicals draft proposal for a new guideline. Acute Inhalation Toxicity - Fixed Concentration Procedure. (p 1-24).

OECD. (2009). Etude de la toxicité chronique. In : lignes directrice de l'OECD pour les essais de produits chimiques. (p. 1-16) Paris : OECD.

Olaniyan, J Oikawa, S., Nishino, K., Oikawa, S., Inoue, S., Mizutani, T., & Kawanishi, S. (1998). Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene. *Biochemical pharmacology*, 56(3), 361-370.

Olaniyan, J. M., Muhammad, H. L., Makun, H. A., Busari, M. B., & Abdullah, A. S. (2016). Acute and sub-acute toxicity studies of aqueous and methanol extracts of *Nelsonia campestris* in rats. *Journal of Acute Disease*, 5(1), 62-70.

Orhan, D. D., Hartevioğlu, A., Küpeli, E., & Yesilada, E. (2007). In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), 394–400.

Ozenda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara. (p. 662), Ed. CNRS, Paris.

Ozenda, P., Capdepon, M., 1977. Recherches sur les Phanérogames parasites V. Sur quelques particularités anatomiques du genre *Cistanche* (*Orobanchacées*). *Bulletin de la Société Botanique de France*, 124, 451-464.

Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424.

Pan, N., & Hori, H. (1996). Antioxidant action of acteoside and its analogs on lipid peroxidation. *Redox Report*, 2(2), 149–154.

Parasuraman, S., Anish, R., Balamurugan, S., Muralidharan, S., Kumar, K. J., & Vijayan, V. (2014). An Overview of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Instrumentation. *Pharmaceutical Methods*, 5(2), 47.

Patil, S., Jolly, C.I., Narayanan, S. (2003). Free radical scavenging activity of acacia catechu and *Rotula aquatica*: implications in cancer therapy. *Indian drugs*, 40, 328 – 332.

Peng, L., Zhao, P., Li, B., Zhang, J.H., Qin, H.Y., Yao, S.Y.(2011). Study on toxicity of *C. deserticolata*. *Applied Preventive Medicine*, 1, 47–49.

Peng, F., Chen, J., Wang, X., Xu, C., Liu, T., & Xu, R. (2016). Changes in levels of phenylethanoid glycosides, antioxidant activity, and other quality traits in *Cistanche deserticola* slices by steam processing. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64(7), 1024-1030.

Percival, M. (1998). Antioxidants Clinical Nutrition Insights. *Advance Nutrition Publications*, 31: 201-205.

Perry, M. (2013). Herboristerie : enquête sur les principales demandes à l'officine. Sciences pharmaceutiques. HAL-01733473, 151.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.

Pietta, P. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7),

Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., & Predoi, G. (2016). Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–36.

Pitaro, M., Croce, N., Gallo, V., Arienzo, A., Salvatore, G., & Antonini, G. (2022). Coumarin-Induced Hepatotoxicity: A Narrative Review. *Molecules*, 27(24), 9063.

Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19.

Piwowarczyk, R., Ochmian, I., Lachowicz, S., Kapusta, I., Sotek, Z., & Błaszak, M. (2020). Phytochemical parasite-host relations and interactions: A *Cistanche armena* case study. *Science of the Total Environment*, 716, 137071.

Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., & Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1499–1503.

Powers, S. K., Talbert, E. E., & Adhietty, P. J. (2011). Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 589(9), 2129–2138.

Prakacsh-Babu, N., Pandikumar, P., & Ignacimuthu, S. (2009). Anti-inflammatory activity of *Albizia lebeck* Benth., an ethnomedicinal plant, in acute and chronic animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(2), 356–360.

Praticò, D., Iuliano, L., Mauriello, A., Spagnoli, L. G., Lawson, J. A., Rokach, J., Maclouf, J., Violi, F., & Fitzgerald, G. F. (1997). Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation*, 100(8), 2028–2034.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. M. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.

Qiao, X. Y., Wang, H. L., & Guo, Y. H. (2007). Study on conditions of seed germination of *Cistanche*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 32(18), 1848–1850.

Qin, G.Q., Wang, Y.W., Wen, P.J., He, L., Fu, W.Z., Wang, F. (2015). Toxicological security evaluation of herba cistanches granule. *Chinese Journal of Health Laboratory and Technology*, 16, 2669–2671.

Quezel, P., & Santa, S. (1962). New flora of Algeria and southern desert regions. *New flora of Algeria and southern desert regions*.

Quirantes-Piné, R., Funes, L. E., Micol, V., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2009). High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *Journal of Chromatography A*, 1216(28), 5391–5397.

Qzinvecht, N.T. (1983). Analyse chimique des plantes medicinales. (42-110), Edition ecole superieure.

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219–236.

Rajput, A., Sharma, R., & Bharti, R. (2021). Pharmacological activities and toxicities of alkaloids on human health. *Materials Today: Proceedings*, 48, 1407–1415.

Ramadan, M. F., Hefnawy, H. T. M., & Gomaa, A. M. (2011). Bioactive lipids and fatty acids profile of *Cistanche phelypaea*. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6, 333-338.

Reed, M. P., Fujiwara, H., & Thompson, D. R. (2001). Comparative metabolism, covalent binding and toxicity of BHT congeners in rat liver slices. *Chemico-Biological Interactions*, 138(2), 155–170.

Rege, M. G., Ayanwuyi, L. O., Zezi, A. U., & Odoma, S. (2021). Anti-nociceptive, anti-inflammatory and possible mechanism of anti-nociceptive action of methanol leaf extract of *Nymphaea lotus* Linn (Nymphaeaceae). *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 11(2), 123–129.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Mayo, J. C., Sainz, R. M., León, J., & Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1129–1146.

Resnik, R. R., & Resnik, R. J. (2018). Medical/Medication complications in oral implantology. In *Misch's Avoiding Complications in Oral Implantology*, 13-53.

Rho, T., Jeong, H., Hong, Y. S., Yoon, K., Cho, J. Y., & Yoon, K. B. (2020). Identification of a novel triterpene saponin from *Panax ginseng* seeds, pseudoginsenoside RT8, and its antiinflammatory activity. *Journal of Ginseng Research*, 44(1), 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2018.11.001>

Rice-Evans, C., Miller, N. R., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159.

Risser, A., Donovan, D., Heintzman, J., & Page, T. (2009). NSAID prescribing precautions. *American family physician*, 80(12), 1371-1378.

Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 657–691.

Rostom, B., Karaky, R., Kassab, I., & Veitia, M. I. (2022). Coumarins derivatives and inflammation: Review of their effects on the inflammatory signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, 922, 174867.

Rostron-Bibra, C. (1982). Tumour promotion by BHT. *Food and Cosmetics Toxicology*, 20(3), 329-331.

Ruckebusch, Y. (1981). Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales. (P 380).Paris: Maloine.

Sachdev, S., & Davies, K. J. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 215–223.

Saklar, S., Ertas, E., Ozdemir, I. S., & Karadeniz, B. (2015). Effects of different brewing conditions on catechin content and sensory acceptance in Turkish green tea infusions. *Journal of food science and technology*, 52(10), 6639-6646.

Samal, P. K., & Dangi, J. S. (2014). Isolation, preliminary characterization and hepatoprotective activity of polysaccharides from *Tamarindus indica* L. *Carbohydrate Polymers*, 102, 1–7.

Sanogo, R., Maiga, A., & Diallo, D. (2006). Activités analgesique et anti-inflammatoire des extraits de *Maytenus senegalensis*, *Stereospermum kunthianum* et *Trichilia*

emetica utilisés dans le traitement traditionnel des dysmenorrhées au Mali. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 14, 123-36.

Sharma, M., Vyas, V.K., Bhatt, S., Ghate, M.D., 2022. Therapeutic potential of 4-substituted coumarins: A conspectus. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* 6 (2022) 100086.

Shehata, H. (2010). Basic Science in Obstetrics and Gynaecology (4th Ed).

Shi, Y., Wu, C., Chen, Y., Liu, W., Feng, F., & Xie, N. (2013). Comparative analysis of three *Callicarpa* herbs using high performance liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization-trap mass spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 75, 239–247.

Si, C. L., Liu, S. C., Hu, H. Y., Jiang, J. Z., Yu, G. J., Ren, X. D., & Xu, G. H. (2013). Activity-Guided Screening of the Antioxidants from *Paulownia tomentosa* var. *tomentosa* Bark. *Bioresources*, 8(1), 628–637.

Silva, A. M., Pinto, D. C. G. A., Rodrigues, F., Albuquerque, T. G., Costa, H. S., De Freitas, V., Rodrigues, F., & Oliveira, M. B. P. (2019). Infusions and decoctions of dehydrated fruits of *Actinidia arguta* and *Actinidia deliciosa*: Bioactivity, radical scavenging activity and effects on cells viability. *Food Chemistry*, 289, 625–634.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (p. 152–178). Academic Press.

Sinha, S., Jothiramajayam, M., Ghosh, M., & Mukherjee, A. (2014). Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 71–77.

Siuzdak, G., 2006. The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology. (p 257). Second Edition. MCC Press, San Diego.

Song, Q., Li, J., Liu, X., Zhang, Y., Guo, L., Jiang, Y., Song, Y., & Tu, P. (2016). Home-made online hyphenation of pressurized liquid extraction, turbulent flow chromatography, and high performance liquid chromatography, *Cistanche deserticola* as a case study. *Journal of Chromatography A*, 1438, 189–197.

Song, Q., Zhou, Z., Li, J., Cao, Y., Zhao, Y., Deng, S., Qi, H., Jiang, Y., Song, Y., & Tu, P. (2019). Serial hyphenation of dried spot, reversed phase liquid chromatography, hydrophilic interaction liquid chromatography, and tandem mass spectrometry towards direct chemical profiling of herbal medicine-derived liquid matrices, an application in *Cistanche sinensis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 34–42.

Sousa, S. G., Oliveira, L. M., De Aguiar Magalhães, D., De Brito, T. V., Batista, J. A., Pereira, C. L. M., De Souza Costa, M., Mazulo, J. C. R., De Carvalho Filgueiras, M., Vasconcelos, D. F. P., Da Silva, D. A., Barros, F., Sombra, V. G., Freitas, A. L., De Paula, R. C., Feitosa, J. P., & Barbosa, A. L. D. R. (2018). Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharide extracted from *Morinda citrifolia* Linn (Noni). *Carbohydrate Polymers*, 197, 515–523.

Stefanović, O. D., Tesic, J., & Čomić, L. R. (2015). *Melilotus albus* and *Dorycnium herbaceum* extracts as source of phenolic compounds and their antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potentials. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 417–424.

Subedi, L., Timalsena, S., Duwadi, P., Thapa, R., Paudel, A., & Parajuli, K. (2014). Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 34(5), 584–590.

Subramanion, L.J., Zuraini, Z., Yeng, C., Yee, L.L., Lachimanan, Y.L., Sreenivasan, S., 2011. Acute Oral Toxicity of Methanolic Seed Extract of *Cassia fistula* in Mice. *Molecules*, 16(6), 5268–5282.

Sudhahar, V., Fukai, T. (2014). Antioxidant supplementation and therapies, in: H. Tsukahara, K. Kaneko (Eds.), *Studies on Pediatric Disorders (Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice)*. (p 183-209) New York: Edition Springer.

Tackholm, V., & Boulos, L. (1974). *Students' flora of Egypt* (2nd ed). Beirut: Cairo Univ. Press.

Takahashi, O. (1992). Haemorrhages due to defective blood coagulation do not occur in mice and guinea-pigs fed butylated hydroxytoluene, but nephrotoxicity is found in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 30(2), 89–97.

Tao, Y., Gu, X., Li, W., & Cai, B. (2018). Fabrication and evaluation of magnetic phosphodiesterase-5 linked nanoparticles as adsorbent for magnetic dispersive solid-phase extraction of inhibitors from Chinese herbal medicine prior to ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1532, 58–67.

Tian, S., Miao, M., Bai, M., & Zhenzhen, W. (2017). Phenylethanoid Glycosides of *Cistanche* on menopausal syndrome model in mice. *Journal of the Saudi Pharmaceutical Society*, 25(4), 537–547.

Traesel, G. K., De Souza, J. V., Da Silva De Barros, A. O., Souza, M. A., Schmitz, W., Muzzi, R. M., Oesterreich, S. A., & Arena, A. C. (2014). Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 320–325.

Trampetti, F., Pereira, C., Rodrigues, M. a. M., Celaj, O., D'Abrosca, B., Zengin, G., Mollica, A., Stefanucci, A., & Custódio, L. (2019). Exploring the halophyte *Cistanche phelypaea* (L.) Cout as a source of health promoting products: In vitro antioxidant and enzyme inhibitory properties, metabolomic profile and computational studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165, 119–128.

Todd, J. F. (1991). Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy (including an appendix of terms used in vacuum technology). (Recommendations 1991). *Pure and applied chemistry*, 63(10), 1541-1566.

Tuberoso, C. I. G., Boban, M., Bifulco, E., Budimir, D., & Pirisi, F. M. (2013). Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chemistry*, 140(4), 686–691.

Tüzün, A., Erdil, A., Inal, V., Aydin, A., Bağcı, S., Yesilova, Z., Sayal, A., Karaeren, N., & Dağalp, K. (2002). Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Biochemistry*, 35(7), 569–572.

Us, M.R., Zin, T., Abdurrazak, M., Ahmad, B.A., 2015. Chemistry and pharmacology of syringin, a novel bioglycoside: A review. *Asian J. Pharmaceutical and Clin. Res.* 8, 20–25.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., M, I., & Mazur, M. A. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40.

Velavan, S. (2011). Free radicals in health and diseases. *Pharmacology Online*, 1(1), 1062-77.

Verbelen, M., Collier, D. A., Cohen, D., MacCabe, J. H., & Lewis, G. (2015). Establishing the characteristics of an effective pharmacogenetic test for clozapine-induced agranulocytosis. *Pharmacogenomics Journal*, 15(5), 461–466.

Wallace, H.A. (1989). *Principle and Methods of Toxicology*. New York: Raven Press.

Wang, Y., Hao, H., Wang, G., Tu, P., Jiang, Y., Liang, Y., Dai, L., Yang, H., Lai, L., & Zheng, C. (2009). An approach to identifying sequential metabolites of a typical phenylethanoid glycoside, echinacoside, based on liquid chromatography–ion trap-time of flight mass spectrometry analysis. *Talanta*, 80(2), 572–580.

Wang, T., Zhang, X., & Xie, W. (2012). Cistanche deserticola Y. C. Ma, “Desert Ginseng”: A Review. *The American Journal of Chinese Medicine*, 40(06), 1123–1141.

Wang, T., Chen, C., Yang, M., Deng, B., Kirby, G. W., & Zhang, X. (2016). Cistanche tubulosa ethanol extract mediates rat sex hormone levels by induction of testicular steroidogenic enzymes. *Pharmaceutical Biology*, 54(3), 481–487.

Wang, L., Wang, J., Guan, H., Xu, R., Luo, X., Su, M., Chang, X., Tan, W., Chen, J., & Shi, Y. (2017a). Comparison of the Chemical Profiles and Antioxidant Activities of Different Parts of Cultivated Cistanche deserticola Using Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and a 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl-Based Assay. *Molecules*, 22(11), 2011.

Wang, N., Ji, S., Zhang, H., Mei, S., Qiao, L., & Jin, X. (2017b). Herba Cistanches: Anti-aging. *Aging and Disease*, 8(6), 740.

Wang, W., Xiong, P., Zhang, H., Zhu, Q., Liao, C., & Jiang, G. (2021). Analysis, occurrence, toxicity and environmental health risks of synthetic phenolic antioxidants: A review. *Environmental Research*, 201, 111531.

Wang, Y., Li, X., & Sun, X. (2022). The transformation mechanism and eco-toxicity evaluation of butylated hydroxyanisole in environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 231, 113179.

Wat, E., Ng, C., Koon, C. M., Wong, E. T., Lam, C. W., & Lau, C. B. (2016). The protective effect of Herba Cistanches on statin-induced myotoxicity in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 190, 68–73.

Watson, R. R. (Ed.). (2011). *Melatonin in the Promotion of Health*. CRC Press.

Whyte, M., 2000. Neutrophils. In Cellular mechanisms in airways inflammation. Berlin: Page CP, Banner KH, Spina D Eds, Birkhäuser, 125 -146.

Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 111(3), 544-547.

Witschi, H., Malkinson, A. M., & Thompson, J. A. (1989). Metabolism and pulmonary toxicity of butylated hydroxytoluene (BHT). *Pharmacology & therapeutics*, 42(1), 89-113.

Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., & Chen, F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food chemistry*, 97(4), 705-711.

Wong-Paz, J. E., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Carrillo-Inungaray, M. L., López, L. I., Nevárez-Moorillón, G. V., & Aguilar, C. N. (2015). Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian pacific journal of tropical medicine*, 8(2), 104-111.

Wood, L. G., Gibson, P. G., & Garg, M. L. (2006). A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2057-2066.

Wright, J. S., Johnson, E. R., & DiLabio, G. A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123(6), 1173-1183.

Wu, C. R., Huang, M. Y., Lin, Y. T., Ju, H. Y., & Ching, H. (2007). Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins. *Food chemistry*, 104(4), 1464-1471.

Xin, W., Man, X., Zheng, C., Jia, M., Jiang, Y., Zhao, X., Jin, G., Mao, Z., Huang, H., & Qin, L. (2012). Prenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. *Fitoterapia*, 83(8), 1540-1547.

Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T., & Namba, T. (1996). Antioxidative Effects of Phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19(12), 1580-1585.

Xiong, Q., Tezuka, Y., Kaneko, T., Li, H., Tran, L. C., Hase, K., Namba, T., & Kadota, S. (2000). Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 400(1), 137-144.

Xiong, W. T., Gu, L., Wang, C., Sun, H. X., & Liu, X. (2013). Anti-hyperglycemic and hypolipidemic effects of *Cistanche tubulosa* in type 2 diabetic db/db mice. *Journal of ethnopharmacology*, 150(3), 935-945.

Xu, H. L., Chen, G. H., Wu, Y. T., Xie, L. P., Tan, Z. B., Liu, B., Wang, Q., Chen, H., Huang, G., Liu, M., & Zhou, Y. C. (2022). Ginsenoside Ro, an oleanolic saponin of *Panax ginseng*, exerts anti-inflammatory effect by direct inhibiting toll like receptor 4 signaling pathway. *Journal of ginseng research*, 46(1), 156-166.

Xue, Z., & Yang, B. (2016). Phenylethanoid Glycosides: Research Advances in Their Phytochemistry, Pharmacological Activity and Pharmacokinetics. *Molecules*, 21(8), 991.

Yamashita, M., Fenn, J.B. (1984). Source d'ions Electrospray. Une autre variation sur le thème du jet libre. *Le Journal de Chimie Physique*. 88, 4451-4459.

Yan, Y., Song, Q., Chen, X., Li, J., Li, P., Wang, Y., Liu, T., Song, Y., & Tu, P. (2017). Simultaneous determination of components with wide polarity and content ranges in *Cistanche tubulosa* using serially coupled reverse phase-hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1501, 39-50.

Yang, J. H., Hu, J. P., Rena, K., & Du, N. S. (2009). Structure-activity relationships of phenylethanoid glycosides in plants of *Cistanche salsa* on antioxidative activity. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 32(7), 1067-1069.

Yang, X., Sun, Z., Wang, W., Zhou, Q., Shi, G., Wei, F., & Jiang, G. (2018). Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish. *Science of the Total Environment*, 643, 559–568.

Yihang, L., Guang, L., Meifang, S., Xuelan, L., Xia, Z., Juan, L., & Xi, C. (2016). Acute toxicity study of *Aspidopterys obcordata* aqueous extract in Sprague-Dawley rats. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 36(3), 377–381.

Yoshizawa, F., Deyama, T., Takizawa, N., Usmanghani, K., & Ahmad, M. (1990). The constituents of *Cistanche tubulosa* (Schrenk) Hook. f. II. Isolation and structures of a new phenylethanoid glycoside and a new neolignan glycoside. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 38(7), 1927–1930.

Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.

Yuejie, L., Haiyan, C., Ting, L., Lijun, L., Wenhai, J. (2017). Chemical components identification of *Cistanche deserticola* using X500 QTOF system. Food and Environmental SCIEX. Asia Pacific Application Support Center, Shanghai China. RUO-MKT-02- 6091-A.

Yuldasheva, L. N., Carvalho, E. B., Catanho, M. T., & Krasilnikov, O. V. (2005). Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 1061-1070.

Zatra, Y., 2008. Influence de la castration en période de reproduction, sur l'activité du cortex surrénal chez la gerbille male. (p.125).Thèse de Magister. USTHB.

Ze-Dong, N. A. N., Ming-Bo, Z. H. A. O., Zeng, K. W., Shuai-Hua, T. I. A. N., Wei-Nan, W. A. N. G., Jiang, Y., & Peng-Fei, T. U. (2016). Anti-inflammatory iridoids from the stems of *Cistanche deserticola* cultured in Tarim Desert. *Chinese journal of natural medicines*, 14(1), 61-65.

Zengin, G., Llorent-Martínez, E. J., Sinan, K. I., Yildiztugay, E., Picot-Allain, C., & Mahomoodally, M. F. (2019). Chemical profiling of *Centaurea bornmuelleri* Hausskn. aerial parts by HPLC-MS/MS and their pharmaceutical effects: From nature to novel perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 406-413.

Zhang, J., Hou, J., Weng, X. (2009). Synthetic antioxidants and their oxidation products of antioxidant activity. *Cereal Oils Production*. 1, 59–63.

Zhang, L., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Smith, P. T., Ananthan, R., & Longvah, T. (2012). Antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from the roots of *Sanguisorba officinalis*. *International journal of biological macromolecules*, 51(5), 1057-1062.

Zhang, J., Li, C., Che, Y., Wu, J., Wang, Z., Cai, W., Li, Y., Ma, Z., & Tu, P. (2015). LTQ-Orbitrap-based strategy for traditional Chinese medicine targeted class discovery, identification and herbomics research: a case study on phenylethanoid glycosides in three different species of *Herba Cistanches*. *RSC Advances*, 5(98), 80816–80828.

Zhang, W., Huang, J., Wang, W., Li, Q., Chen, Y. S., Feng, W., Zheng, D., Zhao, T., Mao, G., & Yang, L. (2016). Extraction, purification, characterization and antioxidant

activities of polysaccharides from *Cistanche tubulosa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 448–458.

Zhang, A., Yang, X., Li, Q., Yang, Y., Zhao, G., Wang, B., & Wu, D. (2018a). Immunostimulatory activity of water-extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* as a plant adjuvant in vitro and in vivo. *PLOS ONE*, 13(1), e0191356.

Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018b). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine*, 13, 1-26.

Zhang, H., Xiang, Z., Duan, X., Jiang, J.L., Xing, Y.M., Zhu, C., Song, Q.Q., & Yu, Q. (2019). Antitumor and anti-inflammatory effects of oligosaccharides from *Cistanche deserticola* extract on spinal cord injury. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 360–367.

Zheng, S., Zhang, W., & Liu, S. (2020). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides and triterpenoids from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* and evaluation of their in vitro antioxidant capacities. *PLOS ONE*, 15(12), e0244749.

ANNEXES

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



المدرسة الوطنية العليا للفلاحة
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOME

قسم علم النبات
DEPARTEMENT DE BOTANIQUE

الجزائر :
Alger le :

ENSA, 13 janvier 2021

ATTESTATION

Nous attestons par la présente l'identification de l'échantillon apporté par Melle RAHIM Meriem Zohra comme étant *Cistanche phelypaea* (L.) Cout.

La nomenclature adoptée par Quézel et Santa (1962-1963) est validée par l'index synonymique des plantes d'Afrique du Nord et accessible sur le lien suivant : <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/recherche.php?langue=fr>.

Cette attestation est délivrée à la demande de l'étudiante Melle RAHIM Meriem Zohra.

Pour l'herbier ENSA,

Pr. Benhouhou Salima

Annexe 2

- **Protocoles de préparations des extraits pour le screening phytochimique (Qzinvecht, 1983).**

Préparation de l'infusé à 5% : il est préparé à partir de 5g de poudre végétale qui est mise dans 100ml d'eau distillée bouillante pendant 15 min puis la solution est filtrée.

Préparation du décocté à 10%: il a été préparé par la mise de 10g de poudre végétale dans 100ml d'eau bouillante et maintenue sous ébullition pendant 15min puis la solution est filtrée.

Extraction aqueuse à reflux: Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 2 g de matériel végétal sont mis en présence de 30 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à reflux pendant 15 min. Ensuite, le mélange est filtré.

Extraction au chloroforme : 1g de poudre végétale dans 10mL de CHCl_3 sont chauffés au bain marie pendant 3min puis le mélange est filtré.

Extraction par l'éther di-éthylique: 1g de poudre végétale est mise à macérée dans 20ml d'éther pendant 24h et le résidu est récupéré après évaporation.

Extraction par l'éthanol : Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 2 g de poudre végétale est mise en présence de 30 ml d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant 15 min puis le mélange est filtré.

Extraction en milieu acide : Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 h de 10 g de la poudre végétale dans 50 ml de H_2SO_4 à 5% et le mélange a été filtré.

- **Préparation du réactif de Dragendorff**

Dissoudre 2g de KCl et 1,27g d'iode dans 75ml d'eau, puis ajuster le volume à 100ml avec l'eau.

Annexe 3

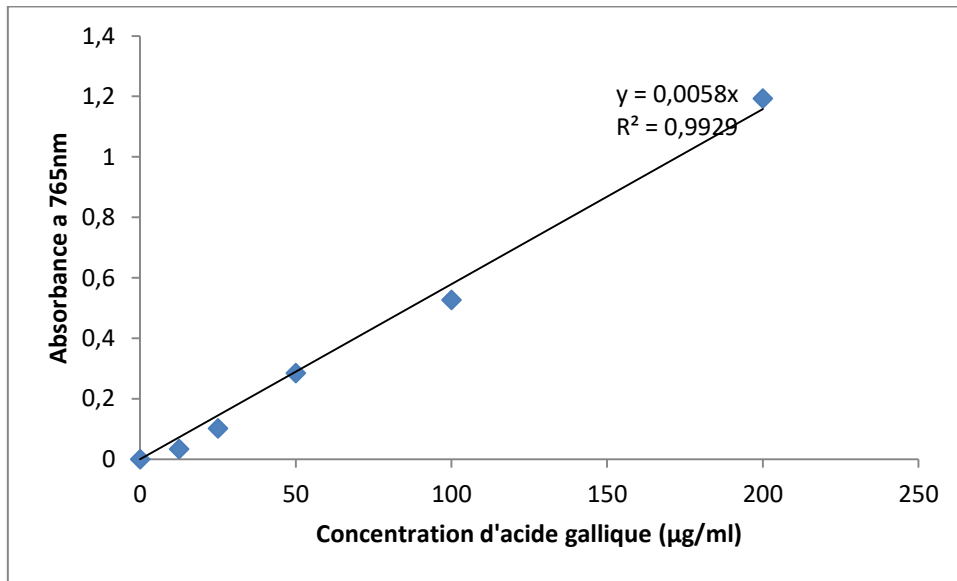


Figure 1 : courbe étalon d'acide gallique.

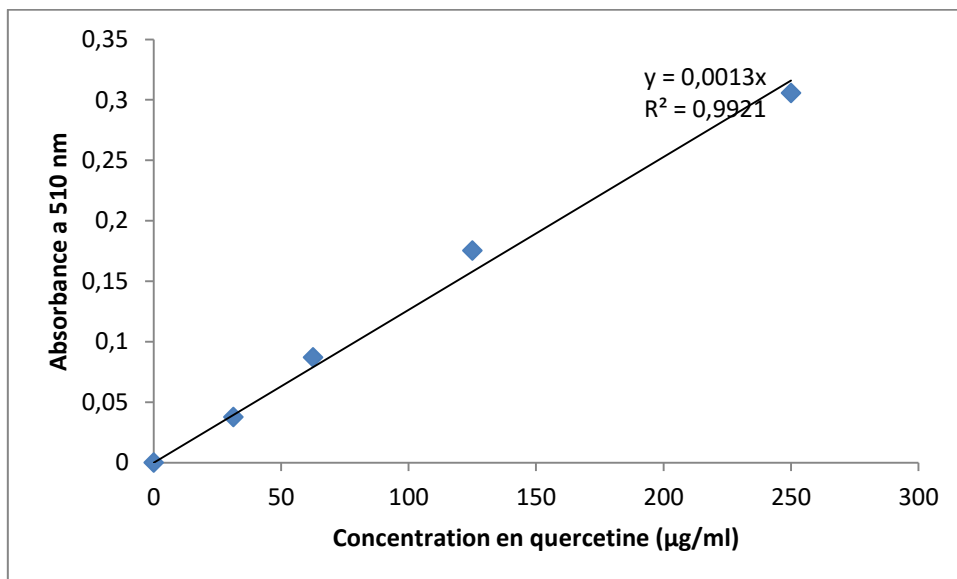


Figure 2 : courbe étalon de quercétine.

Annexe 4

Tableau 1 : Abondance relative des composés identifiés par analyse LC-ESI-QTOF/MS/MS en mode négatif au niveau des trois extraits aqueux. Les résultats sont présentés en moyennes de trois répétitions \pm SEM.

Composé	DEC	INF	MAC
Acide 8-epiloganique (isomère A)	74,45 \pm 2,36	100,44 \pm 1,97	125,09 \pm 3,55
Acide 8-epiloganique (isomère B)	76,01 \pm 2,80	102 \pm 3,40	121 \pm 8,25
Cistanoside F (isomère A)	57,72 \pm 1,59	67,59 \pm 9,42	174,68 \pm 4,78
Cistanoside F (isomère B)	58,43 \pm 2,82	71,67 \pm 8,26	169,89 \pm 1,56
Acteoside	119,04 \pm 1,18	124,01 \pm 10,12	56,93 \pm 17,59
Isoacteoside	153,21 \pm 13,95	80,90 \pm 3,17	65,88 \pm 14
Campenoside II (isomère A)	103,91 \pm 8,13	91,89 \pm 16,39	104,18 \pm 11,06
Campenoside II (isomère B)	99,57 \pm 8,82	92,32 \pm 12,70	108,10 \pm 11,66
2'-Acetylaceoside/tubuloside B	115,19 \pm 1,17	117,66 \pm 12,14	67,15 \pm 16,65
2'-Acetylaceoside/tubuloside B	160,58 \pm 16,61	76,04 \pm 6,17	63,37 \pm 18,05
Echinacoside	91,11 \pm 2,99	104,39 \pm 6,26	104,49 \pm 7,96
Pheliposide	102,24 \pm 28,66	90,72 \pm 10,44	107,037 \pm 27,38
Kankanoside H₁/H₂	90,08 \pm 2,33	107,92 \pm 5,72	101,99 \pm 17,66
Tubuloside A	94,27 \pm 2,82	102,26 \pm 3,85	103 \pm 10,70

Tableau 2 : Abondance relative des composés identifiés par analyse LC-ESI-QTOF/MS/MS en mode positif au niveau des trois extraits aqueux. Les résultats sont présentés en moyennes de trois répétitions \pm SEM.

Composé	DEC	INF	MAC
6-deoxycatalpol	83,46 \pm 21,59	101,04 \pm 11,08	115,49 \pm 18,80
Salidroside	89,30 \pm 10,29	97,49 \pm 9,01	113,20 \pm 12,07
Bartioside	81,59 \pm 12,01	97,61 \pm 17,51	120,79 \pm 20,97
Glucoside	86,59 \pm 10,34	103,38 \pm 10,42	110,02 \pm 17,62
Syringine	78,46 \pm 8,83	91,32 \pm 5	130,20 \pm 6,41
Cistanbuloside C₁/C₂	102,72 \pm 1,16	90 \pm 8,47	107,27 \pm 10,01

Annexe 5

Tableau 1 : Poids corporel moyen (g) des animaux mâles témoins et ceux des lots traités par les extraits aqueux de *C. philipaea* durant les 14 jours de traitement. Les résultats sont présentés en moyennes \pm SEM.

	Poids jours 1 (g)	Poids jours 7 (g)	Poids jours 14 (g)
Témoins	28,17 \pm 0,60	28,67 \pm 0,5578	30,00 \pm 0,5774
DEC 2g/kg de PC	26 \pm 1,69	29,00 \pm 1,506	27,83 \pm 1,740
DEC 5g/kg de PC	28,67 \pm 0,98	30,50 \pm 1,232	28,17 \pm 1,138
INF 2g/kg de PC	26,83 \pm 1,13	28,17 \pm 1,108	27,33 \pm 1,145
INF 5g/kg de PC	27,17 \pm 1,04	28,17 \pm 1,327	1,265 \pm 1,265
MAC 2g/kg de PC	25,83 \pm 1,16	27,83 \pm 1,078	27,17 \pm 1,195
MAC 5g/kg de PC	27 \pm 1	28,17 \pm 0,9804	27,67 \pm 0,6146

Tableau 2 : Poids corporel moyen (g) des animaux femelles témoins et ceux des lots traités par les extraits aqueux de *C. philipaea* durant les 14 jours de traitement. Les résultats sont présentés en moyennes \pm SEM.

	Poids jours 1 (g)	Poids jours 7 (g)	Poids jours 14 (g)
Témoins	24,17 \pm 1,13	24,83 \pm 1,27	26 \pm 1,18
DEC 2g/kg de PC	25,33 \pm 0,88	24,17 \pm 1,01	26 \pm 0,96
DEC 5g/kg de PC	24,67 \pm 0,66	23,50 \pm 0,88	26 \pm 0,68
INF 2g/kg de PC	25,50 \pm 0,88	24,67 \pm 0,88	26,17 \pm 0,83
INF 5g/kg de PC	24,67 \pm 0,49	24,17 \pm 1	26,50 \pm 1,02
MAC 2g/kg de PC	24,50 \pm 0,95	23,83 \pm 0,94	25,83 \pm 0,74
MAC 5g/kg de PC	25,33 \pm 0,80	24,67 \pm 1,05	25 \pm 0,47

Tableau 3 : Poids moyen des organes (g) des animaux mâles témoins et ceux des lots traités par les extraits aqueux de *C. phelipaea* après 14 jours de traitement. Les résultats sont présentés en moyennes \pm SEM.

	Foie	reins	rate	poumons	cœur
Témoins	1,40 \pm 0,03	0,456 \pm 0,015	0,11 \pm 0,004	0,30 \pm 0,01	0,16 \pm 0,009
DEC 2g/kg de PC	1,37 \pm 0,06	0,46 \pm 0,019	0,12 \pm 0,003	0,27 \pm 0,008	0,15 \pm 0,007
DEC 5g/kg de PC	1,39 \pm 0,05	0,43 \pm 0,025	0,12 \pm 0,007	0,29 \pm 0,01	0,17 \pm 0,003
INF 2g/kg de PC	1,43 \pm 0,03	0,46 \pm 0,02	0,12 \pm 0,005	0,28 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01
INF 5g/kg de PC	1,46 \pm 0,04	0,43 \pm 0,01	0,10 \pm 0,003	0,30 \pm 0,005	0,17 \pm 0,008
MAC 2g/kg de PC	1,44 \pm 0,01	0,43 \pm 0,03	0,12 \pm 0,007	0,30 \pm 0,01	0,17 \pm 0,007
MAC 5g/kg de PC	1,40 \pm 0,03	0,45 \pm 0,012	0,11 \pm 0,003	0,30 \pm 0,009	0,15 \pm 0,009

Tableau 4 : Poids moyen des organes (g) des animaux femelles témoins et ceux des lots traités par les extraits aqueux de *C. phelipaea* après 14 jours de traitement. Les résultats sont présentés en moyennes \pm SEM.

	Foie	reins	rate	poumons	cœur
Témoins	1,33 \pm 0,03	0,24 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01
DEC 2g/kg de PC	1,34 \pm 0,13	0,24 \pm 0,01	0,12 \pm 0,009	0,21 \pm 0,02	0,13 \pm 0,005
DEC 5g/kg de PC	1,17 \pm 0,07	0,24 \pm 0,009	0,11 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	0,12 \pm 0,007
INF 2g/kg de PC	1,27 \pm 0,04	0,24 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,13 \pm 0,005
INF 5g/kg de PC	1,16 \pm 0,09	0,26 \pm 0,01	0,12 \pm 0,009	0,23 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01
MAC 2g/kg de PC	1,28 \pm 0,03	0,23 \pm 0,007	0,12 \pm 0,007	0,23 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
MAC 5g/kg de PC	1,181 \pm 0,05	0,25 \pm 0,008	0,12 \pm 0,005	0,19 \pm 0,01	0,13 \pm 0,005

Liste des communications et des publications

Communication internationale

Rahim, M.Z., Benabdelkader, T., Houali, K. Étude comparative de la teneur en composés phénoliques totaux et des activités antioxydantes *in vitro* de différents extraits aqueux de *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. Journées Internationales sur la Biodiversité, l'Environnement et la Biotechnologie 27-28 Avril 2022, Boumerdès Algérie (J I B E B 22).

Communication nationale

Rahim, M.Z., Benabdelkader, T., Houali, K. Comparative studies of total phenolic content and *in vitro* antioxidant activities of different aqueous extracts of *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. *1^{er} Séminaire National sur l'évaluation des activités biologiques des plantes médicinales et docking moléculaire* SNABPMDM-1 organisé par l'Université de Batna-2 à Batna, 22 Mars 2022.

Publication Internationale

Rahim, M. Z., Prinsi, B., Espen, L., Benabdelkader, T., Nabiev, M., & Houali, K. (2022). Comparative analysis of the chemical constituents and *in vitro* antioxidant activities of different aqueous extracts of the *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. from Algeria. *South African Journal of Botany*, 148, 259-267.



Comparative analysis of the chemical constituents and *in vitro* antioxidant activities of different aqueous extracts of the *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. from Algeria

Meriem Zohra Rahim^{a,d}, Bhakti Prinsi^b, Luca Espen^b, Tarek Benabdelkader^a, Mohamed Nabiev^c, Karim Houali^{d,*}

^a Biodiversity, Biotechnology, Environment and Sustainable Development, Department of Biology, Faculty of Sciences, University M'hamed Bougara, Boumerdès 35000, Algeria

^b Department of Agricultural and Environmental Sciences – Production, Landscape, Agroenergy, Università degli Studi di Milano, Via G. Celoria 2, 10133, Milan, Italy

^c Faculty of Hydrocarbons and Chemistry, University M'hamed Bougara, Boumerdès 35000, Algeria

^d Laboratory of Analytical Biochemistry & Biotechnology Research, Faculty of Biological Sciences and Agricultural Sciences, University Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou 15000, Algeria

ARTICLE INFO

Article History:

Received 17 September 2021

Revised 1 February 2022

Accepted 21 April 2022

Available online xxx

Edited by Dr B. Ncube

Keywords:

Cistanche phelypaea

Decoction

Infusion

Cold maceration

LC-ESI-MS/MS

Antioxidant activity

ABSTRACT

Cistanches herba are well-known for their nutritional and therapeutic effects, but only few reports are available about the species *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. and studies of aqueous extracts are scarce. This study aimed to elucidate the impact of aqueous extraction methods including decoction, infusion and cold maceration from *C. phelypaea* roots on phytochemical composition and *in vitro* antioxidant activities of the extracts. In order to accomplish this, determinations of total phenolic and flavonoid contents, liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS and LC/ESI-MS/MS) analyses and *in vitro* antioxidant activity studies were carried out. All extracts had significant levels of total phenolic content, but the decoction possessed the highest concentration and no significant difference was observed between infusion and cold maceration. Concerning flavonoids, decoction and infusion possessed the highest concentrations. Data obtained from LC/ESI-MS and LC/ESI-MS/MS analyses showed similar qualitative profiles for all aqueous extracts with 14 characteristic chromatographic peaks in negative mode and 6 in positive mode, which allowed the tentative identification of syringin, 14 phenylethanoid glycosides and 5 iridoids, including 5 pairs of isomers. However, significant variations were recorded for the relative abundance of some compounds depending on the method that was employed. Hot extraction procedures, decoction and/or infusion were more efficient in extracting acteoside, isoacteoside and two molecules corresponding to isomers of 2'-acetylacteoside/tubuloside B, and it seems that a longer time of heating-extraction was required for an improved extraction of isoacteoside, and one of the two isomers of 2'-acetylacteoside/tubuloside B, as decoction gave a significant higher amount of these compounds. However, 8-epiloganic acid and cistanoside F, with their respective isomers, and syringin were more extractable by the cold maceration process. All extracts had similar antioxidant properties in scavenging DPPH radical and total antioxidant activity assays, with the exception of the ferric-reducing power activity assay, in which cold maceration exhibited a significantly less potent activity. Aqueous extracts of *C. phelypaea* roots present an interesting antioxidant potential which is related to the synergistic effects of several antioxidant compounds.

© 2022 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: A, absorbance; AAEs, ascorbic acid equivalents; ANOVA, analysis of variance; CA, caffeic acid; CE, collision energy; CMA, cold maceration; DEC, decoction; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil; EC₅₀, effective concentration at which the absorbance was 0.5; EIC, extracted ion current; FA, formic acid; FRAP, ferric-reducing antioxidant power; GAEs, gallic acid equivalents; IC₅₀, inhibition concentration 50%; INF, infusion; LC-ESI-MS/MS, liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry; PhG, phenylethanoid glycoside; QEs, quercetin equivalents; RSA, radical-scavenging activity; RT, retention time; SEM, standard error of mean; TAA, total antioxidant activity; TFC, total flavonoid content; TPC, total phenolic content

* Corresponding author.

E-mail address: hualitizi@yahoo.fr (K. Houali).

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.04.041>

0254-6299/© 2022 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The *Cistanche* genus, belonging to the *Orobanchaceae* family, contains 22 species that are perennial parasite plants mainly distributed in arid and semi-arid areas as well as deserts of the northern hemisphere (Jiang and Tu, 2009). Because of its excellent applications in traditional medicine and its nutritional benefits, *Cistanches herba* have been honored as “desert ginseng” (Tian et al., 2017).

Furthermore, pharmacological studies of these species revealed a wide range of biological activities including antiapoptotic (Wat et al., 2016), antihyperglycemic and hypolipidemic (Xiong et al., 2013), hepatoprotective (Guo et al., 2016), neuroprotective (Lin et al., 2008), modulation of the immune response (Zhang et al., 2018) and lifespan extension (Lin et al., 2017). These activities are mainly related to the antioxidant potential of the *Cistanche* species. The main phytochemical constituents of this genus are phenylethanoid glycosides (PhGs), iridoids, oligo- and polysaccharides, lignans, alditols and volatile oils. In particular, PhGs and polysaccharides have been reported to be strongly associated with the observed pharmacological activities of the *Cistanche* species (Jiang and Tu, 2009).

According to Quezel & Santa (1963), the genus *Cistanche* is represented in Algeria by three species: *C. phelypaea* (L.) Cout. (Syn. *C. lutea* (Hoffm.) Link.), *C. violacea* (Desf.) Beck. and *C. mauritanica* (Coss. and Dur.) Beck. *Cistanche phelypaea* is a Saharo-Mediterranean species appreciated for its nutritional and medicinal properties. Given its constant abundance regardless of the rainfall regime, this species was one of the most valuable nutritional sources widely used by nomadic and sedentary populations of the Algerian Sahara during periods of famine and drought (Gast, 2000). Nowadays, it is used as a food condiment and as a remedy for diabetes, abdominal pain, diarrhoea, muscle aches and agalactia (Hammiche and Maiza, 2006). Young roots are the most frequently used; they are consumed as a vegetable after boiling in water or roasting under hot coals. Powders are obtained by drying the macerate obtained after crushing the roots by stones or by drying directly after collection. Furthermore, decoctions are prepared for medical use (Gast, 2000; Bencheleh et al., 2011).

Limited studies have been published about the bioactivities of *C. phelypaea*, reporting *in vitro* antioxidant and anticancer activities (Aboul-Enein et al., 2012; Elkamali and Hamed, 2015). Recently, it was reported that solvent extracts and some purified compounds exhibited inhibitory effects on butyrylcholinesterase, α -glucosidase, α -amylase, tyrosinase and monoacylglycerol lipase enzymes which are involved in some pathological alterations (Beladjila et al., 2018; Trampetti et al., 2019).

The extraction method may have a decisive impact on the phytochemical composition, and consequently the biological activities of the herbal extracts will be influenced. Decoction and infusion are two classical extraction methods that use heating at different contact times. The products are largely consumed, accepted, and added to human food. However, thermal decomposition could reduce the bioactivity of the extracts through the loss of heat-labile substances during the application of these methods. Maceration is another classical procedure without heating and requires a much longer contact time. In this case, as well, obtaining certain active compounds which require heating would be restricted (Pisoschi et al., 2016). Besides that, antioxidant properties of extracts are largely related to the differences in their quantitative and qualitative composition resulting from different extraction settings.

Not much scientific validation has been achieved for this species for its medicinal uses. Taking into account that this species is traditionally exploited in water extracts, the present work was conducted to compare the phytochemical composition and *in vitro* antioxidant capacity of *C. phelypaea* root extracts resulting from various aqueous extraction methods including decoction, infusion and cold maceration.

2. Material and methods

2.1. Plant collection

Young roots of *C. phelypaea* were collected from the Beni Abbes community (30° 4' 48" N, 2° 6' 0" W) located in the South-West of Algeria in January, 2015. This arid area is located in the Grand

Oriental Erg. The specimens belong to *C. phelypaea*. The taxonomic identification of the plant was confirmed by Dr. Rachid Amirouche, a specialist in systematic botany at the University of Sciences and Technology Houari Boumediene, Algiers. The voucher specimen was placed in the Official Herbarium of the National Superior School of Agronomy (ENSA), Algiers, Algeria. The collected plant materials were washed and cut into small pieces, and then air-dried in the shade at room temperature. The dry material was ground to a fine powder and stored carefully until used.

2.2. Preparation of the extracts

Three different aqueous extracts were prepared using the conventional methods of decoction, infusion and cold maceration. To prepare the decoction (DEC), 5 g of the powdered dry roots were added to 200 mL of boiling distilled water, and boiled for 30 min under agitation. To prepare the infusion, (INF) 5 g of the powdered dry roots were added to 200 mL of boiling distilled water, and the mixture was left under agitation for 30 min. For the cold maceration (CMA) process, 5 g of the powdered dry roots were added to 200 mL of cold distilled water and left to macerate under agitation at room temperature for 24 h. After extraction, each extract was filtrated using gauze and centrifuged at 3000g for 30 min. Supernatants were lyophilized and then stored at -20°C for further analysis. Each extraction process was repeated on 3 different samples.

2.3. Phytochemical studies

2.3.1. Determination of total phenolic content

Total phenolic content (TPC) was determined according to the Folin-Ciocalteu method with minor modifications (Singleton et al., 1999). Briefly, a 0.2 mL aliquot, prepared by dissolving each dry extract in distilled water at a concentration of 1 mg/mL was mixed with 1 mL Folin-Ciocalteu phenol reagent and 0.8 mL sodium carbonate solution (7.5%, w/v). After 30 min of incubation in the dark, the absorbance of each mixture was read against a blank at 765 nm. A calibration curve was plotted using gallic acid as standard and total phenolic content was expressed as the mg of gallic acid equivalents/g of dry extract (mg GAEs/g extract).

2.3.2. Determination of total flavonoid content

The total flavonoid content (TFC) was determined using the aluminium trichloride colorimetric method of Subedi et al. (2014) with slight modifications. Therefore, 0.5 mL aliquot, prepared by dissolving each dry extract in distilled water at concentration of 0.5 mg/mL was mixed with 1.5 mL of distilled water and subsequently with 150 μ L of sodium nitrite solution (5%, w/v). After a 5 min interval at room temperature, 150 μ L of aluminium trichloride solution (5%, w/v) was added and allowed to stand for 6 more minutes before 500 μ L of sodium hydroxide solution (4%, w/v) was added. The absorption of the mixture against the blank was immediately recorded at 510 nm. A calibration curve of quercetin was prepared under the same conditions and the total flavonoid content was expressed as mg of quercetin equivalents/g (mg QEs/g extract).

2.3.3. LC-ESI-MS/MS analysis

The phytochemical analysis of the different aqueous extracts of *C. phelypaea* roots was carried out by liquid chromatography - electrospray ionization - (tandem) mass spectrometry (LC-ESI-MS and MS/MS). Freeze-dried powders were dissolved in formic acid (FA) 0.1% (v/v) and filtered onto a sterilized PVDF hydrophilic membrane with pores of 0.45 μ m (Millipore®). After dilution, the samples were analyzed by an Agilent Technologies® 1200 series capillary pump coupled with a dual ESI source on a 6520 Q-TOF mass spectrometer. Briefly, LC runs were performed on a reverse-phase ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (Rapid Resolution HT, 2.1 \times 50 mm, 1.8 μ m, Agilent

Technologies®) in acidic conditions (FA 0.1%, v/v) applying a 43 min linear gradient from 5 to 55% (v/v) of acetonitrile with a flow rate of 150 $\mu\text{L min}^{-1}$. The analysis was performed in both negative and positive acquisition modes. The ESI source was set at 350°C and at 3500 V and 3000 V in positive and negative modes, respectively. Data acquisition was performed within a range from mass to charge (m/z) of 125 to 1500. Chromatographic peak interpretation was performed using the MassHunter Workstation software (version B.03.01, Agilent Technologies®). The compound assignments in negative mode were verified by targeted MS/MS analyses with an isolation width of m/z 4 and fixed collision energy of 30 or 40 V. The MS and MS/MS spectra were interpreted according to literature. The relative quantification of identified compounds was done on MS analyses by extracting the individual EIC (Extracted Ion Current, ± 20 ppm) in negative and positive mode. The amount of each compound was expressed as the relative percentage abundance with respect to the average value among all of the samples. Three samples were analyzed for each type of aqueous extraction (n = 3).

2.4. In vitro antioxidant activity

2.4.1. DPPH radical scavenging assay

A solution of DPPH (0.004%, w/v) radicals was freshly prepared and 1 mL of this solution was added to 1 mL of various concentrations of the extracts (62.5–1000 $\mu\text{g/mL}$). The mixtures were shaken and left to stand for 30 min in the dark. After that the absorbance was measured at 517 nm and the radical-scavenging activity (RSA) (DPPH discoloration) was calculated using the equation: $\text{RSA (\%)} = \frac{(\text{ADPPH} - \text{Asample})}{\text{ADPPH}} \times 100$ (Gurnani et al., 2016). Results were expressed as IC_{50} values, calculated from the graph of RSA percentage against extract concentration. The former correspond to the extract concentration providing 50% of radical-scavenging activity. Ascorbic acid was used as the standard.

2.4.2. Ferric-reducing antioxidant power assay

The ferric reducing power assay (FRAP) was performed according to the method described by Gavamukulya et al. (2014) and Liao et al. (2015). 0.2 mL aliquots were taken from each extract in the range of 15.62 to 1000 $\mu\text{g/mL}$, and then mixed with 500 μL of sodium phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) and 500 μL of potassium ferricyanide solution (1%, w/v). Mixtures were incubated at 50°C in a water bath for 20 min, and 500 μL of trichloroacetic solution (10%, w/v) were added. After that, mixtures were centrifuged at 3000g for 16 min and 700 μL of distilled water were added to 700 μL of the obtained supernatants, then 140 μL of ferric chloride (0.1%, v/v) were added and 10 min later the absorbance was read at 700 nm. The extract concentration that gave 0.5 absorbance (EC_{50}) was calculated from linear regression analysis. Ascorbic acid was used as the standard.

2.4.3. Total antioxidant activity

The total antioxidant activity (TAA) of the aqueous extracts was determined by phosphomolybdenum assay according to the modified method of Do et al. (2014). In brief, an aliquot (0.2 mL) of plant extracts was added to 1.8 mL of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The samples tubes were incubated in a water bath at 90°C for 90 min, then cooled at room temperature and the absorbance was measured at 695nm. A calibration curve was expressed as mg ascorbic acid equivalents/g of extract (mg AAes/g extract).

2.5. Statistical analysis

All the studies were conducted in three independent experiments using triplicate samples (n=3) and the values were averaged and expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). The statistical

significance ($p < 0.05$) was analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey pairwise multiple comparison test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v. 8.0 (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Phytochemical studies

3.1.1. Total phenolic content

The total phenolic content (TPC) of the different aqueous extracts as determined by the Folin-Ciocalteu method and reported as gallic acid equivalents (GAEs, Table 1) showed that the DEC process allowed a significantly higher amount of total phenolics (92.45 \pm 0.73 mg GAEs/g extract) to be obtained. There was no significant difference between INF (79.12 \pm 1.27 mg GAEs/g extract) and CMA (78.59 \pm 4.56 mg GAEs/g extract) procedures suggesting that, in our case, the short heat treatment applied during infusion did not enhance directly the release of phenolic compounds. On the other hand, the contact time of heating might be a predominant factor allowing a greater and better extraction, as exhibited by the larger amount of highly stable phenolic compounds extracted by DEC procedure, in which a longer boiling time is maintained than INF. To the best of our knowledge there are no studies available on TPC of *C. phelypaea*.

3.1.2. Total flavonoid content

The results of total flavonoid content (TFC, Table 1) revealed that DEC and INF extracts had similar amounts of flavonoids (14.26 \pm 0.54 and 14.71 \pm 0.30 mg QEs/g extract) while CMA had the lowest content (9.85 \pm 0.55 mg QEs/g extract). Higher levels of TFC were obtained when extracts were prepared with hot water compared to those obtained at room temperature. This can be related to the high solubility of flavonoids at high temperatures.

In contrast to TPC, it seems that the time of heating did not influence the yield extraction of flavonoids. Moreover, considering that the TFC in INF was found to be higher than that in CMA, it seems that increasing the time of extraction at room temperature did not compensate for the absence of heating. This result does not correspond to that of TPC, since similar amounts of TPC were found in these two extracts, suggesting that other kinds of phenolic compounds might be more extractable by the CMA process. To our knowledge there is no report concerning the flavonoid composition of *C. phelypaea*, that is why there is a particular interest in the study of flavonoids.

3.1.3. LC-ESI-MS/MS analysis

The phytochemical investigation of different aqueous extracts from *C. phelypaea* roots was carried out by LC-ESI-MS, in both negative and positive acquisition modes. The compounds detected in the chromatographic profiles were assigned according to literature (Table 2). Quantifications of the characterized compounds were expressed as the relative percentage abundance for each compound

Table 1
Total phenolic (TPC) and flavonoid (TFC) contents in aqueous roots extracts from *C. phelypaea*.

Extract	TPC (mg GAEs/g extract)	TFC (mg QEs/g extract)
Decoction	92.45 \pm 0.73 ^a	14.26 \pm 0.54 ^a
Infusion	79.12 \pm 1.27 ^b	14.71 \pm 0.30 ^a
Cold maceration	78.59 \pm 4.56 ^b	9.85 \pm 0.55 ^b

Values represent the mean \pm SEM of three separate experiments using triplicate samples in each (n=3). Different superscripted letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$). GAEs, gallic acid equivalents; QEs, quercetin equivalents.

Table 2
Compounds identified in aqueous extracts from roots of *C. phelypaea* by LC-ESI-MS.

N.	Compound	Formula	Formation mode	RT (min)	m/z	References
1	8-epiloganic acid (isomer A)	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	4.69 ± 0.10	375.13	Yoshizawa et al., 1990
2	6-deoxycatalpol	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	[MNH ₄] ⁺	4.76 ± 0.10	364.16	Yoshizawa et al., 1990
			[MNa] ⁺		369.11	
			[MK] ⁺		385.09	
			[2MNa] ⁺		715.24	
3	Salidroside	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	[MNH ₄] ⁺	5.36 ± 0.08	318.15	Yuejie et al., 2017
			[MNa] ⁺		323.11	
			[MK] ⁺		339.08	
4	8-epiloganic acid (isomer B)	C ₂₆ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	5.88 ± 0.12	375.13	Yoshizawa et al., 1990
5	Bartsioside	C ₁₅ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	7.24 ± 0.08	331.14	Yuejie et al., 2017
			[MNH ₄] ⁺		348.16	
			[MNa] ⁺		353.12	
			[MK] ⁺		369.09	
			[2MNa] ⁺		683.25	
6	Cistanoside F (isomer A)	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	8.01 ± 0.17	487.15	Kobayashi et al., 1985
7	Glucoside	C ₁₅ H ₂₄ O ₈	[MNH ₄] ⁺	8.06 ± 0.13	350.18	Yuejie et al., 2017
			[MNa] ⁺		355.14	
			[MK] ⁺		371.11	
			[2MNa] ⁺		687.28	
8	Cistanoside F (isomer B)	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	8.35 ± 0.15	487.15	Tao et al., 2018 Quirantes-piné et al., 2009
9	Syringin	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	[MNH ₄] ⁺	11.10 ± 0.06	390.17	Yuejie et al., 2017
			[MNa] ⁺		395.13	
			[MK] ⁺		411.10	
			[2MNa] ⁺		767.27	
10	Cistantubuloside C ₁ /C ₂	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₁	[MNH ₄] ⁺	15.68 ± 0.11	820.28	Yuejie et al., 2017
			[MNa] ⁺		825.24	
11	Acteoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	19.74 ± 0.10	623.20	Kobayashi et al., 1985
12	Isoacteoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	20.85 ± 0.09	623.20	Kobayashi et al., 1985
13	Campneoside II (isomer A)	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	[M-H] ⁻	16.97 ± 0.13	639.19	Imakura et al., 1985
14	Campneoside II (isomer B)	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	[M-H] ⁻	17.15 ± 0.13	639.19	Imakura et al., 1985
15	2'-acetylacteoside/Tubuloside B	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	[M-H] ⁻	22.58 ± 0.10	665.21	Li et al., 2016b
16	2'-acetylacteoside/Tubuloside B	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	[M-H] ⁻	24.09 ± 0.12	665.21	Li et al., 2016b
17	Echinacoside	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	[M-H] ⁻	17.41 ± 0.13	785.25	Kobayashi et al., 1985
18	Pheliposide	C ₃₆ H ₄₆ O ₂₀	[M-H] ⁻	21.85 ± 0.10	797.25	Jedrejek et al., 2020
19	Kankanoside H ₁ /H ₂	C ₃₇ H ₄₈ O ₂₀	[M-H] ⁻	21.25 ± 0.08	811.27	Morikawa et al., 2010
20	Tubuloside A	C ₃₇ H ₄₈ O ₂₁	[M-H] ⁻	19.93 ± 0.10	827.26	Tao et al., 2018 Chen et al., 2018

N.: chromatographic peak number. Formation mode: ions selected in negative (−) or positive (+) acquisition mode. RT: retention time (min). m/z: mass to charge ratio of the selected ion.

in the three different aqueous extracts, detected in negative and positive acquisition modes (Fig. 1 and 2). These results highlighted some quantitative variations in the chemical profiles of the three different aqueous extracts, DEC, INF and CMA.

In our study, the mass spectrometry analysis in negative mode revealed a complex pattern with 14 compounds, whereas in positive mode 6 compounds were detected. From a qualitative point of view, the analyses showed similar compositions of PhGs and iridoid

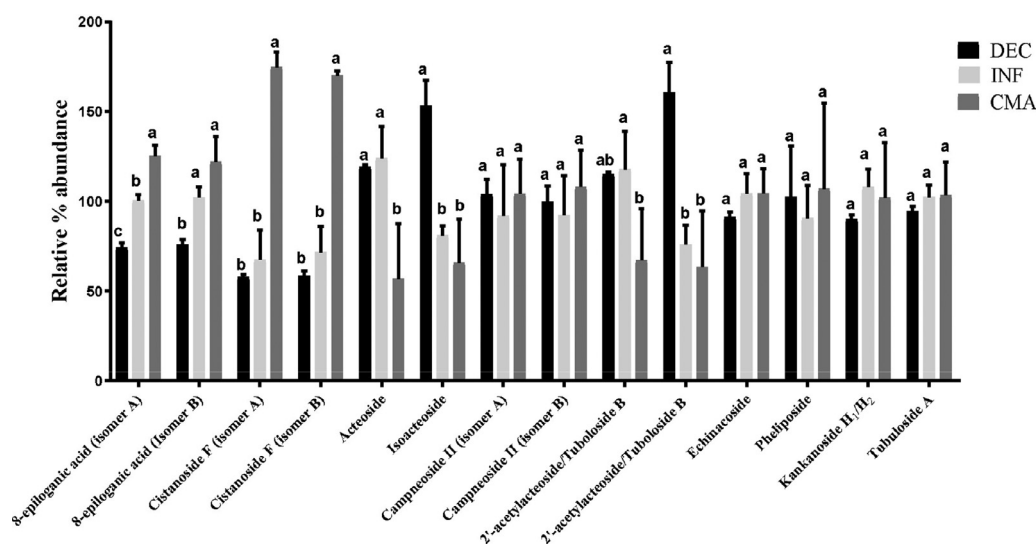


Fig. 1. Relative percent abundance of the identified compounds in different aqueous extracts from *C. phelypaea* roots by LC-ESI-MS analysis in negative acquisition mode.

DEC: decoction; INF: infusion; CMA: cold maceration. Values are the mean ± SEM (n=3). Different letters indicated significant differences assigned according to one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$).

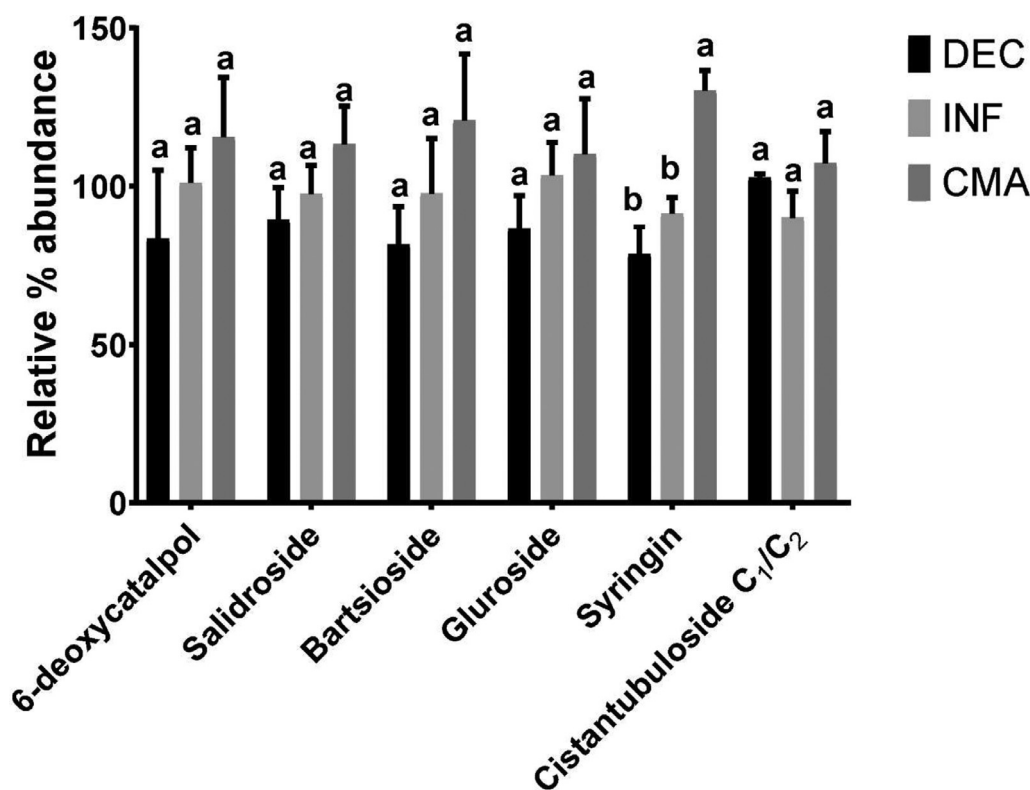


Fig. 2. Relative percent abundance of the identified compounds in different aqueous extracts from *C. phelypaea* roots by LC-ESI-MS analysis in positive acquisition mode.

DEC: decoction; INF: infusion; CMA: cold maceration. Values are the mean \pm SEM ($n=3$). Different letters indicated significant differences assigned according to one-way ANOVA and Tukey's *post-hoc* test ($p < 0.05$).

glycosides for the three different aqueous extracts. This observation is consistent with the previous phytochemical analysis of *Cistanche herba*, reporting that these compounds together with lignans, alditols, oligosaccharides and polysaccharides are the major phytochemical constituents of this genus (Jiang and Tu, 2009; Liu et al., 2013; Bougandoura et al., 2016; Song et al., 2016; Ahn et al., 2017; Yan et al., 2017; Fu et al., 2018).

The MS spectra of PhGs and iridoid glycosides showed that the analytes were detectable in positive mode as adducts with inorganic ions, such as $[\text{MNH}_4]^+$, $[\text{MNa}]^+$ and $[\text{MK}]^+$ (Table 2), as already highlighted for PhGs by other authors (Jiang et al., 2009). Probably, this behavior may have been further reinforced by the water-based extraction procedures adopted in our study. Conversely, in negative mode the prominent signals were observed as $[\text{M-H}]^-$ (Table 2), as previously reported (Song et al., 2019).

The chemical profiles obtained in negative ionization mode revealed the presence of compounds with the same molecular ions but different retention times (RTs, Table 2). In order to obtain additional information about these profiles, we performed an LC-ESI-MS/MS analysis (Table 3). In particular, it was possible to detect 5 pairs of isomers (compounds 1-4, 6-8, 11-12, 13-14 and 15-16), each of those couples having the same molecular ion and fragmentation profile. The LC-ESI-MS/MS analysis did not reveal any structural differences between isomers, indicating that other strategies, such as multiple MS analyses, NMR or the use of specific standards will be required for further characterization.

PhGs are water soluble compounds belonging to the polyphenols with a chemical structure characterized by a phenethyl alcohol ($\text{C}_6\text{-C}_2$) moiety linked to β -glucopyranose/ β -allopyranose. In addition, substituents like aromatic acids and sugars are often linked to the core structure by ester or glycosidic linkages (Xue and Yang, 2016). Generally, PhGs of *Cistanche herba* are found as monosaccharide, disaccharide or trisaccharide glycosides. Moreover, a peculiar characteristic in this genus is that the PhG disaccharide form generally

comprises a Glucose (3 \rightarrow 1) Rhamnose linkage, where the glucose linked to the aglycone is usually substituted at C_4 or C_6 by a caffeoyl or coumaroyl moiety, while at the C_6 position, an additional glucose, or rhamnose, appears in the case of the trisaccharide glycosides (Jiang and Tu, 2009). Until now, 69 PhGs have been identified by HPLC-LTQ-orbitrap-MS through the analysis of three different species (Fu et al., 2018).

To specify, we were able to identify two monoglycosides in the positive mode analysis, corresponding to the PhG salidroside (compound 3) and syringin (compound 9) (Table 2).

In addition, 4 pairs of caffeoylated PhGs disaccharides were tentatively identified in the negative mode, each of them corresponding to a pair of isomers (compound 6-8, 11-12, 13-14 and 15-16). The MS/MS profile of these compounds is marked by the presence of at least one of the fragments at 179, 161 and 135 m/z , which were derived from the cleavage of a caffeic acid moiety (CA), and its subsequent dehydration and decarboxylation, respectively (Table 3, Wang et al., 2009). Consequently, the compounds 6 and 8 were identified as cistanoside F and its isomer. Interestingly, we were able to discriminate among the second pair of isomers, assigning the compound 11 to acteoside and the compound 12 to isoacteoside on the basis of their RTs (Table 3) and relative abundance (unpublished results). Indeed, according to what was proposed by different authors through the use of authentic standards, in reverse phase chromatography the former elutes first and is one of the major PhGs in the *Cistanche* species (Han et al., 2012; Shi et al., 2013; Cui et al., 2016; Li et al., 2016a). Moreover, the pair 13-14 was assigned to campneoside II and its isomer. This molecule is a β -hydroxylated form of acteoside that follows the typical fragmentation mode of the acteoside-type PhGs, with the exception of a distinctive ion at 151 m/z corresponding to a dehydrophenethanol moiety (Shi et al., 2013). Finally, compounds 15-16 were assigned to 2'-acetylacteoside/tubuloside B. According to the study of Li et al. (2016b), on the basis of the different RTs it is possible to speculate that the first chromatographic peak corresponds to 2'-

Table 3Compounds identified in aqueous extracts from roots of *C. phelypaea* by LC-ESI-MS/MS analysis in negative mode.

N.	Compound	RT (min)	[M-H] ⁻ m/z	CE(V)	Fragment ions (m/z)	References
1	8-epiloganic acid (isomer A)	4.69 ± 0.10	375.13	30	213.07 - 169.08 - 151.07	Li et al., 2016b Song et al., 2016
4	8-epiloganic acid (isomer B)	5.88 ± 0.12	375.13	30	213.07 - 169.08 - 151.07	Li et al., 2016b Song et al., 2016
6	Cistanoside F (isomer A)	8.01 ± 0.17	487.15	30	179.03 - 161.02 - 135.04	Li et al., 2016b
8	Cistanoside F (isomer B)	8.35 ± 0.15	487.15	30	179.03 - 161.02 - 135.04	Li et al., 2016b
11	Acteoside	19.74 ± 0.10	623.20	40	461.16 - 161.02 - 135.04	Cui et al., 2016 Li et al., 2016a
12	Isoacteoside	20.85 ± 0.09	623.20	40	461.16 - 161.02 - 135.04	Cui et al., 2016 Li et al., 2016a
13	Campneoside II (isomer A)	16.97 ± 0.13	639.19	30	621.17 - 529.14 - 459.14 179.03 - 161.02 - 151.03	Song et al., 2016 Shi et al., 2013
14	Campneoside II (isomer B)	17.15 ± 0.13	639.19	30	621.17 - 529.14 - 459.14 179.03 - 161.02 - 151.03	Song et al., 2016 Shi et al., 2013
15	2'-acetylacteoside/ Tubuloside B	22.58 ± 0.10	665.21	30	503.16 - 461.16 - 161.02	Li et al., 2016b Shi et al., 2013
16	2'-acetylacteoside/ Tubuloside B	24.09 ± 0.12	665.21	30	503.16 - 461.16 - 161.02	Li et al., 2016b Shi et al., 2013
17	Echinacoside	17.41 ± 0.13	785.25	40	623.21 - 161.02	Li et al., 2016b
18	Pheliposide	21.85 ± 0.10	797.25	40	635.21 - 593.20 - 161.02	Jedrejek et al., 2020
19	Kankanoside H ₁ /H ₂	21.25 ± 0.08	811.27	40	769.25 - 665.22 - 647.21 623.21 - 605.20 - 477.16 145.03	Zhang et al., 2015
20	Tubuloside A	19.93 ± 0.10	827.26	40	665.22 - 623.21 - 161.02	Li et al., 2016b Song et al., 2016

RT: retention time (min). [M-H]⁻: mass to charge ratio (m/z) of the precursor ion. CE: collision energy (V).

acetylacteoside and the second one to tubuloside B. However, further studies are needed to verify this hypothesis.

Four PhGs trisaccharides were also identified in negative mode (Table 3). The first was echinacoside (compound 17), another major PhG along with acteoside in *Cistanche* species, while compound 20 was assigned to tubuloside A, an acetylated derivative of echinacoside. Compound 19 was assigned to kankanoside H₁/H₂ on the basis of an acetylated substitution and a coumaroyl moiety indicated in the MS/MS profile by the sequential losses of -42 m/z and by the diagnostic ion at 145 m/z, respectively (Table 3, Morikawa et al., 2010; Li et al., 2014). At the same time, compound 18 was identified as pheliposide. This molecule differs with respect to tubuloside A in being substituted by xylose rather than glucose (Andary et al., 1985). Based on the classical fragmentation mechanism of PhGs, we can suppose that pheliposide during fragmentation produced the ion at 635 m/z by losing its CA moiety, and the ion 593 m/z by the concurrent losses of CA and acetyl at C₂ position (Table 3). Finally, a caffeoylated trisaccharide PhG was identified as cistantubuloside C₁/C₂ (compound 10) in positive mode (Table 2).

In addition to PhGs, our results also allowed the characterization of five iridoids. This family is considered to be one of the most numerous cyclopentanoid monoterpene derivatives, and it occurs in the glycosides and aglycosides forms comprised in the *Cistanche* species (Bianco, 1994; Jiang and Tu, 2009). Three iridoid glycosides were found in positive mode by the LC/MS analysis, corresponding to 6-deoxycatalpol (compound 2), bartsioside (compound 5) and gluoside (compound 7) (Table 2). Moreover, one iridoid and its isomer were characterized in negative mode LC-ESI-MS/MS as 8-epiloganic acid (compounds 1-4) due to the neutral losses of glucose residue (213 m/z) and CO₂ (169 m/z, Table 3).

The majority of the phytochemical studies of *Cistanche* herba have focused on the *C. tubulosa*, *C. deserticola* and *C. sinensis* species but only a few reports about the *phelypaea* species are available. Our results are consistent with surveys showing mainly the same compounds (Melek et al., 1993; Deyama et al., 1995; Trampetti et al., 2019). In addition, cistanoside F, campneoside II, kankanoside H₁/H₂, cistantubuloside C₁/C₂ and 8-epiloganic acid are reported herein for the first time in this species. Until now, and to the best of our knowledge, pheliposide was reported only in the species *C. phelypaea* (Melek et al., 1993). Nonetheless, Deyama et al. (1995) as well as

Trampetti et al. (2019), who studied the aerial parts from Qatar and the whole flowering plant from Portugal respectively, did not report its identification in *C. phelypaea*. However, these studies employed different periods of collection, as well as different solvents and methods of extraction and analysis. Overall, considering the fact that despite the large number of phytochemical studies pheliposide was not isolated or identified in other *Cistanche* species (Fu et al., 2018), it is possible to propose the use of this molecule as a typical chemotaxonomical marker of *C. phelypaea* within the *Cistanche* genus, at least for the root organ.

At the same time, in our study we could not identify the compounds tubuloside E and ajugol, previously described by Deyama et al. (1995); this can be due to several factors, including solvent extraction, plant organ, and/or the period of collection. In fact, these two compounds have been identified in the methanolic extract from the aerial parts of *C. phelypaea* collected in March. Interestingly, this difference suggests a possible variability in the synthesis of these secondary metabolites, according to the organ and stage of plant growth. In support of this hypothesis, Trampetti et al. (2019) have reported a variation in the secondary metabolite composition of the water extracts from different organs of *C. phelypaea*, showing that PhGs, dominated by echinacoside, were found mainly in roots while iridoids, i.e., bartsioside, ajugol and gluoside, were more abundant in flowers. They also mentioned that the *C. phelypaea* stems contained both PhGs (essentially tubuloside A and 2'-acetylacteoside) and iridoids. Recently, four new PhGs, trisaccharide glycosides carrying coumaroyl substituents have been isolated from a butanolic extract of the aerial part of *C. phelypaea*, growing in the southwest of Algeria (Beladjila et al., 2018).

As we have described, in our study the same qualitative chromatographic pattern was found for all the three kinds of extraction. However, an obvious difference was observed in the relative abundance for some compounds. These compounds include 8-epiloganic acid and its isomer, cistanoside F and its isomer, as well as acteoside, isoacteoside, two isomers of 2'-acetylacteoside/tubuloside B and syringin (Fig. 1 and 2).

The compounds acteoside, isoacteoside and 2'-acetylacteoside/tubuloside B were significantly higher in abundance in DEC and/or INF than in CMA (Fig. 1). This can be attributed to their high solubility in hot water. In addition, isoacteoside and one of the two isomers of

2'-acetylacteoside/tubuloside B were extracted more efficiently by DEC than INF (Fig. 1). These results suggest the requirement of a longer contact time in water at boiling temperature for a better extraction of these PhGs disaccharides. Interestingly, in this case, all of these compounds, having an identical behavior in modified temperature extraction procedures, are structurally homologous. Their chemical structures are similar, since they all consist of three chemical moieties: CA, hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenethyl alcohol) phenylethanoid aglycone, and rhamnose.

However, the CMA procedure showed more efficiency in the extraction of 8-epiloganic acid and cistanoside F, with their respective isomers (Fig. 1) and syringin (Fig. 2). These results suggest that the 8-epiloganic acid, cistanoside F and syringin are extractable mainly at an ambient temperature because of their thermal instability.

3.2. *In vitro* antioxidant activities

Several pathological alterations such as cancer, diabetes, degenerative disorders and inflammation are strongly related to oxidative stress, which is the result of an imbalance between endogenous body antioxidant systems and free radical production, leading to the cellular damage of macromolecules (Kohen and Nyska, 2002). Thus, exogenous antioxidant compounds taken as food and as extracts from medicinal plants may support the endogenous body antioxidant systems to fight oxidative damage and, consequently, can be used as chemopreventive and reducing agents against oxidative stress-induced alterations (Costamagna et al., 2013).

The evaluation of the broad antioxidant activities of plant extracts needs several antioxidant test systems because of the phytochemical complexity of bioactive compounds that respond in a different manner to the variable assay mechanisms. For this purpose, three *in vitro* antioxidant methods were used to evaluate both the scavenging and reducing ability of the aqueous extracts from *C. phelypaea* roots.

3.2.1. DPPH radical scavenging activity

Assessment of the scavenging potential was performed by the widespread DPPH system. This standard and easy colorimetric method reflects the scavenging property of an antioxidant molecule, through its ability to transfer both the hydrogen atom or electron to the stable nitrogen radical DPPH \cdot (purple) which is reduced to DPPH $_2$ (yellow), resulting thus in absorbance change. The measurement of the amount of unreacted DPPH \cdot is correlated to the antioxidant's capacity.

Our results showed that the DPPH assay revealed a marked scavenging potential of the different aqueous extracts, as increased concentration improved the percentage inhibition of the DPPH radical in a dose-dependent manner (unpublished results). Estimation and comparison of sample scavenging activities were carried out by IC $_{50}$ values. As shown in Table 4, no difference between them indicates that aqueous roots extracts of *C. phelypaea* exhibited the same scavenging potential in the DPPH system. Our results are in agreement with previous studies which reported high radical scavenging

activities towards the DPPH radical for different extracts of *Cistanches herba* (Elkamali and Hamed, 2015; Peng et al., 2016; Wang et al., 2017).

Comparative solvent extraction studies for *C. phelypaea* have shown that the best DPPH radical scavenging potential is exerted by the water extracts of different parts as well as of the whole plant (Aboul-Enein et al., 2012; Trampetti et al., 2019). In addition, studies performed by Trampetti et al. (2019) regarding the scavenging activity of stems, roots and flowers of *C. phelypaea* towards different radicals revealed that the water extracts from roots showed the highest DPPH scavenging potential with an IC $_{50}$ value of 0.37mg/mL, which is higher than our IC $_{50}$ for the three aqueous extracts found in the current study.

Compounds identified in our study, mainly PhGs, have been reported to exert from moderate to potent scavenging activity when isolated from the *Cistanche* genus and other plants, as some of them have shown equal or lower IC $_{50}$ values than standards like α -tocopherol and BHT (Xiong et al., 1996; Si et al., 2013). Furthermore, the sequence of the strength of the scavenging potential for these compounds was variable. For instance, Xiong et al. (1996) have isolated 9 PhGs from *C. deserticola*, among which tubuloside B was shown to have the strongest DPPH scavenging potential. At the same time, 2'-acetylacteoside has been reported to exhibit the best scavenging potential among 6 PhGs isolated from *C. salsa* (Yang et al., 2009). In these studies, the scavenging potential of molecules has been related to the presence of catechol groups, the number and position of hydroxyl groups, the presence of 2-acetyl in the middle glucopyranose, and steric hindrance. Jedrejek et al. (2020) also reported that PhGs with the caffeoyl moiety exhibited stronger scavenging activities than those with feruloyl and *p*-coumaroyl ones.

Iridoids have also been reported to exert a DPPH scavenging potential, which is increased by dihydroxybenzoyl and caffeoyl substitutions (Jensen et al., 2010).

3.2.2. Ferric-reducing antioxidant power assay

The FRAP assay was carried out in order to evaluate the ability of the different aqueous extracts to reduce the ferric ion (Fe $^{+3}$) to ferrous (Fe $^{+2}$). Similarly to the DPPH system assay, the reducing activity increased by increasing sample concentration (unpublished results) indicating a good reducing power of the analytes.

As we can see from the EC $_{50}$ values displayed in Table 4, no significant difference was observed in the EC $_{50}$ values of DEC and INF, indicating similar reducing potentials. However, CMA extract exhibited a significantly lower reducing power among the samples, suggesting that some antioxidant molecules might be extracted better by hot water. Earlier studies revealed a good reducing power by the FRAP assay for different *Cistanches herba* extracts (Xiong et al., 2013; Peng et al., 2016; Piwowarczyk et al., 2020). Nevertheless, the data from these studies cannot be compared to ours, because the values were expressed differently. So far, to the best of our knowledge, no studies have been conducted on the potency reduction of the *phelypaea* species. The reducing capacity of plant extracts is related to the oxidizability of the chemical compounds that are able to transfer

Table 4
Antioxidant activities of different aqueous extracts from *C. phelypaea* roots.

Extract	DPPH scavenging activity IC $_{50}$ (μ g/mL)	FRAP assay EC $_{50}$ (μ g/mL)	TAA assay mg AAEs/g extract
Decoction	19.545 \pm 0.993 ^a	321.6 \pm 6.87 ^b	319.93 \pm 3.26 ^a
Infusion	19.061 \pm 0.211 ^a	327.8 \pm 16.01 ^b	326.92 \pm 10.64 ^a
Cold maceration	22.748 \pm 1.498 ^a	458.6 \pm 20.56 ^a	324.21 \pm 5.78 ^a
Ascorbic acid	02.20 \pm 0.068 ^b	100 \pm 01.05 ^c	-

Values represent the mean \pm SEM of three separate experiments using triplicate samples (n=3). Different superscripted letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$). DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil; FRAP, ferric-reducing antioxidant power; TAA, total antioxidant activity; IC $_{50}$, inhibition concentration 50%; EC $_{50}$, Effective concentration at which the absorbance was 0.5; AAEs, ascorbic acid equivalents.

electrons, and it was reported that the most efficient reducing capacity is obtained by compounds extracted with water from different plants (Wong et al., 2006; Akhtar et al., 2018).

3.2.3. Total antioxidant activity

TAA was evaluated by the phosphomolybdenum method, based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the extract at acidic pH. All the tested extracts showed a great antioxidant capacity with no significant difference in their values (Table 4). To the best of our knowledge, no TAA values have previously been reported for *C. phelypaea*.

Our results show a similar trend of TAA and DPPH tests. However, despite the fact that FRAP and TAA are based on the reduction properties of compounds different trends were obtained in this study, indicating that different reaction conditions, as well as different metal reducible ions, involve different antioxidant molecules contained in the extracts.

Generally, our results suggest that the quantitative differences in some PhG and iridoid abundances determined by LC-ESI-MS (Fig. 1 and 2) as well as in the amounts of TPC and TFC (Table 1) in the three water extracts did not influence their antioxidant potential, except for the FRAP assay. Overall, several authors reported that phenolic compounds are not permanently associated with the antioxidant potential of a sample and that other compounds are also good antioxidants. Wang et al. (2017) showed a positive correlation between total PhG content and antioxidant activity of cultivated *C. deserticola*. However, certain samples with high PhG content, such as inflorescence, axis and corolla extracts, did not show a high antioxidant potential.

Despite the quantitative differences for some compounds highlighted by LC-ESI-MS (8-epiloganic acid and isomer, isoacteoside, and 2'-acetylacteoside or isomer tubuloside B, Fig. 1) and in the TPC (Table 1), similar behaviors were observed in all tested antioxidant systems for hot extraction methods (DEC and INF), suggesting that the time of heating-extraction had no effect on the antioxidant capacity. However, when we considered the temperature parameter for water extraction, we were able to find that CMA had less extractive ability than hot processes for some molecules (i.e. acteoside, isoacteoside, 2'-acetylacteoside/tubuloside B and TPC/TFC, Table 1 and Fig. 1). CMA also exhibited lower ferric reducing capacity, a result probably indicating that the higher antioxidant activity of extracts obtained with hot water can be mainly attributed to those compounds. Nevertheless, CMA showed the same potential as hot procedures in scavenging the DPPH radical as well as in the TAA tests. These results most likely reflect that the antioxidant compounds of the extract act in a complementary and synergistic manner. In fact, although CMA is not as effective as hot methods in the extraction of the previously mentioned compounds, it seems that other compounds (8-epiloganic acid isomers, cistanoside F isomers and syringin) are more extractable by this method, and, interestingly, all of them have been described as good DPPH scavengers (Pan and Hori, 1996; Us et al., 2015).

Finally, it is possible that other bioactive compounds contained in the crude extracts, that have not been identified in our analysis and that contribute to antioxidant capacity, were differentially extracted, during the three tested procedures. In fact, the extraction of polysaccharides known as major constituents of *Cistanches herba* is influenced by temperature. Zhang et al. (2016) demonstrated that the increase in temperature between 30 to 50 °C during 40 min increases polysaccharide yield from *C. tubulosa* stems. Additionally, it was found that these polysaccharides exert a considerable antioxidant activity.

4. Conclusion

In this study, the obtained results revealed that aqueous extracts from *C. phelypaea* roots prepared by decoction, infusion and cold

maceration methods showed the same qualitative PhG and iridoid phytochemical profiles when analyzed by the LC-ESI-MS analysis. Nonetheless, quantitative differences in the abundance of some individual compounds as well as in phenolic and flavonoid contents were observed. Interestingly, the influence of temperature and the extraction time was not related to significant variations in antioxidant capacity, except for the cold macerate which showed the weakest ferric reducing power. Altogether, our findings suggest a synergistic antioxidant effect of the phytochemical components of these complex mixtures, although further studies should be performed to identify other antioxidant compounds of interest from these extracts. Decoction and infusion preparations can be used as good alternative dietary supplements, and along with maceration, these procedures can provide pharmaceutical, nutritional and cosmetic products.

Funding

This research is supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research. Algeria.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors are grateful to Dr. Antonio Servadio and Dr. Djamel Mes-saoudene for their precious help during the research.

References

- Aboul-Enein, A.M., El-Ela, F.A., Shalaby, E.A., El-Shemy, H.A., 2012. Traditional medicinal plants research in Egypt: Studies of antioxidant and anticancer activities. *J. Medicinal Plants Res.* 6, 689–703.
- Ahn, J., Chae, H.-S., Chin, Y.-W., Kim, J., 2017. Dereplication-guided isolation of new phenylpropanoid-substituted diglycosides from *Cistanche salsa* and their inhibitory activity on NO production in macrophage. *Molecules* 22, 1138.
- Akhtar, N., Haq, I.-U., Mirza, B., 2018. Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian J. Chem.* 11, 1223–1235.
- Andary, C., Privat, G., Wylde, R., Heitz, A., 1985. Pheliposide et arenarioside, Deux nouveaux esters hétérosidiques de l'acide caféique isolés de *Orobanché arenaria*. *J. Nat. Prod.* 48, 778–783.
- Beladjila, K.A., Berrehal, D., De Tommasi, N., Granchi, C., Bononi, G., Braca, A., De, Leo, M., 2018. New phenylethanoid glycosides from *Cistanche phelypaea* and their activity as inhibitors of monoacylglycerol lipase (MAGL). *Planta Med.* 84, 710–715.
- Benchehla, A.-C., Bouziane, H., Maka, M., Ouahes, C., Monod, T., 2011. Fleurs du Sahara: Voyage Ethnobotanique avec les Touaregs du Tassili, Second ed. Ibis Press, Paris.
- Bianco, A., 1994. Recent developments in iridoids chemistry. *Pure Appl. Chem.* 66, 2335–2338.
- Bougandoura, A., D'Abrosca, B., Ameddah, S., Scognamiglio, M., Mekkiou, R., Fiorentino, A., Benayache, S., Benayache, F., 2016. Chemical constituents and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. *Fitoterapia* 109, 248–253.
- Chen, X., Deng, Z., Huang, X., Geng, C., Chen, J., 2018. Liquid chromatography–mass spectrometry combined with xanthine oxidase inhibition profiling for identifying the bioactive constituents from *Cistanche deserticola*. *Int. J. Mass spectrom.* 430, 1–7.
- Costamagna, M.S., Ordoñez, R.M., Zampini, I.C., Sayago, J.E., Isla, M.I., 2013. Nutritional and antioxidant properties of *Geoffroea decorticans*, an Argentinean fruit, and derived products (flour, arropo, decoction and hydroalcoholic beverage). *Food Res. Int.* 54, 160–168.
- Cui, Q., Pan, Y., Xu, X., Zhang, W., Wu, X., Qu, S., Liu, X., 2016. The metabolic profile of acteoside produced by human or rat intestinal bacteria or intestinal enzyme *in vitro* employed UPLC-Q-TOF-MS. *Fitoterapia* 109, 67–74.
- Deyama, T., Yahikozawa, K., Al-Easa, H.S., Rizk, A.M., 1995. Constituents of plants growing in Qatar: part xxviii. Constituents of *Cistanche phelypaea*. *Qatar Univ. Sci. J.* 15, 51–55.
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.-H., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food and Drug Anal.* 22, 296–302.
- Elkamali, H.H., Hamed, S.E.M., 2015. Antioxidant potential of some Sudanese medicinal plants used in traditional medicine. *Int. J. Scientific World* 3, 192–198.
- Fu, Z., Fan, X., Wang, X., Gao, X., 2018. *Cistanches Herba*: an overview of its chemistry, pharmacology, and pharmacokinetics property. *J. Ethnopharmacol.* 219, 233–247.

- Gast, M., 2000. Moissons du désert: utilisation des ressources naturelles en période de famine au Sahara central. Ibis Press, Paris.
- Gavamukulya, Y., Abou-Elella, F., Wamunyokoli, F., AEI-Shemy, H., 2014. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and *in vitro* anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific J. Tropical Med.* 7, S355–S363.
- Guo, Y., Cao, L., Zhao, Q., Zhang, L., Chen, J., Liu, B., Zhao, B., 2016. Preliminary characterizations, antioxidant and hepatoprotective activity of polysaccharide from *Cistanche deserticola*. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 678–685.
- Gurnani, N., Gupta, M., Mehta, D., Mehta, B.K., 2016. Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). *J. Taibah. Univ. Med. Sci.* 10, 462–470.
- Hamliche, V., Maiza, K., 2006. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.* 105, 358–367.
- Han, L., Boakye-Yiadom, M., Liu, E., Zhang, Y., Li, W., Song, X., Fu, F., Gao, X., 2012. Structural characterisation and identification of phenylethanoid glycosides from *Cistanches deserticola* Y.C Ma by UHPLC/ESI–QTOF–MS/MS. *Phytochem. Anal.* 23, 668–676.
- Imakura, Y., Kobayashi, S., Mima, A., 1985. Bitter phenyl propanoid glycosides from *Campsis chinensis*. *Phytochemistry* 24, 139–146.
- Jedrejek, D., Pawelec, S., Piwowarczyk, R., Pecio, Ł., Stochmal, A., 2020. Identification and occurrence of phenylethanoid and iridoid glycosides in six Polish broomrapes (*Orobanchae* spp. and *Phelipanche* spp., Orobanchaceae). *Phytochemistry* 170, 112189.
- Jensen, S.R., Gotfredsen, C.H., Harput, U.S., Saracoglu, I., 2010. Chlorinated iridoid glucosides from *Veronica longifolia* and their antioxidant activity. *J. Nat. Prod.* 73, 1593–1596.
- Jiang, Y., Li, S.P., Wang, Y.T., Chen, X.J., Tu, P.F., 2009. Differentiation of Herba Cistanches by fingerprint with high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 2156–2162.
- Jiang, Y., Tu, P.-F., 2009. Analysis of chemical constituents in *Cistanche* species. *J. Chromatogr. A* 1216, 1970–1979.
- Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T., Fukushima, S., 1985. Studies on the constituents of Cistanchis herba. V. Isolation and structures of two new phenylpropanoid glycosides, cistanosides E and F. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 1452–1457.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30, 620–650.
- Li, C., Liu, Y., Abdulla, R., Aisa, H.A., Suo, Y., 2014. Characterization and identification of chemical components in *Neopicrorhiza scrophulariiflora* roots by liquid chromatography–electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* 6, 3634.
- Li, Y., Zhou, G., Peng, Y., Tu, P., Li, X., 2016a. Screening and identification of three typical phenylethanoid glycosides metabolites from Cistanches Herba by human intestinal bacteria using UPLC/Q-TOF-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118, 167–176.
- Li, Y., Peng, Y., Wang, M., Zhou, G., Zhang, Y., Li, X., 2016b. Rapid screening and identification of the differences between metabolites of *Cistanche deserticola* and *C. tubulosa* water extract in rats by UPLC/Q-TOF-MS combined pattern recognition analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 131, 364–372.
- Liao, D.Y., Chai, Y.C., Wang, S.H., Chen, C.W., Tsai, M.S., 2015. Antioxidant activities and contents of flavonoids and phenolic acids of *Talinum triangulare* extracts and their immunomodulatory effects. *J. Food and Drug Anal.* 23, 294–302.
- Lin, Z., Wen, J., Zhu, T., Fang, Y., Gu, Q., Zhu, W., 2008. Chrysoenamidine A from an endophytic fungus associated with *Cistanche deserticola* and its neuroprotective effect on SH-SY5Y cells. *J. Antibiot. (Tokyo)* 61, 81–85.
- Lin, W.-Y., Yao, C., Cheng, J., Kao, S.-T., Tsai, F.-J., Liu, H.-P., 2017. Molecular pathways related to the longevity promotion and cognitive improvement of *Cistanche tubulosa* in *Drosophila*. *Phytomedicine* 26, 37–44.
- Liu, X.-M., Li, J., Jiang, Y., Zhao, M.-B., Tu, P.-F., 2013. Chemical constituents from *Cistanche sinensis* (Orobanchaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 47, 21–24.
- Melek, F., El-Shabrawy, O., El-Gindy, M., Miyase, T., 1993. Pharmacological activity and composition of ethyl acetate extract of *Cistanche phelypaea*. *Fitoterapia* 64, 11–14.
- Morikawa, T., Pan, Y., Ninomiya, K., Imura, K., Matsuda, H., Yoshikawa, M., Yuan, D., Muraoka, O., 2010. Acylated phenylethanoid oligoglycosides with hepatoprotective activity from the desert plant *Cistanche tubulosa*. *Biorg. Medicinal Chem.* 18, 1882–1890.
- Pan, N., Hori, H., 1996. Antioxidant action of acetoiside and its analogs on lipid peroxidation. *Redox Report* 2, 149–154.
- Peng, F., Chen, J., Wang, X., Xu, C., Liu, T., Xu, R., 2016. Changes in levels of phenylethanoid glycosides, antioxidant activity, and other quality traits in *Cistanche deserticola* slices by steam processing. *Chem. Pharm. Bull.* 64, 1024–1030.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., Cimpeanu, C., Predoi, G., 2016. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: a review. *Oxidative Med. Cellular Longevity* 2016, 9130976.
- Piwoarczyk, R., Ochmian, I., Lachowicz, S., Kapusta, I., Sotek, Z., Błaszak, M., 2020. Phytochemical parasite–host relations and interactions: A *Cistanche armena* case study. *Sci. Total Environ.* 716, 137071.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. New flora of Algeria and southern desert regions, Tome 2. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- Quirantes-Piné, R., Funes, L., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2009. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *J. Chromatogr. A* 1216, 5391–5397.
- Shi, Y., Wu, C., Chen, Y., Liu, W., Feng, F., Xie, N., 2013. Comparative analysis of three *Callicarpa* herbs using high performance liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization-trap mass spectrometry method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75, 239–247.
- Si, C.-L., Liu, S.-C., Hu, H.-Y., Jiang, J.-Z., Yu, G.-J., Ren, X.-D., Xu, G.-H., 2013. Activity-Guided Screening of the Antioxidants from *Paulownia tomentosa* var. *tomentosa* Bark. *BioResources* 8, 628–637.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178.
- Song, Q., Li, J., Liu, X., Zhang, Y., Guo, L., Jiang, Y., Song, Y., Tu, P., 2016. Home-made online hyphenation of pressurized liquid extraction, turbulent flow chromatography, and high performance liquid chromatography, *Cistanche deserticola* as a case study. *J. Chromatogr. A* 1438, 189–197.
- Song, Q., Zhou, Z., Li, J., Cao, Y., Zhao, Y., Deng, S., Qi, H., Jiang, Y., Song, Y., Tu, P., 2019. Serial hyphenation of dried spot, reversed phase liquid chromatography, hydrophilic interaction liquid chromatography, and tandem mass spectrometry towards direct chemical profiling of herbal medicine-derived liquid matrices, an application in *Cistanche sinensis*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 174, 34–42.
- Subedi, L., Timalansa, S., Duwadi, P., Thapa, R., Paudel, A., Parajuli, K., 2014. Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. *J. Tradit. Chin. Med.* 34, 584–590.
- Tao, Y., Gu, X., Li, W., Cai, B., 2018. Fabrication and evaluation of magnetic phosphodiesterase-5 linked nanoparticles as adsorbent for magnetic dispersive solid-phase extraction of inhibitors from Chinese herbal medicine prior to ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A* 1532, 58–67.
- Tian, S., Miao, M., Bai, M., Wei, Z., 2017. Phenylethanoid Glycosides of Cistanche on menopausal syndrome model in mice. *Saudi Pharmaceutical J.* 25, 537–547.
- Trampetti, F., Pereira, C., Rodrigues, M.J., Celaj, O., D'Ambrosia, B., Zengin, G., Mollica, A., Stefanucci, A., Custódio, L., 2019. Exploring the halophyte *Cistanche phelypaea* (L.) Cout as a source of health promoting products: *In vitro* antioxidant and enzyme inhibitory properties, metabolomic profile and computational studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 165, 119–128.
- Us, M.R., Zin, T., Abdurrazak, M., Ahmad, B.A., 2015. Chemistry and pharmacology of syringin, a novel bioglycoside: A review. *Asian J. Pharmaceutical and Clin. Res.* 8, 20–25.
- Wang, Y., Hao, H., Wang, G., Tu, P., Jiang, Y., Liang, Y., Dai, L., Yang, H., Lai, L., Zheng, C., Wang, Q., Cui, N., Liu, Y., 2009. An approach to identifying sequential metabolites of a typical phenylethanoid glycoside, echinacoside, based on liquid chromatography–ion trap–time of flight mass spectrometry analysis. *Talanta* 80, 572–580.
- Wang, X., Wang, J., Guan, H., Xu, R., Luo, X., Su, M., Chang, X., Tan, W., Chen, J., Shi, Y., 2017. Comparison of the chemical profiles and antioxidant activities of different parts of cultivated *Cistanche deserticola* using ultra performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry and a 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-based assay. *Molecules* 22, 2011.
- Wat, E., Ng, C.F., Koon, C.M., Wong, E.C.W., Tomlinson, B., San Lau, C.B., 2016. The protective effect of Herba Cistanches on statin-induced myotoxicity *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* 190, 68–73.
- Wong, C.-C., Li, H.-B., Cheng, K.-W., Chen, F., 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 97, 705–711.
- Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T., Namba, T., 1996. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 1580–1585.
- Xiong, W.-T., Gu, L., Wang, C., Sun, H.-X., Liu, X., 2013. Anti-hyperglycemic and hypolipidemic effects of *Cistanche tubulosa* in type 2 diabetic db/db mice. *J. Ethnopharmacol.* 150, 935–945.
- Xue, Z., Yang, B., 2016. Phenylethanoid glycosides: Research advances in their phytochemistry, pharmacological activity and pharmacokinetics. *Molecules* 21, 991.
- Yan, Y., Song, Q., Chen, X., Li, J., Li, P., Wang, Y., Liu, T., Song, Y., Tu, P., 2017. Simultaneous determination of components with wide polarity and content ranges in *Cistanche tubulosa* using serially coupled reverse phase-hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1501, 39–50.
- Yang, J.-H., Hu, J.-P., Rena, K., Du, N.-S., 2009. Structure–activity relationships of phenylethanoid glycosides in plants of *Cistanche salsa* on antioxidative activity. *J. Chin. Medicinal Mater.* 32, 1067–1069.
- Yoshizawa, F., Deyama, T., Takizawa, N., Usmanghani, K., Ahmad, M., 1990. The constituents of *Cistanche tubulosa* (SCHRENK) HOOK. f. II: isolation and structures of a new phenylethanoid glycoside and a new neolignan glycoside. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 1927–1930.
- Yuejie, L., Haiyan, C., Ting, L., Lijun, L., Wenhai, J., 2017. Chemical components identification of *Cistanche deserticola* using X500 QTOF system. *Food and Environmental SCIEX. Asia Pacific Application Support Center, ShanghaiChina.* RUO-MKT-02-6091-A.
- Zhang, J., Li, C., Che, Y., Wu, J., Wang, Z., Cai, W., Li, Y., Ma, Z., Tu, P., 2015. LTQ-Orbitrap-based strategy for traditional Chinese medicine targeted class discovery, identification and herbomics research: a case study on phenylethanoid glycosides in three different species of Herba Cistanches. *RSC Adv.* 5, 80816–80828.
- Zhang, W., Huang, J., Wang, W., Li, Q., Chen, Y., Feng, W., Zheng, D., Zhao, T., Mao, G., Yang, L., Wu, X., 2016. Extraction, purification, characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Cistanche tubulosa*. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 448–458.
- Zhang, A., Yang, X., Li, Q., Yang, Y., Zhao, G., Wang, B., Wu, D., 2018. Immunostimulatory activity of water-extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* as a plant adjuvant *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 13, e0191356.

Résumé

Les espèces appartenant au genre *Cistanche* sont bien connues pour leurs effets nutritionnels et thérapeutiques, cependant très peu de rapports scientifiques sont disponibles sur l'espèce *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. Ce travail vise principalement à élucider l'impact des méthodes d'extraction aqueuse comprenant la décoction, l'infusion et la macération à froid des racines de *C. phelypaea* sur la composition phytochimique, l'activité antioxydante *in vitro* et celle anti-inflammatoire *in vivo*. L'étude phytochimique a été réalisée par des tests de criblage phytochimique au niveau de la poudre végétale. De plus, des dosages du contenu total en composés phénoliques, en flavonoïdes et en sucres suivis de l'analyse par chromatographie liquide (LC/ESI-QTOF-MS et LC/ESI-QTOF-MS/MS) ont été réalisés pour les trois extraits aqueux. L'activité antioxydante de ces extraits a été étudiée et comparée par les tests de piégeage du radical DPPH, le pouvoir réducteur du fer ferrique et l'activité antioxydante totale. La toxicité aiguë a été évaluée par l'administration orale des doses de 2 et 5g/kg de poids corporel des extraits aqueux à des souris BalbC mâles et femelles et le potentiel anti-inflammatoire a été étudié par le modèle d'œdème plantaire induit par la carragénine chez les souris BalbC. Les résultats du criblage phytochimique ont indiqué la présence de flavonoïdes libres, tanins galliques hydrolysables, coumarines, triterpènes, caroténoïdes, oses/holosides, stérols et saponosides. La décoction a permis d'obtenir un meilleur rendement d'extraction et des contenus plus élevés en composés phénoliques et en sucres totaux. Concernant les flavonoïdes, la décoction et l'infusion ont montré des contenus plus élevés que la macération. Les données obtenues à partir des analyses chromatographiques ont montré des profils qualitatifs similaires avec 14 pics chromatographiques caractéristiques en mode négatif et 6 en mode positif, ce qui a permis l'identification de la syringine, 14 glycosides phényléthanoïdes et 5 iridoïdes. Des variations ont été enregistrées pour l'abondance relative de certains composés en fonction du procédé d'extraction employé. Tous les extraits ont présenté des propriétés antioxydantes similaires dans les trois systèmes étudiés à l'exception du macérât qui a montré un pouvoir réducteur moins puissant du fer ferrique. Ce pouvoir a été corrélé au taux de flavonoïdes. L'administration orale des trois extraits n'a produit aucun effet toxique. Une réduction significative dans le pourcentage d'augmentation de l'œdème plantaire a été enregistrée chez les souris traitées par les trois extraits aqueux avec une réduction plus remarquable chez celles traitées par le décocté. À la lumière des résultats obtenus, l'utilisation des jeunes racines de *C. phelypaea* sous forme d'extraits aqueux dans la modulation et la prévention des états pathologiques liés au stress oxydatif et à l'inflammation est très favorable en terme de balance bénéfices-risques et la décoction serait la forme la plus efficace.

Mots clés : *Cistanche phelypaea*, décoction, infusion, macération, phytochimie, antioxydant, toxicité aiguë, anti-inflammatoire.

Abstract

Species belonging to the genus *Cistanche* are well known for their nutritional and therapeutic effects, however very few scientific reports are available on the species *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. This work mainly aims to elucidate the impact of aqueous extraction methods including decoction, infusion and cold maceration of the roots of *C. phelypaea* on the phytochemical composition, the antioxidant activity *in vitro* and that anti-inflammatory activity *in vivo*. Phytochemical studies were carried out by phytochemical screening tests of the vegetable powder. In addition, determination of the total phenolic, flavonoid and sugar contents followed by the analysis of the extracts by liquid chromatography (LC/ESI-QTOF-MS and LC/ESI-QTOF-MS/MS) were performed in the different water extracts. The antioxidant activity of these extracts was studied and compared by DPPH radical scavenging test, ferric iron reducing power and total antioxidant activity. Acute toxicity was evaluated by oral administration of doses of 2 and 5g/kg of body weight of the aqueous extracts to male and female BalbC mice and the anti-inflammatory potential was studied by the plantar edema model induced by carrageenan in BalbC mice. Phytochemical screening results indicated the presence of free flavonoids, hydrolysable gallic tannins, coumarins, triterpenes, carotenoids, saccharides/holosides, sterols and saponosides. The decoction resulted in a higher extraction yield and higher content of total phenolic compounds and sugars. Regarding flavonoids, decoction and infusion showed higher contents than maceration. Data obtained from chromatographic analyzes showed similar qualitative profiles for all aqueous extracts with 14 characteristic chromatographic peaks in negative mode and 6 in positive mode, which allowed the identification of syringin, 14 phenylethanoid glycosides and 5 iridoids. Variations have been recorded for the relative abundance of some compounds depending on the extraction process used. All extracts exhibited similar antioxidant properties in the three systems studied with the exception of the macerate which showed a less powerful reducing power of ferric iron. This power was correlated with the level of flavonoids. Oral administration of the three extracts produced no toxic effects. A significant reduction in the percentage increase in plantar edema was recorded in mice treated with the three aqueous extracts with a more remarkable reduction in those treated with the decoction. In the light of the results obtained, the use of young roots of *C. phelypaea* in the form of aqueous extracts in the modulation and prevention of pathological states linked to oxidative stress and inflammation is very favorable in terms of benefit-risk balance and the decoction would be the most effective form.

Key words: *Cistanche phelypaea*, decoction, infusion, maceration, phytochemical, antioxidant, acute toxicity, anti-inflammatory.