

Université Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 01/B.An/2024

N° de série : 24/D3C/2024



**Thèse de Doctorat**  
**Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle**  
**Domaine : Science de la Nature et de la Vie**  
**Filière : Science Biologiques**  
**Spécialité : Physio-Toxicologie Cellulaire**

*Présentée et soutenu par : MECHERI Amira*

**Intitulé :**

**Evaluation de l'activité antioxydante et des propriétés  
biologique des extraits phénoliques des plantes médicinales  
*Crataegus oxyacantha* et *Asteriscus graveolens* : Etude *in vitro*  
et *in vivo***

**Soutenu le : 13/06/2024**

**Membres du jury :**

<b>Président : LALAOUI Korichi</b>	Professeur	Université Frères Mentouri Constantine 1
<b>Directrice de thèse : AMRANI Amel</b>	Professeur	Université Frères Mentouri Constantine 1
<b>Examineur : ZELLAGUI Amar</b>	Professeur	Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi
<b>Examinatrice : BENAÏSSA Ouahiba</b>	Professeur	Université Mustapha Benboulaïd Batna 2
<b>Examinatrice : BOUBEKRI Nassima</b>	MCA	Université Frères Mentouri Constantine 1
<b>Examineur : HANFER Mourad</b>	MCA	Université Mustapha Benboulaïd Batna 2

**Année universitaire : 2023 – 2024**

# Remerciements

**J**'aimerais en tout premier lieu remercier mon Dieu, tout-puissant qui ma donné la capacité d'accomplir ce modeste travail et qui m'a toujours guidé vers le bon chemin.

Je souhaite particulièrement remercier ma directrice de thèse, Madame **Amrani Amel**, Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques et ses conseils. Je lui adresse également mes remerciements distingués pour avoir consacré son temps précieux, pour ses critiques constructives, son enthousiasme et ses qualités personnelles et professionnelles. Je n'oublierai jamais tout ce que vous avez fait pour moi, vous êtes et vous resterez toujours mon exemple.

Je suis reconnaissante envers le président du jury, le Professeur **Lalaoui Korichi** de l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour son soutien précieux et son rôle essentiel dans l'évaluation de ma thèse. Mes remerciements s'adressent également à Madame **Benaïssa Ouahiba**, Professeur à l'Université Mustapha Ben Boulaid Batna 2, à Monsieur **Zellagui Amar**, Professeur à l'Université Larbi Ben M'hidi d'Oum El-Bouaghi, et à Monsieur **Hanfar Mourad**, maître de conférences à l'Université Mustapha Ben Boulaid Batna 2, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineurs. Leurs évaluations approfondies et leurs précieux commentaires ont grandement enrichi ma thèse.

Je voudrais remercier également Madame **Boubekri Nassima**, Maitre de Conférences classe « A » à l'université de Mentouri Constantine 1, de me faire l'honneur de participer à ce jury et d'avoir accepté d'évaluer et d'examiner cette thèse. Ainsi de dire que votre investissement dans ce travail a été primordial, je vous fais part de toute ma gratitude pour vos conseils, vos connaissances et votre expérience qui m'ont aidée dans de très nombreuses circonstances.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers **tous mes enseignants** à l'Université Mentouri de Constantine. Leur dévouement et leurs enseignements ont constitué des piliers fondamentaux de mon parcours académique.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude au Professeur **Stephano Alacqua** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire en Italie. Mes remerciements les plus chaleureux pour son intérêt, son accueil bienveillant, la confiance témoignée et le soutien continu tout au long de mon séjour. Un immense

*merci va également à son équipe remarquable, comprenant **Stéphanie, Irène, Viola et Martae** pour leur collaboration précieuse qui a enrichi significativement mon expérience.*

*Je n'oublierai pas d'adresser mes vifs remerciements à Monsieur **Bensouici Chawki**, responsable du laboratoire de biochimie au Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche et m'avoir permis de réaliser plusieurs activités. Sa générosité et son soutien ont été essentiels pour le succès de mes travaux de recherche.*

*Mes remerciements s'étendent également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse. Enfin, ma gratitude va à "**mes parents et mes sœurs**" pour leur soutien infaillible tout au long de ce parcours académique exigeant.*

## *Dédicace*

*Avec gratitude et reconnaissance . . .*

*Je dédie ce modeste travail à la communauté scientifique*

*Espérant qu'il lui sera utile*

# Evaluation de l'activité antioxydante et des propriétés biologique des extraits phénoliques des plantes médicinales *Crataegus oxyacantha* et *Asteriscus graveolens* : Etude *in vitro* et *in vivo*

## Résumé

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer l'effet antioxydant, antidiabétique, neuroprotecteur, anti inflammatoire et protecteur vis-à-vis la toxicité aiguë de la doxorubicine (DOX) des extraits de *Crataegus oxyacantha* (Rosacées) et d'*Asteriscus graveolens* (Astéracées). Dans cette étude, la capacité antioxydante (DPPH, GOR, ABTS, FRAP, CUPRAC, LPO et Phenanthroline), photoprotectrice, antidiabétique ( $\alpha$ -glucosidase) et anticholinestérase [acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE)] des extraits de *n*-butanol et d'acétate d'éthyle des feuilles et des fruits de *C. oxyacantha* et l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* ont été étudiées à l'aide des méthodes standard. Selon les résultats obtenus, tous les extraits de plantes ont des effets antioxydants significatifs. L'extrait d'acétate d'éthyle de feuilles de *C. oxyacantha* qui contient les valeurs les plus élevées en termes de contenu bioactif total présentait le potentiel antioxydant le plus élevé. De plus, tous les extraits de plantes étudiée avaient un effet inhibiteur sur l' $\alpha$ -glucosidase. L'effet inhibiteur est concentration dépendante. Les résultats ont également indiqué une activité inhibitrice substantielle du BChE pour l'extrait *n*-butanol et d'acétate d'éthyle des feuilles de *C. oxyacantha*, l'extrait *n*-butanol étant l'inhibiteur le plus puissant de l'AChE. De plus, les extraits de plantes présentaient un potentiel photoprotecteur significatif. Ces activités sont fortement corrélées avec les teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux.

Les études *in vivo* est portée sur les extraits *n*-butanol des deux plantes étudiées. La première étude vise à évaluer l'effet hépatoprotecteur de *C. oxyacantha* contre la toxicité induite par la DOX chez les rats. Tandis que la deuxième vise à étudier l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* contre l'hépatotoxicité et la toxicité des testicules induite par le même médicament. La DOX agit essentiellement en provoquant un dysfonctionnement s'exprime par une augmentation significative de la peroxydation des lipides, qui est détectée par l'augmentation du taux de MDA dans les tissus, ainsi qu'une diminution importante du taux de GSH et de l'activité enzymatique de la GPx, accompagné également par des changements notables des paramètres biochimiques caractérisés par une élévation des taux sérique d'ASAT, ALAT, LDH, le cholestérol et les triglycérides. Cependant, le prétraitement des rats par les extraits de *C. oxyacantha* (100 mg/kg), *A. graveolens* (75 mg/kg) et la vitamine E (100 mg/kg) a permis de rétablir les paramètres biochimiques et les paramètres du stress oxydant à leurs valeurs normales. L'étude histologique a montré une diminution des dommages sévère du foie et des testicules distingués chez les rats traités par la DOX. L'activité anti-inflammatoire des extraits *n*-butanol de *C. oxyacantha* et *A. graveolens* est également évaluée *in vivo*. Les résultats montrent que les deux extraits sont capables de réduire l'œdème de l'oreille induit par le xylène et l'œdème de la patte induit par le formol.

En conclusion, ces résultats révèlent le potentiel prometteur des extraits de *C. oxyacantha* et d'*A. graveolens* en tant qu'agents antioxydants, antidiabétique, anti-inflammatoire et protecteurs contre la toxicité de la DOX, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans le domaine de la recherche médicale et de la pharmacologie pour le développement de thérapies complémentaires.

**Mots clés:** *Crataegus oxyacantha*, *Asteriscus graveolens*, antioxydants, doxorubicine, hépatotoxicité, toxicité testiculaire, anti-inflammatoire.

## Evaluation of the antioxidant activity and biological properties of phenolic extracts of medicinal plants *Crataegus oxyacantha* and *Asteriscus graveolens*: *In vitro* and *in vivo* study

### Abstract

The main objective of the current research is to investigate the antioxidant, antidiabetic, neuroprotective, anti-inflammatory and protective effects of *Crataegus oxyacantha* (Rosaceae) and *Asteriscus graveolens* (Asteraceae) against the toxicity induced by doxorubicin (DOX). In this study, the antioxidant capacity (DPPH, GOR, ABTS, FRAP, CUPRAC, LPO, and Phenanthroline), photoprotective, antidiabetic ( $\alpha$ -glucosidase), and anticholinesterase [acetylcholinesterases (AChE) and butyrylcholinesterases (BChE)] properties of *n*-butanol and ethyl acetate extracts derived from the leaves and fruits of *C. oxyacantha*, as well as the *n*-butanol extract of *A. graveolens*, were investigated using standard methods. The results indicated that all plant extracts exhibit significant antioxidant effects. The ethyl acetate extract of the leaves of *C. oxyacantha*, which contains the highest values in terms of total bioactive content, exhibited the highest antioxidant potential. Moreover, all studied plant extracts had an inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase. The results also indicated a substantial inhibitory activity of BChE for the *n*-butanol extract and ethyl acetate extract of the leaves of *C. oxyacantha*. The *n*-butanol extract was the most potent inhibitor of AChE. Furthermore, the plant extracts exhibited significant photoprotective potential. These activities are strongly correlated with the levels of total flavonoids and phenols.

The *in vivo* studies focus on the *n*-butanol extracts of two plants under investigation. The first study aims to assess the hepatoprotective effect of *C. oxyacantha* against DOX-induced toxicity in rats. The second study aims to investigate the preventive effect of the *n*-butanol extract *A. graveolens* against hepatotoxicity and testicular toxicity induced by the same drug. DOX primarily elicits dysfunction characterized by a significant increase in lipid peroxidation, which is indicated by the elevated level of MDA in the tissues. as well as a substantial reduction in glutathione (GSH) levels and glutathione peroxidase (GPx) enzymatic activity, accompanied also by notable changes in biochemical parameters characterized by an elevation in serum levels of AST, ALT, LDH, cholesterol, and triglycerides. However, pretreatment of rats with *n*-butanol extracts of *C. oxyacantha* (100 mg/kg), *A. graveolens* (75 mg/kg), and vitamin E (100 mg/kg) restored the biochemical and oxidative stress parameters to their normal values. Histopathological study revealed reduced severe liver and testicular damage in rats treated with DOX. The anti-inflammatory activity of the *n*-butanol extracts of *C. oxyacantha* and *A. graveolens* is evaluated *in vivo*. The results show that both extracts are capable of reducing xylene-induced ear edema and formalin induced paw edema.

In conclusion, these results reveal the promising potential of extracts of *C. oxyacantha* and *A. graveolens* as antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory agents, and protectors against the toxicity of DOX. Thus, opening new perspectives in the field of medical research and pharmacology for the development of complementary therapies.

**Keywords:** *Crataegus oxyacantha*, *Asteriscus graveolens*, antioxidants, doxorubicin, hepatotoxicity, testicular toxicity, anti-inflammatory.

## تقييم النشاط المضاد للأكسدة والخصائص البيولوجية للمستخلصات الفينولية للنبتين الطبيتين *In vivo* و *In vitro* دراسة: *Asteriscus graveolens* و *Crataegus oxyacantha*

### ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة، المضاد للسكري، الواقي للأعصاب، المضاد للالتهاب والتأثير الوقائي اتجاه السمية الحادة المحرصة بدواء دوكسوريبيسين لمستخلصات النبتين الطبيتين *Crataegus oxyacantha* (Rosacées) و *Asteriscus graveolens* (Asteracées). في هذا العمل تمت دراسة الفعل المضاد للأكسدة (GOR، DPPH، ABTS، FRAP، CUPRAC، LPO و Phenanthroline)، الواقي من الضوء، المضاد للسكري (α-glucosidase) و المضاد للكولين استيريز [butyrylcholinestérase و acétylcholinestérase (AChE)] للمستخلصات البيتانولية و ايثيل اسيتات لأوراق و ثمار نبات *C. oxyacantha* و المستخلص البيتانولي لنبات *A. graveolens* و هذا باستعمال طرق معيارية. حسب النتائج المتحصل عليها فإن كل مستخلصات النبتين تملك نشاطا معنويا مضادا للأكسدة. حيث أظهر مستخلص أسيتات ايثيل لأوراق نبات *C. oxyacantha* قدرة مضادة للأكسدة أكبر لإحتوائه على كمية أكبر من المركبات النشطة بيولوجيا. إضافة الى أن كل مستخلصات النباتات تملك نشاطا مثبطا لإنزيم α-glucosidase حيث يرتبط هذا الفعل بالتركيز. أشارت النتائج أيضًا إلى نشاط مثبط كبير لإنزيم BChE للمستخلص البيتانولي و اسيتات ايثيل لأوراق نبات *C. oxyacantha* في حين المستخلص البيتانولي مثبط أقوى لإنزيم AChE. كما أظهرت المستخلصات النباتية نشاطا معنويا في الوقاية من الضوء، حيث ترتبط هذه النشاطات بمحتوى الفلافونويدات و الفينولات الكلية في المستخلصات.

تمت الدراسة داخل العضوية على المستخلصات البيتانولية للنبتين المدروستين. تهدف الدراسة الأولى الى تقييم الفعل الوقائي لمستخلص نبات الزعرور اتجاه السمية الكبدية المحرصة بدواء دوكسوريبيسين عند جرذان إناث، في حين تركزت الدراسة الثانية على دراسة الفعل الوقائي للمستخلص بيتانولي لنبات *A. graveolens* اتجاه سمية الكبد والخصي المحرصة بنفس الدواء. يعمل دوكسوريبيسين بواسطة احداث خلل وظيفي وذلك بالارتفاع المعنوي في الأكسدة الفوقية للدهون الذي يعبر عنه بارتفاع مستوى MDA في الأنسجة و كذلك انخفاض هام في مستوى GSH و نشاط انزيم GPx، و يكون مرافقا بتغيرات واضحة في المؤشرات البيوكيميائية التي تميزت بارتفاع معنوي في مستوى ASAT، ALAT، LDH، كولسترول، و الجليسيريدات الثلاثية. في حين أدت المعاملة المسبقة للجرذان بالمستخلصات البيتانولية لنبات *C. oxyacantha* بجرعة 100ملغ/كغ، نبات *A. graveolens* بجرعة 75ملغ/كغ و فيتامين E بجرعة 100ملغ/كغ الى تعديل في المؤشرات البيوكيميائية وكذلك مؤشرات الجهد التأكسدي، كما بينت الدراسة النسيجية انخفاض في الأضرار التي أحدثها ر دواء دوكسوريبيسين على مستوى الكبد والخصي. تمت دراسة الفعل المضاد للالتهاب داخل العضوية للمستخلصات البيتانولية لنبات *C. oxyacantha* و *A. graveolens*، حيث أظهرت النتائج قدرة المستخلصين على خفض حجم الاستسقاء الموضعي المحرض ب xylène وكذلك المحرض بالفورمول.

ان النتائج المتحصل عليها تظهر الإمكانيات الواعدة لمستخلصات نبات *C. oxyacantha* و *A. graveolens* كعوامل مضادة للأكسدة، مضادة للسكري، مضادة للالتهاب و واقية ضد سمية الدوكسوريبيسين، مما يفتح آفاق جديدة في مجال البحوث الطبية و الصيدلانية لتطوير العلاجات التكميلية.

**الكلمات المفتاحية:** *Asteriscus graveolens*، *Crataegus oxyacantha*، مضاد للأكسدة، دوكسوريبيسين،

سمية الكبد، سمية الخصي، مضاد للالتهاب.

***LISTE DES ABREVIATIONS***

<b>ABTS<sup>•+</sup> :</b>	2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
<b>AChE :</b>	Acetylcholinesterase
<b>AcOEt :</b>	Ethyl acetate
<b>AGPI :</b>	Polyunsaturated fatty acids
<b>ALAT :</b>	Alanine aminotransferase
<b>ASAT :</b>	Aspartate aminotransferase
<b>Atg :</b>	Autophagy-related genes
<b>BChE :</b>	Butyrylcholinesterase
<b>BHA :</b>	Butylated hydroxyanisole
<b>BHT:</b>	Butylated hydroxytoluene
<b>Bnip3:</b>	Bcl-2-like 19 kDa-interacting-protein 3
<b>COX:</b>	Cyclooxygenase
<b>CUPRAC:</b>	Cupric reducing antioxidant capacity assay
<b>DOX:</b>	Doxorubicin
<b>DPPH<sup>•</sup>:</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>DTNB:</b>	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
<b>ERO:</b>	Reactive oxygen species (ROS)
<b>FADD:</b>	Fas-associated death domain
<b>FasL:</b>	Fas ligand
<b>FRAP:</b>	Ferric ion Reducing Antioxidant Power
<b>GPx :</b>	Glutathione peroxidase
<b>GSH :</b>	Reduced glutathione
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :</b>	Hydrogen peroxide
<b>HDL :</b>	High density lipoprotein

<b>i.p :</b>	Intraperitoneal injection
<b>IC<sub>50</sub> :</b>	Half-maximal inhibitory concentration
<b>LDH :</b>	Lactate dehydrogenase
<b>LDL :</b>	Low-density lipoproteins
<b>MDA :</b>	Malondialdehyde
<b>mTOR :</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>NADH :</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide
<b><i>n</i>-BuOH :</b>	<i>n</i> -Butanol extract
<b>NFATc4 :</b>	Nuclear Factor Activated T-cell 4
<b>NF-<math>\kappa</math>B :</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>PARP-1:</b>	Poly (ADP-ribose) Polymerase-1
<b>RIPK1:</b>	Receptor-interacting protein kinase 1
<b>RIPK3:</b>	Receptor-interacting protein kinase 3
<b>SPF:</b>	Sun protection factor
<b>TBA :</b>	Thiobarbituric acid
<b>TG :</b>	Triglycerides

LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Structure moléculaire de la DOX.....	04
<b>Figure 2</b> : Biotransformation de la DOX.....	07
<b>Figure 3</b> : Modalités d'action du complexe protéasome-DOX.....	08
<b>Figure 4</b> : Intercalation de la DOX dans la molécule d'ADN.....	09
<b>Figure 5</b> : Inhibition de l'action du topoisomérase II par la DOX.....	10
<b>Figure 6</b> : Cycle de réduction de la DOX et la formation des radicaux libres.....	13
<b>Figure 7</b> : Induction de la mort cellulaire par la DOX.....	15
<b>Figure 8</b> : Les voies d'activation et les principaux régulateurs impliqués dans l'autophagie et la nécrose induites par la DOX.....	17
<b>Figure 9</b> : Mécanismes de l'hépatotoxicité induite par la DOX.....	19
<b>Figure 10</b> : Mécanismes de la toxicité des reins induite par la DOX.....	20
<b>Figure 11</b> : Stress oxydant et apoptose induits par la DOX dans les testicules.....	22
<b>Figure 12</b> : Principaux systèmes enzymatiques antioxydants impliqués dans le contrôle des ROS...	24
<b>Figure 13</b> : Les principaux groupes de polyphénols.....	26
<b>Figure 14</b> : Principaux dérivés de l'acide cinnamique.....	27
<b>Figure 15</b> : Principaux dérivés de l'acide benzoïque.....	27
<b>Figure 16</b> : Structure du squelette de base des flavonoïdes et de leurs classes.....	29
<b>Figure 17</b> : Feuilles de <i>C. oxyacantha</i> .....	34
<b>Figure 18</b> : Appareil reproducteur de <i>C. oxyacantha</i> .....	34
<b>Figure 19</b> : Photos représentant les fruits ou cenelles de la plante <i>C. oxyacantha</i> .....	35
<b>Figure 20</b> : Les principaux dérivés flavonoïdes de la plante <i>C. oxyacantha</i> .....	38
<b>Figure 21</b> : Exemple des principaux constituants des espèces <i>Crataegus</i> .....	39
<b>Figure 22</b> : Quelques produits commercialisés à base de <i>C. oxyacantha</i> .....	43
<b>Figure 23</b> : Photo d'un buisson d' <i>Asteriscus graveolens</i> .....	45
<b>Figure 24</b> : Structure de quelques constituants de l'espèce <i>A. graveolens</i> .....	49
<b>Figure 25</b> : Les étapes de l'extraction des feuilles et des fruits de <i>C. oxyacantha</i> .....	52
<b>Figure 26</b> : Les étapes de l'extraction des feuilles et fleurs de la plante <i>A. graveolens</i> .....	54
<b>Figure 27</b> : La réduction du DPPH par un antioxydant.....	57
<b>Figure 28</b> : Piégeage du radical ABTS <sup>•+</sup> par un antioxydant.....	57
<b>Figure 29</b> : Réduction du complexe chromogène de Cu <sup>+2</sup> -Nc.....	58
<b>Figure 30</b> : Formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phénanthroline.....	59
<b>Figure 31</b> : Structure chimique de radical Galvinoxyl.....	60
<b>Figure 32</b> : Mécanisme de la réaction du ferricyanide de potassium.....	61
<b>Figure 33</b> : Mécanisme d'hydrolyse du p-NPG par l' $\alpha$ -glucosidase.....	63
<b>Figure 34</b> : Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman.....	65
<b>Figure 35</b> : Réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique.....	71
<b>Figure 36</b> : Principe de dosage du glutathion.....	72
<b>Figure 37</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.....	77
<b>Figure 38</b> : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	78
<b>Figure 39</b> : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonols.....	78

<b>Figure 40</b> Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits <i>n</i> -butanol et acétate d'éthyle des feuilles de <i>C. oxyacantha</i> et la vitamine C.....	86
<b>Figure 41</b> : Effets de la DOX, de la vitamine E et de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. oxyacantha</i> sur les taux sériques des enzymes ASAT, ALAT et LDH.....	90
<b>Figure 42</b> : Effets de la DOX, de la vitamine E et de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. oxyacantha</i> sur les taux sériques de cholestérol, de LDL, d'HDL et des triglycérides.....	91
<b>Figure 43</b> : Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. oxyacantha</i> , la vitamine E et la DOX sur la production du MDA dans Les cellules hépatiques.....	92
<b>Figure 44</b> : Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Crataegus oxyacantha</i> , la vitamine E et la DOX sur la variation de glutathion (GSH) dans Les cellules hépatiques.....	92
<b>Figure 45</b> : Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol, la vitamine E et la DOX sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) dans Les cellules hépatiques.....	93
<b>Figure 46</b> : Effets de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>Crataegus oxyacantha</i> et la vitamine E sur les changements histologiques du foie suite à la toxicité par la DOX.....	95
<b>Figure 47</b> : Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>Crataegus oxyacantha</i> (50 et 100 mg/kg) sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris.....	96
<b>Figure 48</b> : Inhibition de l'œdème chez les différents groupes de souris, en présence d'un prétraitement par l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Crataegus oxyacantha</i> (50 mg/kg et 100 mg/kg) et la molécule de références.....	97
<b>Figure 49</b> : Courbe de l'évolution de l'œdème en présence d'un prétraitement une demi-heure avant l'injection de formol (3,5 %), chez 4 lots de rats.....	98
<b>Figure 50</b> : Inhibition de l'œdème de la patte chez les différents lots des rats en présence d'un prétraitement par l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. oxyacantha</i> (50 mg/kg et 100 mg/kg) et la molécule de références (aspirine 300 mg/kg).....	98
<b>Figure 51</b> : Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> et la vitamine C vis-à-vis la peroxydation lipidique non enzymatique induite par le FeSO <sub>4</sub> .....	117
<b>Figure 52</b> : Effets de la DOX, de la vitamine E et de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> sur les taux sériques des transaminases (ASAT et ALAT).....	119
<b>Figure 53</b> : Effets de la DOX, de la vitamine E et de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> sur les taux sériques de cholestérol, de LDL, d'HDL et des triglycérides.....	120
<b>Figure 54</b> : Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> , la vitamine E et la DOX sur le taux de l'MDA dans les cellules hépatiques et testiculaires.....	121
<b>Figure 55</b> : Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> , la vitamine E et la DOX sur la variation de glutathion (GSH) dans les cellules du foie et des testicules.....	122
<b>Figure 56</b> : Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol d' <i>A. graveolens</i> , la vitamine E et la DOX sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) dans les cellules hépatiques et testiculaires.....	123
<b>Figure 57</b> : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats traités par la DOX (15 mg/kg) et/ou l'extrait <i>n</i> -butanol d' <i>A. graveolens</i> (75 mg/kg) et la vitamine E (100 mg/kg).....	125
<b>Figure 58</b> : Effets de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>Asteriscus graveolens</i> et la vitamine E sur les changements histologiques du foie suite à la toxicité par la DOX.....	127
<b>Figure 59</b> : Effet de l'extrait <i>n</i> -butanol d' <i>A. graveolens</i> (50 et 100 mg/kg) sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris.....	128

<b>Figure 60</b> : Inhibition de l'œdème chez les différents groupes des souris, en présence d'un prétraitement par l'extrait <i>n</i> -butanol d' <i>A. graveolens</i> (50 mg/kg et 100 mg/kg) et la molécule de références (aspirine 300 mg/kg).....	<b>128</b>
<b>Figure 61</b> : Courbe de l'évolution de l'œdème en présence d'un prétraitement une demi-heure avant l'injection de formol (3,5 %),.....	<b>130</b>
<b>Figure 62</b> : Inhibition de l'œdème du pied chez les différents lots des rats en présence d'un prétraitement par l'extrait <i>n</i> -butanol d' <i>A. graveolens</i> (50 mg/kg et 100 mg/kg) et la molécule de références (aspirine 300mg/kg).....	<b>130</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Exemples des activités pharmacologiques de la plante <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>42</b>
<b>Tableau 2</b> : Position systématique de l'espèce <i>Asteriscus graveolens</i> .....	<b>46</b>
<b>Tableau 3</b> : Quelques usages thérapeutiques de la plante <i>A. graveolens</i> dans différentes régions.....	<b>47</b>
<b>Tableau 4</b> : Quelques phytoconstituants d' <i>Asteriscus graveolens</i> .....	<b>48</b>
<b>Tableau 5</b> : Activités biologiques de l'espèce <i>A. graveolens</i> .....	<b>50</b>
<b>Tableau 6</b> : Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF.....	<b>63</b>
<b>Tableau 7</b> : Rendement de l'extraction des feuilles et des fruits la plante <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>76</b>
<b>Tableau 8</b> : Teneur en polyphénols, flavonoïdes et flavonols dans les extraits de la plante <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>79</b>
<b>Tableau 9</b> : Activité antiradicalaire au DPPH des extraits de la plante <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>80</b>
<b>Tableau 10</b> : Inhibition du cation radical ABTS <sup>•+</sup> par les extraits de <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>81</b>
<b>Tableau 11</b> : La capacité antioxydante de réduction du cuivre de la plante <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>82</b>
<b>Tableau 12</b> : Réduction du fer par la méthode phénanthroline des extraits de <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>83</b>
<b>Tableau 13</b> : Activité antiradicalaire (Galvinoxyl) des extraits de <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>84</b>
<b>Tableau 14</b> : Absorbance du pouvoir réducteur des extraits de <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>85</b>
<b>Tableau 15</b> : Activité photoprotectrice SPF des extraits de la plante <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>87</b>
<b>Tableau 16</b> : Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase des différents extraits de <i>C. oxyacantha</i> ....	<b>87</b>
<b>Tableau 17</b> : Inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>88</b>
<b>Tableau 18</b> : Inhibition de la butyrylcholinestérase par les extraits de <i>C. oxyacantha</i> .....	<b>89</b>
<b>Tableau 19</b> : Rendement des phases de la plante <i>A. graveolens</i> .....	<b>111</b>
<b>Tableau 20</b> : la teneur en polyphénols, flavonoïdes et flavonols de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> .....	<b>112</b>
<b>Tableau 21</b> : Activité antiradicalaire au DPPH de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> et des standards .....	<b>112</b>
<b>Tableau 22</b> : inhibition du cation radical ABTS <sup>•+</sup> par l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> .....	<b>113</b>
<b>Tableau 23</b> : La capacité antioxydante de réduction du cuivre de la plante <i>A. graveolens</i> .....	<b>114</b>
<b>Tableau 24</b> : Activité phénanthroline de l'extrait <i>n</i> -butanol d' <i>A. graveolens</i> .....	<b>114</b>
<b>Tableau 25</b> : Activité antiradicalaire (Galvinoxyl) de l'extrait <i>n</i> -butanol d' <i>A. graveolens</i> .....	<b>115</b>

<b>Tableau 26</b> : Absorbance du pouvoir réducteur de l'extrait d' <i>A. graveolens</i> .....	<b>116</b>
<b>Tableau 27</b> : Activité photoprotectrice SPF de l'extrait de la plante <i>A. graveolens</i> .....	<b>117</b>
<b>Tableau 28</b> : inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase par l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> ....	<b>118</b>
<b>Tableau 29</b> : Inhibition de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase par l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> .....	<b>118</b>

# Table des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction .....1

## *Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE*

**I. LA DOXORUBICINE .....4**

I.1. Définition et origine .....4

I.2. Structure chimique de la DOX .....4

I.3. Pharmacocinétique de la DOX .....5

I.3.1. Voie d'administration et absorption .....5

I.3.2. La distribution .....5

I.3.3. Le métabolisme .....6

I.3.4. L'élimination .....7

I.4. Mécanismes d'action de la DOX.....8

I.4.1. Intercalation dans la molécule d'ADN .....8

I.4.2. Inhibition de l'enzyme topoisomérase II.....9

**II. TOXICITÉ DE LA DOX ET STRESS OXYDANT.....11**

II.1. La cardiotoxicité..... 11

II.1.1. Production des radicaux libres ..... 12

II.1.2. Les différents mécanismes de mort cellulaire induite par la DOX ..... 13

II.1.2.1. L'apoptose cellulaire ..... 13

II.1.2.2. La nécrose cellulaire ..... 16

II.1.2.3. L'autophagie cellulaire..... 16

II.2. L'hépatotoxicité ..... 18

II.3. La néphrotoxicité ..... 19

II.4. La toxicité des testicules ..... 20

<b>III. LES EFFETS PROTECTEURS DES ANTIOXYDANTS VIS À VIS LA TOXICITÉ</b>	
<b>DE LA DOX</b> .....	<b>22</b>
III.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques .....	22
III.1.1. La superoxyde dismutase .....	23
III.1.2. La catalase.....	23
III.1.3. La Glutathion Peroxydase.....	23
III.2. Les systèmes non-enzymatiques .....	24
III.2.1. La vitamine E.....	24
III.2.2. La Vitamine C.....	25
III.2.3. Le glutathion réduit (GSH) .....	25
<b>IV. LES POLYPHÉNOLS</b> .....	<b>25</b>
IV.1. Classification des polyphénols .....	26
IV.1.1. Acides phénoliques.....	27
IV.1.2. Les flavonoides.....	28
IV.1.3. Les tanins .....	30
IV.1.4. Les stilbènes .....	30
IV.1.5. Les lignanes .....	30
IV.2. Activités biologiques des polyphénols .....	31
<b>V. DONNÉES GÉNÉRALES SUR LES PLANTES ÉTUDIÉES</b> .....	<b>33</b>
<b>V.1. Présentation de l'espèce <i>Crataegus oxyacantha</i></b> .....	<b>33</b>
V.1.1. Etymologie et appellations.....	33
V.1.2. Distribution géographique .....	33
V.1.3. Description botanique.....	33
V.1.4. Classification botanique de <i>C. oxyacantha</i> .....	35
V.1.4.1. Classification taxonomique.....	35
V.1.4.2. Classification phylogénique APG IV 2016.....	36
V.1.5. L'utilisation traditionnelle de la plante <i>C. oxyacantha</i> .....	36
V.1.6. Composition chimique .....	37
V.1.7. Les effets biologiques et pharmacologiques .....	40
V.1.7.1. Effets cardiovasculaires .....	40
V.1.7.2. Autres effets pharmacologiques.....	41
V.1.8. Formes pharmaceutiques .....	43
V.1.9. Toxicité de la plante.....	43
<b>V.2. Présentation de l'espèce <i>Asteriscus graveolens</i> (Forsk.) Dc</b> .....	<b>44</b>

V.2.1. La famille des Asteracées .....	44
V.2.1. Distribution géographique d' <i>Asteriscus graveolens</i> (Forsk.) Dc.....	45
V.2.2. Description botanique .....	45
V.2.3. Noms Vernaculaires et Synonymes .....	46
V.2.4. Place dans la systématique.....	46
V.2.5. Usages en médecine traditionnelle.....	46
V.2.6. Composition chimique .....	47
V.2.7. Les effets biologiques et pharmacologiques .....	49

## **Chapitre II : MATERIEL ET METHODES**

<b>I. ETUDE EXPÉRIMENTALE IN VITRO .....</b>	<b>51</b>
I.1. Matériel végétal .....	51
I.1.1. La plante <i>Crataegus oxyacantha</i> .....	51
I.1.1.1. Récolte du matériel végétal .....	51
I.1.1.2. Procédures de l'extraction de la plante.....	51
I.1.2. La plante <i>Asteriscus graveolens</i> (Forsk.) DC.....	53
I.1.2.1. Récolte de la matière végétale .....	53
I.1.2.2. Procédures de l'extraction de la plante.....	53
I.2. Etude phytochimique.....	55
I.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux .....	55
I.2.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes .....	55
I.2.3. Dosage des flavonols totaux .....	56
I.3. Activité antioxydante.....	56
I.3.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	56
I.3.2. Test de piégeage du radical ABTS <sup>+</sup> .....	57
I.3.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) .....	58
I.3.4. Activité de réduction par formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phenanthroline.....	59
I.3.5. Effet scavenger du radical Galvinoxyl (GOR) .....	59
I.3.6. Activité du pouvoir réducteur.....	60
I.3.7. Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO) .....	61
I.4. Activité photoprotectrice SPF .....	62
I.5. Activités enzymatiques.....	63
I.5.1. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase .....	63

I.5.2. Détermination de l'activité anti-Alzheimer (l'activité anti-cholinestérase) .....	64
<b>II. EXPÉRIMENTATION ANIMALE .....</b>	<b>65</b>
II.1. Animaux et conditions d'hébergement .....	65
II.2. Induction de la toxicité et traitement des rats.....	66
II.2.1. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Crataegus oxyacantha</i> contre la toxicité de la doxorubicine (DOX) .....	66
II.2.2. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait <i>n</i> -butanol d' <i>Asteriscus graveolens</i> contre la toxicité de la doxorubicine (DOX) .....	66
II.3. Le sacrifice des animaux et prélèvement du sang .....	67
II.4. prélèvement des organes et préparation d'homogénat .....	67
II.5. Evaluation biochimique et mesure des paramètres du stress oxydatif .....	67
II.5.1. Evaluation des paramètres biochimiques .....	67
II.5.1.1. Evaluation de l'activité enzymatique de l'ASAT .....	68
II.5.1.2. Evaluation de l'activité enzymatique de l'ALAT .....	68
II.5.1.3. Evaluation de l'activité enzymatique de LDH .....	68
II.5.1.4. Dosage du cholestérol plasmatique .....	68
II.5.1.5. Dosage des triglycérides plasmatiques.....	69
II.5.2. Mesure des paramètres du stress oxydant .....	70
II.5.2.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA) .....	70
II.5.2.2. Dosage du glutathion (GSH) .....	71
II.5.2.3. Evaluation de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GP <sub>X</sub> ) .....	72
II.6. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> .....	73
II.6.1. L'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris .....	73
II.6.2. Œdème de la patte induit par le formol chez les rats .....	73
II.7. Etude histopathologique.....	74
III. Analyses statistiques .....	75

### ***Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION***

#### **Partie 1 : Résultats et discussion de l'étude expérimentale *in vitro* et *in vivo* de la plante**

##### ***Crataegus oxyacantha***

<b>I. ETUDE EXPÉRIMENTALE <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>76</b>
I.1. Rendements d'extraction .....	76
I.2. Analyse phytochimique .....	76

I. 2.1. Dosage des polyphénols totaux .....	76
I.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....	77
I.2.3. Dosage des flavonols totaux .....	78
I.3. Evaluation de l'activité antioxydante .....	79
I.3.1. Activité antiradicalaire au DPPH .....	79
I.3.2. Test de piégeage du radical ABTS .....	80
I.3.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) .....	81
I.3.4. Activité de réduction par formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phénanthroline.....	82
I.3.5. Test d'activité antiradicalaire galvinoxyl (GOR) .....	83
I.3.6. Activité du pouvoir réducteur (FRAP) .....	84
I.3.7. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO) .....	85
I.4. Evaluation de l'activité photoprotectrice SPF .....	86
I.5. Evaluation de l'activité enzymatique .....	87
I.5.1. Evaluation de l'activité inhibitrice de l'α-glucosidase .....	87
I.5.2. Evaluation de l'activité anti-cholinestérase (Anti-Alzheimer) .....	88
I.5.2.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase .....	88
I.5.2.2. Inhibition de la butyrylcholinestérase .....	88
<b>II. ETUDE EXPÉRIMENTALE IN VIVO .....</b>	<b>89</b>
II.1. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. oxyacantha</i> contre la toxicité de la doxorubicine (DOX) .....	89
II.1.1. L'effet du traitement sur les marqueurs biochimiques.....	89
II.1.1.1. Effet sur les taux sériques des enzymes ASAT, ALAT et LDH .....	89
II.1.1.2. Effet du traitement sur le profil lipidique .....	90
II.1.2. L'effet du traitement sur le taux des biomarqueurs du stress oxydant dans le foie .....	91
II.1.2.1. Effet sur la concentration du malondialdéhyde (MDA) .....	91
II.1.2.2. Effet sur la concentration du glutathion réduit GSH.....	92
II.1.2.3. Effet sur la l'activité enzymatique de la GPx.....	93
II.1.3. Effet du traitement sur les changements histologiques du foie.....	94
II.2. Évaluation de l'activité anti inflammatoire .....	95
II.2.1. Inhibition de l'œdème de l'oreille induit par le xylène .....	95
II.2.2. Inhibition de l'œdème induit par le formol.....	97
<b>Discussion .....</b>	<b>99</b>

## Partie 2 : Résultats et discussion de l'étude expérimentale *in vitro* et *in vivo* de la plante

### *Asteriscus graveolens*

<b>I. ETUDE EXPÉRIMENTALE <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>111</b>
I.1. Rendements d'extraction.....	111
I.2. Etude phytochimique.....	111
I.2.1. Dosage des polyphénols, des flavonoides et des flavonols .....	111
I.3. Evaluation de l'activité antioxydante .....	112
I.3.1. Activité antiradicalaire au DPPH .....	112
I.3.2. Test de piégeage du radical ABTS .....	113
I.3.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) .....	113
I.3.4. Activité de réduction par formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phenanthroline.....	114
I.3.5. Activité de piégeage du radical Galvinoxyl (GOR) .....	115
I.3.6. Pouvoir réducteur du fer (FRAP) .....	115
I.3.7. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO) .....	116
I.4. Evaluation de l'activité photoprotectrice SPF (Sun Protection Factor) .....	117
I.5. Evaluation de l'activité enzymatique .....	117
I.5.1. Evaluation de l'activité inhibitrice de l'α-glucosidase .....	117
I.5.2. Evaluation de l'activité anti-cholinestérase .....	118
<b>II. ETUDE EXPÉRIMENTALE <i>IN VIVO</i></b> .....	<b>119</b>
II.1. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait <i>n</i> -butanol de la plante <i>A. graveolens</i> contre l'hépatotoxicité et la toxicité des testicules induite par la DOX.....	119
II.1.1. L'effet du traitement sur les marqueurs biochimiques.....	119
II.1.1.1. Effet sur les taux sériques des enzymes ASAT et ALAT .....	119
II.1.1.2. Effet du traitement sur le profil lipidique .....	120
II.1.2. Effet du traitement sur les paramètres du stress oxydant.....	120
II.1.2.1. Effet sur le malondialdéhyde (MDA) .....	121
II.1.2.2. Effet sur le glutathion réduit (GSH) .....	121
II.1.2.3. Effet sur l'activité de la GPx.....	123
II.1.3. Etude histologique.....	123
II.1.3.1. Etude histologique des testicules .....	123
II.1.3.2. Etude histologique du foie .....	126
II.2. Evaluation de l'activité anti inflammatoire .....	127
II.2.1. Inhibition de l'œdème de l'oreille induit par le xylène .....	127

II.2.2. Inhibition de l'œdème induit par le formol.....	129
<b>Discussion</b> .....	<b>131</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>144</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>147</b>

# ***Introduction***

## **Introduction**

Les flavonoïdes représentent une classe très diversifiée de métabolites secondaires comprenant environ 10,000 structures identifiées à ce jour (Khan *et al.*, 2021 ; Chen *et al.*, 2023). Ils constituent le groupe le plus important de composés polyphénoliques ayant des effets potentiellement bénéfiques sur la santé humaine (Roy *et al.*, 2022). Les effets thérapeutiques de nombreuses médecines traditionnelles peuvent être liés dans de nombreux cas à la présence de ces polyphénols. Une grande variété d'activités pharmacologiques ont été rapportées pour ces substances, y compris les propriétés anti-inflammatoires, antiprolifératives, neuroprotecteur, cardiovasculaire, antidiabétiques (Ullah *et al.*, 2020), néphroprotecteur (Vargas *et al.*, 2018), hépatoprotecteur (Gajender *et al.*, 2023) et antioxydantes, et leurs ingestion ne produit généralement pas de toxicité (Mota *et al.*, 2009). Les effets thérapeutiques des flavonoïdes ont été prouvés dans la majorité des études précliniques sur des modèles murins. De plus, la conjugaison des flavonoïdes avec d'autres médicaments importants peuvent renforcer la puissance de ces composés et réduit leur effet indésirables (Ullah *et al.*, 2020).

La doxorubicine (DOX), est un médicament anticancéreux appartenant à la famille des anthracyclines. Elle est largement reconnue comme l'un des agents chimiothérapeutiques le plus efficace utilisé dans le traitement d'une variété de tumeurs solides et hématologiques malignes (Judson *et al.*, 2014). Néanmoins, en dépit de son potentiel anticancéreux reconnu, l'utilisation clinique de la DOX suscite encore des désagréments et demeure limitée en raison de sa toxicité grave sur divers organes tels que, le cœur, le foie, les reins et les testicules (Carvalho *et al.*, 2009 ; Granados-principal *et al.*, 2010 ; Biondo *et al.*, 2016).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme exact de la toxicité de la DOX. Il a été rapporté que les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la peroxydation lipidique jouent un rôle important dans la cardiotoxicité, l'hépatotoxicité et la toxicité des testicules provoquée par la DOX. En raison de sa structure chimique, la DOX a la capacité de générer des radicaux libres et d'induire un stress oxydant lors de son métabolisme. Cela peut entraîner des dommages au niveau des cellules et des tissus (Granados-principal *et al.*, 2010 ; Stěrba *et al.*, 2013). Jusqu'à présent, aucune substance n'a été mise sur le marché qui réverse la chimiorésistance et protège réellement les tissus sains contre les effets néfastes de la DOX sans réduire son efficacité thérapeutique.

La recherche d'agents protecteurs pour atténuer les problèmes des effets secondaires de la DOX constitue une voie d'exploration toujours ouverte.

Dans le contexte de la thérapie et la prévention contre les effets secondaires de la DOX, des produits extraits des plantes ont attiré l'attention par leurs activités anticancéreuses, chimiopréventives et cardioprotectrices. Les essais précliniques ont montré des propriétés antioxydantes pour plusieurs substances phytochimiques telles que celles des plantes d'*Aerva lanata*, d'*Aronia melanocarpa*, d'*Astragalus polysaccharide* et de *Bombyx mori*. D'autres extraits végétaux ont montré une capacité à inhiber l'apoptose, tels que ceux des plantes *Astragalus polysaccharide*, *Azadirachta indica*, *Bombyx mori* et *Allium stivium*. Contrairement aux agents synthétiques, les substances phytochimiques ne nuisent pas l'activité clinique de la DOX (Abushouk *et al.*, 2017).

À la lumière de ces données, le présent travail a été entrepris afin d'évaluer l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des différents extraits issus d'espèces végétales endémiques, ainsi que leur effet protecteur contre la toxicité induite par la DOX chez les rats.

Les espèces que nous avons étudiées sont; *Crataegus oxyacantha* de la famille des Rosacées et *Asteriscus graveolens* de la famille des Astéracées, connues localement sous le nom de "Zaaror et Tafss respectivement" (Djerroumi et Nacef, 2004 ; Said *et al.*, 2018), elles sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies telles que les maladies gastro-intestinales, les douleurs abdominales, les maladies inflammatoires et les infections bactériennes (Bardakci *et al.*, 2019 ; Benaissa *et al.*, 2020). Ces deux plantes possèdent une forte activité antioxydante, en raison de la présence de différents composés bioactifs notamment les polyphénols et les flavonoïdes qui ont de nombreux effets pharmacologiques, ce sont des hépatoprotecteurs, cardioprotecteurs, anti-inflammatoires... etc. Le choix de ces deux espèces s'est basé essentiellement sur la grande utilisation en médecine traditionnelle des plantes appartenant aux familles des Rosacées et Astéracées. Pour cela, notre travail vise à atteindre les objectifs suivants :

- ✓ Evaluation de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en flavonols
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydante des extraits par plusieurs tests *in vitro* (DPPH, ABTS, Galvinoxyl, CUPRAC, phénanthroline, pouvoir réducteur et LPO).
- ✓ Evaluation de l'activité antidiabétique *in vitro* par l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase

- ✓ Evaluation de l'activité anti-cholinestérase *in vitro* contre deux enzymes AChE et BChE.
- ✓ Evaluation *in vivo* de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait *n*-butanol de *Crataegus oxyacantha* contre la toxicité de la DOX.
- ✓ Evaluation *in vivo* de l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de la plante *Asteriscus graveolens* contre la toxicité hépatique et la toxicité testiculaire induite par la DOX.
- ✓ Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* en utilisant l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris et l'œdème de la patte induit par le formol chez les rats.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une analyse de la bibliographie existante concernant le sujet de cette thèse. La deuxième partie présente en détail le matériel utilisé ainsi que les méthodes mises en œuvre pour répondre aux questions posées dans ce projet. La troisième partie se concentre sur la présentation des résultats obtenus au cours de cette recherche, suivie d'une discussion approfondie pour interpréter ces résultats dans un contexte scientifique. Enfin, une conclusion résume les principaux travaux de cette étude et offre des perspectives pour d'éventuelles études ultérieures dans ce domaine.

***Chapitre I :***  
***Revue bibliographique***

## I. LA DOXORUBICINE

### I.1. Définition et origine

La DOX ou adriamycine, fait partie de la famille des anthracyclines est un antibiotique anticancéreux apparu dans les années 1960 à partir de bactéries Gram positive du genre *Streptomyces peucetius* (Carvalho *et al.*, 2009; Wakharde *et al.*, 2018). À ce jour, la DOX est la molécule de référence la plus efficace utilisée en chimiothérapie dans le traitement de nombreuses tumeurs chez l'Homme, notamment dans le cadre de la thérapeutique des carcinomes mammaires, ovariens ou vésicaux, des lymphomes hodgkiniens ou non, des cancers du poumon et des leucémies aiguës et chroniques (Meredith et Dass, 2016).

### I.2. Structure chimique de la DOX

La DOX est un membre de la famille des anthracyclines, elle possède une structure composée de quatre noyaux aromatiques (tétra cyclique) (Figure 1), Les groupements fonctionnels importants pour son action sont la quinone, l'hydroquinone (accepteur et donneur d'électrons), la chaîne latérale acyclique et le sucre daunosamine, responsable de l'hydrosolubilité de la DOX (Carvalho *et al.*, 2009; Tam, 2013).

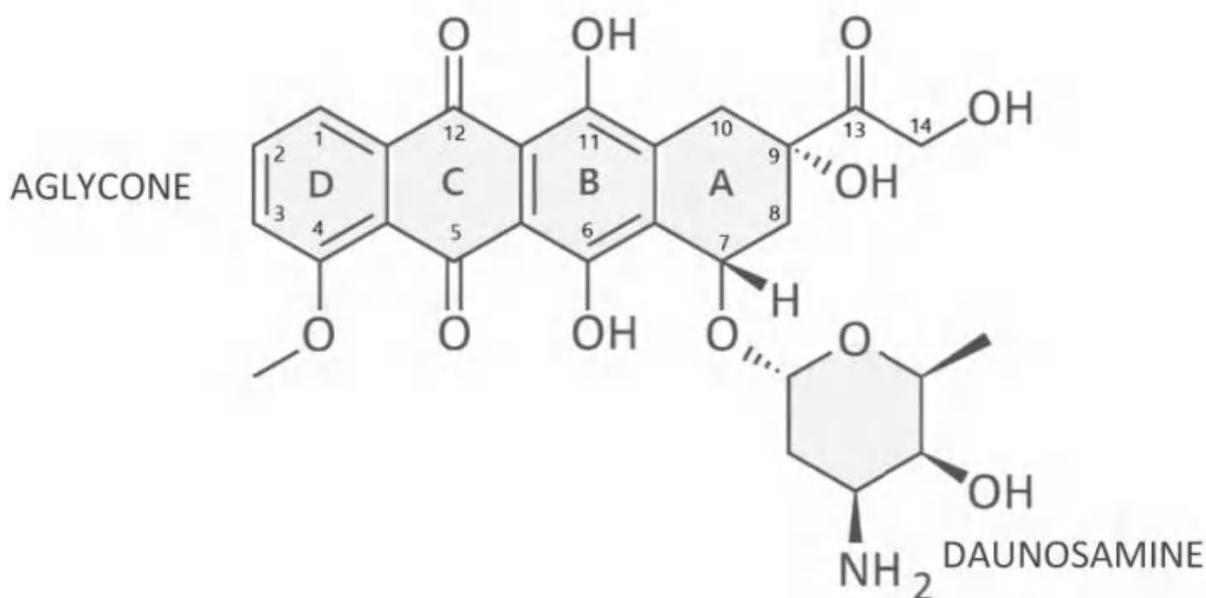


Figure 1 : Structure moléculaire de la DOX (Souza *et al.*, 2021)

### I.3. Pharmacocinétique de la DOX

La pharmacocinétique permet d'étudier le comportement de la molécule d'intérêt et son devenir dans l'organisme, Pour cela, on étudie quatre paramètres : l'absorption, la distribution dans l'organisme, le métabolisme et l'élimination.

#### I.3.1. Voie d'administration et absorption

L'administration de la DOX se fait habituellement par voie intraveineuse généralement en perfusion de solution de chlorure de sodium isotonique ou de solution de glucose à 5% afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée, cette méthode minimise le risque d'extravasation périverneuse qui endommagerait les tissus. La DOX peut être également administrée par voie intravésicale dans les cas du cancer de la vessie, qui concernent principalement les personnes âgées. La dose d'administration varie selon le patient et se trouve en général entre 30 et 70 mg/m<sup>2</sup> administrée toutes les trois semaines jusqu'à une dose totale cumulative déterminée par le médecin. En effet, ce médicament anticancéreux, administré à des doses totales cumulées de 550 mg/m<sup>2</sup> entraînerait des problèmes cardiaques chez plus de 7 % des patients traités (Tokarska *et al.*, 2006 ; Lal *et al.*, 2010).

#### I.3.2. La distribution

Dans le sang, 60-70% de la DOX se retrouve liée à diverses protéines plasmatiques, particulièrement à l'albumine, leur demi-vie de distribution initiale est courte, entre 5 et 30 minutes, elle est rapidement éliminée du plasma et distribuée vers la plupart des tissus de l'organisme comme le foie, les poumons, le cœur et la rate, hormis le cerveau car elle ne traverse pas la barrière hématoencéphalique (Lal *et al.*, 2010). Il a été démontré que l'hydrophobicité de la DOX associée à sa nature de base faible non chargée, lui permet de diffuser passivement à travers la membrane plasmique par un mouvement de flip-flop du feuillet externe au feuillet interne (Borst *et al.*, 2000). Après entrée dans les cellules des organes cible, la DOX est prise en charge par le complexe protéasome puis migre et s'accumule à l'intérieur du noyau à cause de sa très grande affinité avec l'ADN (Minotti *et al.*, 2004), ce qui représente une concentration nucléaire en DOX d'environ cinquante fois plus importante à celle du cytoplasme (Lal *et al.*, 2010). La DOX cytoplasmique est distribuée équitablement entre les organites tels que les mitochondries, les lysosomes et l'appareil de Golgi, elle est donc très peu présente sous forme libre au niveau cytoplasmique (Lal *et al.*, 2010 ; Tacar *et al.*, 2013).

### I.3.3. Le métabolisme

La DOX est métabolisée principalement au niveau du foie avec des réactions de phase I et de phase II, et est convertie en doxorubicinol (Figure 2) ainsi qu'en plusieurs dérivés aglycones (Jacevic *et al.*, 2018). Les aldokéto réductases cytoplasmiques sont responsables de la réduction de la DOX en doxorubicinol à la présence du NADPH (Minotti *et al.*, 2001). Cette voie métabolique correspond à la voie principale de métabolisation de la DOX (Lal *et al.*, 2010). Le doxorubicinol (13-dihydroDOX) est un métabolite hydrophile qui se liant également aux protéines plasmatiques, Certaines études suggèrent que sa toxicité dans les cellules cancéreuses peut être inférieure à celle du DOX et plus toxique pour les cellules cardiaques (Heibein *et al.*, 2012; Olson *et al.*, 1988). La DOX peut également subir une réduction à un électron, pour former un radical DOX semi-quinone. Cette réaction est catalysée par différentes enzymes de type NADPH- oxydoréductases comme NADPH cytochrome P450 réductase et la NADH-ubiquinone oxydoréductase (complexe I mitochondrial) (Stéphanie *et al.*, 2006). Les autres métabolites des formes aglycones de la DOX pouvant être produites par l'élimination de la partie glycosidique (kuraishy *et al.*, 2017) sous l'action du cytochrome P450 réductase-NADPH dépendante, menant à la formation des composés 7-hydroxy aglycones ou 7-déoxy aglycones. Finalement la DOX et ses métabolites subissent des réactions de conjugaisons (phase II) avec l'acide glucuronique ou le groupement sulfate pour être excrétés par la bile.

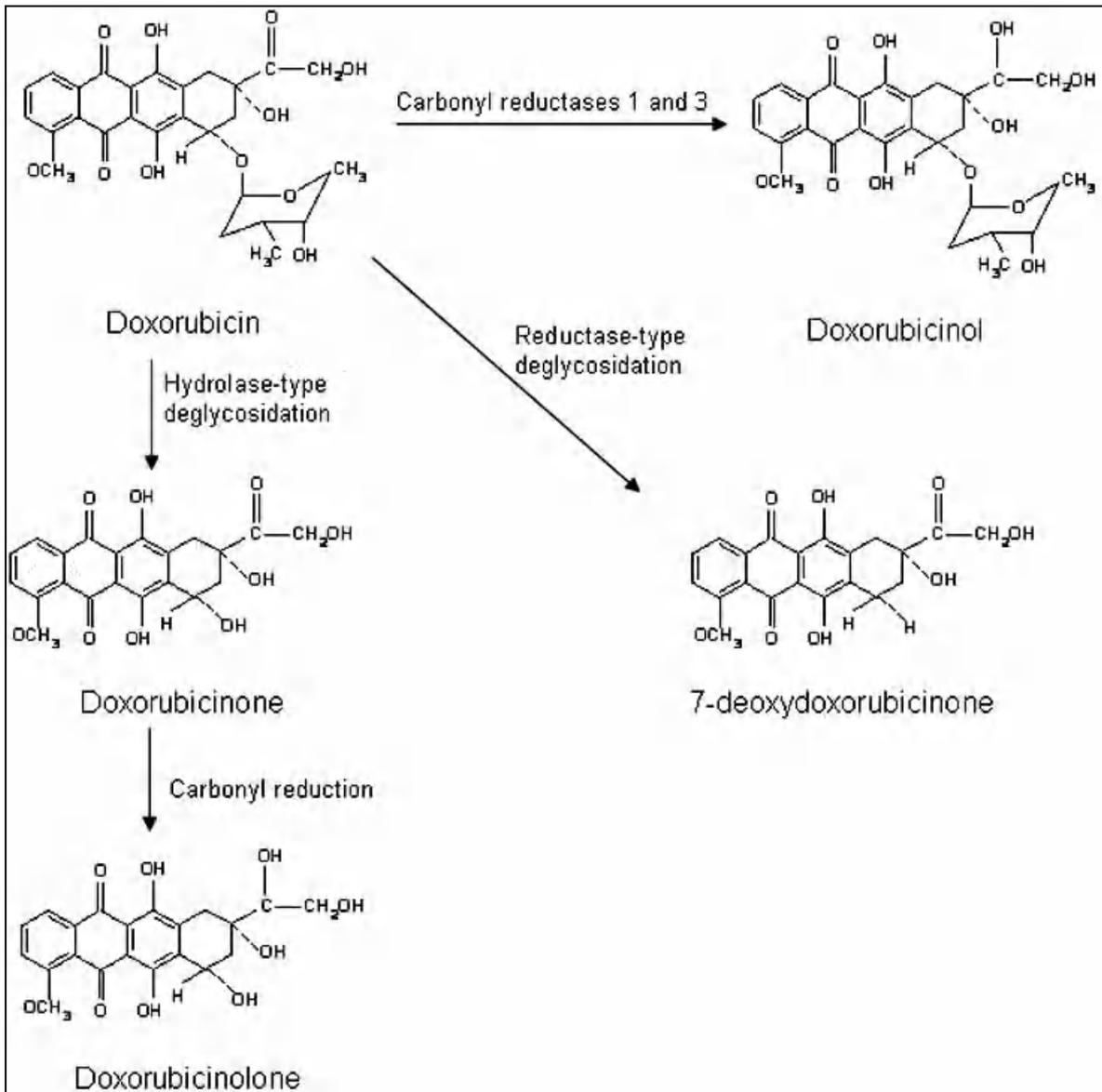


Figure 2: Biotransformation de la DOX (Lal *et al.*, 2010)

### I.3.4. L'élimination

La DOX ainsi que ses métabolites sont éliminés majoritairement par la bile et les selles à raison de 40–50% sous forme inchangée et de 23% sous forme de doxorubicinol. Mais également excrétés par voie rénale, En effet, 5 à 12 % de la dose administrée sont retrouvées dans les urines ce qui explique la coloration rouge de l'urine, quelques jours après le traitement, Leur temps d'élimination est de 30 heures (Alkuraishy *et al.*, 2017 ; Alghorabi *et al.*, 2019).

#### I.4. Mécanismes d'action de la DOX

La DOX est un antibiotique cytotoxique peut exercer ses effets anticancéreux par une intercalation dans l'ADN, une inhibition de l'enzyme topoisomérase II et la formation des radicaux libres (Lal *et al.*, 2010).

##### I.4.1. Intercalation dans la molécule d'ADN

La DOX pénètre dans les cellules cancéreuses par simple diffusion en liant la sous unité 20S du protéasome dans le cytoplasme pour former un complexe grâce à sa forte affinité avec les protéasome (Kiyomiya *et al.*, 2001). Une fois le complexe forme, celui-ci subit une translocation du cytoplasme vers le noyau, via les pores nucléaires. Enfin la DOX se dissocie du protéasome et se lie à l'ADN en raison de sa plus grande affinité pour l'ADN que pour le protéasome (Figure 3) (Minotti *et al.*, 2004 ; Carvalho *et al.*, 2009).

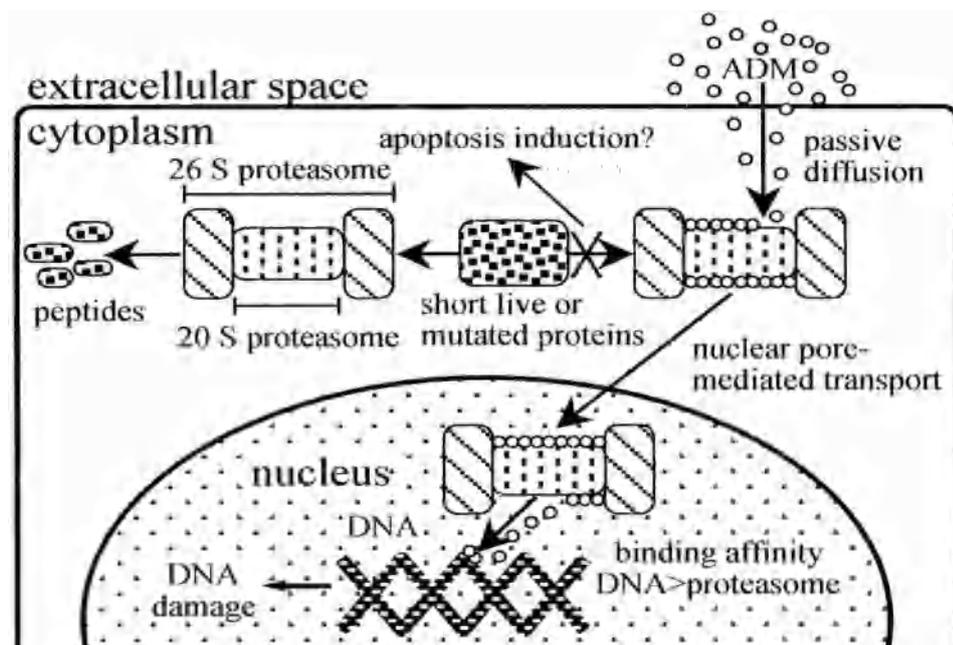
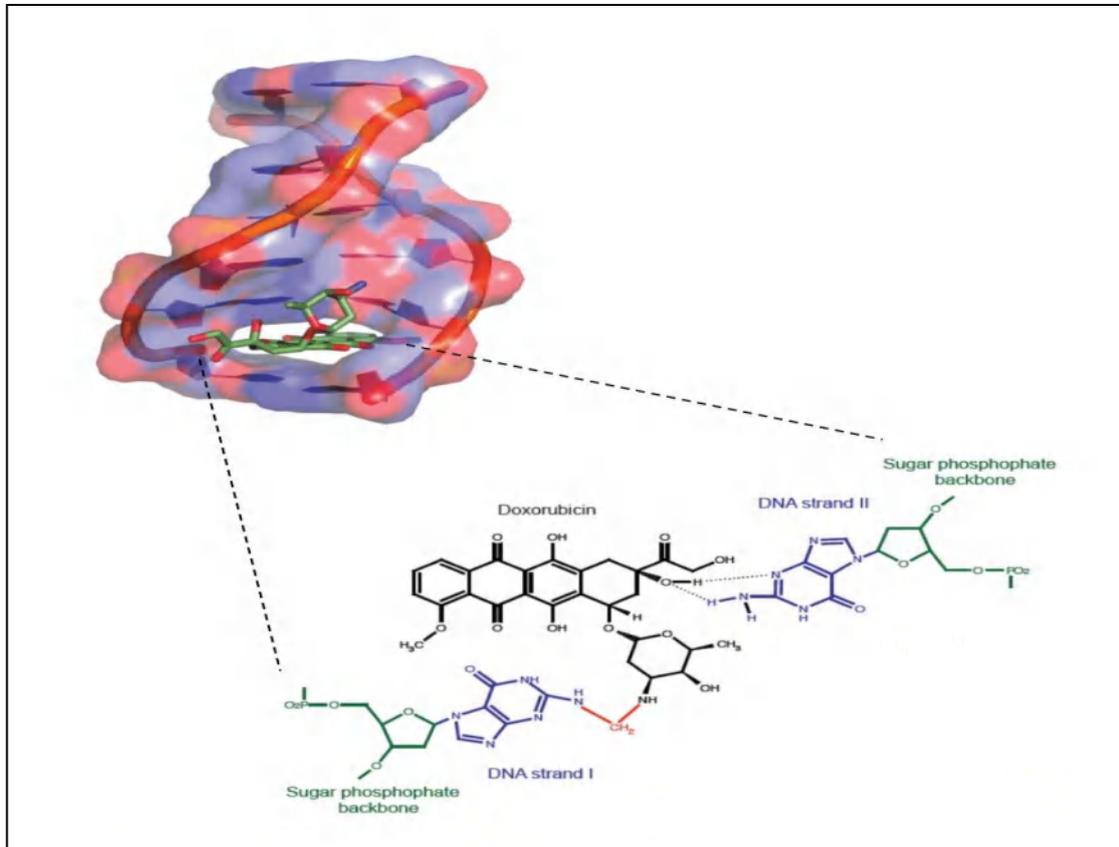


Figure 3 : Modalités d'action du complexe protéasome-DOX (Kiyomiya *et al.*, 2001)

La DOX se lie aux doubles-brins de l'ADN (Forrest *et al.*, 2012). Sa structure cyclique plane lui permet de former des adduits ou ponts (crosslink) en s'intercalant directement entre deux paires de bases adjacentes principalement sur les résidus guanine dans la double hélice d'ADN par formation de liaisons hydrogènes (Figure4) (Yang *et al.*, 2014 ; Aniogo *et al.*, 2017). De plus, la partie glucidique de la DOX interagit avec les protéines régulatrices de l'ADN

(Figure 4) en empêchant la fixation de différentes enzymes tels que l'ADN et l'ARN polymérase, ce qui a pour conséquence une inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN et donc la synthèse des protéines. (Carvalho *et al.*, 2009 ; Meredith *et al.* 2016).

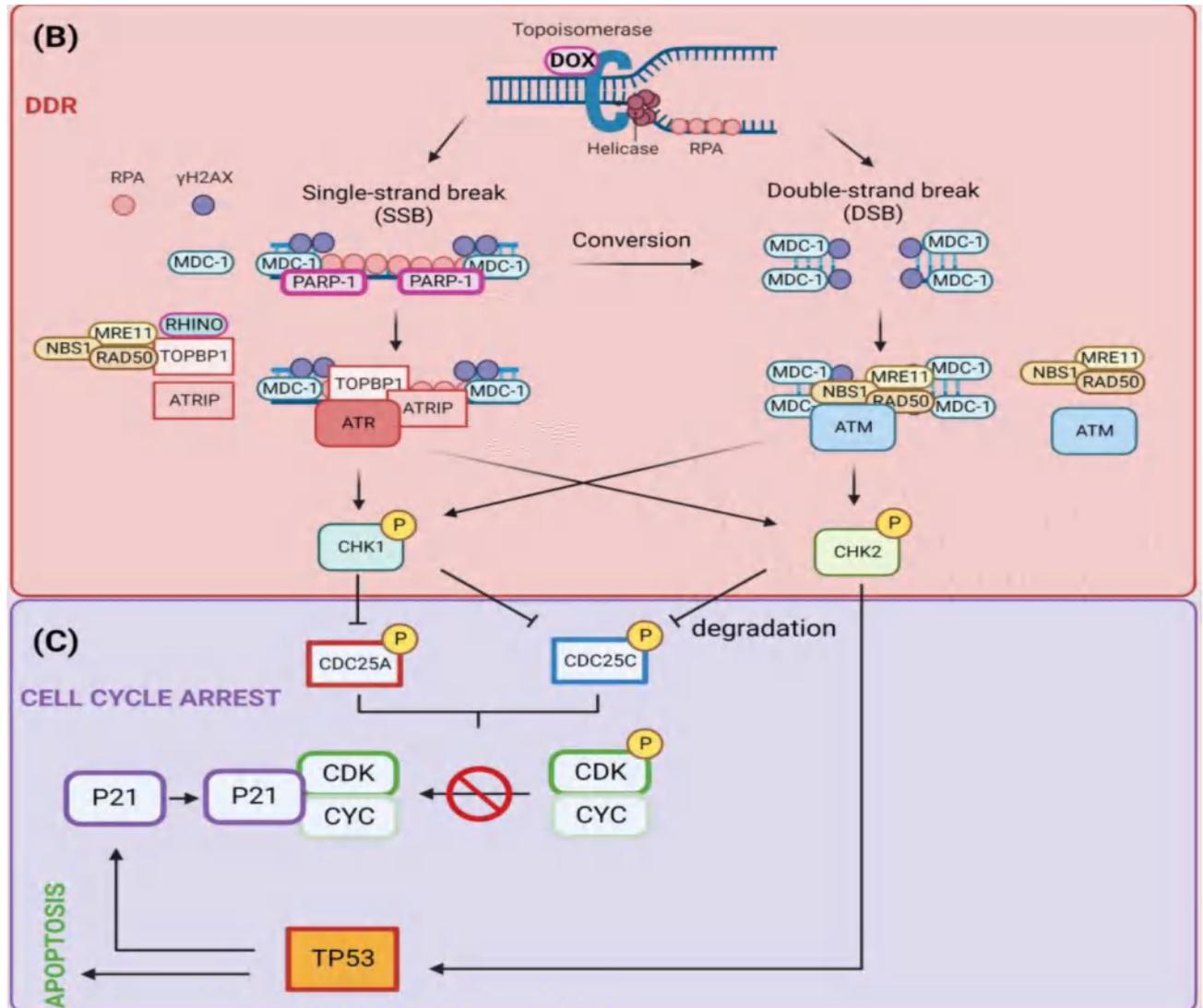


**Figure 4: Intercalation de la DOX dans la molécule d'ADN (Yang *et al.*, 2014)**

#### I.4.2. Inhibition de l'enzyme topoisomérase II

Les topoisomérases sont des enzymes ubiquitaires qui contrôlent la topologie de l'ADN (Yang *et al.*, 2014 ; Zhu *et al.*, 2016 ). Elles sont essentielles pour de nombreux processus de la vie cellulaire tels que la transcription, la réplication, la recombinaison et la condensation des chromosomes lors de la mitose et probablement la méiose (Zhu *et al.*, 2016). Les topoisomérases II forment un complexe avec l'ADN en induisant des cassures transitoires simple et double brin sans générer des dommages à l'ADN. La DOX agit en stabilisant le complexe de clivage [ADN-topoisomérase II] et empêche le raccord entre les brins d'ADN clivés, ce qui perturbe la structure de l'ADN et bloque sa synthèse (Figure 5) (Meredith et Dass, 2016), ces effets au niveau de l'ADN mènent à l'activation du P53, l'arrêt du cycle cellulaire et donc la mort de la cellule tumorale par apoptose (Forrest *et al.*, 2012). Toutefois, l'apoptose n'est pas la seule conséquence biologique possible en réponse aux dommages à l'ADN par la DOX. Selon la dose reçue, la

durée d'exposition et le type cellulaire, l'apoptose, la nécrose, la sénescence ou l'autophagie peuvent être induites (Meredith et Dass, 2016).



**Figure 5. inhibition de l'action du topoisomérase II par la DOX (Kciuk *et al.*, 2023)**

(B) Activation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN (DDR). Le piégeage des enzymes topoisomérases II par la DOX induit la formation de cassures simples brin (SSB) et l'induction de cassures double brin (DSB). Les SSB sont détectés par la poly [ADP-ribose] polymérase 1 (PARP-1) et l'ADNsb est recouvert de protéine de réplication A (RPA). Cela entraîne le recrutement de divers facteurs, notamment la protéine 1 de liaison à l'ADN topoisomérase 2 (TOPBP-1), les complexes RAD9, RAD1, HUS1 (RHINO), la protéine interagissant avec l'ATR (ATRIP), les complexes MRE11-RAD50-NBS1, et la sérine/thréonine-protéine kinase ATR qui contribuent à la formation de foyers de protéine γH2AX sur les sites de dommages. Les DSB sont détectés par des complexes MRN, qui recrutent un médiateur de la protéine 1 du point de contrôle des dommages à l'ADN (MDC-1) et l'amplification de la formation de foyers par la kinase ataxie télangiectasie mutée (A-T mutée) (ATM). Par conséquent, les kinases ATR et ATM phosphorylent les kinases de point de contrôle CHK1 et CHK2. (C) Induction de l'apoptose ou de l'arrêt du cycle cellulaire par DOX. La phosphorylation des phosphatases CDC25A/C médiée par CHK1/2 entraîne leur dégradation et, par conséquent, aucune déphosphorylation des complexes CDK-cycline qui empêchent la progression du cycle cellulaire. Alternativement, CHK2 phosphoryle et active le facteur de transcription de l'antigène tumoral cellulaire p53 (TP53), conduisant à une régulation positive de P21, qui se lie aux complexes CDK-cycline non phosphorylés (actifs) et contribue à l'arrêt du cycle cellulaire.

## II. Toxicité de la DOX et stress oxydant

Le stress oxydant est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou nos tissus lorsqu'ils sont soumis à une production excessive, endogène ou exogène, de radicaux libres oxygénés qui dépasse leurs capacités antioxydantes (Favier, 2006). Ces radicaux libres sont définis comme étant des espèces chimiques réactives possédant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur orbital externe ce qui leur confère une instabilité (Migdal et Serres, 2011). Ils sont produits en permanence par le métabolisme cellulaire aérobie en conditions normales, notamment au niveau de la mitochondrie dans la chaîne respiratoire et sont essentiels à plusieurs processus comme la transduction de signaux, la mort cellulaire et la régulation du cycle cellulaire. Par ailleurs, bien que les radicaux libres participent à de nombreuses fonctions physiologiques, ils ont été considérés comme nuisibles, responsables de potentiels dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides qui contribuent à la pathogenèse d'un grand nombre de maladies qui possèdent un caractère radicalaire (Migdal et Serres, 2011 ; Schieber et Chandel, 2014 ; Zbadi *et al.*, 2018). L'induction d'un stress oxydant par la DOX est l'un des hypothèses principales la plus répandue (Simunek *et al.*, 2009), elle représente une large gamme des effets indésirables toxiques sur les différents organes tels que le foie, le cœur, les reins, le cerveau et les testicules (Carvalho *et al.*, 2009 ; Aktas *et al.*, 2019).

### II.1. La cardiotoxicité

La DOX peut entraîner, à fortes doses cumulatives, des troubles cardiaques (Migdal et Serres, 2011). La cardiotoxicité induite par la DOX peut être aiguë, subaiguë ou chronique. La cardiotoxicité aiguë survient dans environ 11% des cas et se manifeste dans les 2-3 jours de traitement. Elle peut être réversible et son apparition prédit le risque d'insuffisance cardiaque dans le futur. L'incidence de la cardiomyopathie chronique est beaucoup moins importante que la toxicité aiguë et est estimée chez 1,7%. Bien qu'il se manifeste habituellement dans les 30 jours suivant l'exposition à la dernière dose, il peut ne se manifester qu'après 6 à 10 ans plus tard. La cardiotoxicité subaiguë et chronique est permanente et irréversible. La cardiotoxicité induite par la DOX peut se manifester par l'une des symptômes suivantes : hypotension, tachycardie, arythmies transitoires ou cardiomyopathie tardive sous forme de fatigue, de dyspnée et d'œdème des membres inférieurs (Abushouk *et al.*, 2017). Le mécanisme de cardiotoxicité n'est pas totalement connu (Shevchuk *et al.*, 2012 ; Mohamed et Kassem, 2018). Les données les plus convaincantes supposent que les effets secondaires de toxicité cardiaques sont attribués à la génération des radicaux libres, la perturbation de l'homéostasie calcique, l'apoptose cellulaire et modulation de l'expression de certains gènes de la signalisation cellulaire (Zhang *et al.*, 2010).

### II.1.1. Production des radicaux libres

Le mécanisme de la cardiotoxicité induite par la DOX le plus largement étudié est la génération d'un stress oxydant (Mohamed et Kassem, 2018). En effet, La DOX est capable d'induire une production accrue de radicaux libres et plus particulièrement des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Cette production d'ERO s'explique notamment par la structure de la DOX qui contient une quinone capable de subir une réduction enzymatique, catalysée par les flavines réductases (NADPH cytochrome P450 réductase, NADH déshydrogénase), entraînant la formation d'un dérivé semi-quinone radicalaire (Migdal et Serres, 2011 ; Meredith et Dass, 2016). Ce dérivé peut lui-même subir une réduction en hydroquinone, ou retourner à la forme quinone en cédant son électron célibataire à l'oxygène moléculaire, produisant ainsi des radicaux superoxydes ( $O_2^-$ ) (Figure 6) qui sera également oxydé par la superoxyde dismutase (SOD) pour former du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), une molécule stable qui peut être décomposé en eau et en oxygène grâce à l'action des catalases et des glutathions peroxydases (GSH-Px). à ce stade, le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde peuvent entraîner la formation de radicaux hydroxyles ( $OH^\bullet$ ) par la réaction d'Haber-Weiss, Ce radical hydroxyle est l'une des espèces chimiques les plus réactives et très toxiques, il peut être à l'origine de l'oxydation délétère de constituants cellulaires. Cette réaction lente peut être catalysée par certains métaux et plus particulièrement le fer (Delemasure *et al.*, 2006 ; Tokarska *et al.*, 2006). Une deuxième voie de génération de radicaux libres par la DOX fait intervenir la formation d'un complexe organométallique entre la DOX et le fer. Au sein de la cellule, les anthracyclines stimulent la libération de l'ion ferrique  $Fe^{3+}$  (à partir de la transferrine et de la ferritine) pour former un complexe très stable :  $Fe^{3+}$ -(anthracycline)<sup>3</sup>. Ce complexe peut subir un cycle interne d'oxydoréduction puis aboutir à la formation de radicaux  $O_2^-$  (Castel *et al.*, 2012). L'anion superoxyde peut également réagir avec le monoxyde d'azote (NO) pour produire l'anion peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), agent oxydant très instable, qui pourrait lui-même générer le radical OH indépendamment de la mise en jeu des processus faisant intervenir le fer. L'ensemble de ces voies de production de radicaux libres seraient, en partie, à l'origine des atteintes irréversibles observées au niveau des cardiomyocytes qui sont particulièrement sensibles aux radicaux libres car elles sont pauvres en agents antioxydants comme la catalase et la SOD (Zucchi *et al.*, 2003; Delemasure *et al.*, 2006).

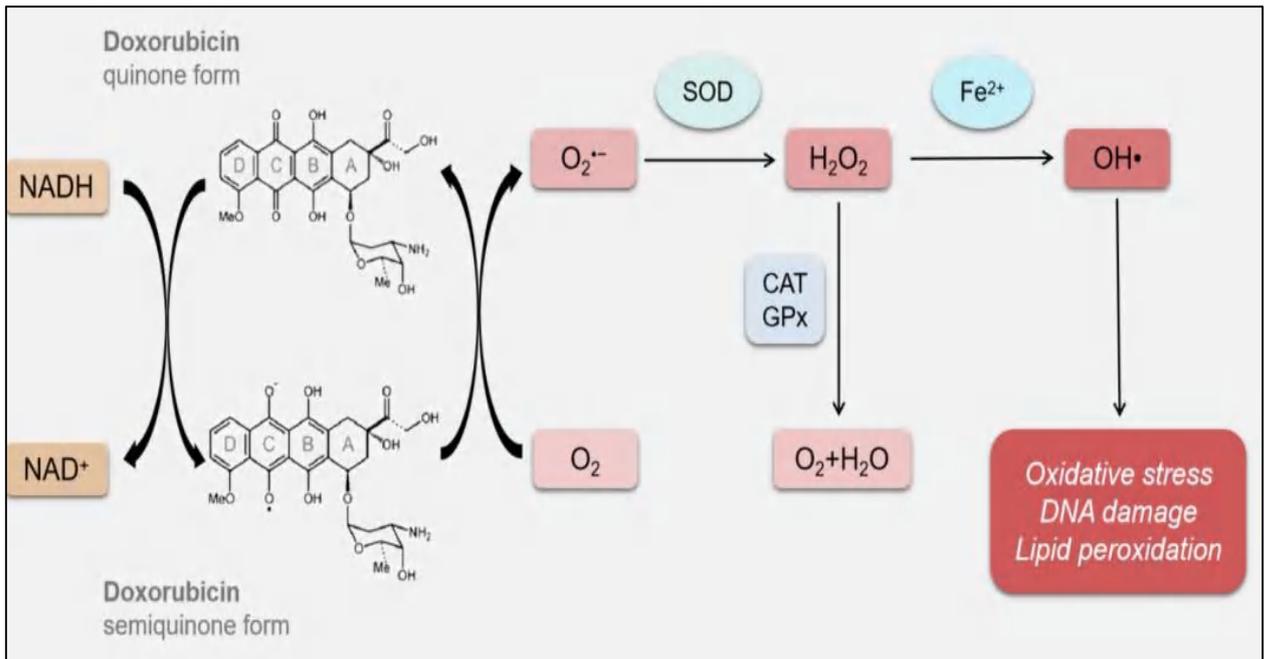


Figure 6 : Cycle de réduction de la DOX et la formation des radicaux libres (Wang *et al.*, 2021)

La production de radicaux libres par la DOX et les anthracyclines en général, au sein des cellules myocardiques, entraîne une peroxydation lipidique responsable de l'altération des fonctions membranaires. L'homéostasie calcique est alors perturbée. Il s'ensuit une diminution de la contractilité myocardique, ainsi qu'un défaut de relaxation par « excès » du calcium disponible au niveau des myofibrilles. De plus, le stress oxydatif associé au traitement par la DOX peut induire directement des lésions mitochondriales ayant pour conséquence une altération des processus de transferts membranaires et une évolution de la cellule vers l'apoptose. La formation de peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), au sein des cardiomyocytes, pourrait également jouer un rôle très important dans la cardiotoxicité induite par la DOX, du fait du spectre de ses actions toxiques : oxydation des lipides et des thiols, stimulation de la libération de fer, de ses sites de stockage et nitration des résidus tyrosine des protéines (Delemasure *et al.*, 2006).

## II.1.2. Les différents mécanismes de mort cellulaire induite par la DOX

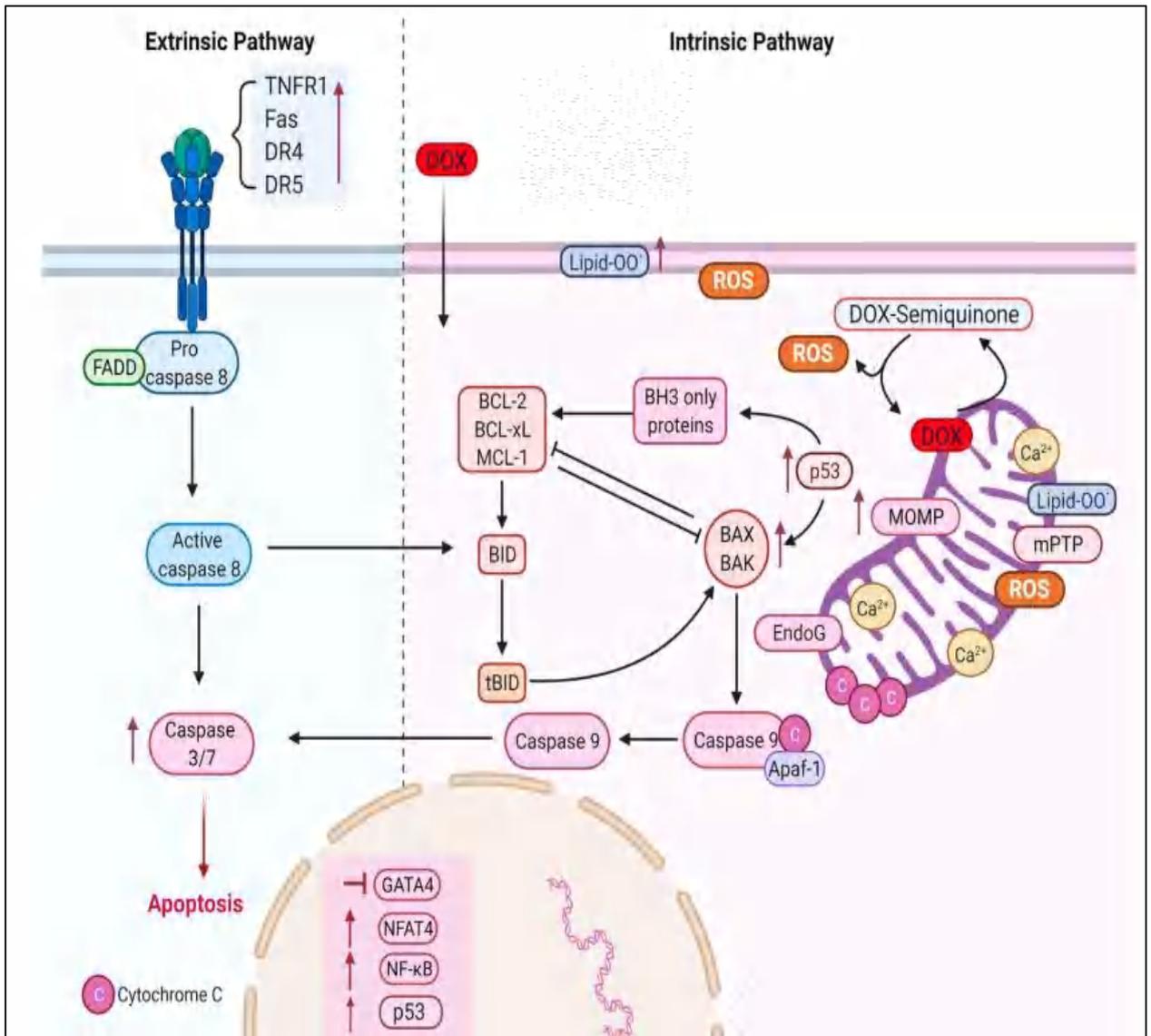
### II.1.2.1. L'apoptose cellulaire

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée provoquant des changements morphologiques de la cellule en réponse à un signal. La cellule apoptotique est caractérisée par la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine, la convulsion des membranes cytoplasmiques et nucléaires et la condensation du cytoplasme. Ces changements

morphologiques conduisent à la formation des corps apoptotiques éliminés par phagocytose. L'apoptose induite par la DOX dans les cardiomyocytes est médiée par les ROS et peut être initiée par deux voies alternatives : soit par les récepteurs de mort à la surface cellulaire (voie extrinsèque), soit par voie mitochondriale (voie intrinsèque). Par les deux voies, l'induction de l'apoptose conduit à l'activation des caspases initiateuses qui activeront à leur tour les caspases effectrices (Tokarska *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010 ; Octavia *et al.*, 2012).

La DOX déclenche la voie apoptotique extrinsèque par la liaison des ligands Fas (FASL) à leurs récepteurs spécifique à la surface de la cellule (Figure 7). Cette liaison induit le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain protein) qui induit l'activation de la caspase 8 puis l'activation de protéines effectrices menant à la mort cellulaire. La DOX peut également initiée la voie extrinsèque par l'activation de la voie calcium/calciéurine (Figure 7), à l'origine de l'activation du Nuclear Factor Activated T-cell 4 (NFATc4), menant à la régulation positive de FasL, ainsi que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B activé par les ERO conduisant à la surexpression et l'activation de plusieurs gènes apoptotiques tels que FasL, Fas, c-Myc et p53 (Zhang *et al.*, 2010; Meredith et Dass, 2016).

La voie intrinsèque est généralement induite par des signaux internes de la cellule. La DOX initie la mort cellulaire par apoptose en induisant l'activation du gène P53; un élément clé dans la réponse aux stress cellulaires qui joue un rôle crucial dans l'activation et l'expression de divers protéines pro-apoptotiques telles que BCL-2 / BAX (Figure 7), NOXA, PUMA pour ensuite permettre l'ouverture des pores mitochondrial et libération du cytochrome C (Figure 7) dans le cytoplasme. Une fois libéré, le cytochrome C se fixe au facteur d'activation des protéases apoptotiques (Apaf-1) et à la procaspase 9 en présence d'ATP pour former l'apoptosome. Dans ce complexe, la caspase 9 est activée et clive les protéases effectrices (caspases 3, 6 et 7) qui entraînent l'activation de la mort cellulaire par apoptose (Meredith et Dass, 2016 ; Mobaraki *et al.*, 2017).



**Figure 7. Induction de la mort cellulaire par la doxorubicine (Christidi et Brunham, 2021)**

Représentation schématique de l'apoptose induite par la doxorubicine dans le cœur. Régulation positive de p53, Bax/Bak induite par la doxorubicine et régulation négative de GATA4 et Bcl-XL activant les caspases 9, 3 et 7, entraînant la mort par apoptotique. La surcharge calcique des mitochondries et l'activation des pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) entraînent une perte potentielle de la membrane mitochondriale, un gonflement des mitochondries et une rupture de la membrane externe permettant la libération de l'endonucléase G (EndoG), du cytochrome c et de l'activation de la caspase 9. La doxorubicine induit la voie apoptotique extrinsèque via la régulation positive des récepteurs de mort et activation de NFAT et NF-κB. DR : récepteur de mort, récepteur 1 du facteur de nécrose tumorale TNFR1, protéine associée à FADD Fas avec domaine de mort, récepteur de mort DR, peroxydes lipidiques lipide-OO', endonucléaseG EndoG, calcium Ca<sup>2+</sup>, espèces réactives de l'oxygène ROS, pore de transition de perméabilité mitochondriale mPTP, mitochondries externes MOMP perméabilité membranaire, doxorubicine DOX, protéine X associée à Bax Bcl-2, facteur 1 de protéase d'apoptose Apf-1, mort du domaine d'interaction BID BH3, facteur nucléaire NF-κB-κB, facteur nucléaire NFAT4 des cellules T activées, GATA4 GATA -protéine de liaison 4.

### **II.1.2.2. La nécrose cellulaire**

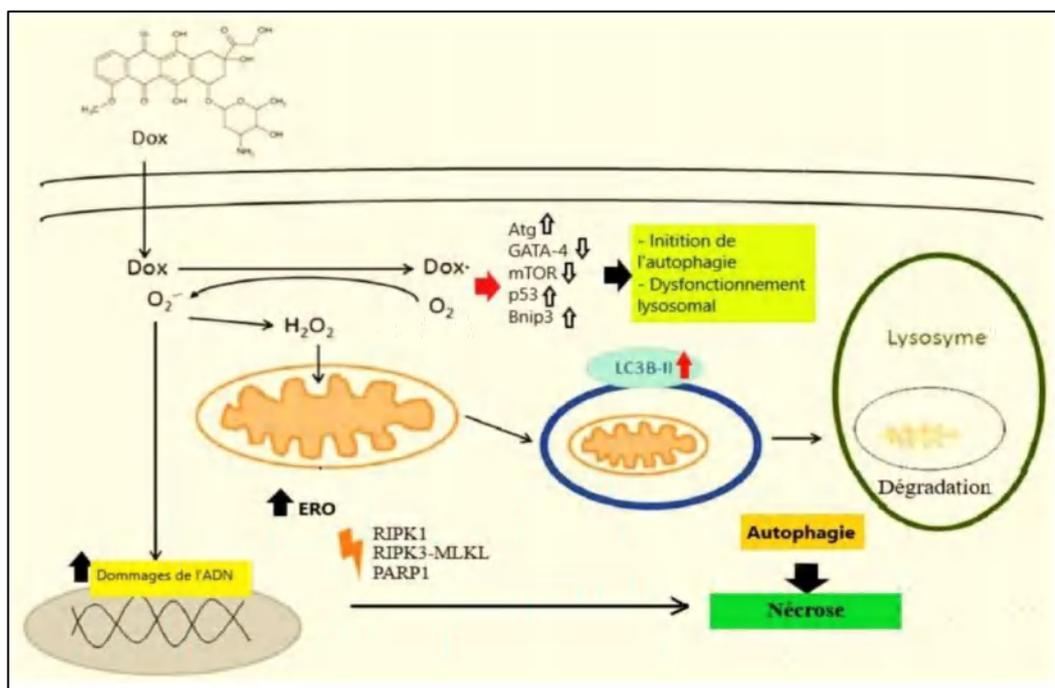
La nécrose est un processus de mort cellulaire non programmée qui se caractérise par une augmentation du volume de la cellule, un gonflement des organites et une rupture précoce de la membrane plasmique avec perte du contenu intracellulaire (Zhang *et al.*, 2009). Plusieurs études ont rapporté une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de l'infiltration de cellules inflammatoires, et de la nécrose dans les cœurs des souris traitées par la DOX (Ikegami *et al.*, 2007 ; Riad *et al.*, 2009). En effet, La DOX peut induire la nécrose des cellules par la production des ROS et la perturbation de l'homéostasie calcique ce qui a pour conséquence l'augmentation de la concentration en calcium dans la mitochondrie. L'accumulation de calcium dans la mitochondrie conduit à la formation de MPT responsables de la perte du potentiel mitochondrial. Cela perturbe la production d'énergie mitochondriale et diminue le pool d'ATP cellulaire, déclenchant la nécrose cellulaire (Wallace, 2007).

La DOX induit également la nécrose par le biais d'un mécanisme qui dépend de la protéine Bcl-2-like 19 kDa-interacting-protein 3 (Bnip3). Cette protéine joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité mitochondriale et dans la régulation des signaux de mort cellulaire. En situation de stress pathologique, la protéine Bnip3 favorise non seulement la nécrose cellulaire, mais aussi l'autophagie (Regula *et al.* 2002). La production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) résultant du traitement à la DOX contribue à la nécrose en réponse aux adduits de l'ADN via plusieurs voies de signalisation intracellulaires complexes. Cela englobe la voie impliquant les récepteurs des protéines kinases RIPK1 et RIPK3, ainsi que la poly-(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) (Shin *et al.*, 2015 ; Yang *et al.*, 2016).

### **II.1.2.3. L'autophagie cellulaire**

L'autophagie cellulaire, également connue sous le nom d'autophagocytose est un processus cellulaire de dégradation et de recyclage des composants cellulaires, tels que des protéines, des organites et d'autres structures cellulaires. C'est un mécanisme essentiel qui permet aux cellules de se débarrasser des éléments endommagés ou inutiles, de maintenir leur homéostasie et de fournir des éléments nutritifs essentiels en période de stress ou de privation. Elle consiste en l'encapsulation des éléments à dégrader dans des vésicules spéciales appelées autophagosomes, qui sont ensuite fusionnées avec des lysosomes pour la dégradation des contenus. L'autophagie joue un rôle important dans divers processus biologiques, y compris la régulation de la croissance cellulaire et la réponse aux stress environnementaux (Lockshin et Zakeri, 2004 ; Tsujimoto et Shimizu, 2005). La DOX peut déclencher l'autophagie via le stress oxydatif résultant de la production des ERO au sein de la mitochondrie. Ces composés induisent

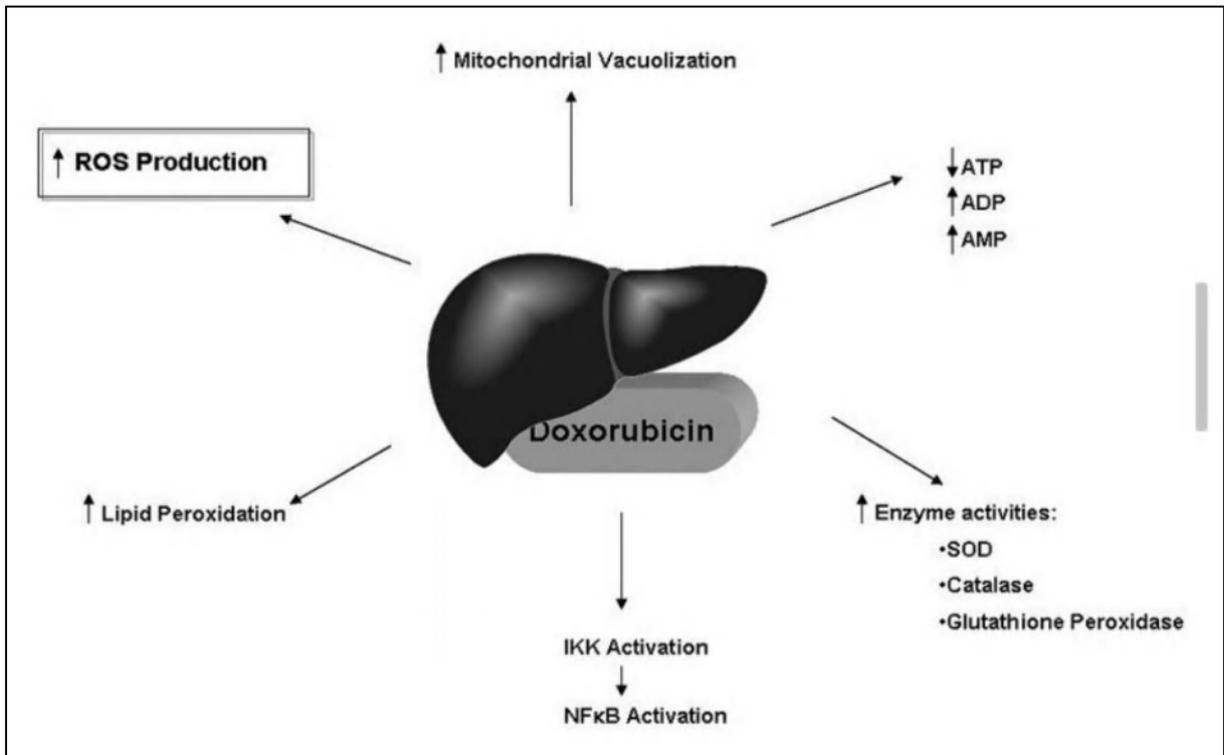
des dysfonctionnements dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, perturbant la production d'énergie, ce qui conduit à un état de faible énergie cellulaire et à l'augmentation du ratio AMP/ATP. Cela se traduit par l'activation de la kinase calmoduline-dépendante et de l'AMPK, entraînant à la fois l'activation de la JNK et l'inhibition de mTOR (Meredith et Dass, 2016). L'AMP-kinase dépendante (AMPK) et la protéine cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR) sont deux marqueurs fiables de l'état énergétique de la cellule. En effet, la diminution des réserves d'énergie dans la cellule et l'augmentation du calcium intracellulaire suite à l'exposition à la DOX activent l'AMPK, qui joue un rôle antagoniste à la protéine mTOR (connue pour inhiber le processus d'autophagie (Figure 8). Lorsque l'AMPK est activé, cela provoque une diminution de l'activité de la mTOR, ce qui stimule l'autophagie (Jung *et al.* 2010). Une autre voie par laquelle la DOX favorise le déclenchement de l'autophagie a été suggérée. Cette voie implique la suppression du facteur de transcription GATA-4 par la p53, entraînant ainsi une réduction de l'activité de la protéine Bcl-2 (Xu *et al.* 2012). En général, la DOX provoque des altérations cellulaires associées à l'initiation de l'autophagie. Ces modifications comprennent la formation d'autophagosomes, une augmentation du nombre de vacuoles autophagiques, une augmentation des niveaux de phosphatidyléthanolamine-II (LC3-II), une augmentation de l'expression des gènes de l'autophagie (Atg) et l'activation de Beclin-1 (Wang *et al.* 2014).



**Figure 8 : Les voies d'activation et les principaux régulateurs impliqués dans l'autophagie et la nécrose induites par la DOX (Boussada, 2020)**

## II.2. L'hépatotoxicité

Le foie est un organe vital qui joue un rôle majeur dans le métabolisme et remplit plusieurs fonctions importantes dans le corps, notamment le stockage du glucose sous forme de glycogène, la synthèse des protéines plasmatiques et la détoxification. Au cours du traitement par la DOX, le foie reçoit, accumule et métabolise des concentrations élevées du DOX, il est donc prévisible que le foie soit l'un des organes les plus affectés par ce traitement. En effet, près de 40 % des patients ont subi des lésions hépatiques après le traitement par la DOX (Carvalho *et al.*, 2009). Le métabolisme des concentrations élevées de la DOX entraîne une surproduction d'ERO et des dommages oxydatifs. En conséquence, ces ERO altèrent de nombreuses structures et fonctions biologiques essentielles, ce qui engendre une augmentation des dommages oxydatifs, y compris des atteintes à l'ADN, la peroxydation des lipides, une réduction du taux de vitamine E et des niveaux de glutathion réduit (GSH). Cela contribue à un déséquilibre oxydatif qui confirme la toxicité hépatique de la DOX (Tacar *et al.*, 2013 ; Carvalho *et al.*, 2009). La production excessive de radicaux libres peut également déclencher l'activation de la kinase IKB (IKK), qui à son tour phosphoryle les inhibiteurs d'IKK pour activer le facteur nucléaire kappaB (NFκ-B). Ce facteur stimule par la suite les cytokines pro-inflammatoires pour induire l'apoptose (Tacar *et al.*, 2013). La DOX provoque des changements pathologiques dans les hépatocytes tels que l'augmentation de la vacuolisation mitochondriale, le gonflement, et la dilatation de l'espace intercellulaire (Carvalho *et al.*, 2009). L'efflux de la DOX à travers les cellules est médié par les protéines de la cassette de liaison à l'ATP/ABC, telles que la P-glycoprotéine, qui maintiennent l'homéostasie chimique et réduisent l'accumulation intracellulaire de médicaments, constituant ainsi l'une des premières lignes de défense des cellules. Cependant, ce mécanisme exige une dépense énergétique élevée, ce qui est limité en présence de DOX, car elle diminue l'adénosine triphosphate (ATP) et augmente l'adénosine diphosphate (ADP), l'adénosine monophosphate (AMP) et le phosphate inorganique (Pi) à l'intérieur des cellules (Figure 9). De la même manière, le potentiel de phosphorylation, une mesure de la capacité de la cellule à effectuer des processus dépendants de l'ATP, diminue lors du traitement par la DOX (Hildebrand *et al.*, 2008 ; Carvalho *et al.*, 2009).



**Figure 9 : Mécanismes de l'hépatotoxicité induite par la DOX (Carvalho *et al.*, 2009)**

### II.3. La néphrotoxicité

La DOX provoque une néphropathie et une protéinurie en endommageant les podocytes glomérulaires. La néphropathie induite par la DOX se produit lorsque le médicament perturbe le fonctionnement normal des mitochondries, entraînant une réduction de l'activité des complexes I et IV des mitochondries. Cela entraîne une augmentation des niveaux de triglycérides, de superoxydes et de citrate synthase, tandis que les niveaux de la vitamine E et de composés antioxydants sont réduits, avec une peroxydation des lipides. La structure du néphron est altérée lorsque des protéines de passage local entrent en contact avec le tissu rénal exposé, conduisant finalement à la glomérulosclérose. Cette maladie qui affecte les glomérules est connue pour causer l'hypertension, la résistance aux stéroïdes et la protéinurie, conduisant éventuellement à l'insuffisance rénale (Carvalho *et al.*, 2009 ; Tacar *et al.*, 2013). Contrairement au foie, la capacité de régénération du rein est limitée, ce qui réduit sa capacité à se guérir quand les glomérules sont endommagés. Cela augmente le degré de susceptibilité à des dommages dans l'ensemble du corps, en particulier le rein lui-même en raison de leur rôle essentiel dans la régulation de la composition chimique du sang et le maintien de l'équilibre des fluides. Lorsque les glomérules sont endommagés, ils ne peuvent plus remplir leurs fonctions normales, ce qui

provoque des lésions glomérulaires, de l'inflammation, une dilatation des tubules, et affecte également la perméabilité capillaire (Tacar *et al.*, 2013). Plusieurs études ont identifié que l'utilisation de la DOX entraîne une néphrotoxicité, caractérisée par une élévation des taux d'urée et de créatinine dans le sang, ainsi qu'une augmentation des dommages oxydatifs au niveau des reins, tout en provoquant une diminution des niveaux de GSH rénal. ce qui est confirmé par les résultats histopathologiques tels que l'élévation marquée de la nécrose tubulaire (Hou *et al.*, 2009; Ibrahim *et al.*, 2012). Cette atteinte rénale conduit à l'albuminurie et à l'hypoalbuminémie, ce qui, à long terme, peut évoluer vers le syndrome néphrotique (Mohajeri et Sahebkar, 2018).

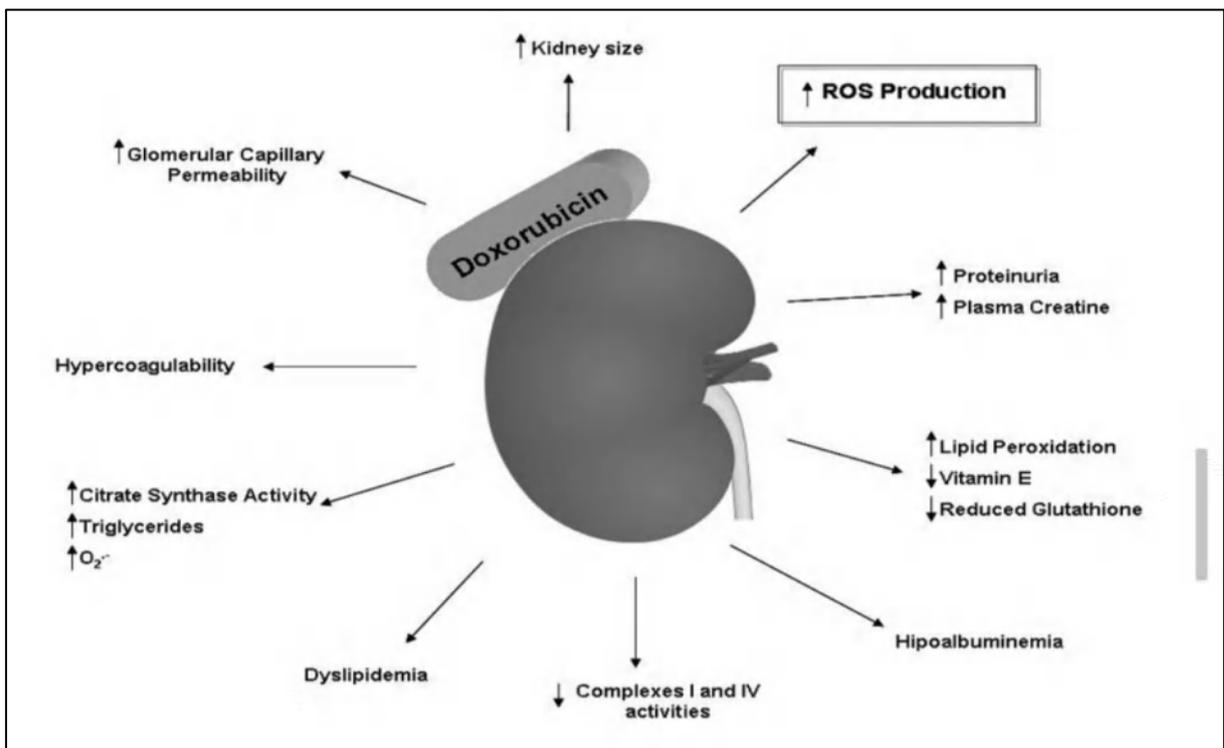


Figure 10 : Mécanismes de la toxicité des reins induite par la DOX (Carvalho *et al.*, 2009)

#### II.4. La toxicité des testicules

Les testicules sont des organes du système reproducteur masculin qui ont deux rôles essentiels, soit la production des gamètes mâles et la production de l'hormone masculine appelée testostérone (Mawhinney & Mariotti, 2013). Un impact des chimiothérapies sur ces organes a donc le potentiel d'induire des conséquences significatives sur la fonction reproductrice masculine. La DOX peut avoir plusieurs conséquences négatives sur la spermatogenèse et la fertilité masculine, entraîne une diminution de la quantité de spermatozoïdes qui sont ciblés grâce à leur activité mitotique élevée, réduit la mobilité des spermatozoïdes, et augmente le

pourcentage de spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques (Yeh *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2012). Les testicules sont sensibles à ces effets car ils contiennent des cellules à renouvellement rapide (Sridevi, 2011; Das *et al.*, 2012). Cependant, en raison de la barrière hémato-testiculaire, la concentration de la DOX dans les testicules est plus faible que dans d'autres tissus (Xin *et al.*, 2012).

Précédemment, il a été noté que la production de radicaux libres et l'induction du stress oxydatif sont les principaux mécanismes pathogènes associés à l'exposition à la DOX. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites entraînent une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes. Il est essentiel de souligner que le tissu testiculaire présente naturellement une carence en Mn-SOD (SOD2) (composant puissant de la famille SOD). Ce qui le rend plus susceptible aux dommages oxydatifs provoqués par la DOX tels que la dénaturation des protéines, la fragmentation de l'ADN ainsi qu'une importante peroxydation lipidique. Cette peroxydation lipidique élevée est le résultat de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés situés dans les membranes des spermatozoïdes (Hozayen, 2012; Mohamed *et al.*, 2015). L'augmentation du stress oxydatif provoqué par la DOX entraîne une cascade de signalisation cellulaire, conduisant à la mort programmée des cellules germinales (Yeh *et al.*, 2007 ; Das *et al.*, 2012; Renu et Valsala, 2019). Cela se manifeste par l'activation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B et l'augmentation de l'expression des protéines telles que MAPK, P53, la caspase-3 (effectrice) et une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Trivedi *et al.*, 2011; Hozayen, 2012).

La DOX a également des effets directs en perturbant le contrôle de rétroaction négatif de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Eleiwa *et al.*, 2018). Son impact sur les cellules de Leydig entraîne une réduction de la production de testostérone (Vijay *et al.*, 2013; Mohamed *et al.*, 2015; Nowrouzi *et al.*, 2019). Il a été également signalé que le traitement par la DOX peut réduire l'expression de  $3\beta$ -HSD et de  $17\beta$ -HSD, qui sont des enzymes clés de l'androgénèse testiculaire (Rizk *et al.*, 2014). L'expression de l'ARNm du StAR, qui est une protéine essentielle facilitant le transport du cholestérol à travers la membrane mitochondriale, une étape cruciale du processus de stéroïdogénèse, a également été diminuée après l'exposition à la DOX. Tous ces effets indésirables ont le potentiel de provoquer une infertilité masculine ultérieurement (Das *et al.*, 2012).

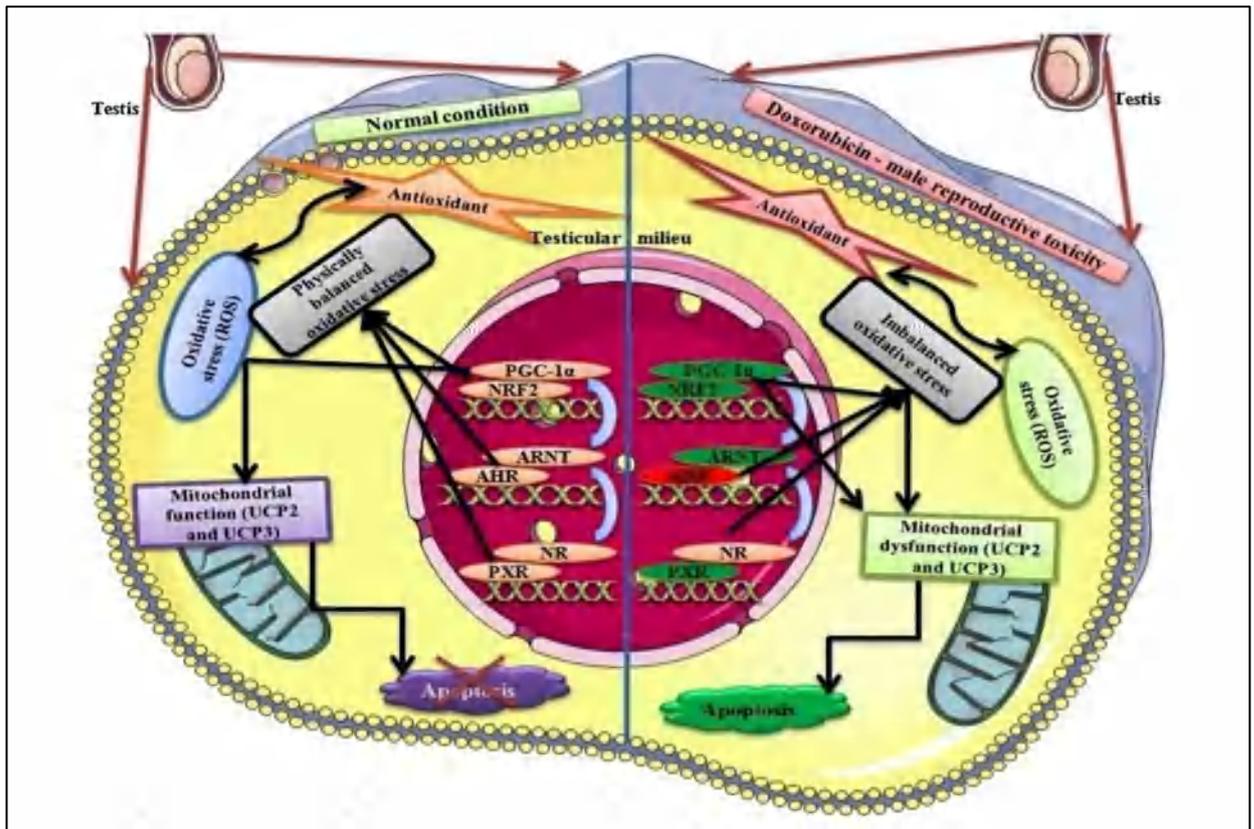


Figure 11 : Stress oxydant et apoptose induits par la DOX dans les testicules (Renu et Valsala, 2019)

### III. Les effets protecteurs des antioxydants vis à vis la toxicité de la DOX

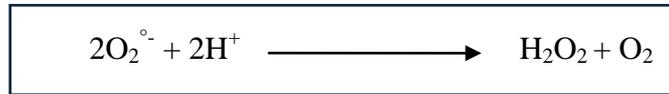
La toxicité induite par la DOX au niveau du cœur, du foie et des reins peut être réduite par l'effet bénéfique des antioxydants qui vont jouer un rôle antagoniste. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable de neutraliser ou de réparer les dégâts causés par les radicaux libres dans l'organisme en permettant leur élimination et de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques des ROS. Ces antioxydants peuvent être soit enzymatiques, soit moléculaires. Ils peuvent être d'origine endogène, synthétisés de manière intracellulaire, ou exogène, acquis via les aliments et les suppléments alimentaires.

#### III.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes, la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx), ainsi que d'autres enzymes (les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, les thioredoxines) ayant également des propriétés anti-oxydantes. Elles peuvent toutes transformer les espèces radicalaires en composé moins réactifs.

### III.1.1. La superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une protéine métallique catalysant la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène selon la réaction :



Ce dernier peut être à son tour; soit dismuté en oxygène et eau grâce à la catalase, soit transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion, catalysée par la glutathion peroxydase. Il existe trois différentes classes de superoxyde dismutase chez l'homme notamment : La SOD à cuivre et à zinc (Cu-ZnSOD) que l'on trouve dans le cytosol et au niveau des liquides extracellulaires, la SOD à fer (Fe-SOD) et la SOD à manganèse (Mn-SOD), dans les mitochondries (Vamecp *et al.*, 2004 ; Haleng *et al.*, 2007).

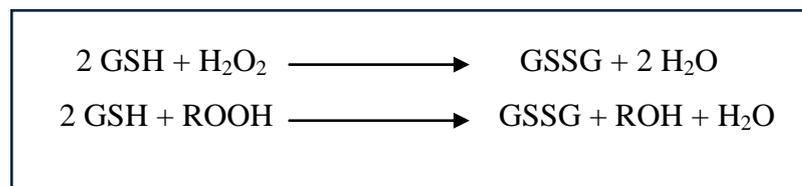
### III.1.2. La catalase

La catalase (CAT) est une enzyme héminique, c'est-à-dire possède un atome de fer qui participe à la fabrication de l'hème. Elle est répartie dans les différents tissus, principalement au sein des peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. Cette enzyme est tétramérique constituée de quatre chaînes polypeptides, comportant chacune un groupement porphyrine avec un atome central de fer sous forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) lié au site actif et une molécule de NADPH. La catalase agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire qui sont des composés stables selon la réaction suivante :



### III.1.3. La Glutathion Peroxydase

La Glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) impliquée dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et d'autres peroxydes d'origine lipidique en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène selon les réactions suivantes :



C'est une enzyme formée de quatre sous-unités identiques comportant chacune un atome de sélénium. Elle se retrouve dans les liquides extracellulaires ainsi que dans les cellules, au sein du cytosol et des mitochondries (Finaud *et al.*, 2006). Chez les eucaryotes, plusieurs types de GPx ont été identifiés selon leur localisation ; La GPx 1 l'isoforme la plus fréquente, est exprimée dans de nombreuses cellules telles que les érythrocytes, les cellules hépatiques et rénales et est présente dans le cytoplasme et la mitochondrie. Les autres isoformes sont la GPx 2 gastro-intestinale, la GPx 3 plasmique, la GPx 4 située à l'interface de la membrane interne et du cytoplasme, et enfin la GPx 5 localisée dans l'épididyme (Comhair et Erzurum, 2002).

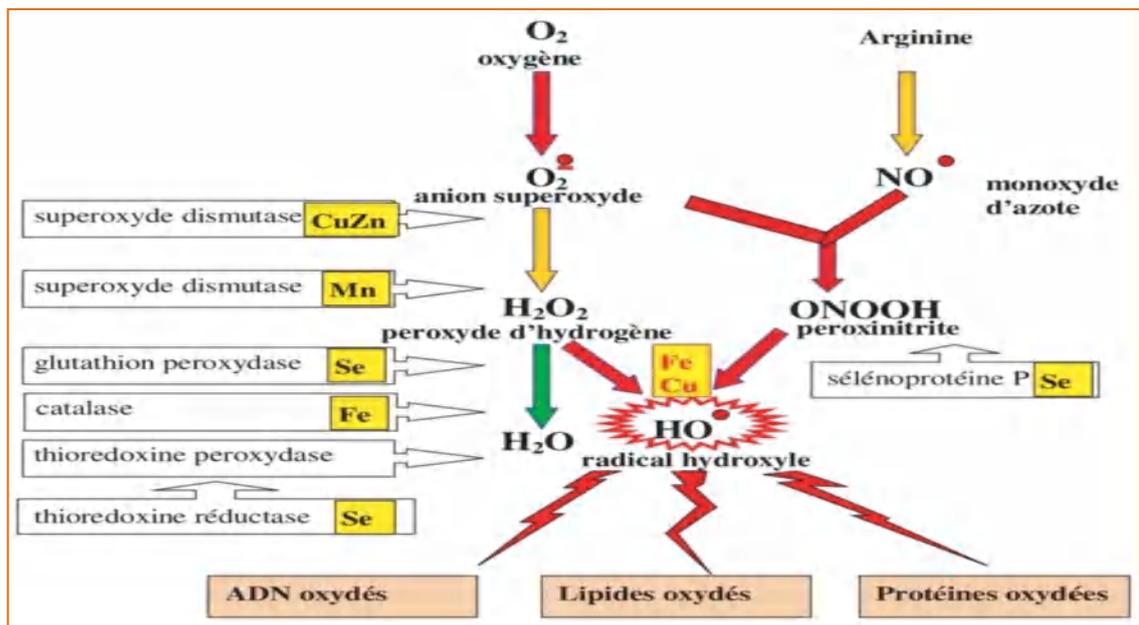


Figure 12 : Principaux systèmes enzymatiques antioxydants impliqués dans le contrôle des ROS (Favier, 2003)

### III.2. Les systèmes non-enzymatiques

#### III.2.1. La vitamine E

La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner un ensemble d'isomères, les tocophérols (constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone) et les tocotriénols (qui diffèrent des tocols par la présence de 3 doubles liaisons sur cette chaîne latérale). Il existe dans la nature 8 isomères dont l' $\alpha$ -tocophérol est le plus abondant. La vitamine E est un antioxydant liposoluble présent en grande quantité dans les huiles végétales (l'huile de palme, d'olive,...), son caractère hydrophobe lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxydes ( $ROO^\bullet$ ) pour former un radical tocophéryle,

empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique (Haleng *et al.*, 2007; Birben *et al.*, 2012).

### III.2.2. La Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique, appartient à la classe des vitamines hydrosolubles et se trouve dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'homme). C'est une molécule antioxydante capable de réagir directement avec des espèces réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), en réduisant la peroxydation lipidique et les dommages aux protéines et à l'ADN. La vitamine C peut également régénérer la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) à partir du radical  $\alpha$ -tocophéryle. Cette réaction participe au recyclage de la vitamine E sous sa forme réduite (Haleng *et al.*, 2007; Farbstein *et al.*, 2010).

### III.2.3. Le glutathion réduit (GSH)

Le glutathion est un tripeptide composé de trois acides aminés (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le GSH joue un rôle important comme antioxydant endogène et dans le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction en réduisant le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la GPx. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique. Le glutathion possède d'autres propriétés antioxydantes comme : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C (Haleng *et al.*, 2007; Birben *et al.*, 2012; Couto *et al.*, 2013).

## IV. Les polyphénols

Les polyphénols sont des composés naturels que l'on trouve dans divers aliments d'origine végétale, notamment les céréales, les fruits, les légumes, le thé, le café et le vin. Ils servent de métabolites secondaires produits par les plantes pour se défendre contre d'autres organismes (Edeas, 2007 ; Tsao, 2010). Ces composés sont caractérisés par leur structure contenant plusieurs groupes hydroxyles sur au moins deux atomes de carbone dans des cycles aromatiques (Durazzo *et al.*, 2019). Bien que des molécules avec un seul cycle, comme les acides phénoliques et les alcools phénoliques, ne soient pas strictement des polyphénols, elles présentent de nombreuses propriétés et caractéristiques similaires et sont généralement regroupées avec les polyphénols. Les polyphénols sont largement connus pour leurs effets

antioxydants, qui peuvent aider à réduire les dommages causés par les radicaux libres dans le corps. Ils ont été associés à divers avantages pour la santé, tels que la protection contre les maladies cardiaques et le soutien à la santé cérébrale. Une alimentation variée riche en aliments contenant des polyphénols peut contribuer à une meilleure santé (Stevenson et Hurst, 2007; Edeas, 2007; Weichselbaum et Buttriss, 2010).

#### IV.1. Classification des polyphénols

Plus de 8000 polyphénols ont été identifiés (Tsao, 2010). Ils peuvent être regroupés en plusieurs catégories principales, dont les acides phénoliques, les flavonoïdes les tanins et autres (Figure 13). Chacun de ces groupes présente une variété de composés aux structures chimiques distinctes, et ils se trouvent dans une grande diversité d'aliments et de boissons (Jeong *et al.*, 2004).

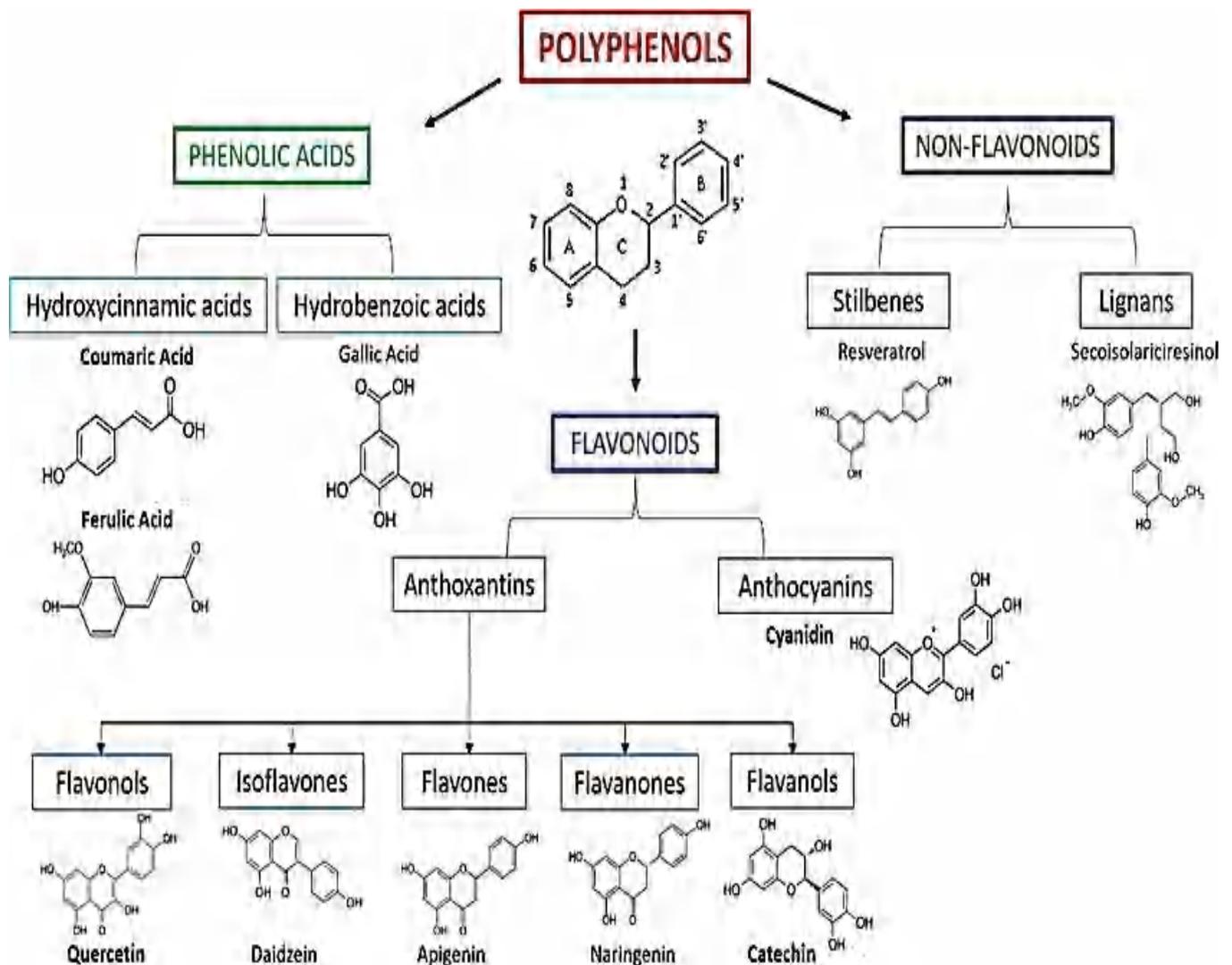


Figure 13 : Les principaux groupes de polyphénols (Beconcini *et al.*, 2020)

### IV.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont parmi les principaux polyphénols présents dans l'alimentation, se trouvant dans tous les fruits et légumes, et constituant environ un tiers de la teneur totale en polyphénols dans notre régime alimentaire. Ils se présentent généralement sous forme d'esters, de glycosides ou d'amides, mais rarement sous forme libre. La diversité structurale de ces composés dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyle sur le cycle aromatique (Sharma *et al.*, 2015; Tanase *et al.*, 2019). Les acides phénoliques, qui sont des polyphénols non-flavonoïdes, peuvent être regroupés en deux catégories principales, les acides hydroxycinnamiques et les acides hydroxybenzoïques et sont caractérisés par une structure de base de type (C6-C3) et (C6-C1), respectivement. Les acides benzoïques les plus répandus comprennent l'acide gallique, vanillique, syringique et protocatechique, tandis que parmi les acides cinnamiques les plus courants, on trouve l'acide p-coumarique, caféique et férulique (Călinoiu *et al.*, 2018 ; Tanase *et al.*, 2019).

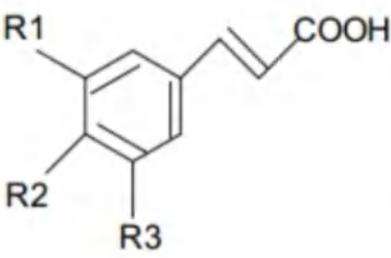
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Acides phénoliques</b>
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Figure 14 : Principaux dérivés de l'acide cinnamique (Călinoiu *et al.*, 2018)

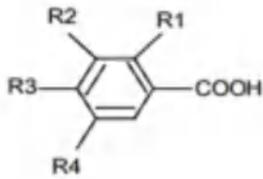
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>Acide phénolique</b>
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p-hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Figure 15 : Principaux dérivés de l'acide benzoïque (Călinoiu *et al.*, 2018)

#### **IV.1.2. Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes forment une catégorie de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ils peuvent être reconnus comme pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules sous forme d'hétérosides ou en tant que constituants de plastes spécifiques, les chromoplastes (Atanasova et Ribarova, 2009 ; Stevanovic *et al.*, 2009). Les flavonoïdes partagent tous une structure chimique de base, caractérisée par un squelette carboné comprenant quinze atomes de carbone. Ce squelette est constitué de deux cycles aromatiques A et B reliés par une chaîne en C3, formant ainsi un hétérocycle (Erdman *et al.*, 2007). De manière générale, la structure des flavonoïdes est définie par le modèle C6-C3-C6, créant une structure de type diphényle propane à laquelle des groupes hydroxyles, oxygènes, méthyles ou des sucres peuvent être associés aux noyaux de cette molécule (Narayana *et al.*, 2001; Medic-Saric *et al.*, 2004 ; Malesev et Kuntic, 2007). Les flavonoïdes peuvent être divisés en plusieurs classes en fonction du degré d'oxydation et de la nature des substituants présents sur le cycle C, dont les principales sont les flavonols, les flavanols, les flavanones, les flavones, les anthocyanidines et les isoflavones (Losada-Barreiro et Bravo-Diaz, 2017) (Figure 16).

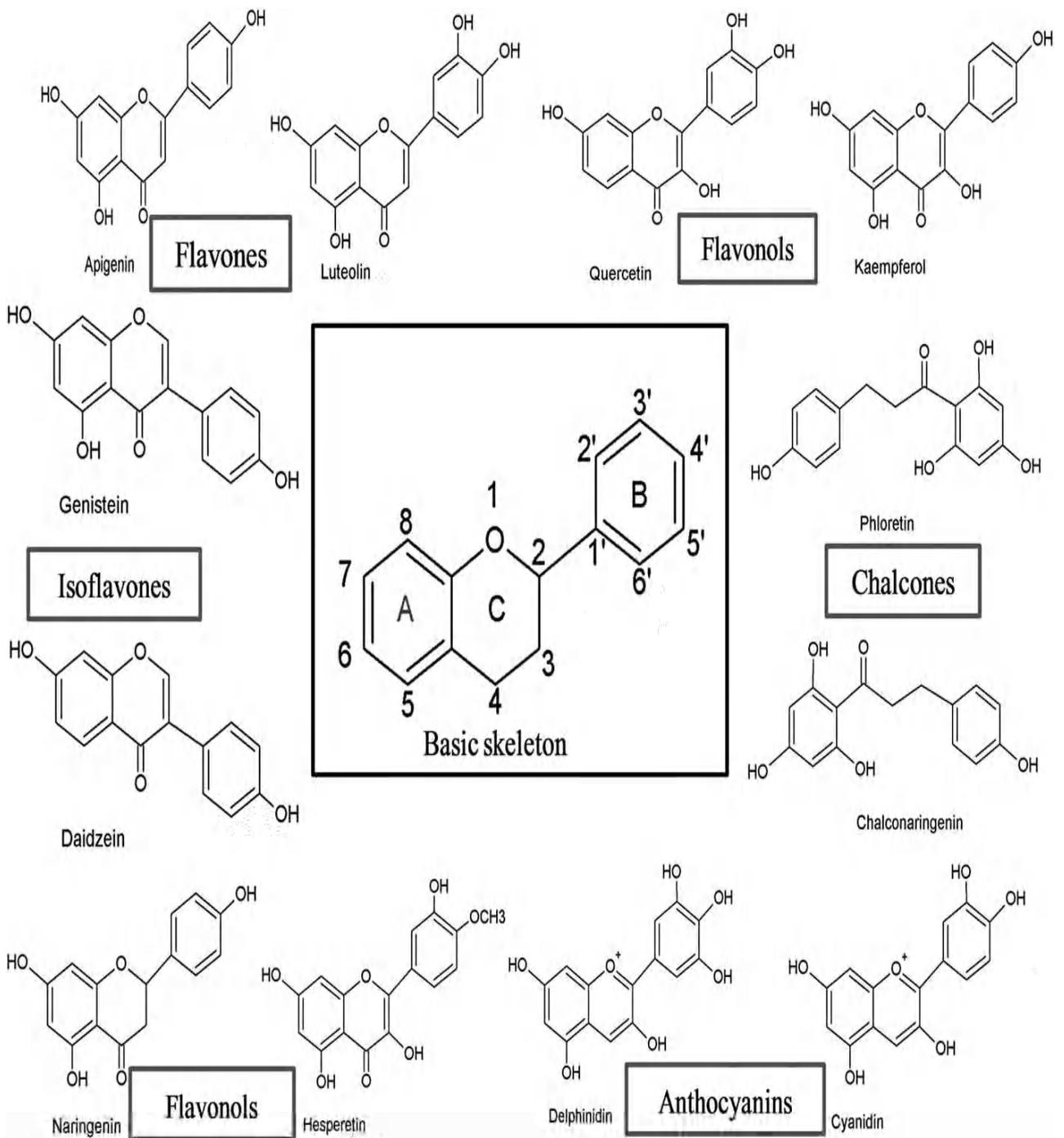


Figure 16. Structure du squelette de base des flavonoïdes et de leurs classes (Panche *et al.*, 2016)

#### IV.1.3. Les tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques d'origine végétale, de poids moléculaire élevé, présents dans diverses parties de la plante telles que les feuilles, les fruits, l'écorce, le bois et les racines (Redondo *et al.*, 2014). Ils possèdent un nombre important de groupements hydroxyles, permettant des associations stables avec différentes substances, notamment les protéines, les polysaccharides, les acides nucléiques, les stéroïdes, ainsi que d'autres polymères comme les alcaloïdes et les gélatines. Les tanins peuvent être répartis en deux catégories principales, à savoir les tanins hydrolysables et condensés. Les premiers se présentent sous forme d'esters d'acide gallique, comprenant les tanins galliques et ellagiques, tandis que les seconds, également appelés proanthocyanidines, sont des polymères de monomères polyhydroxyflavan-3-ol. Une troisième catégorie concerne les phlorotannins, constitués exclusivement de phloroglucinol, et présents dans divers genres d'algues brunes, bien que leur importance dans l'alimentation humaine soit limitée (Balasundram *et al.*, 2006 ; Okuda et Ito, 2011). Les tanins présentent une gamme variée d'activités biologiques, englobant des propriétés antioxydantes, des caractéristiques antimicrobiennes, antifongique, antitumorale et anti-inflammatoires qui peuvent contribuer à la lutte contre les infections et l'inflammation (Lamy *et al.*, 2014).

#### IV.1.4. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques provenant du métabolisme secondaire des végétaux. Ils se caractérisent par une structure de type C6-C2-C6, comprenant deux cycles benzéniques reliés par un pont éthylène. Cette disposition particulière de la double liaison éthylénique entre les cycles confère aux stilbènes des propriétés structurales et réactives qui sont significatives pour leur rôle dans la défense des plantes et leur intérêt en tant que composés bioactifs. Ces substances sont présentes en quantité minime dans notre alimentation et sont des phytoalexines, produites par les plantes en réaction à l'agression de micro-organismes pathogènes tels que les champignons, les bactéries et les virus. Les principales sources de stilbènes comprennent les raisins, le soja et les arachides. Le resvératrol, le plus célèbre d'entre eux, a fait l'objet de nombreuses études en raison de ses propriétés potentiellement anticancéreuses (Martinez *et al.*, 2014).

#### IV.1.5. Les lignanes

Les lignanes sont des composés qui s'accumulent dans les parois cellulaires, que ce soit dans les tissus sclérenchymes ou le noyau des fruits. Ils contribuent à la rigidité des fibres au

niveau de la sève brute. Ils se forment à partir de deux unités de phénylpropane et d'un pont à quatre carbones, ce qui engendre diverses structures chimiques dans la nature. Les graines de lin renferment la plus grande quantité de ces composés, tandis que d'autres sources précieuses incluent les céréales et certains légumes. Les lignanes représentent l'une des principales classes de phytoestrogènes, en association avec les isoflavones (Martinez *et al.*, 2014 ; Mrduljas *et al.*, 2017).

#### IV.2. Activités biologiques des polyphénols

Les bienfaits des polyphénols suscitent un intérêt particulier, notamment dans deux domaines clés : la phytothérapie et la nutrition. Des recherches récentes approfondies sur les composés phénoliques en général, et plus spécifiquement sur les flavonoïdes, sont menées en raison de leurs nombreuses propriétés physiologiques. Ces composés présentent des activités notables telles que des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antiallergiques, antivirales, antibactériennes, hépatoprotectrices, cardioprotectrices, anticancéreuses et antithrombotiques (Ahmed *et al.*, 2015 ; Shahidi et Yeo, 2018).

- **Propriétés antioxydantes** : Les polyphénols sont largement reconnus comme les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation, présentant une capacité antioxydante *in vitro* qui dépasse celle des vitamines et des caroténoïdes (Archivio *et al.*, 2007; Weichselbaum et Buttriss, 2010). Les polyphénols agissent comme des antioxydants puissants qui participent à la protection contre les dommages oxydatifs au niveau cellulaire et réduisant ainsi le risque de diverses maladies. Leur capacité à éliminer les radicaux libres et à restaurer les antioxydants enzymatiques est due à leurs structures chimiques idéales (Losada-Barreiro et Bravo-Diaz, 2017). En plus de neutraliser les radicaux, les polyphénols sont également reconnus comme des agents chélateurs de métaux. Ils ont la capacité de chélater des métaux de transition tels que le  $Fe^{2+}$ , réduisant ainsi directement le taux de réaction de Fenton, ce qui prévient l'oxydation causée par des radicaux hydroxyles très réactifs (Tsao, 2010).
- **Propriétés antiallergiques** : Les flavonoïdes possèdent des propriétés antiallergiques bien établies. Par exemple, la quercétine démontre une forte capacité inhibitrice de la libération d'histamine des astrocytes. Ils agissent également en inhibant des enzymes

impliquées dans la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles, notamment l'AMPC phosphodiesterase et l'ATPase  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante (Ghedira, 2005).

- ✚ **Propriétés anticancéreuses** : Les flavonoïdes et les composés phénoliques peuvent avoir un effet préventif sur le développement du cancer en agissant pendant l'étape d'initiation en piégeant les agents mutagènes électrophiles ou en favorisant la réparation de l'ADN altéré. Au cours des phases de promotion et de progression, ils fonctionnent comme des agents inhibiteurs de tumeurs par divers mécanismes, tels que l'induction de l'apoptose et la suppression de la prolifération cellulaire (Scalbert *et al.*, 2002; Vauzour *et al.*, 2010).
  
- ✚ **Propriétés antimicrobiennes** : Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes en raison de la présence de groupes phénoliques et d'autres composants chimiques dans leur structure. Ils peuvent avoir des effets bénéfiques contre divers micro-organismes (Harborne et Williams., 2000). Plusieurs études antérieures ont démontré que les polyphénols, en particulier les flavonoïdes, possèdent une activité bactéricide agissant à travers trois mécanismes distincts : altération de la membrane plasmique bactérienne par la réduction de la fluidité membranaire, inhibition du métabolisme énergétique bactérien, et blocage de la synthèse des acides nucléiques (Djahra *et al.*, 2015; Zacchino *et al.*, 2017).
  
- ✚ **Effet sur le système cardiovasculaire** : Les flavonoïdes, grâce à leur présence dans diverses sources alimentaires, sont réputés pour exercer une influence bénéfique sur la santé cardiovasculaire. Leur impact protecteur s'exprime par la modification de processus pathologiques associés aux maladies cardiovasculaires. Certains flavonoïdes, en particulier, démontrent des effets positifs dans des conditions telles que l'athérosclérose et les formes stables de maladies cardiovasculaires. Le mécanisme sous-jacent à ces bienfaits implique la réduction de l'oxydation des LDL par l'inhibition de la LOX, l'atténuation du stress oxydatif, et la diminution de l'inflammation. Ainsi, la consommation régulière de flavonoïdes peut contribuer à soutenir la santé du système cardiovasculaire en agissant sur plusieurs fronts pathologiques (Duchnowicz *et al.*, 2012).

## V. Données générales sur les plantes étudiées

### V.1. Présentation de l'espèce *Crataegus oxyacantha*.

#### V.1.1. Etymologie et appellations

L'aubépine est le nom commun de toutes les espèces végétales du genre *Crataegus*, ce genre est dérivé du mot grec « *Krataegos* » ou « *Kratos* » signifiant la dureté du bois. Le nom de l'espèce *oxyacantha* vient du mot grec « *oxus* » qui signifie pointu, et « *akantha* » qui signifie une épine (à épines pointues). Les appellations vernaculaires de *Crataegus oxyacantha* se diffèrent selon la région. En France, Aubépine ou épine blanche obtenu du nom latin « *spina alba* ». Les Anglais utilisent les noms: Hawthorn, May blossom, White thorn, Hawthorn midland, May Day Flower. Chez les indiens : Vansaangli, Pandaakh. En langue arabe elle porte la nomination de Zaaror ou Ain baquera (Djerroumi et Nacef, 2004; Verma *et al.*, 2007; Kashyap *et al.*, 2012; Attard et Attard, 2019).

#### V.1.2. Distribution géographique

*Crataegus oxyacantha* se trouve principalement dans les zones dont la latitude est entre 30 ° et 50 ° N (Kashyap *et al.*, 2012). Est un arbrisseau épineux poussant dans les buissons, les bois, les haies. On le retrouve un peu partout dans le monde mais d'une façon prépondérante dans les régions tempérées de l'hémisphère nord comme l'Afrique du Nord, l'Asie occidentale l'Inde, la Chine et l'Amérique du Nord (Fineschi *et al.*, 2005 ; Poitevin, 2014 ; Everaldo et Henrietta, 2019). Dans l'Algérie, cette plante est répandue dans les forêts et les maquis de l'Atlas Tallien. *C. oxyacantha* a été introduite en Tasmanie et dans d'autres parties de l'Australie dans les années 1800 où elle était utilisée comme haie, elle pousse maintenant à Victoria, en Tasmanie, dans les collines d'Adélaïde et dans les plateaux de Nouvelle-Galles du Sud (Kashyap *et al.*, 2012 ; Thomas *et al.*, 2021) .

#### V.1.3. Description botanique

*C. oxyacantha*, ou aubépine, est un type d'arbuste ou d'arbre aux rameaux épineux de la famille des rosacées qui peut atteindre jusqu'à dix mètres de hauteur (Yunar *et al.*, 2010; Poitevin, 2014; Ahmadipour *et al.*, 2017). Il est facilement reconnaissable par son aspect épineux, ses branches de couleur grise sont en effet garnies d'épines acérées et courtes (Kashyap *et al.*, 2012).

**Les feuilles :** sont caduques, alternes. L'aubépine possède des feuilles ovales de petite à moyenne taille, incisées, dentées et divisées en trois à cinq lobes peu profonds. Les feuilles sont

vertes luisantes ou sombres sur le dessus et plus pâles en-dessous (Fineschi *et al.*, 2005 ; Kashyap *et al.*, 2012). Les stomates ne sont présents que sur la face inférieure des feuilles (Thomas *et al.*, 2021).



**Figure 17 : Feuilles de *C. oxyacantha*, « A et B » : Feuilles plus ou moins trilobées au sommet, dentelées. « C » : Face intérieure de la feuille légèrement velue (Association AFC, 2022)**

**Les fleurs :** Les fleurs de couleur blanche ou un peu rosée apparaissent après les feuilles au printemps. Elles sont groupées en corymbes rameux c'est-à-dire portées à l'intérieur d'inflorescences à tête plate ou dans des inflorescences globulaires appelées ombelles et contiennent généralement 5 pétales, 5 à 18 étamines. Les fleurs d'aubépine sont particulièrement parfumées, leur odeur rappelle celle des amandes amères. A la fin de l'été et durant l'automne, les fleurs laissent leur place à des fruits (Kashyap *et al.*, 2012 ; Poitevin, 2014).



**Figure 18: Appareil reproducteur de *C. oxyacantha*, « D » : Fleurs épanouies, « E » : Fleur à 2 styles avec des étamines tirant sur le rose foncé-rouge (Association AFC, 2022)**

**Les fruits :** Les fruits appelés cenelles, sont des petites drupes d'une couleur rouge vif brillant qui devient sombre et mat au moment de la maturité, munis d'une mouche à leur extrémité. Ils sont connus sous le nom des pépins (fruits à pépins) renfermant deux à trois noyaux. Les fruits d'aubépines sont consommés par les oiseaux (Kashyap *et al.*, 2012).



Figure 19 : Photos représentant les fruits ou cenelles de la plante *C. oxyacantha* (Association AFC, 2022)

#### V.1.4. Classification botanique de *Crataegus oxyacantha*

##### V.1.4.1. Classification taxonomique

Selon Kashyap *et al.*, (2012), la classification taxonomique de *C. Oxyacantha* est présentée comme suit :

- ✓ **Royaume:** Plantea
- ✓ **Division:** Angiosperme
- ✓ **Classe:** Magnoliopsida
- ✓ **Ordre:** Rosales
- ✓ **Famille:** Rosaceae
- ✓ **Sous-famille:** Maloidae
- ✓ **Tribe:** Crataegeae
- ✓ **Genre:** *Crataegus*
- ✓ **Espèce:** *Crataegus oxyacantha* Linn.

#### V.1.4.2. Classification phylogénique APG IV 2016

- ✓ **Règne:** Plantea
- ✓ **Clade:** Angiospermes
- ✓ **Classe:** Rosidées
- ✓ **Ordre:** Rosale
- ✓ **Famille:** Rosacées
- ✓ **Sous famille:** Spiraeoïdées
- ✓ **Genre:** *Crataegus*
- ✓ **Espèce:** *Crataegus laevigata* (Poir). DC

**Synonymes :** *Crataegus oxyacantha* (L) auct, *Crataegus oxyacanthoides*. Thuill

#### V.1.5. L'utilisation traditionnelle de la plante *Crataegus oxyacantha*

*C. oxyacantha* est une plante fruitière utilisée en médecine traditionnelle depuis l'Antiquité, elle possède une longue histoire en tant que substance thérapeutique active (Kashyap *et al.*, 2012). Différentes parties de la plante, les fleurs, les feuilles et les baies vertes (non mûres) et rouges (mûres) ont été utilisées depuis longtemps pour leurs effets antispasmodiques, cardiotonique, diurétique, hypotenseur, anti-athérosclérotique dans la médecine populaire de nombreux pays comme la Serbie, la France, le Chili, la Turquie et la Chine (Erdogan, 2016 ; Bardakci *et al.*, 2019).

En médecine traditionnelle chinoise, les fruits de l'aubépine sont principalement utilisés pour améliorer le système de circulation sanguine, ainsi que l'élimination des stases sanguines et traiter l'indigestion, la diarrhée, les douleurs abdominales et l'hyperlipidémie. Dans la tradition européenne, l'aubépine est utilisée pour soigner les calculs rénaux et vésicaux et comme diurétique. De plus, les fruits sont également utilisés contre les problèmes intestinaux en Turquie (Bardakci *et al.*, 2019).

*C. oxyacantha* a été considérée comme une plante cardioprotectrice, elle est utilisée pour traiter divers problèmes cardiaque y compris l'insuffisance cardiaque, l'hypertension, l'angine de poitrine, légère altération du rythme cardiaque et l'athérosclérose. En plus de ses propriétés cardiotoniques bien connues, il a également été rapporté que *C. oxyacantha* possède diverses autres activités pharmacologiques telles que antihyperlipidémique, anxiolytique, antioxydante, antihyperglycémiant, immunomodulateur, et antimutagène (Erdogan, 2016). *C. oxyacantha* est

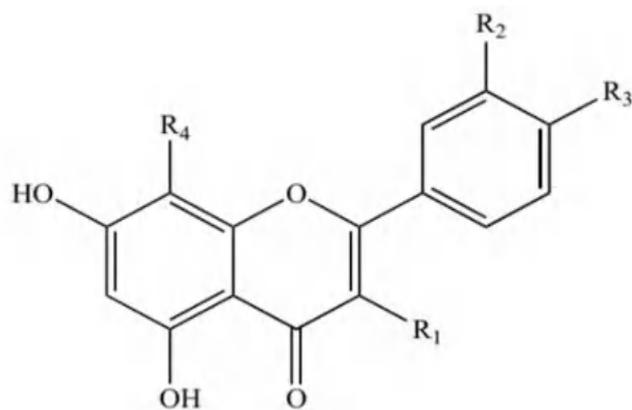
considérée comme une plante officielle en médecine homéopathique pour le traitement des maladies cardiovasculaires (Poitevin, 2014 ; Erdogan, 2016).

#### V.1.6. Composition chimique

Les espèces d'aubépine stockent plusieurs constituants, aux valeurs médicinales et/ou nutritives. Plusieurs études ont montré que les constituants chimiques des espèces de *Crataegus* sont similaires, et donc, leurs propriétés chimiques et leurs activités pharmacologiques sont étroitement liées (Attard et Attard, 2019). L'utilisation de l'aubépine en phytothérapie repose sur sa composition riche en principes actifs. Parmi les composés identifiés, on peut citer :

- Des amines (phényléthylamine, tyramine, dopamine...) (Verma *et al.*, 2007).
- Des acides triterpéniques dont l'acide ursolique et oléanolique (Erdogan, 2016).
- Des polyphénols en quantités très importante et comprenant :
  - ✓ Des acides hydroxycinnamiques (coumarines) ; acide chlorogénique.
  - ✓ Des flavonoïdes "4-oxo-flavonoïdes" sous forme soit d'hétérosides de flavones comme la vitexin -2"-*O*-rhamnoside (dans les feuilles), soit d'hétérosides de flavonols comme le quercétol-3-*O*-galactoside ou hypéroside (dans les fleurs et les fruits). Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires les plus cités chez les aubépines, ils se trouvent sous forme libre ou sous forme de glycosides dans les fleurs, les fruits et les feuilles. Les flavonoïdes comprennent l'apigénine, l'hyperoside, la rutine, la quercétine, la lutéoline-7-glucoside, vitexine, catéchine, lutéoline, épicatechine, anthocyanes (Descheemaeker, 2001 ; Attard et Attard, 2019).
  - ✓ Des dérivés de flavanols. Ils comprennent des catéchines et surtout la (-) épicatechine les flavanols majoritaires sont des proanthocyanidines oligomères (OPC) ou procyanidines ou tanins condensés (Descheemaeker, 2001 ; Kashyap *et al.*, 2012).

Les fruits de l'aubépine sont riches en plusieurs minéraux principalement le potassium, le calcium, le magnésium et le phosphore. Et des traces de plusieurs autres minéraux tels que le sodium, le bore, le chrome, le fer, le cobalt, le manganèse et le zinc. Les fruits d'aubépine se trouvent dans plusieurs préparations de multivitamines et de minéraux à base de plantes (Attard et Attard, 2019).



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Flavonoid
H	H	OH	β-D-glucosyl	Vitexin
O-β-D-Rutinosyl	OH	OH	H	Rutin
O-β-D-Galactosyl	OH	OH	H	Hyperoside
O-β-D-Glucosyl	OH	OH	H	Isoquercitrin
OH	OH	OH	H	Quercetin

Figure 20 : Les principaux dérivés flavonoïdes de la plante *C. oxyacantha* (Erdogan, 2016)

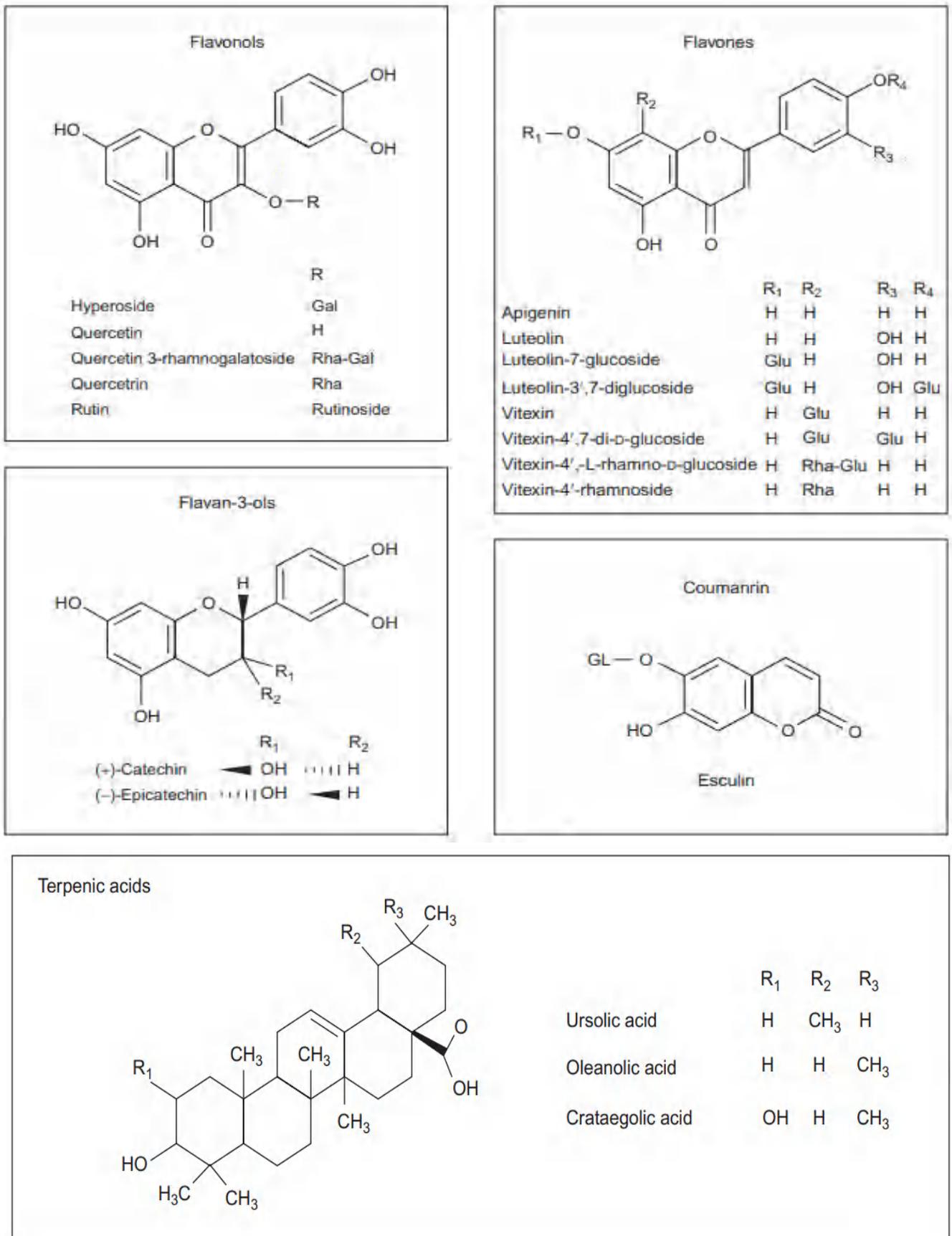


Figure 21 : Exemple des principaux constituants des espèces *Crataegus* (Attard et Attard, 2019)

### V.1.7. Les effets biologiques et pharmacologiques

#### V.1.7.1. Effets cardiovasculaires

L'aubépine est le remède le plus précieux pour le système cardiovasculaire et considéré comme l'un des meilleurs toniques cardiaques trouvés dans le règne végétal. Il dilate les vaisseaux sanguins périphériques, augmente le métabolisme dans le muscle cardiaque, dilate les vaisseaux coronaires et améliore l'apport sanguin au cœur et aide ainsi à traiter les maladies cardiaques et à atténuer les symptômes au stade précoce de l'insuffisance cardiaque (Verma *et al.*, 2007 ; Paul *et al.*, 2017).

L'activité principale de l'aubépine est d'augmenter le flux sanguin coronaire. Cela peut être dû à la relaxation des artères coronaires, qui augmente directement le flux sanguin ou à une augmentation des vitesses de contraction et de relaxation, qui augmente l'intervalle diastolique et laisse ainsi plus de temps pour le passage du sang dans les artères coronaires (Verma *et al.*, 2007).

L'action inotrope positive de l'aubépine peut être due à l'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase myocardique qui est une enzyme membranaire intégrale qui maintient le potentiel de repos cardiaque. Il diminue également la tension artérielle ce qui entraîne une augmentation de la tolérance à l'exercice au cours du stade précoce de l'insuffisance cardiaque congestive (ICC) (Verma *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013).

Les préparations d'aubépine ont la capacité d'inhiber l'enzyme phosphodiesterase (PDE), qui entraîne finalement une augmentation des nucléotides cycliques intracellulaires. Cette inhibition peut également expliquer l'effet inotrope positif et une relaxation de la musculature lisse vasculaire (Descheemaeker, 2001 ; Verma *et al.*, 2007). Il a été rapporté que l'aubépine a un effet inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Il peut également avoir un effet cardio-protecteur en raison de sa capacité à réduire les besoins en oxygène du tissu cardiaque (Verma *et al.*, 2007).

Les types de polyphénols contenus dans l'aubépine ont montré des impacts multiples concourant à un effet capillaro-protecteur et antiathérogène. De nombreux flavonoïdes, tels que les catéchines et les OPC, notamment le dimère B2, sont reconnus pour leur effet veinotonique, renforçant la résistance et diminuant l'hyperperméabilité des capillaires sanguins, ils protègent également le collagène, inhibent les enzymes (élastase, collagénase), interfèrent avec la cascade de l'acide arachidonique (lipoxigénase, cyclooxygénase), agissent en tant qu'antioxydants et antiradicalaires, protègent contre la lipoperoxydation des LDL. L'extrait de fruits de l'aubépine

diminue la synthèse du cholestérol chez le rat soumis à un régime athérogène, stimule l'élimination des acides biliaires et augmente l'activité des récepteurs hépatiques des LDL (Descheemaeker, 2001).

#### V.1.7.2. Autres effets pharmacologiques

Il a été démontré que l'aubépine présente une activité antioxydante associée à sa teneur en flavonoïdes et en procyanidines. L'activité antioxydante la plus significative a été observée en utilisant un extrait de jeunes feuilles fraîches suivi de bourgeons floraux frais et de fleurs séchées. L'aubépine a la capacité d'augmenter la vitamine C intracellulaire et a un effet protecteur sur les processus oxydatifs. Les procyanidines oligomères sont en grande partie responsables de l'effet cardio-protecteur de l'aubépine après l'ischémie, grâce à son activité de piégeage des radicaux libres (Verma *et al.*, 2007).

L'aubépine présente également des propriétés anti-inflammatoire en empêchant la production et la libération de promoteurs d'inflammation tels que les histamines, les sérines protéases, les prostaglandines, les leucotriènes, Etc., ainsi qu'en inhibant le clivage enzymatique par une enzyme sécrétée par les leucocytes pendant l'inflammation. De plus, *Crataegus* a une action significative sur la stabilisation du collagène en affectant son métabolisme. Il relie les fibres de collagène pour renforcer la matrice de collagène des tissus conjonctifs (Verma *et al.*, 2007). Différentes propriétés pharmacologiques de l'espèce *C. oxyacantha* ont été résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Exemples des activités pharmacologiques de la plante *C. oxyacantha*

Partie utilisée	Extrait	Activité	Référence
Fruits	Hydro-alcoolique (Ethanol/eau)	Anti-inflammatoire Anti-apoptotique	Vijayan <i>et al.</i> , 2012
Feuilles, Fleurs	Hydro-alcoolique	Hypotensive	Walker <i>et al.</i> , 2002
Feuilles, Fruits	Acétate d'éthyle <i>n</i> -butanol	Antimicrobienne Antioxydante	Benabderrahmane <i>et al.</i> , 2021
Fruits	Ethanol Méthanol Aqueux	Antimicrobienne Antioxydante	Kostic <i>et al.</i> , 2012
Fruits	Ethanol	Anti-inflammatoire Anti-radicalaire Gastro-protecteur Antimicrobienne	Tadic <i>et al.</i> , 2008
Feuilles Bourgeons des fleurs	Aqueux (tisane)	Antioxydante Anti-inflammatoire	Nascimento <i>et al.</i> , 2021
Partie aérienne	Dichlorométhane	Anti-cholinestérase	Ali <i>et al.</i> , 2017
Ecorce	Acétone Acétate d'éthyle	Antioxydante	Silva <i>et al.</i> , 2000
Feuilles, Fruits	Méthanol	Inhibition de l'ECA	Lacaille <i>et al.</i> , 2001
Fruits	49% Ethanol	Cardio-protectrice	Degenring <i>et al.</i> , 2003
Fleurs	Hydro-alcoolique	Anxiété et dépression	Hanus <i>et al.</i> , 2004
Feuilles	50% Ethanol	Effet chronotrope négatif, Cardiotonique	Jayalakshmi <i>et al.</i> , 2006
Fruits	95% Ethanol	Infarctus du myocarde	Long <i>et al.</i> , 2006
Feuilles, Fruits fleurs	Méthanol	Cardio-protectrice	Zick <i>et al.</i> , 2008
Fleurs	Hydro-alcoolique (Ethanol/eau)	Cardio-protectrice	Jayachandran <i>et al.</i> , 2010
Plante entière	Méthanol	Hypolipidémique	Kanyonga <i>et al.</i> , 2011

### V.1.8. Formes pharmaceutiques

Les différentes présentations pharmaceutiques de l'aubépine sont constituées des fleurs, des sommités (mélange de fleurs et de feuilles) et des fruits séchés, qui peuvent être utilisées en infusion ou sous forme de poudres utilisables en gélules. Les formes extractives traditionnelles telles que la teinture, l'extrait fluide, les extraits mous et secs sont disponibles sous forme hydro-alcooliques ou aqueux. La Pharmacopée Européenne a défini une quantité minimale de flavonoïdes (1.5% pour les parties aériennes) ou de procyanidines (1% pour les fruits). Ces formes galéniques sont largement utilisées en France dans la composition de médicaments sédatifs. Il existe des produits industriels à base d'extraits de feuilles et fleurs, parfois additionnés de fruits. La standardisation des teneurs en flavonoïdes et procyanidines «ou flavanes» a été appliquée de manière plus avancée qu'auparavant, notamment en Allemagne. Enfin, les spécialités pharmaceutiques comprennent, soit des médicaments à base d'Aubépine seule, soit des associations avec d'autres plantes ou extraits, parfois avec des substances de synthèse ou des cardiotoniques (Descheemaeker, 2001).



Figure 22 : Quelques produits commercialisés à base de *C. oxyacantha*

### V.1.9. Toxicité de la plante

L'aubépine est une plante non toxique et ses effets secondaires sont minimes lorsqu'elle est consommée aux doses recommandées. Aucun changement dans l'état sanguin, les enzymes hépatiques, les électrolytes et la vitesse de sédimentation du glucose ou des érythrocytes n'a été observé dans les études cliniques humaines. L'extrait de l'aubépine ne présente aucun effet indésirable avec de faibles doses, mais des doses plus élevées augmentent le risque

d'hypotension et de sédation. Les symptômes généraux de la toxicité aiguë observés dans un certain nombre de modèles animaux (cobaye, grenouille, tortue, chat, lapin et rat) sont la bradycardie et la dépression respiratoire entraînant un arrêt cardiaque et une paralysie respiratoire. Il ne doit pas être utilisé chez les enfants de moins de 2 ans (Verma *et al.*, 2007 ; Kashyap *et al.*, 2012).

## V.2. Présentation de l'espèce *Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc.

### V.2.1. La famille des Astéracées

Le terme « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme des fleurs (Harkati, 2011) Les Astéracées (anciennement connues sous le nom de Composées) constituent une famille de plantes à fleurs appartenant aux Dicotylédones. C'est la famille la plus importante chez les Angiospermes. Elle contient environ 1600 genres et plus de 25 000 espèces dans le monde (Chaib *et al.*, 2017 ; Mandel *et al.*, 2017; Rolnik et Olas, 2021 ). La famille des Astéracées est largement distribuée dans le monde entier dans une variété d'habitats écologique, à l'exception de l'antarctique. On les retrouve dans les forêts, les prairies d'altitude et même les espaces verts urbains, mais elles sont beaucoup moins fréquentes dans les zones tropicales. La proportion la plus élevée des espèces se trouve dans les latitudes subtropicales et tempérées inférieures des régions arides et semi-arides. Les astéracées sont particulièrement répandues dans les environnements ouverts et secs (Rolnik et Olas, 2021 ; Easmin *et al.*, 2021).

Les plantes de cette famille présentent des caractères morphologiques divers, certaines espèces sont des arbres atteignant plus de 30 mètres ; cependant, beaucoup d'autres sont des arbustes, arbres ou plantes grimpantes, et la plupart sont des herbes vivaces ou annuelles (Rolnik et Olas, 2021). Les feuilles sont simples, à lobes pennés chez certaines espèces, alternées ou opposées et épineuses chez certains genres. L'inflorescence est un capitule, les fleurs sont soit actinomorphes soit zygomorphes, elles peuvent être hermaphrodites, mâles, femelles ou neutres (Adedeji et Jewoola, 2008).

Les Astéracées regroupent de nombreuses espèces différentes ayant des caractéristiques morphologiques et des composés actifs bien distincts. Ceci leur donne des propriétés très différentes. En effet, certaines plantes possèdent des propriétés médicinales tandis que d'autres sont des mauvaises herbes et des plantes toxiques (Easmin *et al.*, 2021).

### V.2.1. Distribution géographique d'*Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc.

*Asteriscus graveolens* est une plante aromatique endémique qui s'étend de l'Afrique du Nord aux régions désertiques d'Asie (Fyad *et al.*, 2020). Elle est principalement distribuée dans le Sud-ouest de l'Algérie et le Sud-est du Maroc (Cristofari *et al.*, 2012 ; Saad *et al.*, 2016 ). On le trouve également en Jordanie, en Égypte et en Palestine (Bengera *et al.*, 2020). Dans le Hoggar, cette espèce est située dans la province de Tamanrasset (sud de l'Algérie), elle est fréquente dans les savanes désertiques, les lits de rivières limoneux sablonneux et pierreux et aussi sur les montagnes rocheuses jusqu'à 2800 mètres d'altitude (Chaib *et al.*, 2017).

### V.2.2. Description botanique

*A. graveolens* est une espèce appartenant à la famille des Astéracées, connue localement sous le nom de « Tafss » (Said *et al.*, 2018). C'est une plante herbacée touffue qui peut atteindre jusqu'au 50 centimètre de hauteur (Gad *et al.*, 2021). Elle est largement répandue dans la région de la Macaronésie, le bassin méditerranée et l'Afrique du nord, y compris le désert saharien (Hammoud *et al.*, 2018). Les plantes de cette espèce sont considérées comme des plantes vivaces car la majorité des populations dépérissent pendant la saison sèche et les branches peuvent être régénérées à la prochaine saison des pluies (Bengera *et al.*, 2020). *A. graveolens* se caractérise par des feuilles allongées, couvertes de trichomes, dentelées ou largement lobées, avec des nervures saillantes à la face inférieure et un parenchyme hétérogène. Les inflorescences sont allongées plus au moins espacées à la base et les fleurs sont jaunes et fleurissent au printemps, de mars à mai (Znini *et al.*, 2012; Alilou, 2012; Bengera *et al.*, 2020).



Figure 23 : Photo d'un buisson d'*Asteriscus graveolens* (Znini *et al.*, 2012)

### V.2.3. Noms Vernaculaires et Synonymes

Les synonymes d'*Asteriscus graveolens* (Achoub et al., 2019 ; Benaissa et al., 2020) sont :

- *Bubonium graveolens* (Forsk.)
  - *Bupthalmum graveolens* (Forsk.)
  - *Nauplius graveolens* (Forssk.)
  - *Bubonium odorum* (Schousb.)
  - *Odontospermum odorum* (Schousb.)
  - *Asteriscus stenophyllus* (Link.)
  - *Asteriscus cavanillesi* (Caball.)
  - *Bupthalmum odorum* (Schousb.)
- **Nom arabe:** Tafss, Tameyout (Chaib *et al.*, 2017 ; Said *et al.*, 2018).

### V.2.4. Place dans la systématique :

Tableau 2 : Position systématique de l'espèce *Asteriscus graveolens* (Achoub, 2020)

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous-règne</b>	Tracheobionta
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotyledones
<b>Sous-classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Astérales
<b>Famille</b>	Asteraceae
<b>Genre</b>	<i>Asteriscus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Asteriscus graveolens</i> (Forsk.) Dc.

### V.2.5. Usages en médecine traditionnelle

*A. graveolens* fait partie des plantes médicinales endémiques, largement utilisées par la population locale du sud-ouest algérien pour traiter diverses affections telles que la fièvre, les maladies gastro-intestinales, les maux de tête, les douleurs céphaliques, la bronchite et aussi

comme agent anti-inflammatoire (Znini *et al.*, 2011; Benaissa *et al.*, 2020). Les Touaregs utilisent cette herbe pour aromatiser le thé (Chaib *et al.*, 2017). *A. graveolens* est également utilisée au Maroc pour ses propriétés antimicrobiennes et hypoglycémiantes (Cristofari *et al.*, 2012).

**Tableau 3 : Quelques usages thérapeutiques de la plante *A. graveolens* dans différentes régions (Bammou *et al.*, 2015)**

Préparation	Partie utilisée	Région d'étude	Usage thérapeutique
Décoction	Plante entière	Sud du Maroc	Fertilité et troubles menstruels
Infusion	Plante entière		Maladies des gencives et maux de dents
Poudre	Feuilles		Maux de tête et migraine
Décoction	Partie aérienne	Sud-est du Maroc	Diabète, obésité et maux de ventre
Décoction	Racine		maux de dents
Infusion	Feuilles, tige	Tassili n'Ajjer, Sahara central	Fièvre et pathologies du système respiratoire
Poudre	Feuilles, tige		Intoxication par les venins de scorpions et d'insectes
Jus	Feuilles		Sinusite
Décoction	Partie aérienne	Nord du Sinaï Égypte	Diarrhée, maux de tête et rhume, diabète

### V.2.6. Composition chimique

Plusieurs études phytochimiques réalisées sur l'espèce *A. graveolens* ont montré que cette plante est riche en composés bioactifs tels que les acides phénoliques, les monoterpènes, les flavonoïdes, sesquiterpènes, les alcaloïdes et les coumarines (Saad *et al.*, 2016; Fyad *et al.*, 2020). Les huiles essentielles contiennent principalement des monoterpènes oxygénés (37,6% dans les feuilles et 60,3% dans les fleurs) avec 1,8-cinéol (21,1% dans les fleurs). Les autres composants sont le cis-chrysanthényle acétate (44,30%) et cis-8-acétoxychrysanthényle acétate (33,70%) et le t-muurolole (6,51%) (Fyad *et al.*, 2020).

Les principaux phytoconstituants d'*A. graveolens* ont été mentionnés dans le Tableau 4

Tableau 4 : Quelques phytoconstituants d'*Asteriscus graveolens*

Partie de plante	Composés isolés	Références
Feuilles, Fleurs	Alcaloïdes, coumarines, saponosides, tanins, terpénoïdes, Flavonoïdes, acide caféique, des flavones (lutéoline, artemétine, névadensine)	Alilou <i>et al.</i> , 2014
Partie aérienne	Flavonoïdes, Glucoside flavonoïdes, saponins, cardinolids	Cheriti <i>et al.</i> , 2013
Fleurs	<i>cis</i> -chrysanthenyl acetate, <i>cis</i> -8-acetoxychrysanthenyl acetate, T-muurolol	Aouissi <i>et al.</i> , 2018
Partie aérienne	Terpénoïdes, <i>cis</i> -chrysanthenyl acetate, Myrtenyl acetate, <i>cis</i> -chrysanthenol, liguloxide, monoterpènes oxygénés, sesquiterpene hydrocarbons, kessane , liguloxide, T-cadinol, Valerianol	Chaib <i>et al.</i> , 2017
Feuilles	6-oxocyclonerolidol, 6-hydroxycyclonerolidol	Znini <i>et al.</i> , 2012
Partie aérienne	Acyclic sesquiterpene (7,12-dihydroxy- 6,7-dihydro-5,(6) E-dehydronerolidol), Germacranolide lactone sesquiterpène (9b-hydroxy-11b,13-dihydroparthenolide- 9-O-b-D-glucopyranoside), (9a-hydroxy-11b,13-dihydroparthenolide-9-O-b-D-glucopyranoside)	Achoub <i>et al.</i> , 2019

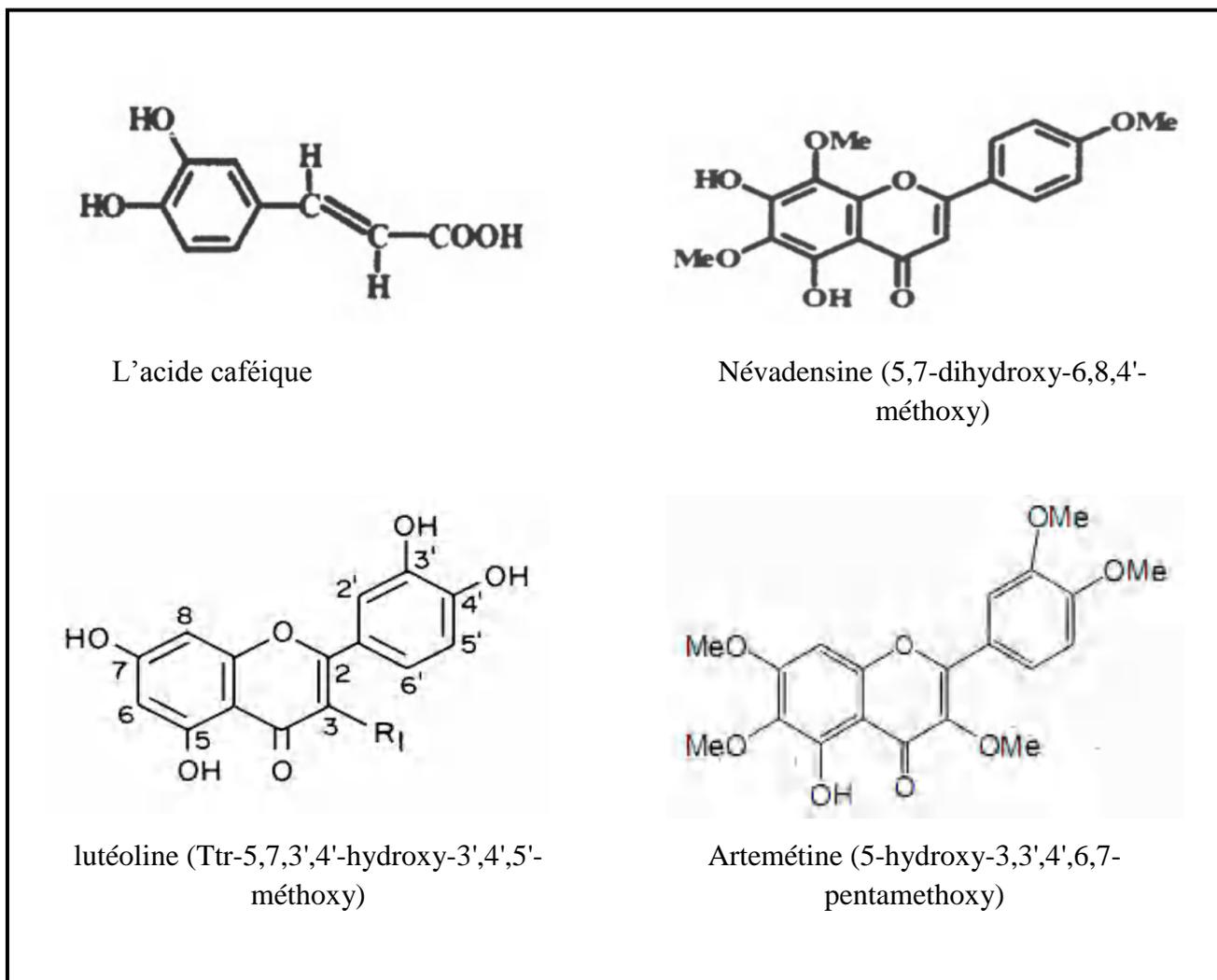


Figure 24 : Structure de quelques constituants de l'espèce *A. graveolens* (Alilou *et al.*, 2014)

### V.2.7. Les effets biologiques et pharmacologiques

*A. graveolens* est considérée comme l'une des plantes sahariennes les plus importantes, utilisée spécifiquement pour ses propriétés médicinales et aromatiques (Fyad *et al.*, 2020). Elle est utilisée dans le traitement des troubles gastro-intestinaux, comme remède dans les palpitations cardiaques, pour soulager les douleurs et la fièvre et pour traiter le diabète et les rhumatismes (Cheriti *et al.*, 2013). Elle est également connue pour le traitement des plaies infectées et pour protéger les dommages causés par la pollution environnementale (Cristofari *et al.*, 2012 ; Achoub *et al.*, 2019).

Il a été rapporté que les plantes de cette espèce possèdent des activités anti-tumorales, antioxydantes, antispasmodiques, antifongiques, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et hypoglycémiantes (Cristofari *et al.*, 2012 ; Znini *et al.*, 2012). Selon Fahmy (2003), les huiles essentielles d'*A. graveolens* ont montré une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, et une activité antifongique contre les levures, tels que *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Cristofari *et al.*, 2012). Diverses activités biologiques d'*Asteriscus graveolens* ont été mentionnées dans le tableau suivant :

**Tableau 5 : Activités biologiques de l'espèce *A. graveolens***

Partie utilisée	Extrait	Activité biologique	Référence
Feuilles, fleurs	Huile essentielle	Antimicrobienne	Melekmi <i>et al.</i> , 2006
Partie aérienne	Chloroformique	Antifongique	Alilou <i>et al.</i> , 2016
Partie aérienne	Aqueux	Antifongique	Bammou <i>et al.</i> , 2015
Flours	Huile essentielle	Antioxydante Antimicrobienne Anti-tumorale	Aouissi <i>et al.</i> , 2018
Partie aérienne	Huile essentielle	Antimicrobienne	Chaib <i>et al.</i> , 2017
Branches, Feuilles	Méthanolique	Anticancéreuse (cancer colorectal) Antioxydante Antimicrobienne	Gad <i>et al.</i> , 2022
Partie aérienne	Méthanolique	Antioxydante	Haddouchi <i>et al.</i> , 2016
Feuilles	Huile essentielle	Antimicrobienne Antioxydante	Aljeldah <i>et al.</i> , 2022
Partie aérienne	Ethanolique Méthanolique	Antimicrobienne	Alrawashdeh <i>et al.</i> , 2019
Feuilles, Fleurs	Aqueux	Antifongique	Askarne <i>et al.</i> , 2012

***Chapitre II :***  
***Etude expérimentale***

## I. Etude expérimentale *in vitro*

### I.1. Matériel végétal

#### I.1.1. La plante *Crataegus oxyacantha*

##### I.1.1.1. Récolte du matériel végétal

La plante a été récoltée au mois d'avril 2014 dans la région de la wilaya de Mila (Nord-est de l'Algérie) et identifiée par le professeur Mohamed Kaabeche (département de botanique, Université Ferhat Abbas, Sétif-Algérie). L'extraction de la plante est réalisée par Mme Benabderrahmane Wassila (Docteur en chimie), au sein des laboratoires de l'Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques Département de Chimie, Université Constantine 1.

##### I.1.1.2. Procédures de l'extraction de la plante

Les fruits séchés à l'air (460 g) ou les feuilles (800 g) de *C. oxyacantha* ont été broyées puis mise à macérer dans un mélange hydro alcoolique (éthanol/eau, 80/20 ; v/v) à température ambiante pendant 24 heures. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure 48, 72 heures successivement afin d'extraire le maximum. Après filtration, l'extrait hydro alcoolique récupéré est concentré sous pression réduite à une température n'excédant pas 35 °C. La solution obtenue (400 mL environ) est additionnée de 400 mL d'eau distillée sous agitation magnétique puis laissée reposer une nuit à 4 °C pour précipiter un maximum de chlorophylles. Après filtration, la solution obtenue est soumise à des affrontements successifs à l'aide de solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole (1 × 300 mL), puis le chloroforme (3 × 300 mL), ensuite l'acétate d'éthyle (3 × 300 mL) et en dernier le *n*-butanol (3 × 300 ml). Les quatre phases organiques sont séchées au sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrées puis concentrées sous pression réduite (35° C environ). Cette extraction permet d'obtenir des extraits bruts : éther de pétrole, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH.

Les étapes de l'extraction des feuilles et des fruits de la plante *C. oxyacantha* sont résumées dans la Figure 25.

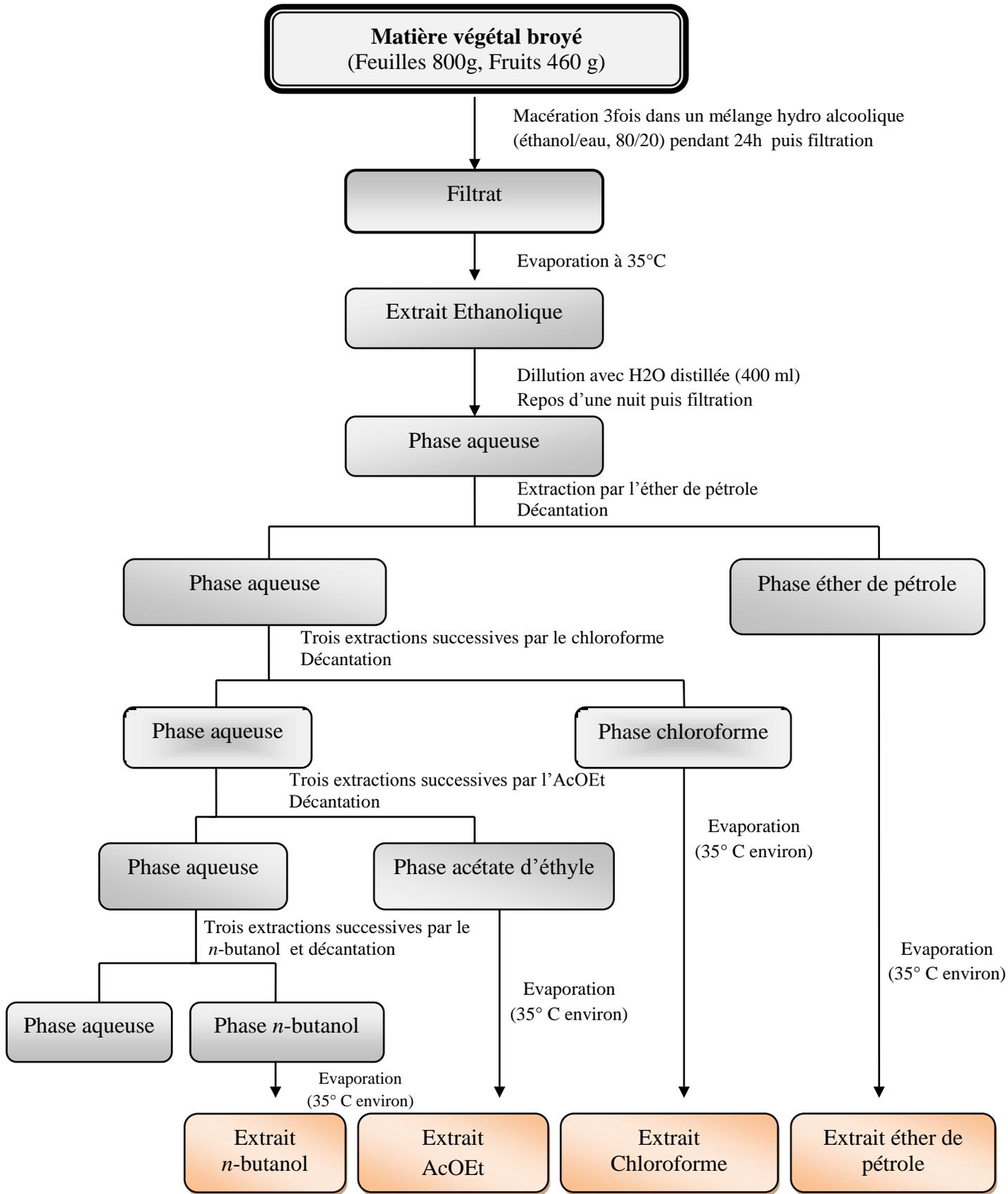


Figure 25 : Les étapes de l'extraction des feuilles et des fruits de *C. oxyacantha*

### **I.1.2. La plante *Asteriscus graveolens* (Forsk.) DC.**

#### **I.1.2.1. Récolte de la matière végétale**

La plante *Asteriscus graveolens* a été collectée de la Daya de Béchar dans le sud-ouest Algérien (31°37'0''N, 2°13'0''W) et identifiée par M. Benabdelhakem (Directeur de l'Agence de Préservation de la Nature, Béchar. Algérie. Un spécimen de référence AGA0510-BEC- ALG-52 a été déposé à l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Constantine 1. L'extraction de la plante est réalisée par Mme Hammoud Leila (Docteur en chimie).

#### **I.1.2.2. Procédures de l'extraction de la plante**

Le matériel végétal récolté (Feuilles et fleurs) a été bien nettoyé et séché à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil à température ambiante. Une quantité (1580g) de la plante sèche a été macérée dans un mélange hydro alcoolique (Ethanol/Eau, 70/30, v/v) pendant 24 heures à température ambiante. Cette opération est effectuée 3 fois, suivie chaque fois d'une filtration et soumis à une évaporation rotative à environ 35 °C pour obtenir l'extrait brut éthanolique. A cet extrait, on ajoute 632 mL d'eau distillée et laissé au repos à froid (4°C) pendant une nuit pour une précipitation maximale de chlorophylle. Après filtration on obtient une solution aqueuse. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante (le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol). Les trois phases organiques obtenues ont été séchées avec du sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrées et concentrées à sec sous pression réduite puis pesées. La Figure 26 résume les différentes étapes de cette extraction :

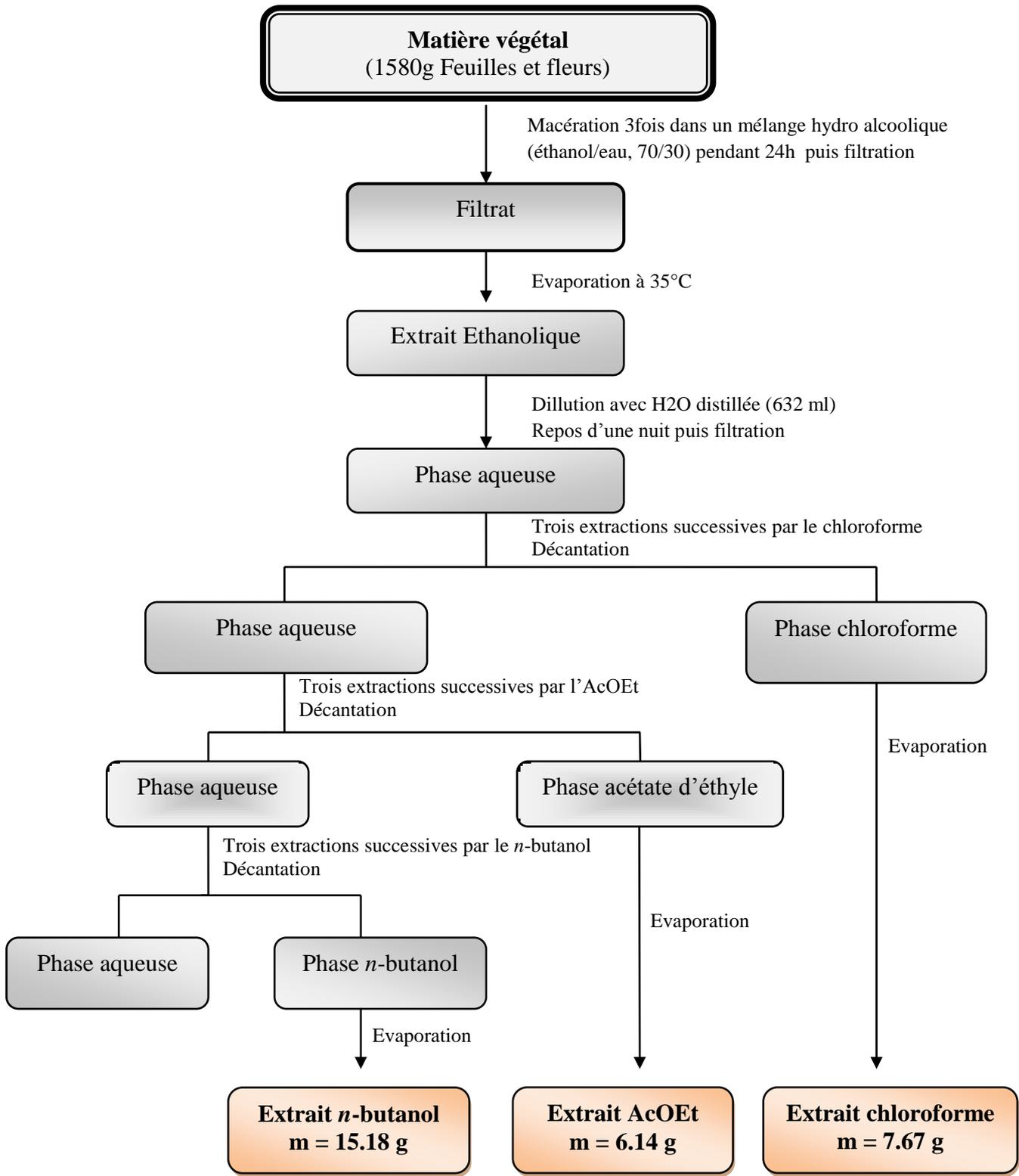


Figure 26 : Les étapes de l'extraction des feuilles et fleurs de la plante *A. graveolens*

## I.2. Etude phytochimique

### I.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle des plantes : *C. oxyacantha* et *A. graveolens* a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode décrite par Singleton et Rossi, 1965. Le principe de la méthode est fondé sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif « Folin-Ciocalteu », qui est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique de couleur jaune. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à environ 750-765 nm. Brièvement, dans une microplaque à 96 puits, un volume de 20 µL de chaque extrait (dilués dans l'eau distillée ou dans le Méthanol) a été mélangé avec 100 µL de Folin-Ciocalteu FCR dilué (1 :10) et 75 µL de solution de carbonate de sodium (7,5%). Après 2 h d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été effectuée contre un blanc à l'aide d'un lecteur de microplaques à 765 nm. Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à des concentrations allant de 25 à 500 µg/mL. Les teneurs en polyphénols totaux des extraits sont alors exprimées en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme (µgGAE/mg) d'extrait à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage d'acide gallique (Muller *et al.*, 2010).

### I.2.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits des deux plante a été déterminée en utilisant la méthode des microplaques décrite par Topçu *et al.*, 2007. Le principe de la méthode est basé sur la formation d'un complexe entre  $Al^{+3}$  et les flavonoïdes. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde  $\lambda = 415$  nm. Un volume de 50 µL de chaque extrait (1 mg dans 1 ml du méthanol) a été mélangé avec 130 µL de MeOH, 10 µL d'acétate de potassium ( $CH_3COOK$ ) et 10 µL de nitrate d'aluminium ( $Al(NO_3)_2 \cdot 9H_2O$ ). Après 40 min d'incubation à température ambiante, la lecture a été effectuée à 415 nm par un lecteur de microplaques. La teneur totale en flavonoïdes est calculée en microgrammes d'équivalents de quercétine (µgQE) pour 1 mg d'extrait à l'aide d'une équation obtenue à partir d'une droite d'étalonnage de la quercétine.

### I.2.3. Dosage des flavonols totaux

La teneur en flavonols des extraits a été déterminée en utilisant la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) décrite par Kumaran *et al.*, 2007. En bref, une quantité de 50 µL de chaque extrait a été mélangée avec 50 µL d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> (20 mg/mL) et 150 µL d'acétate de sodium (50 mg/mL). Après deux heures et demi d'incubation à l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 440 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. La courbe détalonnage des flavonols a été effectuée en utilisant la quercétine à des concentrations allant de 25 à 200 µg/mL. Le résultat est exprimé en microgrammes d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (µg de QE / mg d'extrait).

### I.3. Activité antioxydante

Les propriétés antioxydantes in vitro des extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle des deux plantes *Crataegus oxyacantha* et *Asteriscus graveolens* ont été évaluées par sept méthodes : piégeage du radical libre DPPH, l'ABTS, méthode de CUPRAC, Galvinoxyl radical (GOR), phenanthroline, reducing power et LPO.

#### I.3.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés antiradicalaires, il est réduit et change de couleur en virant au jaune (figure 27). Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Bentabet *et al.*, 2014). Cette méthode est fondée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger ce radical. Le pourcentage de piégeage du radical (I %) est calculé selon l'équation suivante :

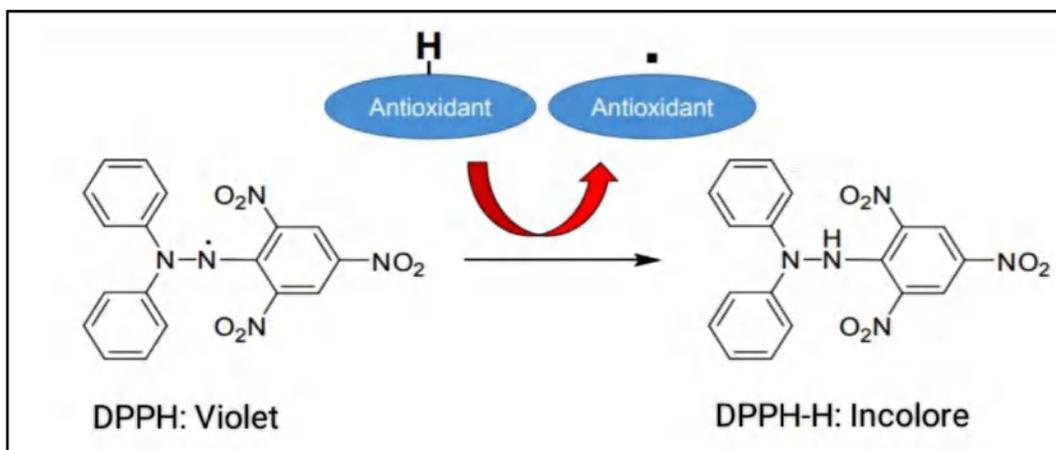
$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Blanc}}} \times 100$$

**A<sub>Blanc</sub>** : l'absorbance du blanc contenant tous les réactifs sans l'extrait

**A<sub>Extrait</sub>** : l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait

La capacité des extraits à piéger le radical DPPH est déterminée selon la méthode décrite par Blois, 1958. Dans une microplaque à 96 puits, 160 µL de la solution méthanolique du DPPH (6 mg dans 100 mL de méthanol) ont été ajoutés à 40 µL d'échantillon dilué dans des solutions de méthanol à des concentrations différentes. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en

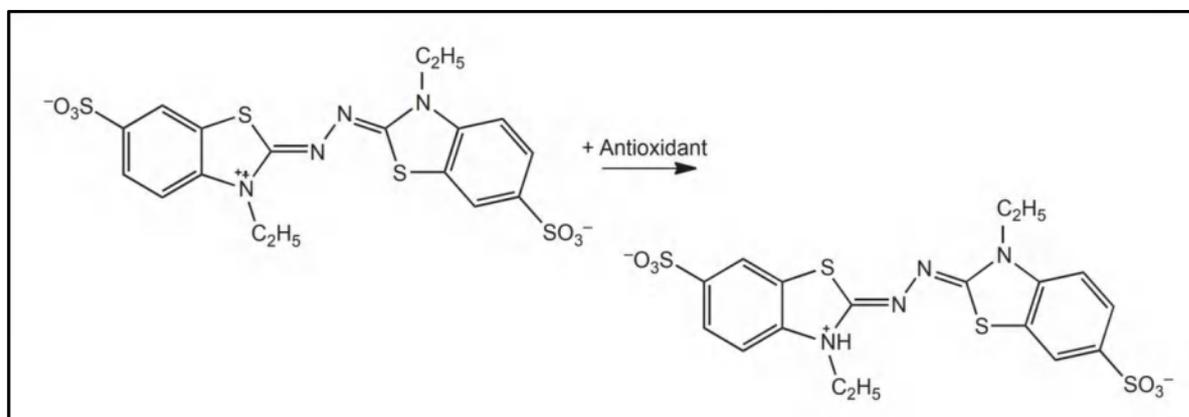
mélangeant 40  $\mu\text{L}$  de méthanol avec 160  $\mu\text{L}$  de la solution méthanolique du DPPH. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm en utilisant un lecteur de microplaques. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards de références ou contrôles positifs pour la comparaison de l'activité avec les extraits utilisés et ont été préparés dans les mêmes conditions que les échantillons.



**Figure 27** : La réduction du DPPH par un antioxydant (Xiao *et al.*, 2020)

### I.3.2. Test de piégeage du radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$

Le principe de la méthode est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical cation  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  d'une couleur bleu-verte et le transforme en ABTS incolore. Ce radical est généré en réagissant avec l'ABTS (Acide 2,2'-azino-bis 3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) et le persulfate de potassium ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical entraîne sa réduction et une diminution de l'absorbance à 734 nm. Cette diminution dépend de l'activité antioxydante du composé ou l'extrait testé, mais souvent aussi du temps et de la concentration (Bensalah *et al.*, 2011; Liang et Kitts, 2014; Rodriguez *et al.*, 2019).



**Figure 28** : Piégeage du radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  par un antioxydant (Rodriguez *et al.*, 2019)

Le test de piégeage des cations radicalaires  $ABTS^{*+}$  a été déterminé selon la méthode décrite par Re *et al.*, (1999), avec de légères modifications. L'ABTS a été dissous dans l'eau distillée à une concentration de 7 mM avec 2,45 mM de persulfate de potassium, le mélange est incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 à 16 heures. L'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par l'éthanol ou l'eau jusqu'à  $0,700 \pm 0,020$  à 734 nm avant l'utilisation. Ensuite, 160  $\mu$ L de la solution d'ABTS ont été mélangés avec 40  $\mu$ L de la solution d'extrait à différentes concentrations. Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards positifs et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (PI) et en  $IC_{50}$  comme précédemment décrits pour le test DPPH (Re *et al.*, 1999).

### I.3.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

Le principe de la méthode de réduction de cuivre est basé sur le suivi de la diminution de l'absorbance du complexe Cu (II)-Néocuproïne de couleur bleu claire. Lorsqu'un agent antioxydant est présent, ce complexe est réduit en Cu (I)-Néocuproïne de couleur jaune orangé (figure 29). Cette réaction est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm (Massoud *et al.*, 2022).

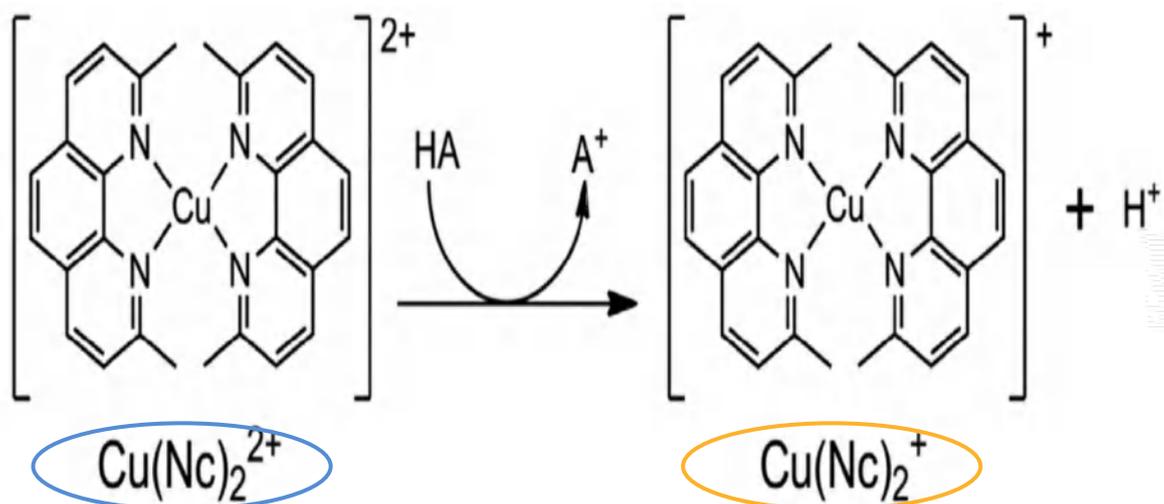


Figure 29 : Réduction du complexe chromogène de  $Cu^{+2}$ -Nc (Xiao *et al.*, 2020)

La capacité antioxydante par réduction de cuivre des extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle a été déterminée par la méthode d'Apak *et al.*, (2004). Brièvement, dans une microplaque à 96 puits, 50  $\mu$ L de solution de chlorure de cuivre (II) ( $CuCl_2$ , 10 mM), 50  $\mu$ L de solution alcoolique néocuproïne (7.5 mM) et 60  $\mu$ L du tampon aqueux d'acétate d'ammonium ( $NH_4Ac$ ) à (pH =

7.00, 1 M) ont été ajoutées à 40  $\mu\text{L}$  d'extrait à différentes concentrations. Après 1 heure d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 450 nm contre un réactif blanc en utilisant un lecteur de microplaques. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles du BHA et BHT (antioxydants standards). Les résultats ont été donnés en  $A_{0.50}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance (Apak *et al.*, 2004).

### I.3.4. Activité de réduction par formation du complexe $\text{Fe}^{+2}$ -phénanthroline

L'activité phénanthroline a été utilisée pour déterminer le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{+3}$ ) dans les échantillons selon la méthode décrite par Szydłowska-Czerniaka *et al.*, (2008). Cette méthode est basée sur la réduction des ions ( $\text{Fe}^{+3}$ ) en ( $\text{Fe}^{+2}$ ) par un antioxydant. Le  $\text{Fe}^{+2}$  ainsi produit interagit avec l'orthophénanthroline pour former le complexe de ferroïne (phénanthroline- $\text{Fe}^{+2}$ ) de couleur rouge orange (figure 30). En bref, dans une microplaque de 96 puits, un volume de 10  $\mu\text{L}$  de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ , 0,2 %), 30  $\mu\text{L}$  Phénanthroline (0.5%) et 110  $\mu\text{L}$  de méthanol. Le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 20 min à 30°C et l'absorbance a été mesurée à 510 nm contre un réactif à blanc. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standard.

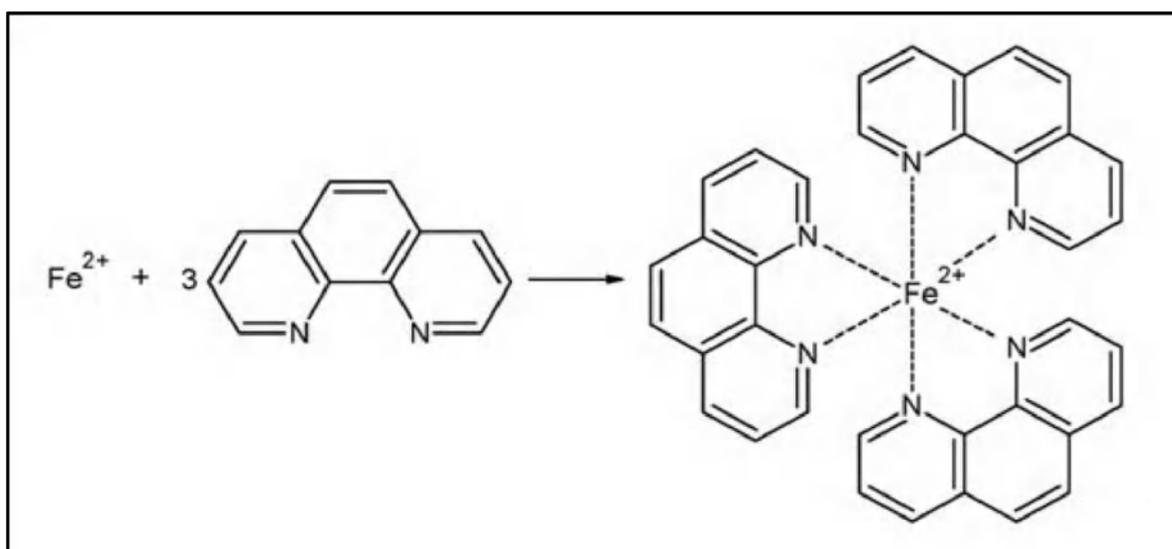
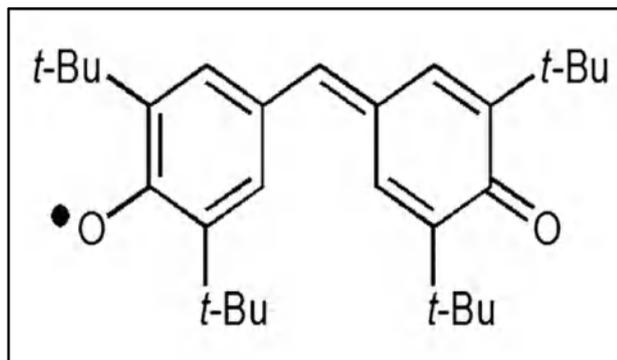


Figure 30 : Formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phénanthroline (Kicinski et Dyjak, 2020)

### I.3.5. Effet scavenger du radical Galvinoxyl (GOR)

Le galvinoxyl (Figure 31) est un radical libre stable qui peut être utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des différents types d'échantillons. Le principe de la méthode est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire ou à neutraliser le radical galvinoxyl de couleur

initialement jaune qui se traduit par la disparition de cette couleur. Cette réduction est facilement mesurée par spectrophotométrie à 428 nm (Grilj *et al.*, 2012; Imai *et al.*, 2019).



**Figure 31: Structure chimique de radical Galvinoxyl (Grilj *et al.*, 2012)**

L'activité de piégeage de radical galvinoxyl (GOR) a été évaluée selon la méthode décrite par Shi *et al.* (2001). Un volume de 40  $\mu\text{L}$  d'extrait à différentes concentrations est ajouté à 160  $\mu\text{L}$  de la solution méthanolique de galvinoxyl (0,1 mM) dans une microplaque à 96 puits. Après 120 min d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 428 nm. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards positifs et le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante :

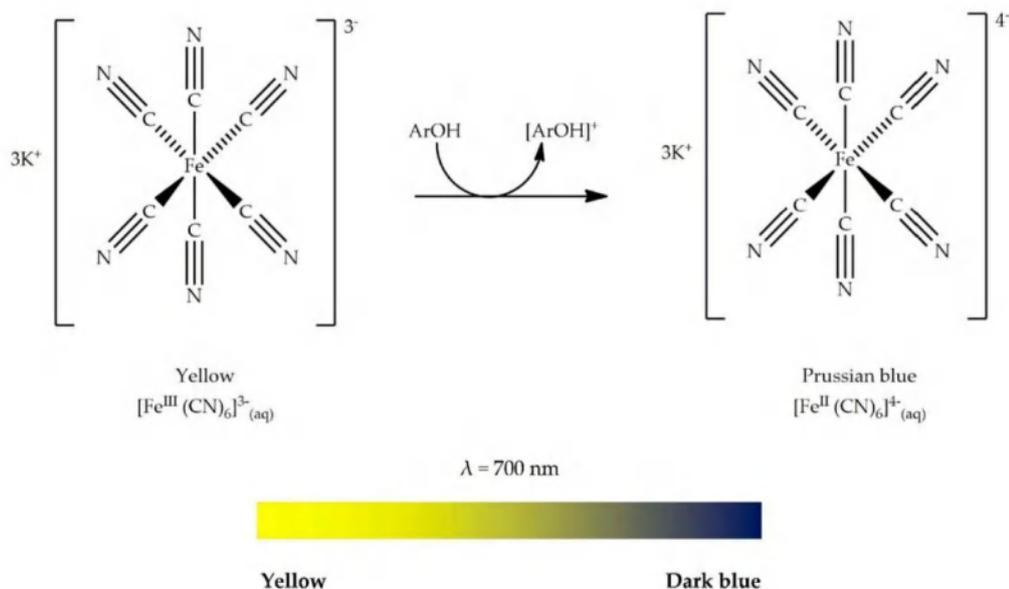
$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

$A_C$  : Absorbance de contrôle en absence de l'extrait

$A_E$  : Absorbance de l'échantillon

### I.3.6. Activité du pouvoir réducteur

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction oxydoréduction entre l'extrait et les ions métallique de transition, notamment le fer. Le ferricyanide de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  fournit des ions  $\text{Fe}^{+3}$  qui seront réduit en  $\text{Fe}^{+2}$  par les antioxydants présents dans l'extrait végétal (Khadhri *et al.*, 2012). La réaction est révélée par le changement de la couleur jaune du fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) vers la couleur bleu du fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ) d'ont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm (Figure 32) (Sadeer *et al.*, 2020).



**Figure 32 : Mécanisme de la réaction du ferricyanide de potassium (Sadeer *et al.*, 2020)**

Le pouvoir réducteur des extraits est déterminé par la méthode d'Oyaizu (1986), avec une légère modification. Dans une microplaque à 96 puits, 10  $\mu\text{L}$  d'extrait à différentes concentrations (ou des antioxydants standards) a été mélangé avec 40  $\mu\text{L}$  du tampon phosphate (0,2 M ; pH=6,6) et 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de potassium ferricyanide  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement à température ambiante, 50  $\mu\text{L}$  d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% (pour stopper la réaction), 40  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et 10  $\mu\text{L}$  de chlorure de fer  $\text{FeCl}_3$  (0.1%) sont ajoutés au mélange. La lecture de l'absorbance se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. L'acide ascorbique, l'acide tannique et l' $\alpha$ -tocophérol sont utilisés comme standards positifs. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. Les résultats ont été calculés à titre d' $A_{0.5}$   $\mu\text{g/mL}$ .

### I.3.7. Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation lipidique (LPO) dans le jaune d'œuf est évaluée par le dosage de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode décrite par Amrani *et al.*, (2018). Les jaunes d'œufs frais ont été homogénéisés dans la solution PBS (20 mM, PH 7,4) et centrifugés pendant 20 minutes à 4000 tours/min pour éliminer les précipitations. Une aliquote de 1 ml de surnageant obtenu est mélangée avec la solution d'extrait ou la vitamine C (pour le standard ou contrôle positif) à différentes concentrations (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL) et 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeSO}_4$  (0.07 M). Le mélange a été incubé à 37°C pendant une heure. Après l'incubation, la réaction est stoppée

par l'addition de 1 ml d'acide trichloroacétique TCA (20%) puis 1,5 ml d'acide thiobarbiturique TBA (1%). Les échantillons ont été mélangés en utilisant un agitateur vortex, ensuite chauffés à 100°C pendant 15 minutes. Après centrifugation à 4000 tours/min pendant 20 minutes, la couleur du complexe a été mesurée à 532 nm. Le groupe contrôle a été réalisé en parallèle (sans extrait) dans les mêmes conditions que les échantillons, sauf que l'acide trichloroacétique (TCA, 20%) a été ajouté avant l'incubation et toutes les mesures ont été effectuées en triple (Boubekri *et al.*, 2014; Amrani *et al.*, 2018).

L'activité de piégeage de la peroxydation lipidique (K%) est calculée en utilisant la formule suivante :

$$K (\%) = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

#### I.4. Activité photoprotectrice SPF

L'effet photoprotecteur caractérisé par le facteur de protection solaire (SPF) a été évalué selon la méthode de Mansur *et al.* (1986). Les échantillons ont été dilués dans le méthanol pour obtenir une concentration de 2 mg/mL. 200 µL de chaque extrait ont été mis dans une microplaque à 96 puits puis mesurés à différentes longueurs d'onde ( $\lambda = 290$  à 320 nm) chaque 5 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Chaque mesure spectrophotométrique est réalisée en triple et la valeur SPF a été calculée par la formule suivante :

$$SPF_{\text{Spectrophotometric}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

**EE ( $\lambda$ ):** spectre d'effet érythémal (erythemal effect spectrum)

**I ( $\lambda$ ):** spectre d'intensité solaire (solar intensity spectrum)

**Abs ( $\lambda$ ):** l'absorbance des échantillons (absorbance of sunscreen product)

**CF :** facteur de correction (correction factor = 10)

Les valeurs de  $EE(\lambda) \times I(\lambda)$  sont des constantes déterminées par Sayre *et al.*, (1979) (Tableau6).

Tableau 6 : Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF (Mansur *et al.*, 1986)

Longueur d'onde $\lambda$ (nm)	EE ( $\lambda$ )x I( $\lambda$ ) (Normes)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180
Total	1

## I.5. Activités enzymatiques

### I.5.1. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase

Le substrat chromogène *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG) est largement utilisé pour la détermination de l'activité  $\alpha$ -glucosidase. C'est une molécule incolore qui contient un résidu D-glucose lié à un fragment *p*-nitrophénol via une liaison glycosidique. L'hydrolyse de cette liaison par l' $\alpha$ -glucosidase libère du *p*-nitrophénol de couleur jaune qui absorbe à 405 nm (Figure 33). En présence d'inhibiteur, l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase diminue ou est inhibée. Cela est exprimé par diminution de la dégradation du substrat p-NPG (Lankatillake *et al.*, 2021).

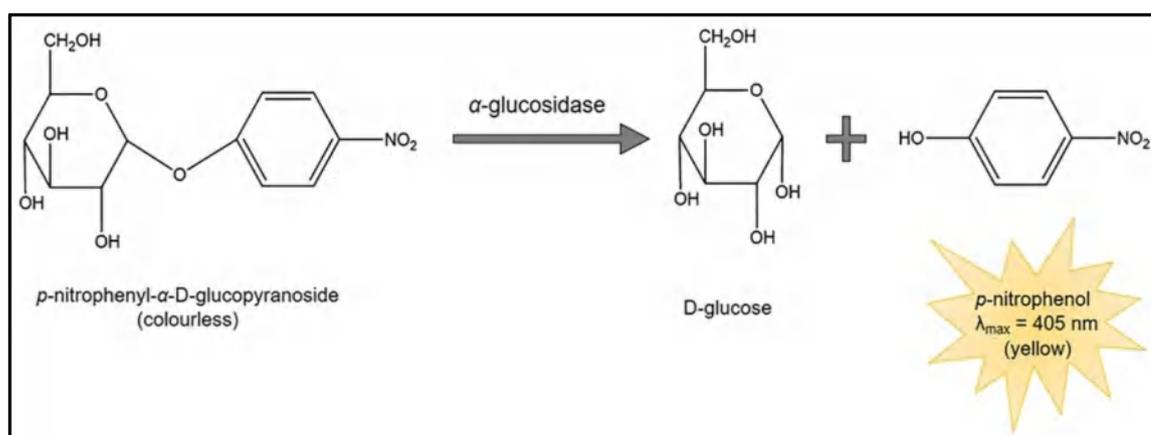


Figure 33 : Mécanisme d'hydrolyse du p-NPG par l' $\alpha$ -glucosidase (Lankatillake *et al.*, 2021)

L'activité inhibitrice des extraits contre l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase a été évaluée par la méthode de Lordan *et al.* (2013) avec quelques modifications. Brièvement, 50  $\mu$ L de chaque extrait à différentes concentrations ont été mélangés avec 50  $\mu$ L de solution de p-NPG à 5 mM dans du tampon phosphate (p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside), puis incubés pendant 10 minutes à 37°C. Après incubation, un volume de 100  $\mu$ L de la solution enzymatique (1 mg d'enzyme alpha-glucosidase dans 10 mL de tampon phosphate 100 mM, pH 6,9) a été ajouté au mélange. L'absorbance a été mesurée à 405 nm à 37 °C chaque 10 min, pendant 30 min (0-10-20-30 min) en utilisant un lecteur de microplaque à 96 puits. L'acarbose est utilisé comme contrôle positif. L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase a été exprimée en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition de l}'\alpha\text{-glucosidase \%} = [(\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{Extrait}}) / \text{Abs}_{\text{contrôle}}] \times 100$$

### I.5.2. Détermination de l'activité anti-Alzheimer (l'activité anti-cholinestérase)

Le dosage enzymatique de l'activité de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase a été réalisé en utilisant une méthode spectrophotométrique légèrement modifiée par Ellman *et al.*, (1961), qui utilise des substrats artificiels; l'iodure d'acétylthiocholine (ACI) et le chlorure de butyrylthiocholine (BuCi), dont l'hydrolyse conduit à la formation de Thiocholine. Cette dernière, forme un dérivé coloré en jaune avec le DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) (Somboro *et al.*, 2013 ; Mebrek *et al.*, 2018). L'intensité de la couleur du produit est mesurée à 412 nm et elle est proportionnelle à l'activité enzymatique (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014). Dans une microplaque à 96 puits, un volume de 10  $\mu$ L d'une solution d'extrait à différentes concentrations a été mélangé avec 150  $\mu$ L de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH=8) et 20  $\mu$ L d'AChE ( $5.32 \times 10^{-3}$  U) ou BChE ( $6.85 \times 10^{-3}$  U). Le mélange a été incubé pendant 15 min à 25°C, puis 10  $\mu$ L de la solution DTNB (0.5 mM) ont été ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'addition de 10  $\mu$ L de substrat d'iodure d'acétylthiocholine (0.71 mM) ou le chlorure de butyrylthiocholine (0.2 mM). La lecture se fait à 412 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. La galantamine est utilisée comme référence (Ellman *et al.*, 1961).

Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE est déterminé par rapport au blanc (éthanol avec le phosphate buffer pH 8) selon la formule :

$$\% \text{ Inhibition d'AChE ou BChE} = [(E - S)/E] \times 100$$

E : l'activité de l'enzyme sans extrait

S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

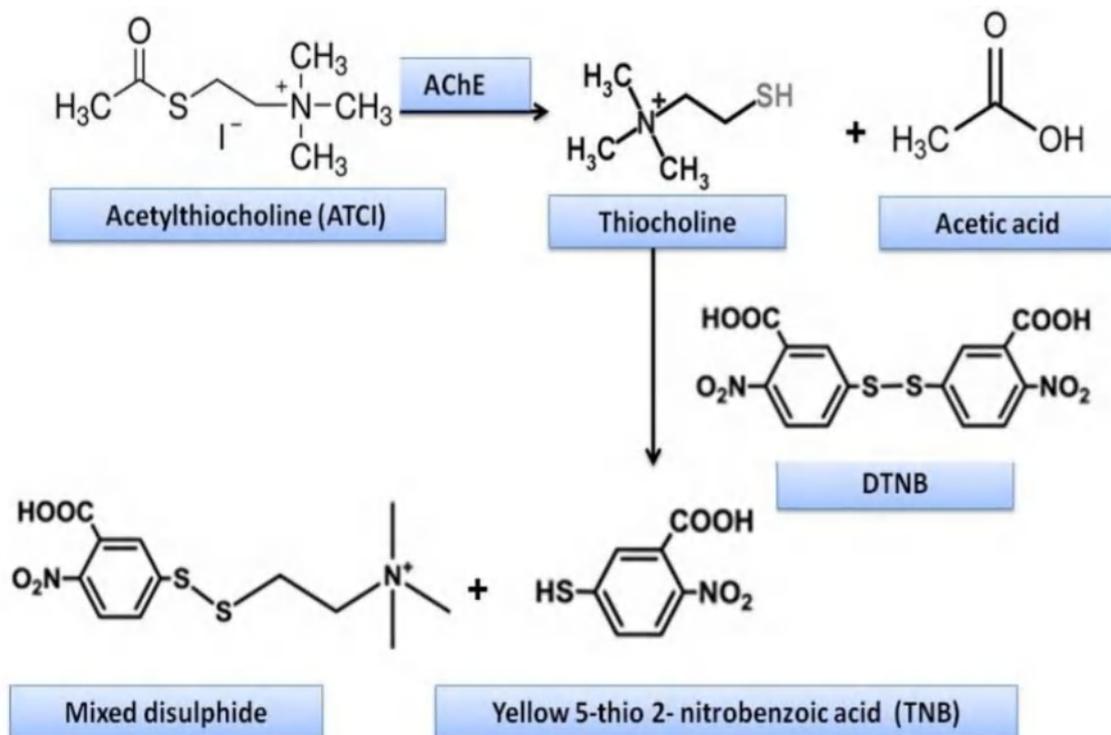


Figure 34 : Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014)

## II. Expérimentation animale

### II.1. Animaux et conditions d'hébergement

Les rats utilisés dans cette expérimentation sont des rats adultes de la souche *Wistar albinos*, pesant entre 170 et 220 g et provenant de l'animalerie de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1. Les rats sont placés par groupes dans des cages en plastiques qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois pour une période d'acclimatation avant d'être utilisés dans cette expérience. Pendant cette période, les rats ont un accès libre à l'eau et à la nourriture de type standard et ils sont maintenus dans une chambre de l'animalerie à température ambiante.

## **II.2. Induction de la toxicité et traitement des rats**

Cette expérimentation est divisée en deux parties :

### **II.2.1. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de *Crataegus oxyacantha* contre la toxicité de la doxorubicine (DOX)**

L'étude de l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* vis-à-vis de la toxicité hépatique induite par la doxorubicine a été réalisée durant une période de 10 jours sur des rats femelles (170-200 g) répartis en 5 lots de 6 rats chacun:

- **Lot 1 (Témoin)** : non traité
- **Lot 2 (DOX)** : traités par la doxorubicine par injection intrapéritonéale à la dose unique de 15 mg/kg
- **Lot 3 (Extrait)** : traités par l'extrait par gavage, à raison de 100 mg/kg dissous dans l'eau distillée pendant dix jours
- **Lot 4 (Extrait + DOX)** : traités par l'extrait à la dose 100 mg/kg par gavage pendant 10 jours et la DOX à la dose unique de 15 mg/kg par voie intrapéritonéale, le 8<sup>ème</sup> jour du traitement.
- **Lot 5 (Vitamine E+ DOX)** : traités par la vitamine E par gavage, à raison de 100 mg/kg dissous dans l'eau distillée pendant dix jours et par la doxorubicine, à raison de 15 mg/kg le huitième jour.

### **II.2.2. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol d'*Asteriscus graveolens* contre la toxicité de la doxorubicine (DOX)**

L'étude de l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* vis-à-vis de la toxicité hépatique et la toxicité des testicules induite par la doxorubicine a été réalisée durant une période de 10 jours sur des rats mâle (180-220 g) répartis au hasard en 5 lots de 7 rats chacun de la façon suivante :

- **Lot 1 (Témoin)** : animaux non traité, recevant l'eau distillée par gavage pendant 10 jours
- **Lot 2 (DOX)** : animaux recevant l'eau distillée par gavage pendant 10 jours puis traités le 8<sup>ème</sup> jour par la doxorubicine à la dose 15 mg/kg par voie intrapéritonéale.
- **Lot 3 (Extrait)** : animaux recevant par gavage l'extrait *n*-butanol à la dose 75 mg/kg (dilué dans l'eau distillée), pendant 10 jours.

- **Lot 4 (Extrait + DOX) :** animaux recevant par gavage l'extrait *n*-butanol à la dose 75 mg/kg pendant 10 jours et une seule injection de la DOX au 8<sup>ème</sup> jour par voie intrapéritonéale.
- **Lot 5 (Vitamine E+ DOX) :** animaux recevant la vitamine E par gavage à la dose 100 mg/kg pendant 10 jours et traités par la doxorubicine, à raison de 15 mg/kg le huitième jour.

L'état de santé général des rats sous traitement est surveillé et le poids corporel de chaque rat est mesuré chaque jour durant toute la période du traitement.

### **II.3. Le sacrifice des animaux et prélèvement du sang**

A la fin des délais d'administrations, tous les rats ont été sacrifiés après 72 h de l'injection de la Dox. Le prélèvement du sang s'effectue à partir de la veine porte et récupéré dans des tubes héparines, ces tubes vont subir une centrifugation à 3000 tours/min pendant 10 min. Les échantillons obtenus ont été stockés à -20°C jusqu'à l'utilisation pour le dosage des paramètres biochimiques et enzymatiques (triglycérides, LDH, cholestérol, ASAT, ALAT, ...).

### **II.4. prélèvement des organes et préparation d'homogénat**

Les organes des rats (foie et testicules) sont rapidement prélevés et rincés avec une solution saline froide NaCl 0,9 % afin d'éliminer complètement le sang, puis séchés sur le papier filtre et pesés. Ensuite chaque organe est coupé en petits morceaux, une partie est fixée dans le formol à 10 % pour l'étude histologique, le reste est homogénéisé dans la solution du KCl 1,15 % et centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu est conservé pour les dosages ultérieurs de l'MDA, GSH et la GPx.

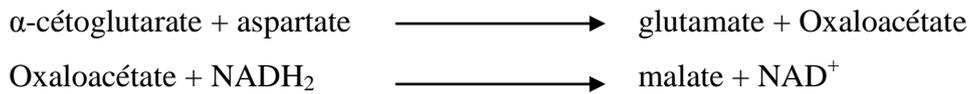
### **II.5. Evaluation biochimique et mesure des paramètres du stress oxydatif**

#### **II.5.1. Evaluation des paramètres biochimiques**

L'évaluation des paramètres biochimiques est réalisée par des méthodes enzymatiques ou colorimétriques au niveau du laboratoire biochimie de l'hôpital CHU-Constantine, en utilisant des kits commerciale (BIOMAGHREB, SPINREACT) avec un automate multiparamétrique.

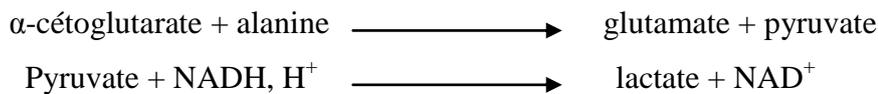
### II.5.1.1. Evaluation de l'activité enzymatique de l'ASAT

L'aspartate aminotransférase (ASAT ou GOT) catalyse le transfert du groupement amine de l'aspartate sur l' $\alpha$ -cétoglutarate en formant une molécule de glutamate et d'oxaloacétate. En présence de NADH<sub>2</sub> et de malate déshydrogénase (MDH), l'oxaloacétate est réduit en L-malate. Le NADH<sub>2</sub> est ensuite oxydé en NAD<sup>+</sup> selon la réaction ci-dessous :



### II.5.1.2. Evaluation de l'activité enzymatique de l'ALAT

L'alanine aminotransférase (ALAT ou GPT) catalyse le transfert du groupement amine de l'alanine sur l' $\alpha$ -cétoglutarate formant une molécule de glutamate et pyruvate. En présence de NADH, H<sup>+</sup> et de lactate déshydrogénase (LDH), le pyruvate est réduit en L-lactate selon la réaction :



### II.5.1.3. Evaluation de l'activité enzymatique de LDH

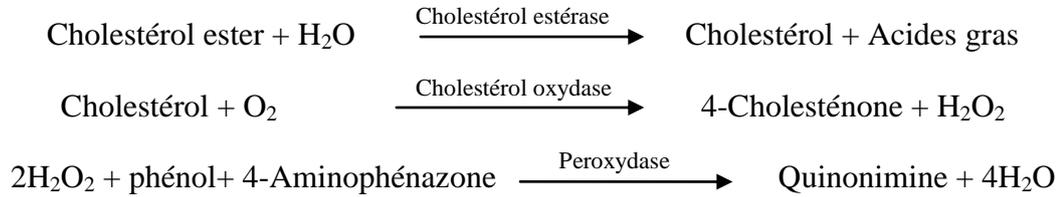
La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme intracellulaire catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate par le NADH. Le taux de la diminution de NADH est proportionnel à la concentration catalytique du LDH présent dans l'échantillon.



### II.5.1.4. Dosage du cholestérol plasmatique

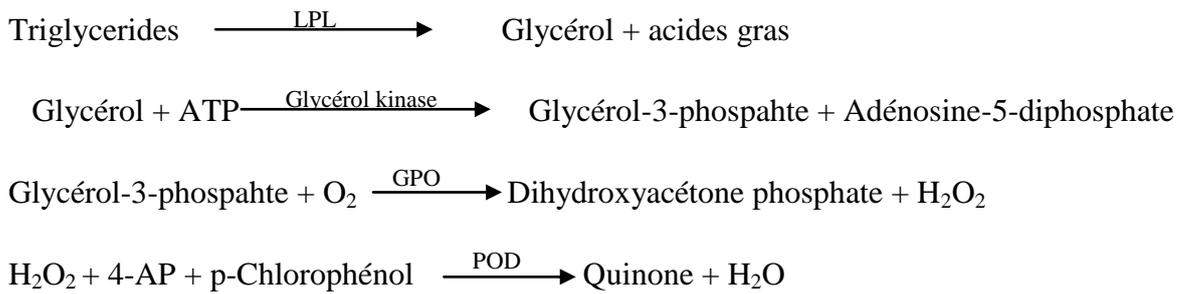
Le dosage de cholestérol plasmatique est une méthode colorimétrique utilisée pour évaluer les niveaux de cholestérol dans le sang. Le principe de la méthode est basé sur la transformation des esters de cholestérol en cholestérol libre, l'oxydation de ce produit donne la naissance de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui réagit avec le phénol et 4-Aminophenazone sous

l'action de la peroxydase pour donner un complexe « Quinone imine » de couleur rose mesurable par spectrophotométrie à 500 nm. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans le plasma sanguin (Deeg *et al.*, 1983; Artiss *et al.*, 1997).



### II.5.1.5. Dosage des triglycérides plasmatiques

L'incubation des triglycérides contenus dans l'échantillon avec la lipoprotéinlipase (LPL) libère le glycérol et les acides gras. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine diphosphate (ADP) par la glycérol kinase et l'ATP. Le glycérol-3-phosphate (3GP) est en suite converti par la glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Dans la réaction finale, le peroxyde d'hydrogène réagit avec 4-aminophénazone (4-AP) et le p-chlorophénol en présence de peroxydase (POD) pour donner un composé de couleur rouge. L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon.



## **II.5.2. Mesure des paramètres du stress oxydant**

### **II.5.2.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)**

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux formés lors de la dégradation des lipides polyinsaturés sous l'effet des radicaux libres, il est utilisé souvent comme un biomarqueur de la peroxydation lipidique. Le taux de l'MDA dans le foie et les testicules est mesuré selon la méthode d'Uchiyama et Mihara, (1978). Le principe de la méthode est basé sur la condensation de l'MDA en milieu acide et à chaud (100°C) avec deux molécules de l'acide thiobarbiturique (TBA). Cette réaction entraîne la formation d'un complexe MDA-TBA de couleur rose qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 530 nm (Figur35). Une augmentation de production du MDA dans les organes en conséquence du stress oxydant, traduit par une augmentation de la formation du complexe.

Pour le dosage du malondialdéhyde, l'homogénat des organes ou du standard a été ajouté à la solution contenant le TBA (0,67 %) et l'acide phosphorique (1 %). Le mélange réactionnel a été chauffé à 100°C pendant 45 minutes. Après refroidissement, un volume de 2 ml de n-butanol est ajouté puis suivi par une centrifugation à 3000 tours/min pendant 15 minutes. L'absorbance du surnageant a été mesurée par spectrophotomètre à 530 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'homogénat par l'eau distillée. Le 1,1,3,3-tétraéthoxypropane est utilisé comme standard et la concentration de MDA est exprimée en nmol/g de tissu (Uchiyama et Mihara, 1978).

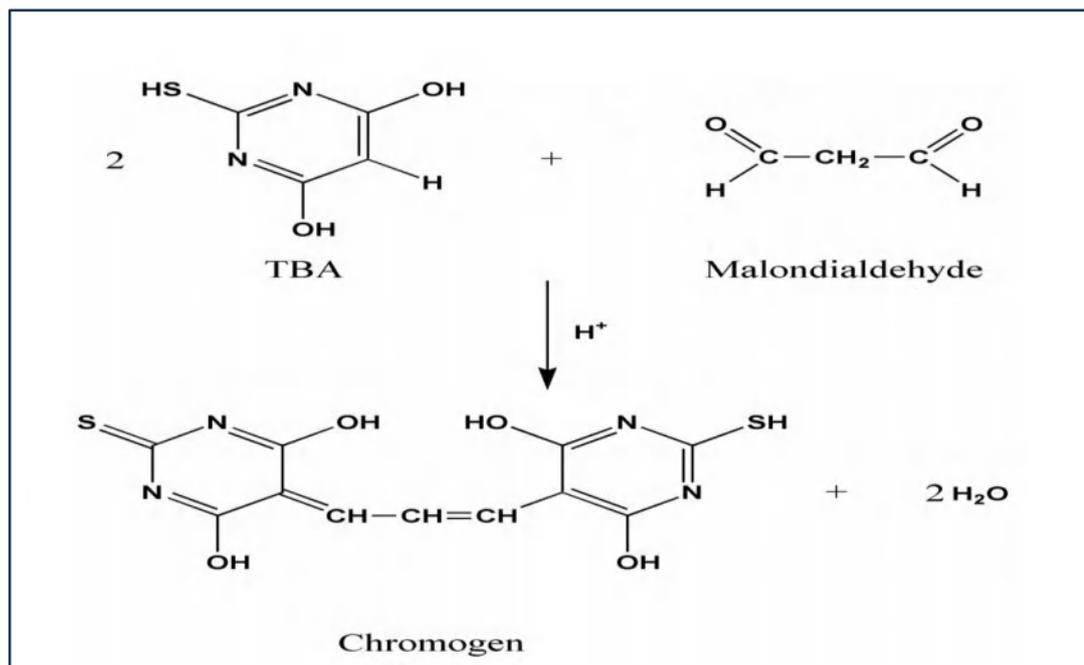


Figure 35 : Réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique (Antolovich *et al.*, 2002)

### II.5.2.2. Dosage du glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion (GSH) au niveau du foie et des testicules a été réalisé selon la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Le principe de cette méthode est basé sur le fractionnement de la molécule d'acide 5,5'- dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) par le groupement sulfhydryle (-SH) du glutathion, ce qui entraîne la libération d'un composé de couleur jaune, l'acide thionitrobenzoïque (TNB). Ce dernier à pH alcalin (8-9) présente une absorbance à 412 nm (figure 36). Brièvement, 0,5 ml de solution TCA (10%) est ajouté à 0,5 ml de l'homogénat des organes. Après agitation légère de 10 à 15 minutes, le mélange est centrifugé à 2000 tours/min pendant 5 minutes. Dans un autre tube à essai, 200  $\mu\text{L}$  de surnageant obtenu sont mélangés avec 1,8 ml de solution tampon phosphate (0,1 M, pH = 8) et 100  $\mu\text{L}$  de solution DTNB. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en nmol/g de tissu.

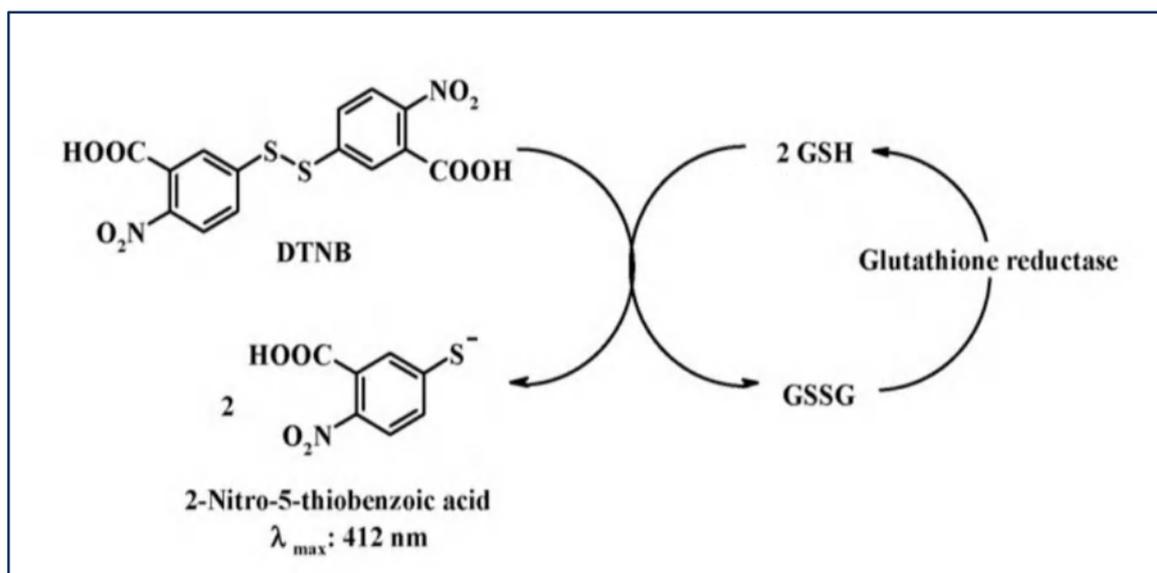
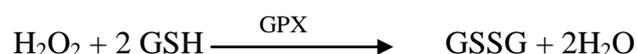


Figure 36 : Principe de dosage du glutathion (Araujo *et al.*, 2007)

### II.5.2.3. Evaluation de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GP<sub>x</sub>)

L'activité du glutathion peroxydase (GP<sub>x</sub>) est évaluée par la technique de Flock et Gunzler (1984) avec légère modification, en utilisant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat. La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB). Le groupe sulfhydryl (-SH) du glutathion réagit spontanément avec le DTNB et forme un composé de couleur jaune, l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) selon les réactions suivantes :



Pour un dosage spectrophotométrique on mélange 200 µl de l'homogénat, 200 µl tampon TBS (100Mm, PH= 7,4), 400 µl GSH (0,1 mM) et 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,3 mM). Le mélange est incubé au bain marie à 25°C pendant 5 min puis on ajoute 1 ml TCA 1 % pour arrêter la réaction. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 10 min à 3000t/min. 480 µl du surnageant obtenu est ajouté à 2.2 ml de tampon phosphate et 320 µl DTNB (1 mM). Après 5 min, l'absorbance est mesurée à 412 nm. L'activité de l'enzyme GP<sub>x</sub> a été exprimée en µmol GSH/ mg de protéine. Le dosage des protéines totales est déterminé par la méthode de Lowry *et al.* (1951).

## II.6. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

### II.6.1. L'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris

Pour évaluer l'effet anti-œdémateux des extraits de deux plantes étudiées, l'œdème de l'oreille est induit par le xylène selon la méthode de Hosseinzadeh *et al.*, (2002). Les souris ont été divisées en 4 groupe de 5 chacun de la manière suivante :

**Groupe 1:** eau physiologique (NaCl 0,9%)

**Groupe 2:** solution d'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha* /*A. graveolens* à la dose de 50 mg/kg

**Groupe 3:** solution d'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha* /*A. graveolens* à la dose de 100 mg/kg

**Groupe 4:** solution d'acide acétylsalicylique (Aspirine) à la dose de 300 mg/kg

Trente minutes après l'administration par voie intrapéritonéale des différentes solutions, 300 µl de xylène ont été appliqués sur la surface antérieure et postérieure de l'oreille droite de chaque souris à l'aide d'une micropipette. L'oreille gauche a été considérée comme témoin. Après 15 minutes de l'application du xylène, les souris ont été sacrifiées et les deux oreilles ont été retirées puis pesées.

La différence entre les oreilles droite et gauche a été déterminée pour chaque lot. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est calculé par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ Traité}) / \Delta \text{ Témoin}] \times 100$$

Où :  $\Delta$  représente la différence du poids de l'œdème entre l'oreille droite et gauche

### II.6.2. Œdème de la patte induit par le formol chez les rats

La recherche des propriétés anti-inflammatoires a été réalisée selon le modèle d'inflammation aiguë, par l'induction de l'œdème dans les pattes des rats (150 - 200 mg/kg) en utilisant le formaldéhyde (3,5 %) comme substance inflammatoire et à raison de 0,1ml par patte. Les rats sont répartis en 4 groupes de 5 rats chacun. Les différents traitements ont été administrés par injection intrapéritonéale :

**Groupe 1 :** contrôle négatif, reçoivent l'eau physiologique (NaCl 0,9%).

**Groupe 2:** reçoivent l'aspirine à la dose de 300 mg/kg

**Groupe 3 :** reçoivent l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha /A.graveolens* à la dose 50 mg/kg

**Groupe 4 :** reçoivent l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha /A.graveolens* à la dose 100 mg/kg

Une heure plus tard, l'œdème de la patte a été induit par l'injection de 0,1 ml de formol (3,5%) au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite de chaque rat. L'évolution de l'œdème a été mesuré avant et à 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h et 5h après l'injection du formol en utilisant un pied à coulisse numérique (Arzi *et al.*, 2015). L'importance de l'œdème a été évaluée par la détermination de la moyenne du pourcentage d'augmentation du volume de la patte des rats suivant la formule:

$$\% \text{ AUG} = [(V_t - V_0) / V_0] \times 100$$

V<sub>t</sub> : Volume de la patte au temps t

V<sub>0</sub> : Volume initial de la patte

L'activité anti-inflammatoire a également été évaluée en calculant le pourcentage d'inhibition de l'œdème (% INH) selon la relation :

$$\% \text{ INH} = [(\% \text{ AUG témoin} - \% \text{ AUG traité}) / \% \text{ AUG témoin}] \times 100$$

## **II.7. Etude histopathologique**

Après le sacrifice des animaux, les organes (foie et testicules) doivent être rapidement prélevés, rincés avec l'eau physiologique (NaCl 0,9%) puis fixés dans une solution de formol à 10 %. Les échantillons ont été ensuite transportés au service de l'anatomie pathologique de l'hôpital CHU Benbadis-Constantine pour la réalisation des coupes histologique. L'étude est effectuée selon le protocole expérimental du laboratoire, la technique comporte les étapes suivantes :

### **☛ Déshydratation et inclusion**

Comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être complètement déshydratés avant l'étape de l'inclusion. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains successifs d'alcool (éthanol) à concentrations croissantes (70%, 90% et 100 %). Après la déshydratation par l'éthanol, les échantillons subissent deux bains de xylène et deux autres de paraffine fondue durant 24 h pour chacun. Le

xylène occupe la place de l'eau afin de faciliter la pénétration de la paraffine à l'intérieur des tissus.

#### ■ Coupes histologiques et étalement

Les blocs de paraffine obtenus sont coupés à l'aide d'un microtome en coupes de 4 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Ces dernières sont étalées et collées sur des lames en verre préalablement recouvertes de gélatine 2 % puis séchées à 35 - 42° C dans une étuve pendant 12 heures.

#### ■ Déparaffinage et réhydratation

Le déparaffinage est effectué en plongeant les lames des échantillons dans des bains de xylène et de toluène. Les coupes sont réhydratées ensuite par le passage dans des bains successifs d'éthanol de degrés décroissants puis dans l'eau distillée.

#### ■ Coloration et montage des coupes

Les coupes histologiques sont colorées avec la combinaison entre deux colorants hématoxyline et éosine. En résumé, les lames sont immergées successivement dans les étapes suivantes : d'abord 5 minutes dans une solution d'hématoxyline à 1%, ensuite 5 minutes dans de l'eau courante, puis 30 secondes dans un bain d'éosine, suivi d'un rinçage à l'eau distillée. Enfin, les lames colorées sont recouvertes de lamelles et sont prêtes à être observées au microscope.

### III. Analyses statistiques

Les résultats des différents tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne plus ou moins l'écart type (moyenne  $\pm$  SD). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> et A<sub>0.5</sub> sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

L'évaluation statistique des résultats est effectuée par l'analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivie du test post-hoc de Tukey ou le test *t* de Student, en utilisant le logiciel Graph Pad Prism Version 5. Les valeurs de  $p < 0.05$  sont considérées statistiquement comme significatives.

***Chapitre III :***  
***Résultats et discussion***

## Partie 1

### Résultats et discussion de l'étude expérimentale *in vitro* et *in vivo* de la plante *Crataegus oxyacantha*

#### I. Etude expérimentale *in vitro*

##### I.1. Rendements d'extraction

L'extraction des feuilles et des fruits de la plante *C. oxyacantha* montre que les extraits *n*-butanol représentent le rendement le plus élevé (6,33 et 2,02 % respectivement), suivis par les extraits d'acétate d'éthyle. Cependant, le rendement le plus faible est obtenu par les extraits chloroformiques (Tableau 7).

**Tableau 7 : Rendement de l'extraction des feuilles et des fruits la plante *C. oxyacantha***

Matériel végétal	phase	Masse (g)	Rendement (%)
Feuilles (800 g)	Chloroforme	2,13	0,27
	Acétate d'éthyle	14,01	1,75
	<i>n</i> -butanol	50,07	6,33
Fruits (460 g)	Chloroforme	1,17	0,25
	Acétate d'éthyle	2,03	0,44
	<i>n</i> -butanol	9,32	2,02

##### I.2. Analyse phytochimique

###### I.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux dans les extraits de la plante *C. oxyacantha* est estimée par la méthode de folin-ciocalteau à partir de la régression linéaire  $y=0,0034x + 0,1044$  ;  $R^2= 0,9972$  de la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique à différentes concentrations (Figure 37). La quantité des polyphénols a été exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EAG}/\text{mg Extrait}$ ).

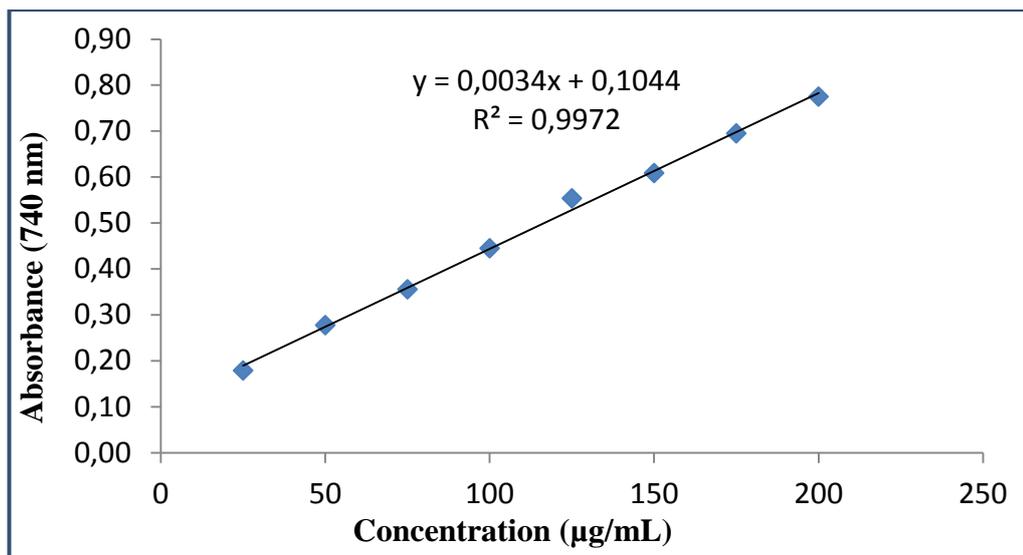


Figure 37 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols

Les teneurs en polyphénols totaux révèlent que les extraits AcOEt des feuilles et des fruits contenaient la plus grande concentration en composés phénoliques ( $869,09 \pm 12,48$  ;  $697,23 \pm 5,82$  µg EAG/mg Extrait respectivement), suivis par les extraits *n*-butanol (Tableau 8).

### I.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La détermination de la teneur en flavonoïdes dans les différents extraits de *C.oxycantha* est estimée par la méthode de nitrate d'aluminium ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ). Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe entre  $\text{Al}^{+3}$  et les flavonoïdes. Ce complexe de couleur jaune absorbe la lumière à 415 nm. Le contenu en flavonoïdes est déterminé à partir de la régression linéaire  $y=0,0048x$  ;  $R^2= 0,997$  de la courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine à différentes concentrations (Figure 38). La teneur en flavonoïdes est exprimée en µg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

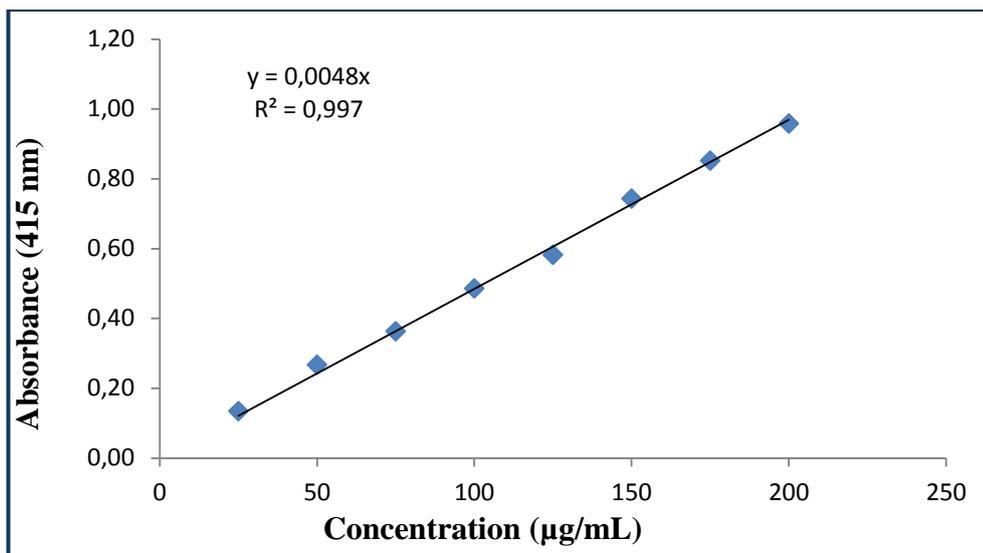


Figure 38 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes révèlent également que l'extrait acétate d'éthyle des feuilles contient la plus grande quantité en flavonoïdes avec une teneur de 165,69±6,18 µg QE/mg Extrait (Tableau 8).

### I.2.3. Dosage des flavonols totaux

Le dosage des flavonols dans les extraits de la plante *C. oxyacantha* a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>). La teneur en flavonols est exprimée en µg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait), l'équation standard de la courbe d'étalonnage  $y=0,0071x + 0,0225$ ,  $R^2= 0,9986$  (Figure 39).

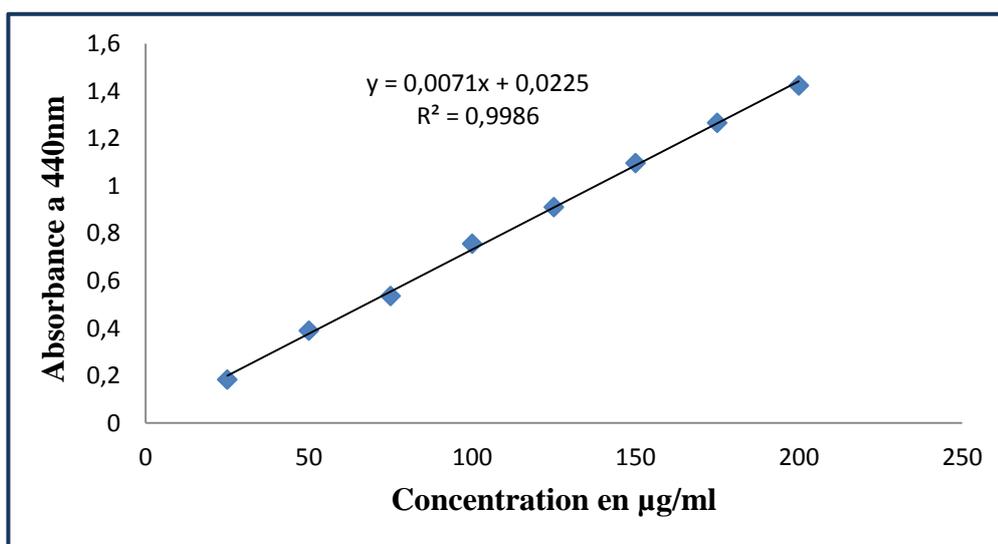


Figure 39 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonols

Pour la teneur totale en flavonols, les valeurs les plus élevées étaient toujours dans les extraits acétate d'éthyle. Les résultats sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau 8 : Teneur en polyphénols, flavonoïdes et flavonols dans les extraits de la plante *C. oxyacantha***

Extrait	Polyphénols totaux (µg EAG/mg extrait)	Flavonoïdes totaux (µg EQ/mg extrait)	Flavonols totaux (µg EQ/mg extrait)
<i>n</i> -BuOH Fruits	136,54±8,52	21,46±0,58	19,21±0,29
AcOEt Fruits	697,23±5,82	154,51±10,16	68,83±3,63
<i>n</i> -BuOH Feuilles	521,05 ± 2,70	116,176 ± 0,59	45,96 ± 1,99
AcOEt Feuilles	869,09 ± 12,48	165,69 ± 6,18	97,16 ± 4,40

D'après le Tableau 8, les résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des flavonols révèlent que tous les extraits de *C. oxyacantha* sont riche en ces composés mais le taux le plus élevé est détecté dans l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles, suivi par l'extrait AcOEt des fruits, ensuite l'extrait *n*-butanol des feuilles. Alors que la plus faible quantité a été enregistrée dans l'extrait *n*-butanol des fruits.

### I.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans cette étude, les extraits bruts (acétate d'éthyle et *n*-butanol) des feuilles et fruits de la plante *C. oxyacantha* ont été étudiés pour leurs activités antioxydantes potentielles en utilisant 7 méthodes différentes.

#### I.3.1. Activité antiradicalaire au DPPH

Le radical DPPH a été largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux. Le composé 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure/activité antioxydante des composés phénoliques (Bentabet *et al.*, 2014). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La réduction de ce radical s'accompagne par son passage de la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH à la couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 514–518 nm (Moreno *et al.*, 2020). Dans cette étude, le BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants. Le tableau 9 ci-dessous résume les résultats obtenus pour les extraits des feuilles et des fruits de la plante *C. oxyacantha*.

Tableau 9 : Activité antiradicalaire au DPPH des extraits de la plante *C. oxyacantha*

Extraits	% Inhibition du DPPH						
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	IC50 µg/mL
<i>n</i> -BuOH Fruits	9,96±1,34	14,56±0,22	21,47±1,49	31,52±2,24	53,26±2,77	78,21±1,41	46,49±2,21 <sup>e</sup>
AcOEt Fruits	22,59±1,55	37,53±0,22	59,56±3,56	84,83±0,70	86,10±0,08	86,85±0,49	9,94±0,61 <sup>b</sup>
<i>n</i> -BuOH Feuilles	8,88±1,20	19,40±1,10	34,19±2,49	63,18±2,66	83,65±0,61	85,35±0,28	19,37±0,75 <sup>c</sup>
AcOEt Feuilles	21,37±1,97	39,69±3,45	63,46±3,74	84,12±0,67	85,06±0,73	85,35±0,70	9,25±0,77 <sup>b</sup>
BHT	11,69±1,88	22,21±1,30	37,12±1,80	52,63±2,70	56,02±0,53	83,60±0,23	22,32±1,19 <sup>d</sup>
BHA	28,95±1,16	54,33±1,59	76,76±1,65	84,09±0,35	87,53±0,82	87,73±0,15	5,73±0,41 <sup>a</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

Les résultats obtenus montrent que les extraits acétate d'éthyle des feuilles et des fruits de *C. oxyacantha* présentent le pourcentage d'inhibition le plus élevé avec  $CI_{50} = 9,25 \pm 0,77$  et  $9,94 \pm 0,61$  µg/mL respectivement, suivis par l'extrait butanolique des feuilles avec une valeur de  $CI_{50} = 19,37 \pm 0,75$  µg/mL. Tandis que l'extrait *n*-butanol des fruits est le plus faible parmi tous les extraits testés ( $CI_{50} = 46,49 \pm 2,21$  µg/mL). Ces résultats ont été comparés avec les valeurs des standards BHA et BHT ( $CI_{50} = 5,73 \pm 0,41$  et  $22,32 \pm 1,19$  µg/mL respectivement). Cette excellente activité de piégeage des radicaux libres est liée à la richesse des extraits de *Crataegus oxyacantha* en composés phénoliques (Tableau 8).

D'après les résultats obtenus et en comparaison avec les antioxydants de référence, les extraits sont classés par ordre d'efficacité comme suit : BHA > AcOEt Feuilles > AcOEt Fruits > *n*-BuOH Feuilles > BHT > *n*-BuOH Fruits

### I.3.2. Test de piégeage du radical ABTS

Dans cette étude, les radicaux libre ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleue/verte ont été réduits en ABTS<sup>+</sup> incolore en présence d'un antioxydant, cette décoloration de la solution a été suivie par la mesure de l'absorbance et la détermination de la concentration inhibitrice des extraits en comparaison avec les antioxydants de référence BHA et BHT. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 10 ci-dessous :

Tableau 10 : Inhibition du cation radical ABTS<sup>•+</sup> par les extraits de *C. oxyacantha*

Extraits	% Inhibition de l'ABTS						
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
<i>n</i> -BuOH Fruits	14,82±1,09	20,09±0,53	41,74±1,37	70,12±1,66	90,51±1,57	90,71±1,36	16,89±0,38 <sup>e</sup>
AcOEt Fruits	41,89±2,14	75,54±0,97	90,96±2,72	91,61±0,31	92,11±0,35	92,06±0,98	3,89±0,13 <sup>c</sup>
<i>n</i> -BuOH Feuilles	21,80±0,80	44,95±3,64	70,82±1,03	91,21±2,05	91,46±0,61	91,81±0,68	8,11±0,25 <sup>d</sup>
AcOEt Feuilles	69,06±0,53	87,44±8,97	92,27±0,35	92,92±0,45	93,12±0,17	90,91±2,20	2,15±0,07 <sup>b</sup>
BHT	59,22±0,59	78,55±3,43	90,36±0,00	92,18±1,27	93,37±0,86	94,87±0,87	1,29±0,30 <sup>a</sup>
BHA	83,42±4,09	93,52±0,09	93,58±0,09	93,63±0,16	93,63±0,95	94,20±0,90	1,81±0,10 <sup>b</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits de l'aubépine *C. oxyacantha* présentent une capacité inhibitrice du radical ABTS<sup>•+</sup> plus élevée mais les extraits acétate d'éthyle possèdent la meilleure activité antioxydante par rapport aux autres extraits. En comparant ces résultats avec les produits de référence employés dans cette étude, il est observé que l'extrait AcOEt des feuilles avec une valeur de  $CI_{50} = 2,15 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$  démontre une activité antiradicalaire ABTS<sup>•+</sup> presque similaire à celle du BHA ( $CI_{50} = 1,81 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ ) et du BHT ( $CI_{50} = 1,29 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$ ).

Le classement des standards et les extraits selon leur puissance de réduction d'ABTS est le suivant : BHT > BHA > AcOEt Feuilles > AcOEt Fruits > *n*-BuOH Feuilles > *n*-BuOH Fruits.

### I.3.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

La réduction de cuivre CUPRAC est une méthode utilisée pour mesurer l'activité antioxydante des composés. Le principe de ce test est le suivi de la diminution de l'absorbance du complexe cuivre (II)-néocuproïne (bleu clair). En présence d'un antioxydant ce complexe est réduit en Cu (I)-néocuproïne de couleur jaune orange qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 450 nm (Özyürek *et al.*, 2011). Le dosage de cette réaction est mesuré à titre des valeurs  $A_{0,5}$  des extraits de *C. oxyacantha* et des standards BHA et BHT utilisés. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : La capacité antioxydante de réduction du cuivre de la plante *C. oxyacantha*

Extraits	Absorbance du CUPRAC						
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	A <sub>0,5</sub> µg/mL
<i>n</i> -BuOH Fruits	0,17±0,01	0,19±0,01	0,26±0,01	0,37±0,00	0,63±0,03	1,07±0,03	37,03±1,65 <sup>f</sup>
AcOEt Fruits	0,29±0,01	0,44±0,02	0,70±0,03	1,20±0,09	2,15±0,09	3,66±0,12	7,84±0,31 <sup>c</sup>
<i>n</i> -BuOH Feuilles	0,19±0,01	0,27±0,01	0,41±0,02	0,61±0,03	1,23±0,02	2,09±0,12	18,61±0,79 <sup>e</sup>
AcOEt Feuilles	0,31±0,02	0,51±0,01	0,88±0,01	1,55±0,07	2,80±0,04	3,93±0,05	6,18±0,21 <sup>b</sup>
BHT	0,19±0,01	0,33±0,04	0,66±0,07	1,03±0,07	1,48±0,09	2,04±0,14	9,62±0,87 <sup>d</sup>
BHA	0,46±0,00	0,78±0,01	1,34±0,08	2,36±0,17	3,45±0,02	3,76±0,03	3,64±0,19 <sup>a</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

Les résultats du test CUPRAC montrent que les extraits acétate d'éthyle des feuilles et des fruits sont les plus actifs ( $A_{0,5} = 6,18 \pm 0,21$  et  $7,84 \pm 0,31$  µg/mL respectivement) par rapport aux autres extraits. En comparant ces résultats avec les antioxydants de référence, on constate que ces extraits présentent une activité réductrice supérieure à celle du standard BHT.

L'extrait *n*-butanol des feuilles présente également une très bonne activité réductrice ( $A_{0,5} = 18,61 \pm 0,79$  µg/mL), mais il est moins actif par rapport aux standards BHA ( $A_{0,5} = 3,64 \pm 0,19$  µg/mL) et BHT ( $A_{0,5} = 9,62 \pm 0,87$  µg/mL). Enfin l'extrait *n*-butanol des fruits avec  $A_{0,5} = 37,03 \pm 1,65$  µg/mL a montré le pouvoir réducteur CUPRAC le plus faible par rapport aux standards (BHA et BHT) et aux autres extraits. Le classement des extraits en fonction de leur capacité à réduire le complexe cuivre-néocuproïne est le suivant : BHA > AcOEt Feuilles > AcOEt Fruits > BHT > *n*-BuOH Feuilles > *n*-BuOH Fruits.

#### I.3.4. Activité de réduction par formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phénanthroline

L'activité de phénanthroline est basée sur la réduction de l'ion Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> en présence d'un antioxydant. L'ion Fe<sup>2+</sup> ainsi formé réagit ensuite avec l'orthophénanthroline pour former un complexe de couleur rouge-orange. Cette couleur est mesurée à 510 nm (Yefrida *et al.*, 2018). Les résultats de cette activité sont représentés dans le Tableau 12.

**Tableau 12 : Réduction du fer par la méthode phénanthroline des extraits de *C. oxyacantha***

Extraits	Absorbance phénanthroline						
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A <sub>0,5</sub> µg/mL
<b><i>n</i>-BuOH Fruits</b>	0,34±0,00	0,41±0,00	0,49±0,01	0,62±0,04	0,86±0,12	1,50±0,04	<b>28,34± 2,82<sup>f</sup></b>
<b>AcOEt Fruits</b>	0,51±0,03	0,72±0,02	1,11±0,01	1,63±0,28	1,79±0,65	3,77±0,28	<b>5,94± 0,34<sup>c</sup></b>
<b><i>n</i>-BuOH Feuilles</b>	0,38±0,00	0,48±0,03	0,64±0,01	0,95±0,04	1,53±0,11	2,60±0,15	<b>14,38± 0,51<sup>e</sup></b>
<b>AcOEt Feuilles</b>	0,46±0,01	0,67±0,04	1,11±0,04	1,87±0,11	3,20±0,16	4,24±0,08	<b>7,09± 0,76<sup>d</sup></b>
<b>BHT</b>	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	nt	nt	<b>2,24±0,17<sup>b</sup></b>
<b>BHA</b>	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	nt	nt	<b>0,93±0,07<sup>a</sup></b>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes. nt : non testé.

Selon les résultats obtenus dans ce test (Tableau 12), les extraits de l'aubépine *C. oxyacantha* se sont révélés capables de réduire le fer et de former un complexe Fe<sup>2+</sup>-phénanthroline. On peut déduire que les deux extraits AcOEt des feuilles et des fruits montrent le pouvoir réducteur le plus élevé par rapport aux autres extraits, avec des absorbances égales à 7,09± 0,76 et 5,94± 0,34 µg/mL respectivement. Cette activité est deux fois supérieure à l'extrait *n*-butanol des feuilles, et trois fois plus que l'extrait *n*-butanol des baies. Cependant aucun des extraits n'a présenté une activité supérieure à celle des antioxydants de référence (BHA et BHT) qui présentent la plus forte activité réductrice. Le classement des standards et les extraits en fonction de leur efficacité à réduire le fer est le suivant : BHA > BHT > AcOEt Fruits > AcOEt Feuilles > *n*-BuOH Feuilles > *n*-BuOH Fruits.

### I.3.5. Test d'activité antiradicalaire galvinoxyl (GOR)

Le test galvinoxyl est couramment utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon. Il est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire ou à neutraliser le radical galvinoxyl. Cette réduction est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 428 nm (Imai *et al.*, 2019). Les résultats sont mentionnés dans le Tableau 13.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical galvinoxyl montre que l'extrait acétate d'éthyle des feuilles est le plus actif avec une valeur de CI<sub>50</sub>=9,80±0,40 µg/mL par rapport aux autres extraits. En résumé, les résultats du test galvinoxyl

indiquent que les standards BHA et BHT ( $CI_{50}=4,35\pm 0,13$  ;  $4,99\pm 0,06$   $\mu\text{g/mL}$  respectivement) présentent la plus grande capacité antioxydante, suivis par les extraits AcOEt des feuilles, AcOEt des fruits et *n*-BuOH des feuilles, tandis que l'extrait *n*-butanol des fruits représente la capacité la moins puissante parmi les échantillons testés.

**Tableau 13 : Activité antiradicalaire (Galvinoxyl) des extraits de *C. oxyacantha***

Extraits	(%) Inhibition du radical Galvinoxyl						
	6.25 $\mu\text{g}$	12.5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	200 $\mu\text{g}$	IC <sub>50</sub> $\mu\text{g/mL}$
<i>n</i> -BuOH Fruits	2,85 $\pm$ 1,16	5,19 $\pm$ 1,23	13,36 $\pm$ 0,87	42,96 $\pm$ 1,42	75,71 $\pm$ 0,21	82,84 $\pm$ 0,44	58,32 $\pm$ 2,85 <sup>e</sup>
AcOEt Fruits	12,81 $\pm$ 0,33	37,28 $\pm$ 1,54	64,93 $\pm$ 2,35	75,35 $\pm$ 1,80	82,97 $\pm$ 0,48	89,87 $\pm$ 0,99	18,18 $\pm$ 0,88 <sup>c</sup>
<i>n</i> -BuOH Feuilles	4,26 $\pm$ 0,43	13,80 $\pm$ 1,92	44,80 $\pm$ 3,08	63,11 $\pm$ 1,18	64,74 $\pm$ 0,83	64,93 $\pm$ 0,26	36,80 $\pm$ 0,69 <sup>d</sup>
AcOEt Feuilles	34,52 $\pm$ 2,13	61,76 $\pm$ 1,50	65,53 $\pm$ 0,37	66,44 $\pm$ 1,02	66,56 $\pm$ 1,31	70,40 $\pm$ 0,26	9,80 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>
BHT	58,67 $\pm$ 0,94	69,65 $\pm$ 0,04	72,44 $\pm$ 0,23	73,61 $\pm$ 0,10	nt	nt	4,99 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
BHA	62,27 $\pm$ 1,40	71,46 $\pm$ 0,29	73,25 $\pm$ 0,41	73,78 $\pm$ 0,17	nt	nt	4,35 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes. nt : non testé.

### I.3.6. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Dans cette étude, le pouvoir réducteur des extraits est mesuré par la réduction directe de  $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$  en forme ferreuse  $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$ , cette réduction entraîne un changement de la couleur du milieu réactionnel qui peut être quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm. Les résultats de la capacité réductrice sont exprimés en  $A_{0.5}$  qui signifie la concentration correspond à une absorbance égale à 0.5 (Tableau 14).

Tableau 14 : Absorbance du pouvoir réducteur des extraits de *C. oxyacantha*

Extraits	Absorbance pouvoir réducteur						
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A <sub>0.5</sub> µg/mL
<i>n</i> -BuOH Fruits	0,17±0,02	0,23±0,01	0,35±0,06	0,49±0,04	0,61±0,05	0,93±0,11	62,13±2,99 <sup>g</sup>
AcOEt Fruits	0,38±0,04	0,52±0,03	0,69±0,06	0,84±0,02	1,06±0,04	1,21±0,12	12,59±1,57 <sup>d</sup>
<i>n</i> -BuOH Feuilles	0,26±0,05	0,35±0,03	0,48±0,02	0,74±0,10	0,79±0,15	0,96±0,08	27,39±2,54 <sup>e</sup>
AcOEt Feuilles	0,41±0,07	0,54±0,02	0,81±0,09	0,83±0,08	0,89±0,07	1,39±0,30	10,66±0,11 <sup>c</sup>
Acide ascorbique	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,37±0,20	1,44±0,21	6,77±1,15 <sup>b</sup>
Acide tannique	0,78±0,06	1,02±0,07	1,24±0,18	0,86±0,6	1,01±0,21	1,02±0,13	5,39±0,91 <sup>a</sup>
α-Tocopherol	0,16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	1,81±0,09	34,93±2,38 <sup>f</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

Les résultats obtenus montrent que le taux d'absorbance augmente en fonction de l'augmentation de la concentration utilisée. L'extrait acétate d'éthyle des feuilles présente une capacité réductrice importante avec une valeur d'A<sub>0.5</sub>= 10,66±0,11 µg/mL, suivi directement par l'extrait AcOEt des fruits avec A<sub>0.5</sub>= 12,59±1,57 µg/mL, et ensuite l'extrait *n*-BuOH des feuilles (A<sub>0.5</sub>= 27,39±2,54 µg/mL). Ces trois extraits de la plante *C. oxyacantha* possèdent une forte activité réductrice par rapport à l'α-tocophérol (A<sub>0.5</sub>= 34,93±2,38 µg/mL), mais elle est inférieure par rapport à l'acide tannique (A<sub>0.5</sub>= 5,39±0,91 µg/mL) et l'acide ascorbique (A<sub>0.5</sub>= 6,77±1,15 µg/mL) qui présentent la meilleure activité réductrice. Enfin l'extrait *n*-BuOH des fruits montre une faible activité parmi tous les extraits et les standards utilisés.

Le classement des extraits selon leur activité de réduction du fer et par rapport aux molécules de référence est : Acide tannique > Acide ascorbique > AcOEt Feuilles > AcOEt Fruits > *n*-BuOH Feuilles > α-Tocopherol > *n*-BuOH Fruits.

### I.3.7. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO)

La lecture de la Figure 40, montre que l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique des extraits de *C. oxyacantha* et de la vitamine C est dose dépendante. En comparant les IC<sub>50</sub> des extraits testé par rapport à celle de la vitamine C, nous remarquons que l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique de l'extrait acétate d'éthyle (230,28±7,38 µg/mL) et *n*-butanol (254,07±6,07 µg/mL) est inférieure à l'activité de la vitamine C (20±1,40µg/mL).

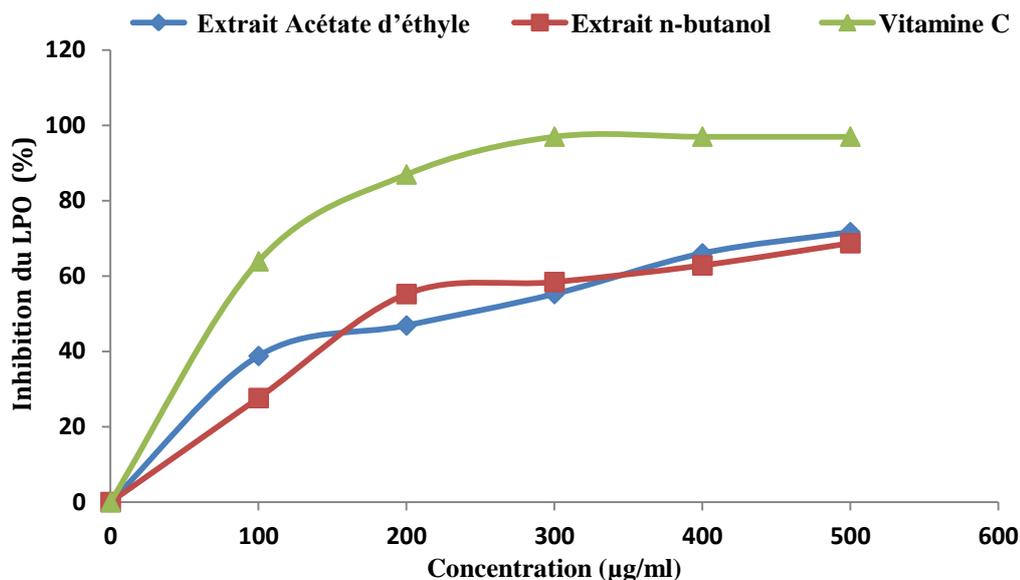


Figure 40 : Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle des feuilles de *C. oxyacantha* et la vitamine C

#### I.4. Evaluation de l'activité photoprotectrice SPF

L'activité photoprotectrice des différents extraits de la plante *C. oxyacantha* a été mesurée en déterminant le facteur de protection solaire *in vitro*. Le test SPF est largement utilisé comme indicateur majeur pour classer le niveau de protection solaire des produits, principalement contre les coups de soleil causés par les rayons UV-B nocifs (Mansour *et al.*, 2020). Il a été rapporté que dans les indices SPF, les valeurs 2-12, 12-30, 30-50, > 50 sont considérées comme ayant une activité de protection solaire minimale, modérée, élevée et maximale respectivement (Schalka *et* Reis, 2011; Amrani *et al.*, 2019).

Dans cette étude, les valeurs SPF des extraits testés sont présentées dans l'intervalle de  $17,19 \pm 0,10$  à  $48,66 \pm 0,00$  (Tableau 15), les deux extraits AcOEt des feuilles et des fruits, ainsi que l'extrait *n*-butanol des feuilles ont montré une activité photoprotectrice élevée, alors que l'extrait *n*-butanol des fruits a présenté une activité SPF moyenne avec une valeur de  $17,19 \pm 0,10$ . Ces résultats indiquent que tous les extraits de l'aubépine *C. oxyacantha* peuvent être utilisés dans des formulations d'écrans solaires pour protéger la peau contre les coups de soleil.

Tableau 15 : Activité photoprotectrice SPF des extraits de la plante *C. oxyacantha*

	<i>n</i> -BuOH Fruits	AcOEt Fruits	<i>n</i> -BuOH Feuilles	AcOEt Feuilles
<b>SPF</b>	17,19 ± 0,10	48,18 ± 0,83	48,66 ± 0,00	48,20 ± 0,79
<b>Protection</b>	Protection moyenne	Haute protection	Haute protection	Haute protection

### I.5. Evaluation de l'activité enzymatique

#### I.5.1. Evaluation de l'activité inhibitrice de l'α-glucosidase

L'effet inhibiteur de l'α-glucosidase d'une substance ou d'un extrait est généralement évalué *in vitro*, en utilisant le p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (pNPG) comme substrat artificiel de la réaction (Assefa *et al.*, 2019). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'α-glucosidase par différentes concentrations des extraits et sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 16 : Activité inhibitrice de l'α-glucosidase des différents extraits de *C. oxyacantha*

Extraits	(% Inhibition de l'α-glucosidase)						
	3,906 µg	7,812 µg	15,62 µg	31,25 µg	62,5 µg	125 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
<i>n</i> -BuOH Fruits	nt	nt	30,78±7,51	92,04±2,34	98,93±0,40	99,43± 0,14	16,12±9,09 <sup>b</sup>
AcOEt Fruits	nt	nt	20,41±0,27	63,86±5,48	86,88±2,46	96,95±0,26	30,80±3,63 <sup>d</sup>
<i>n</i> -BuOH Feuilles	4,29±3,84	62,30±2,68	96,94±1,71	99,40±0,13	99,33±0,13	99,05±0,11	4,99±0,82 <sup>a</sup>
AcOEt Feuilles	-25,83±5,4	-23,07±6,3	2,70±0,83	25,25±1,84	66,51±5,43	94,02±0,94	24,08±5,98 <sup>c</sup>
Acarbose	<b>156,25 µg</b>	<b>312,5 µg</b>	<b>625 µg</b>	<b>1250 µg</b>	<b>2500 µg</b>	<b>5000 µg</b>	<b>IC<sub>50</sub> µg/mL</b>
	38,91±3,20	54,86±1,79	67,29±2,63	80,19±1,66	85,54±0,45	91,05±0,72	275,43±1,59 <sup>e</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes. nt : non testé.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, on constate que tous les extraits de *C. oxyacantha* ont montré une forte activité inhibitrice de l'enzyme α-glucosidase comparé à celle du témoin positif (l'acarbose) qui présente une valeur de  $CI_{50} = 275,43 \pm 1,59 \mu\text{g/mL}$ . La meilleure activité a été enregistrée par l'extrait *n*-BuOH des feuilles ( $CI_{50} = 4,99 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ ).

Le classement de nos extraits selon leurs capacités d'inhiber l' $\alpha$ -glucosidase et par rapport au standard utilisé est : *n*-BuOH Feuilles > *n*-BuOH Fruits > AcOEt Feuilles > AcOEt Fruits > Acarbose

### I.5.2. Evaluation de l'activité anti-cholinestérase (Anti-Alzheimer)

L'activité anticholinestérase des différents extraits de la plante *C. oxyacantha* est évaluée par la méthode d'inhibition de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961).

#### I.5.2.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase

Les résultats de l'activité acétylcholinestérase sont présentés dans le tableau 17. L'activité maximale a été enregistrée dans l'extrait *n*-butanol des feuilles ( $58,54 \pm 2,47\%$  à  $200 \mu\text{g/mL}$ ). Cette activité est faible par rapport à celle du standard galantamine ( $94,77 \pm 0,34\%$  à  $200 \mu\text{g/mL}$ ). Cependant, l'extrait acétate d'éthyle des fruits et les deux extraits *n*-butanol des feuilles et des fruits étaient inactifs pour les différentes concentrations.

**Tableau 17 : Inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de *C. oxyacantha***

Extraits	(%) Inhibition d'AChE						
	6.25 $\mu\text{g}$	12.5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	200 $\mu\text{g}$	IC <sub>50</sub> $\mu\text{g/mL}$
<i>n</i> -BuOH Fruits	-18,52±6,7	-28,70±1,6	-34,34±7,0	-25,95±1,6	-14,62±3,1	7,03±8,24	< 200
AcOEt Fruits	-24,07±2,9	-22,51±4,4	-25,17±0,6	-6,55±7,1	-0,03±9,6	0,97±9,03	< 200
<i>n</i> -BuOH Feuilles	-37,74±1,8	-3,43±6,39	5,47±7,65	18,08±0,83	41,02±3,03	58,54±2,47	159,09± 7,68 <sup>b</sup>
AcOEt Feuilles	-25,03±7,1	-40,26±3,6	-26,45±8,1	-11,41±1,6	8,96±12,79	29,23±4,47	< 200
Galantamine	43,77 ± 0.0	68,50 ± 0,3	80,69 ± 0,4	85,78 ± 1,6	91,80 ± 0,2	94,77 ± 0,34	6,27±1,15 <sup>a</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

#### I.5.2.2. Inhibition de la butyrylcholinestérase

Les résultats de l'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase des extraits de la plante *C. oxyacantha* sont illustrés dans le tableau 18 ci-dessous :

Tableau 18 : Inhibition de la butyrylcholinestérase par les extraits de *C. oxyacantha*

Extraits	(%) Inhibition de BChE						
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
<i>n</i> -BuOH Fruits	8,20±3,99	15,44±4,50	20,89±2,30	15,31±4,31	23,95±5,76	40,68±4,01	< 200
AcOEt Fruits	21,75±3,09	17,10±0,53	24,01±3,81	20,29±3,35	27,13±3,17	28,06±3,97	< 200
<i>n</i> -BuOH Feuilles	12,39±5,95	21,16±3,76	21,22±3,18	34,04±8,04	44,27±4,55	52,57±2,35	175,35± 16,25 <sup>c</sup>
AcOEt Feuilles	23,28±1,90	12,12±8,16	21,29±5,77	31,65±5,70	45,07±2,00	58,29±4,26	148,23± 13,41 <sup>b</sup>
Galantamine	6,93± 0,62	24,03± 2,9	45,13± 2,6	63,87± 2,8	73,57± 0,7	78,95± 0,58	34,75±1,99 <sup>a</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

Les deux extraits (*n*-BuOH et AcOEt) des feuilles ont montré une activité inhibitrice faible sur la BChE. L'activité maximale a été remarquée par l'extrait AcOEt des feuilles (58,29 ± 4,26% à 200 µg/mL) mais elle est plus faible par rapport à la molécule de référence (galantamine), qui présente la plus forte activité contre la BChE. Tandis que les autres extraits (*n*-BuOH et AcOEt) des fruits étaient inactifs pour les différentes concentrations.

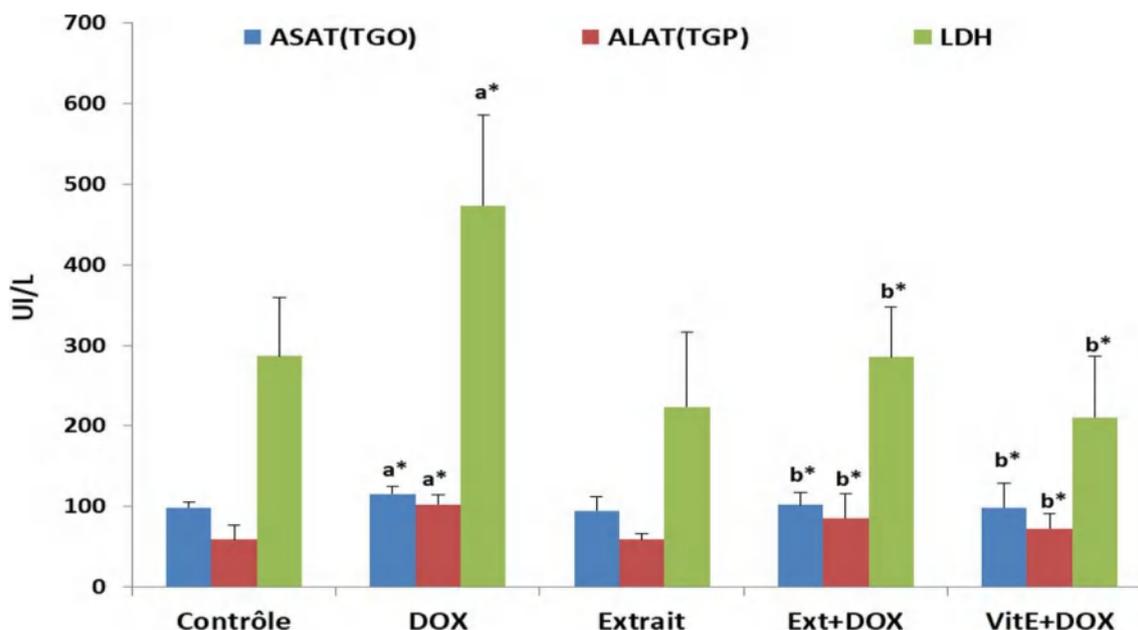
## II. Etude expérimentale *in vivo*

### II.1. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha* contre la toxicité de la doxorubicine (DOX)

#### II.1.1. L'effet du traitement sur les marqueurs biochimiques

##### II.1.1.1. Effet sur les taux sériques des enzymes ASAT, ALAT et LDH

Nos résultats ont révélé une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité enzymatique de l'ALAT, l'ASAT et la LDH chez les rats traités par la DOX (15 mg/kg) en comparaison avec les rats témoins. L'administration de l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha* temporelise l'effet de la DOX et normalise la valeur de ces enzymes contre le groupe traité par la DOX seulement. Chez le groupe traité par l'extrait et la DOX, nous avons constaté une diminution significative du taux sérique d'ASAT, d'ALAT et de LDH. Les mêmes remarques sont notées pour le groupe traité par la vitamine E et la DOX (Figure 41). En conséquence, nos études biochimiques ont prouvé que la DOX a causé une hépatotoxicité qui a été empêchée par l'extrait *n*-BuOH et par la vitamine E.

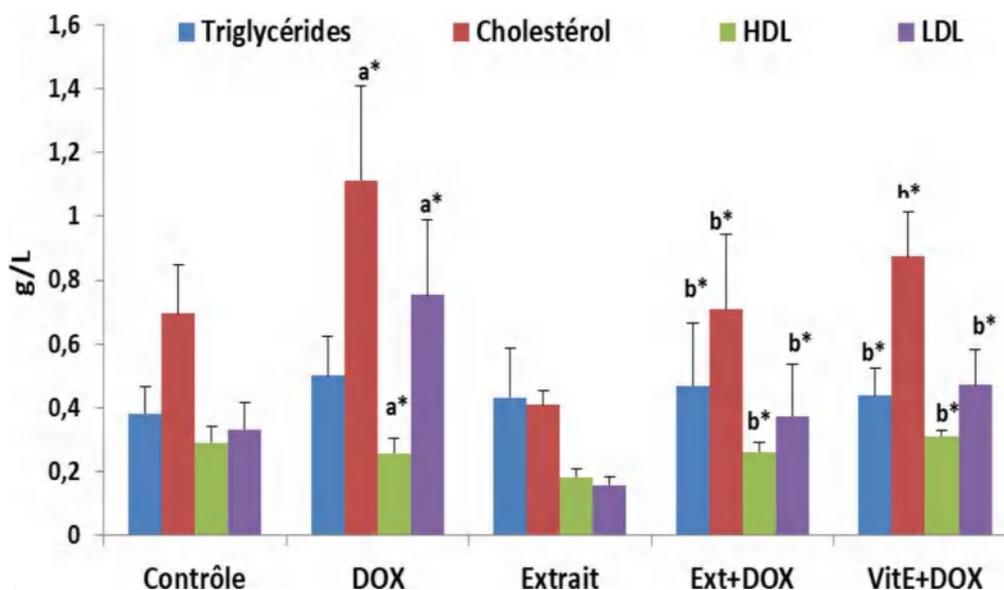


**Figure 41 : Effets de la DOX, de la vitamine E et de l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha* sur les taux sériques des enzymes ASAT, ALAT et LDH**

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart-type. a : comparativement au groupe témoin ; b : comparativement au groupe traité par la DOX. Test t de Student : \* $p < 0,05$

### II.1.1.2. Effet du traitement sur le profil lipidique

L'exposition des rats au DOX à la dose 15 mg/kg du poids corporel provoque une augmentation significative du taux des triglycérides, du cholestérol et des LDL ( $p < 0,05$ ) et une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du HDL en comparaison avec les rats du groupe témoins. Par ailleurs, le prétraitement des rats par l'extrait *n*-butanol (100 mg/kg) de la plante *C. oxyacantha* ou la vitamine E, associés avec la DOX provoque une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du taux du cholestérol, des triglycérides et des LDL (figure 42).



**Figure 42 : Effets de la DOX, de la vitamine E et de l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha* sur les taux sériques de cholestérol, de LDL, d'HDL et des triglycérides**

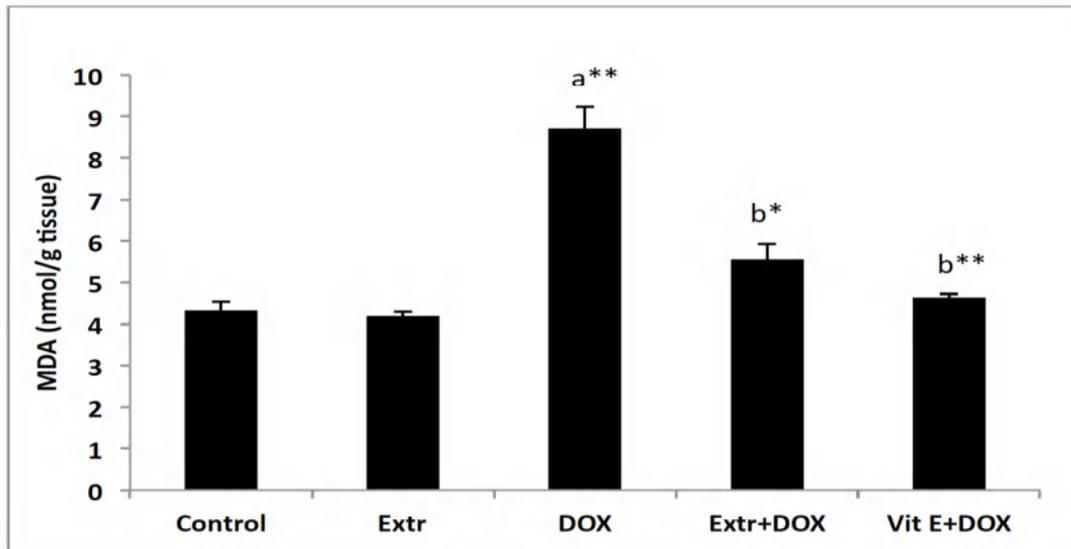
Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart-type. a : comparativement au groupe témoin ; b : comparative- ment au groupe traité par la DOX. Test t de Student : \* $p < 0,05$

## II.1.2. L'effet du traitement sur le taux des biomarqueurs du stress oxydant dans le foie

### II.1.2.1. Effet sur la concentration du malondialdéhyde (MDA)

Le dosage de l'MDA permet de mesurer la peroxydation lipidique, qui est le principal indicateur utilisé pour évaluer le stress oxydatif. La figure 43 montre les changements du niveau de production du malondialdéhyde dans les cellules hépatiques des rats traités par l'extrait *n*-butanol, la vitamine E et la DOX.

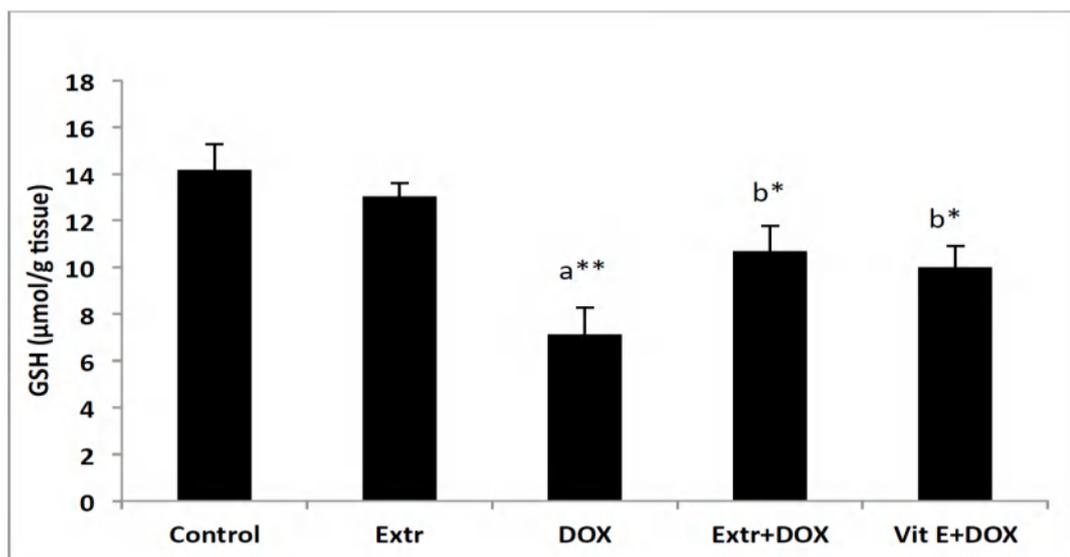
Les résultats ont montré que le traitement des rats par la DOX a provoqué une augmentation significative ( $p < 0.01$ ) du niveau de la peroxydation des lipides hépatiques ( $8,72 \pm 0,52$  nmol MDA/g tissu) par rapport aux rats du lot témoin ( $4,33 \pm 0,20$  nmol MDA/g tissu). Cependant, chez les rats du lot prétraité par l'extrait *n*-butanol de feuilles de *C. oxyacantha*, le niveau de peroxydation lipidique a été réduit à  $5,56 \pm 0,36$  nmol MDA/g tissu en comparaison avec les rats du lot traité par la DOX.



**Figure 43 : Effet de l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha*, la vitamine E et la DOX sur la production du MDA dans Les cellules hépatiques**  
 Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student : (\* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$ ). *a* : comparativement au groupe témoin. *b* : comparativement au groupe traité par la DOX.

### II.1.2.2. Effet sur la concentration du glutathion réduit GSH

Les résultats du dosage de glutathion (GSH) sont représentés dans la Figure 44 :



**Figure 44 : Effet de l'extrait *n*-butanol de *Crataegus oxyacantha*, la vitamine E et la DOX sur la variation de glutathion (GSH) dans Les cellules hépatiques**  
 Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student : (\* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$ ). *a* : comparativement au groupe témoin. *b* : comparativement au groupe traité par la DOX.

Les résultats illustrés dans la Figure 44 montrent que le taux du glutathion réduit (GSH) est diminué de manière significative ( $p < 0.01$ ) au niveau du foie chez les rats traités par la DOX à la dose 15 mg/kg ( $7.14 \pm 1.12 \mu\text{mol/g}$  tissu) par rapport aux rats du groupe témoin ( $14.17 \pm 1.12 \mu\text{mol/g}$  tissu). Par ailleurs, les rats du lot prétraité par l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* présentent une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de la concentration du GSH ( $10.68 \pm 1.10 \mu\text{mol/g}$  tissu) comparés aux rats traités par la DOX.

### II.1.2.3. Effet sur la l'activité enzymatique de la GPx

D'après les résultats obtenus (Figure 45), on constate que le traitement des rats par la doxorubicine à raison de 15 mg/kg de poids corporel a provoqué une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) hépatique ( $19,54 \pm 0,3 \mu\text{mol de GSH/mg de protéine}$ ), comparativement aux rats du lot témoin ( $25,3 \pm 0,7 \mu\text{mol de GSH/mg de protéine}$ ). En revanche, le prétraitement des rats avec l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* ou la vitamine E a augmenté significativement l'activité enzymatique de la GPx hépatique, en comparant avec les rats du lot traité par la DOX.

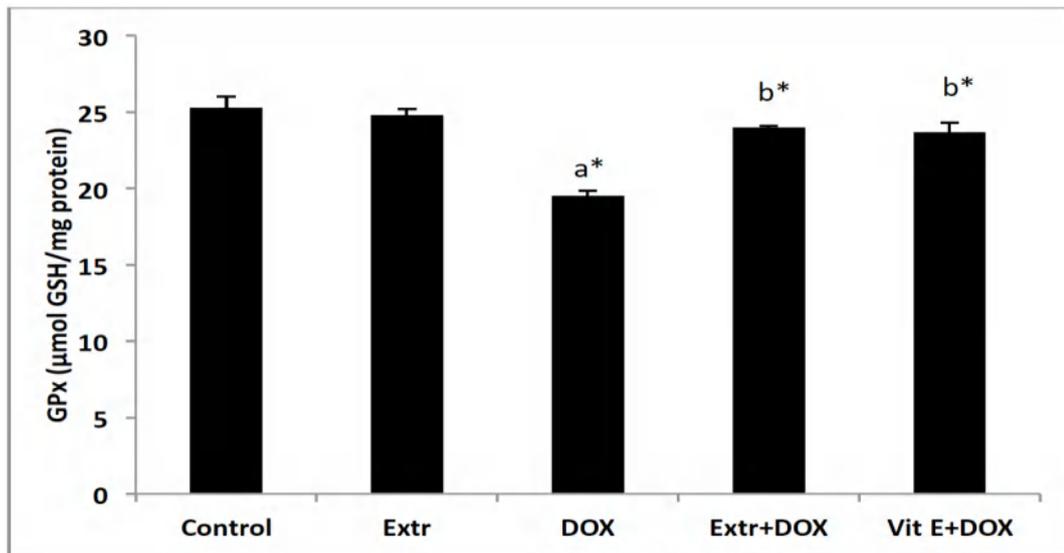


Figure 45 : Effet de l'extrait *n*-butanol, la vitamine E et la DOX sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) dans Les cellules hépatiques

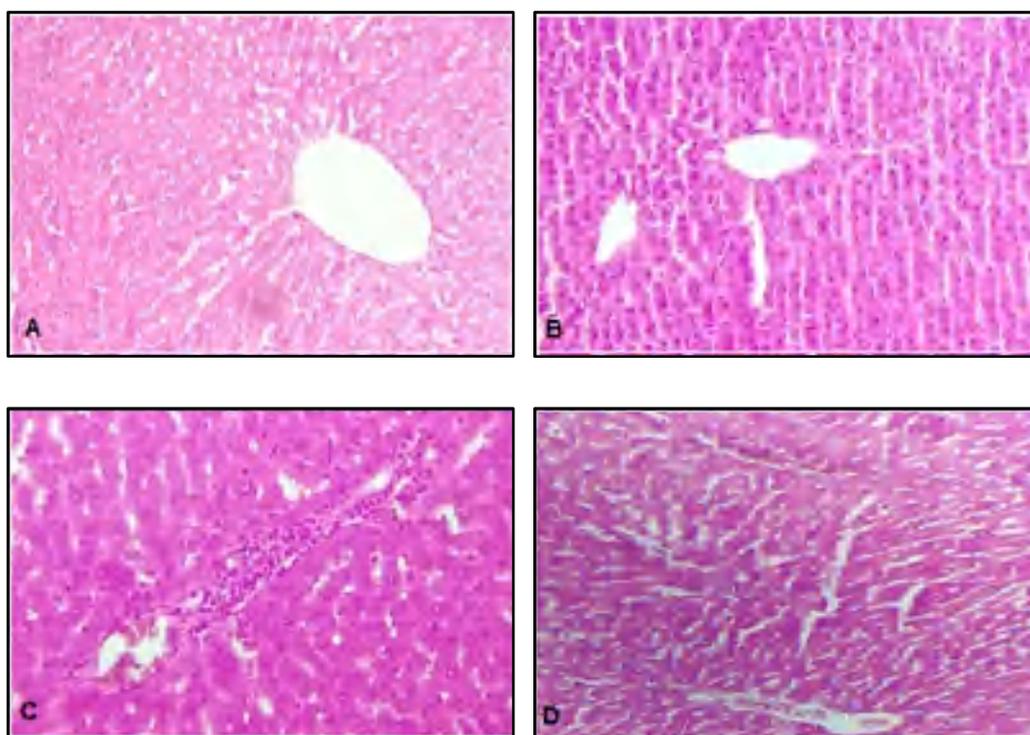
Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type. Test de student : \* $p < 0.05$ . a : comparativement au groupe témoin. b : comparativement au groupe traité par la DOX.

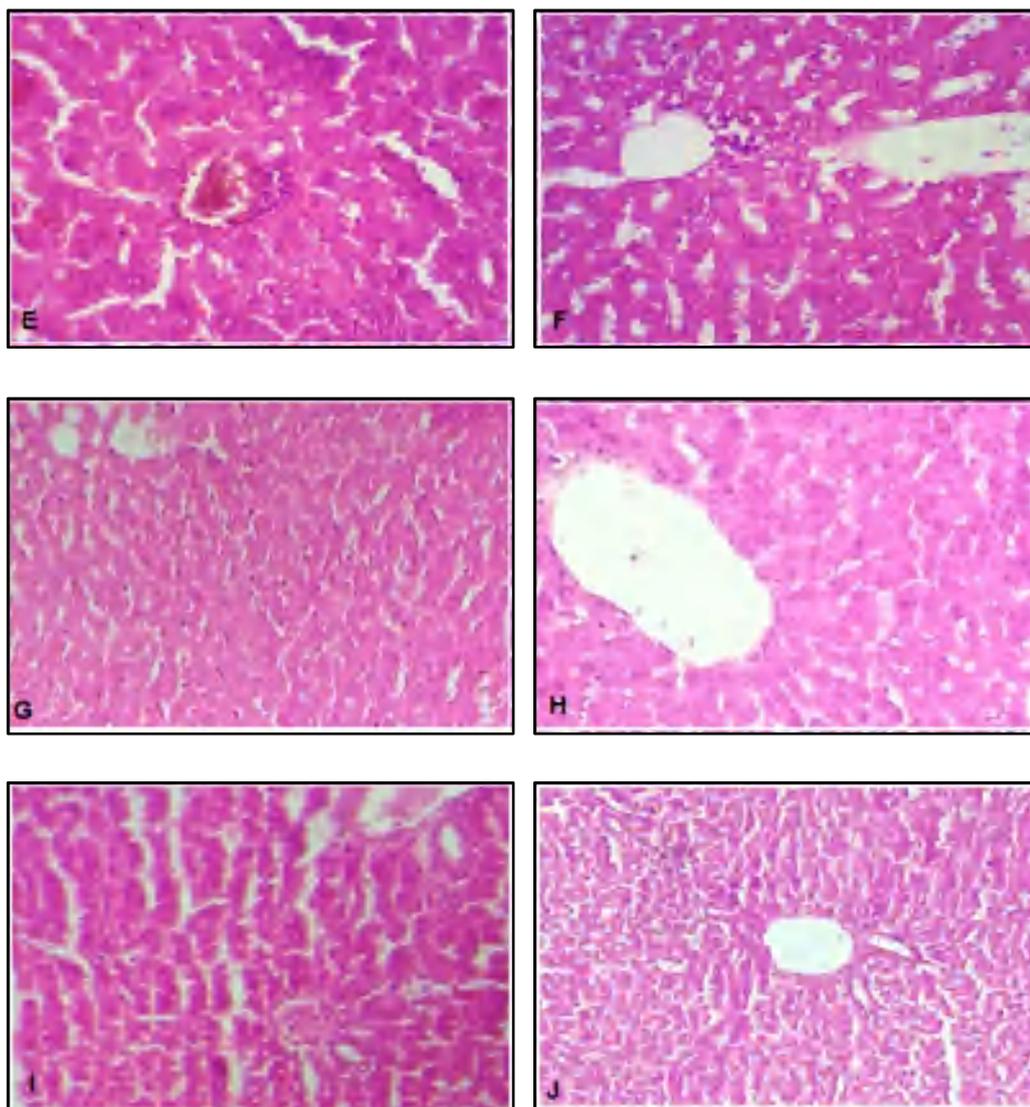
### II.1.3. Effet du traitement sur les changements histologiques du foie

L'observation microscopique du foie des rats du groupe témoin (Figure 46 A) a montré une architecture normale avec un parenchyme hépatiques sain et une architecture lobulaire de base bien conservée dont les cellules hépatiques sont disposées en travées radiales autour de la veine centrolobulaire, créant une structure organisée et fonctionnelle. Aussi bien, Les coupes histologiques des rats du groupe traité par l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* (100 mg/kg) démontrent une structure tissulaire normale apparentée à celle du lot témoin (Figure 46 B).

L'histologie du foie des rats traité par une seule dose de DOX (15 mg/kg) le 8<sup>ème</sup> jour du traitement, révèle des changements histologiques caractérisés par des lésions hépatiques sévères, notamment ; une nécrose étendue, une congestion marquée de la veine centrolobulaire, une inflammation et une congestion interhépatocytaire (Figure 46 C, D, E, F). Ces observations confirment l'effet hépatotoxique bien connu de la DOX, qui peut altérer la structure et le fonctionnement hépatique.

En revanche, les rats prétraités avec l'extrait *n*-butanol et la vitamine E ont montré une réduction considérable de ces lésions, se manifestant principalement par la présence de l'inflammation et une légère congestion (figure 46 G, H, J).





**Figure 46 : Effets de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus oxyacantha* et la vitamine E sur les changements histologiques du foie suite à la toxicité par la DOX.**

A : Contrôle, B : Extrait *C. oxyacantha* (100 mg/kg), C-F : DOX, G-H : Extrait *C. oxyacantha* + DOX, I-J : vitamine E + DOX. Congestion (C, D, E, F). Inflammation (C, D, E, F). Nécrose (C, D, F). (G  $\times$  400)

## II.2. Évaluation de l'activité anti inflammatoire

### II.2.1. Inhibition de l'œdème de l'oreille induit par le xylène

L'effet anti-inflammatoire de l'extrait *n*-butanol des feuilles de *C. oxyacantha* est déterminé en utilisant le modèle de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. Ce modèle consiste à appliquer localement 300  $\mu$ L de xylène pur sur l'oreille droite des souris, ce qui provoque une inflammation caractérisée par le développement rapide d'un œdème au bout d'une demi-heure. Les résultats sont représentés par les Figures 47 et 48.

Chez les souris du groupe témoin qui ont reçu par voie intrapéritonéale l'eau physiologique, on constate un gonflement et une augmentation du poids de l'œdème après l'application locale du xylène ( $33,93 \pm 6,10$  mg). L'administration de 300 mg/kg d'aspirine trente minutes avant l'induction de l'œdème provoque une réduction hautement significative ( $p < 0.01$ ) du poids d'oreilles ( $12,27 \pm 5,03$  mg) par rapport à celui des souris du groupe témoin, ce qui correspond à une inhibition de l'inflammation avec un pourcentage de 64,01 % (Figure 48). Cependant, le traitement des souris par l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* aux doses 50 et 100 mg/kg par voie intrapéritonéale induit une atténuation significative ( $p < 0.05$ ) de l'inflammation avec un pourcentage d'inhibition de 42,77 et 51,92 % respectivement. L'activité anti-inflammatoire de l'extrait *n*-butanol (100 mg/kg) n'est pas significativement différente à celle du groupe traité par l'aspirine.

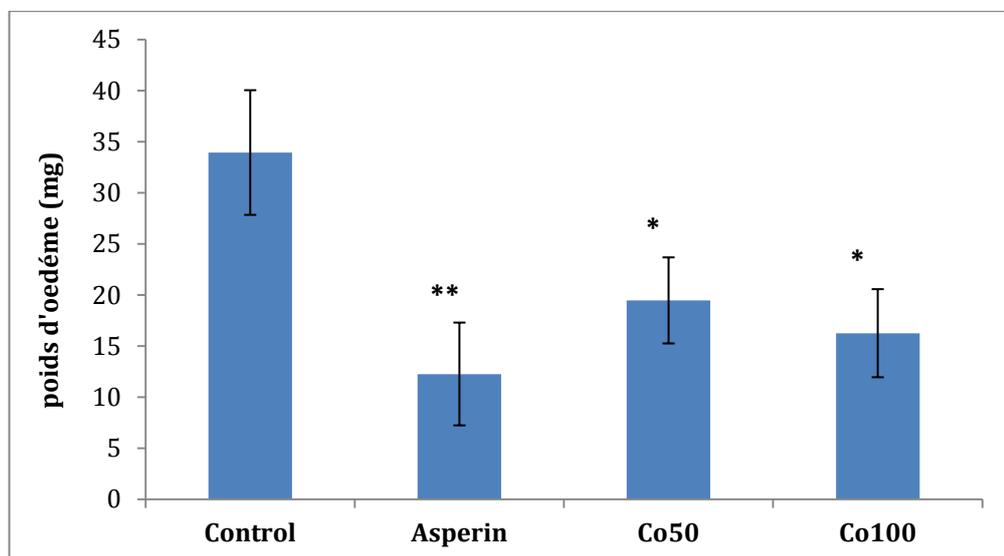
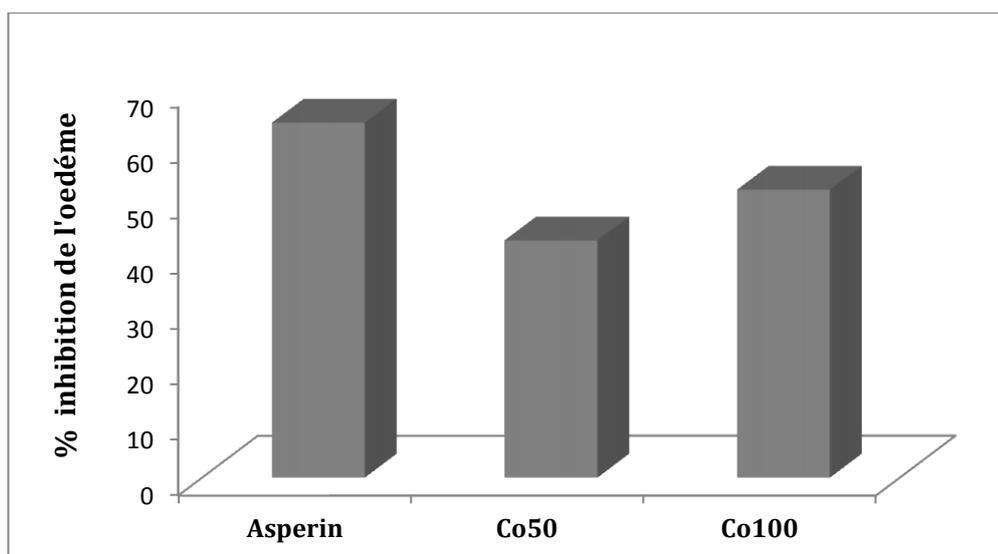


Figure 47: Effet de l'extrait *n*-butanol de la plante *Crataegus oxyacantha* (50 et 100 mg/kg) sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris



**Figure 48 : Inhibition de l'œdème chez les différents groupes de souris, en présence d'un prétraitement par l'extrait *n*-butanol de *Crataegus oxyacantha* (50 mg/kg et 100 mg/kg) et la molécule de références (aspirine 300 mg/kg)**

### II.2.2. Inhibition de l'œdème induit par le formol

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* a été évaluée par la mesure de l'œdème induit par le formol chez les rats. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (aspirine) et à ceux du groupe contrôle ayant reçu le sérum physiologique. L'évolution de l'inflammation pour les différents groupes est représentée par les Figures 49 et 50.

Nous constatons que l'injection de formol 3,5% dans la patte postérieure droite des rats témoins provoque une augmentation progressive du volume de l'œdème durant toute la période de l'expérimentation et qui atteint un maximum ( $2,58 \pm 0,12$  mm) à cinq heures (Figure 49).

L'administration de l'aspirine à la dose 300 mg/kg par voie intrapéritonéale prévient de manière significative l'augmentation du volume de la patte des rats. Le pourcentage d'inhibition est de 39,74, 47,97 et 53,62 % à 1h, 3h et 5 h respectivement, après l'injection de formol (3,5%).

Chez les rats du groupe traité par l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* aux doses 50 et 100 mg/kg, il est observé une importante diminution du volume de l'œdème dès la première heure. Les pourcentages respectifs d'inhibition aux temps 1h, 3h et 5h étant de 40,18, 43,30 et 54,26 % pour la dose de 50 mg/kg ; 39,51, 45,66 et 53,10 % pour la dose de 100 mg/kg (Figure

50). L'activité anti-inflammatoire des deux doses de l'extrait *n*-butanol est presque similaire à celle de l'aspirine.

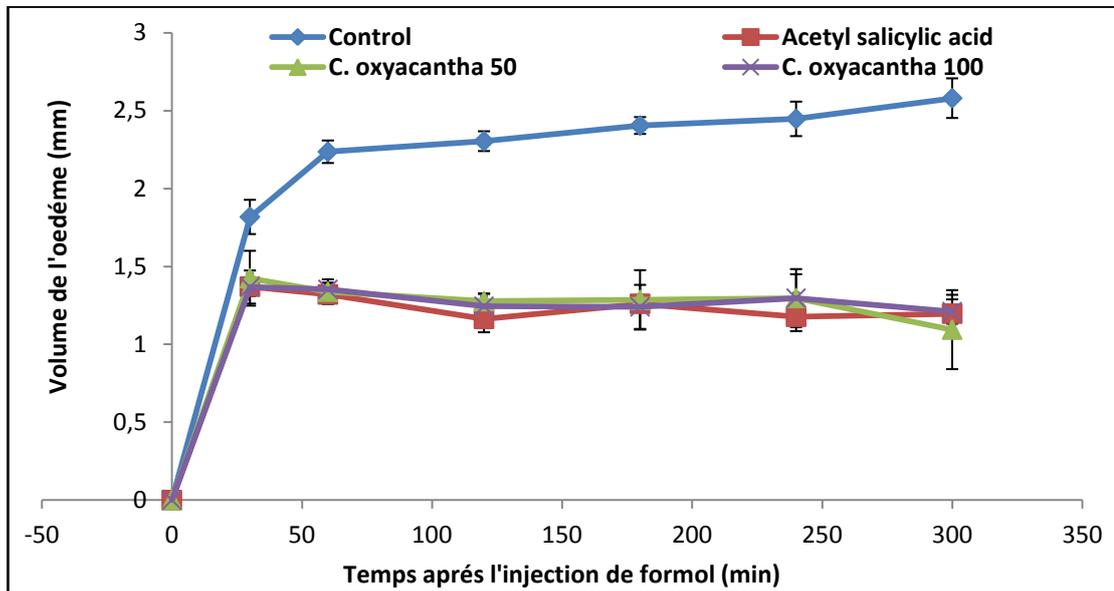


Figure 49 : Courbe de l'évolution de l'œdème en présence d'un prétraitement une demi-heure avant l'injection de formol (3,5 %), chez 4 lots de rats : Lot de référence (témoin négatif : eau physiologique), Lot témoin positif : aspirine, Lot de l'extrait *n*-butanol 50 mg/kg, et Lot de l'extrait 100 mg/kg de *C. oxyacantha*. Chaque point représente une moyenne de 5 animaux

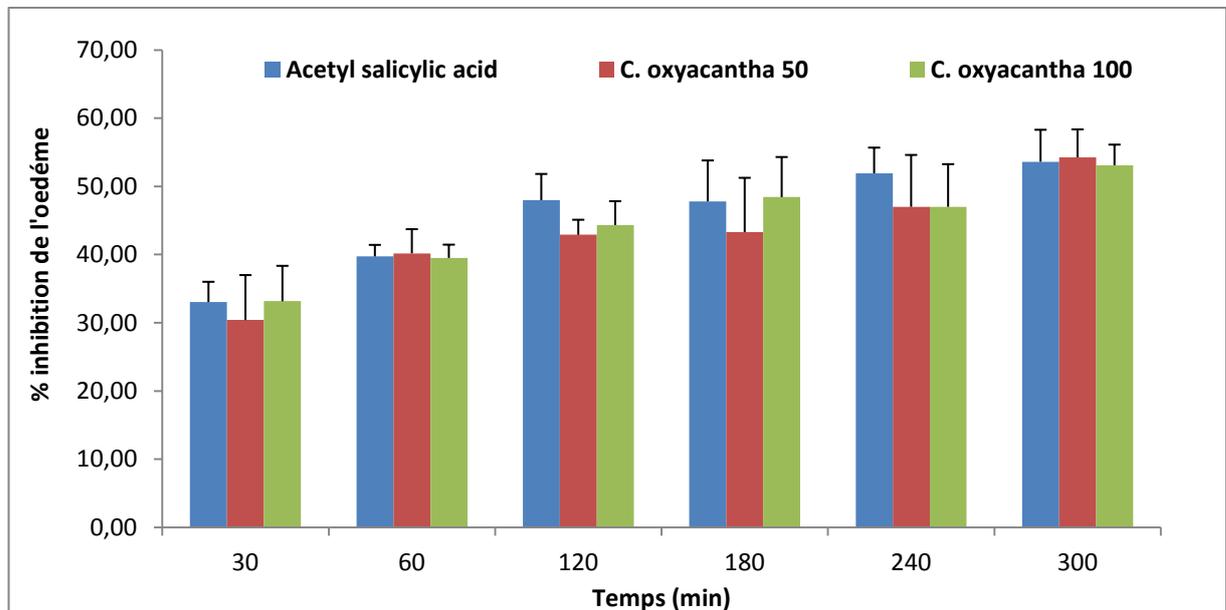


Figure 50 : Inhibition de l'œdème de la patte chez les différents lots des rats en présence d'un prétraitement par l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha* (50 mg/kg et 100 mg/kg) et la molécule de références (aspirine 300mg/kg)

## ➤ Discussion

La doxorubicine (DOX) est un médicament très efficace utilisé en chimiothérapie pour traiter de nombreuses tumeurs. Cependant, son utilisation clinique est limitée par des effets secondaires potentiellement graves sur le cœur et d'autres organes, causés majoritairement par une augmentation de production de radicaux libres et de l'apoptose.

Le stress oxydatif joue un rôle clé dans l'hépatotoxicité induite par la DOX, lorsque la DOX est métabolisée dans le foie, elle peut générer des espèces réactives de l'oxygène ce qui entraîne des lésions cellulaires caractérisée par la désintégration de la membrane, la perte des enzymes et la nécrose qui à long terme peut évoluer en cirrhose (Prasanna *et al.*, 2020).

L'activité hépatoprotectrice de la plante *Crataegus oxyacantha* pourrait être associée en grande partie aux propriétés antioxydantes. En effet, le piégeage des ERO constitue un mécanisme important de l'activité antioxydante qui peut protéger contre les dommages des tissus induit par le stress oxydant. Dans la présente étude, nous avons examiné l'activité antioxydante, antidiabétique, neuroprotecteur et anti inflammatoire des extraits des feuilles et des fruits de la plante *Crataegus oxyacantha* ainsi que l'effet de l'extrait *n*-BuOH des feuilles sur le stress oxydatif induit par la DOX au niveau du foie (effet hépatoprotecteur).

Le screening phytochimique de la plante *C. oxyacantha* a permis d'obtenir trois fractions des feuilles et trois autres des fruits de couleur et d'aspects différents ; chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol. Le rendement le plus élevé que nous avons obtenu est celui des extraits *n*-butanol (6,33 et 2,02 % pour les feuilles et les fruits respectivement) suivi par les extraits acétate d'éthyle (1,75 et 0,44 %). Tandis que, le rendement le plus faible est obtenu par les extraits chloroformiques avec un pourcentage de 0,27 % (feuilles) et 0,25% (fruits). L'utilisation des solvants à polarités différentes permet de séparer les composants de la plante en fonction de leur solubilité dans ces solvants et donc permet de séparer les flavonoïdes selon leur degré de glycosylation (aglycones, mono, di et triglycosylés). Il est difficile de faire une comparaison entre les résultats obtenus dans cette étude et ceux présentes dans la littérature. Cela est principalement dû au fait que le rendement est une mesure relative, qui dépend de divers facteurs tels que ; la méthode d'extraction utilisée (à chaud ou à froid), les conditions de séchage (y compris le lieu, la température et durée du séchage), le stade de croissance des plantes et les caractéristiques du solvant utilisé (Perva-Uzunalic *et al.*, 2006).

L'étude quantitative est menée sur le dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des flavonols. Le choix de quantifier ces composés parmi les différentes substances phytochimique, résulte du fait que les polyphénols ont des activités biologiques très importantes. De même pour les flavonoïdes qui sont considérés comme la classe la plus importante des polyphénols (Meddour *et al.*, 2013; Fadili *et al.*, 2017).

La teneur en polyphénols, en flavonoïdes et en flavonols des extraits de la plante *C. oxyacantha* a été déterminée selon les méthodes décrites dans le chapitre II. Nous avons utilisé des courbes d'étalonnage d'acide gallique et de la quercétine. Les résultats indiquent que l'extrait AcOEt des feuilles présente la teneur la plus élevée en polyphénols ( $869,09 \pm 12,48 \mu\text{g EAG/ mg}$  d'extrait), suivi par l'extrait AcOEt des fruits, ensuite l'extrait *n*-butanol des feuilles. Alors que la plus faible quantité a été enregistrée dans l'extrait *n*-butanol des fruits. Par ailleurs, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles affiche des concentrations relativement plus élevées en flavonoïdes et en flavonols par rapport aux autres extraits ( $165,69 \pm 6,18$ ,  $97,16 \pm 4,40 \mu\text{g EQ/ mg}$  d'extrait respectivement). Ces résultats sont congruents avec ceux de la littérature. Bennabderahman *et al.* (2018), ont également trouvé une teneur supérieure en polyphénols dans l'extrait acétate d'éthyle de *C. oxyacantha* par rapport à l'extrait *n*-butanol.

Les résultats de l'étude quantitative mettent en évidence une proportion significativement plus élevée de polyphénols par rapport aux flavonoïdes. Cette disparité suggère que parmi les polyphénols présents, il n'y a pas uniquement des flavonoïdes, ce qui laisse la possibilité de la présence d'autres composés polyphénoliques tels que les tanins et les coumarines, qui ont été détectés lors des recherches phytochimiques menées dans différentes études portant sur la même espèce (Amor, 2018), et d'autres sur le même genre (Bouزيد *et al.*, 2011; Bouaziz *et al.*, 2014).

L'évaluation de l'activité antioxydante est effectuée à l'aide de plusieurs tests chimiques décrits dans la littérature, notamment les tests DPPH, ABTS, GOR et FRAP qui sont couramment utilisés en raison de leur simplicité opérationnelle et de leur reproductibilité. Ces tests sont souvent employés pour mesurer le pouvoir antioxydant des composés ou des extraits de plantes. Les antioxydants naturels ou synthétiques jouent un rôle crucial en transférant des électrons ou des protons pour inhiber la production, limiter la réaction de propagation ou détruire les espèces réactives de l'oxygène présentes dans les systèmes biologiques. Cela permet de prévenir les maladies résultant du stress oxydatif en réduisant les dommages cellulaires et les effets néfastes des ERO (Alam *et al.*, 2013; Apak *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus de l'activité antiradicalaire par le DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> et galvinoxyle (GOR) révèlent que tous les extraits de la plante *C. oxyacantha* sont actifs et présentent une activité antioxydante élevée, ceci est associé à la richesse des extraits en composés phénoliques, tels que les flavonoïdes et les flavonols, ainsi qu'à leur interaction synergique qui améliore leur capacité antioxydante. Néanmoins les extraits d'acétate d'éthyle des feuilles et des fruits se sont révélés les plus efficaces dans la neutralisation des radicaux libres DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> et galvinoxyle par rapport aux extraits *n*-butanol. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bennabderahmane *et al.* (2018), qui ont démontré que les extraits acétate d'éthyle des feuilles et des fruits de l'espèce *C. oxyacantha* se sont avérés les plus actifs et ont montré une activité antioxydante remarquable vis-à-vis du radical DPPH<sup>•</sup>. Les résultats de l'activité antioxydante contre le radical ABTS<sup>•+</sup> obtenus sont en accord avec ceux de Boudjada *et al.* (2018), qui montrent une activité antioxydante élevée des extraits *n*-butanol et chloroforme de la plante *C. azarolus* avec une CI<sub>50</sub>=4,99±0,06 et 13,89±0,03 µg/mL respectivement. Dans la présente étude, le piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> par les extraits de *C. oxyacantha* s'est révélé être légèrement supérieur à celui du radical DPPH. Cela pourrait être également dû à la présence des molécules réductrices puissantes notamment "les tannins" qui sont considérés comme des antioxydants de haut poids moléculaire, ces antioxydants ont la capacité de neutraliser ou d'inhiber le radical ABTS<sup>•+</sup> (Hagerman *et al.*, 1998).

Les tests CUPRAC (Cupric Reducing Antioxydant Capacity) et la méthode de la phénanthroline sont également des techniques utilisées pour évaluer la capacité antioxydante des extraits. Le test CUPRAC mesure la réduction des ions cuivriques (Cu<sup>2+</sup>) par les antioxydants présents dans l'échantillon, tandis que la méthode du phénanthroline implique la formation d'un complexe coloré en rouge-orange entre les ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>) et l'orthophénanthroline (1,10 phénanthroline) qui est mesuré par spectrophotométrie à 510 nm. Les résultats des tests CUPRAC et phénanthroline confirment les résultats des tests précédents. Ils montrent aussi que l'extrait acétate d'éthyle des feuilles est le plus actif et présente une activité réductrice du cuivre et du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) élevée (A<sub>0,5</sub> = 6,18 ± 0,21 et 7,09 ± 0,76 µg /mL respectivement) par rapport aux autres extraits. Dans une étude réalisée par Boudjada *et al.* (2018) sur les feuilles de l'espèce *C. azarolus*, l'activité réductrice de l'extrait chloroformique (A<sub>0,5</sub> = 29,67 ± 0,17 µg / mL) est inférieure à nos résultats. Tandis que l'extrait *n*-butanol est proche (A<sub>0,5</sub> = 8,95 ± 0,03 µg / mL) en ce qui concerne le test CUPRAC.

D'après nos connaissances, c'est la première fois qu'une étude dans la littérature examine l'activité antioxydante des extraits de l'espèce *C. oxyacantha* en utilisant les tests phénanthroline, galvinoxyle et la réduction cuprique (CUPRAC).

Le test de FRAP évalue le pouvoir réducteur d'une substance en mesurant sa capacité à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Cette réduction se traduit par un changement de la couleur du milieu réactionnel en vert, qui est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. Tous les extraits de la plante *C. oxyacantha* exercent un effet réducteur. Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles présente le pouvoir réducteur le plus puissant ( $A_{0,5}=10,66\pm 0,11\mu\text{g}/\text{mL}$ ), suivi directement par l'extrait AcOEt des fruits avec  $A_{0,5}=12,59\pm 1,57\mu\text{g}/\text{mL}$ , et ensuite l'extrait *n*-BuOH des feuilles ( $A_{0,5}=27,39\pm 2,54\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En comparant ces résultats avec les antioxydants de référence employés dans cette étude, il est observé que ces trois extraits montrent une activité réductrice supérieure à celle du standard  $\alpha$ -Tocophérol qui présente une valeur d' $A_{0,5}=34,93 \pm 2,38 \mu\text{g}/\text{mL}$ . L'extrait *n*-BuOH des fruits montre une faible activité parmi tous les extraits et les standards utilisés. La capacité réductrice observée est due à la présence des substances antioxydantes dans les extraits qui sont capables d'arrêter les réactions en chaîne provoquées par les radicaux libres. Cette inhibition est effectuée en donnant un atome d'hydrogène ou un électron (Duan *et al.*, 2007 ; Prasad *et al.*, 2010). Boudjada *et al.* (2018) ont étudié l'activité du pouvoir réducteur des deux extraits d'une autre espèce *C. azarolus*, ils ont trouvé une valeur d' $A_{0,5}= 96,93 \pm 2,65 \mu\text{g}/\text{mL}$  pour l'extrait chloroformique, cette valeur est relativement plus élevée, donc cet extrait présente une activité réductrice inférieure s'il est comparée à celle de nos extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle.

L'incubation de l'homogénat de jaune d'œuf en présence de  $\text{FeSO}_4$  (source de  $\text{Fe}^{2+}$  métal de transition) a entraîné une augmentation significative de la teneur en MDA. Ces résultats concordent avec d'autres rapports sur l'interaction du  $\text{FeSO}_4$  avec les acides gras polyinsaturés (AGPI) de jaune d'œuf, dans lequel le  $\text{FeSO}_4$  s'est révélé être un initiateur très puissant de la LPO (Amrani *et al.*, 2017). La LPO accrue en présence de  $\text{Fe}^{2+}$  pourrait être attribuée au fait que  $\text{Fe}^{2+}$  peut catalyser des réactions de transfert d'un électron qui génèrent des radicaux libres tels que des radicaux hydroxyles réactifs formés à partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la réaction de Fenton. Le fer décompose également les peroxydes lipidiques, générant ainsi des radicaux pyroxyles et alcoxyles, ce qui favorise la propagation de la LPO (Akomolafe *et al.*, 2015). Dans cette étude, nous avons également évalué l'inhibition de la LPO des extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle des feuilles de la plante *Crataegus oxyacantha* et de la vitamine C. Nos résultats ont montré que l'inhibition de la LPO exercée par les deux extraits *n*-BuOH et AcOEt de *Crataegus oxyacantha*

est démontrée par la diminution de la concentration des radicaux libres produits par le FeSO<sub>4</sub>. Ces résultats expliquent les propriétés antioxydantes des composés phénoliques reportées dans plusieurs travaux (Akomolaf *et al.*, 2015; Amrani *et al.*, 2017 ).

Les extraits naturels sont largement utilisés en médecine traditionnelle et dans l'industrie cosmétique. Ils contiennent divers composés chimiques aux propriétés variées qui peuvent fournir une photoprotection à la peau (Mejía-Giraldo *et al.*, 2015 ; Amrani *et al.*, 2019). Il est bien connu que l'extrait de l'aubépine présente de très bonnes propriétés antioxydantes et une capacité potentielle à protéger la peau contre les rayons UVA et UVB (Jarzycka *et al.*, 2013). Dans ce contexte, notre étude actuelle met en évidence l'importance de la plante *C. oxyacantha* en tant que source prometteuse de nouvelles molécules photoprotectrices et antioxydantes. Dans la présente étude, tous les extraits de la plante *C. oxyacantha* ont montré une activité photoprotectrice élevée, à l'exception de l'extrait *n*-BuOH des fruits qui présente une activité modérée. Cette activité observée est due à la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes dans les extraits de la plante *Crataegus oxyacantha* (Oliveira-Junior *et al.*, 2017 ; Benabderrahmane *et al.*, 2018 ; Benabderrahmane *et al.*, 2021). La quercétine, la naringénine, l'apigénine et l'acide caféique offrent une forte protection solaire contre tous les types de rayons UV (Stevanato *et al.*, 2014). Ainsi, la présence de ces composés dans les extraits de *C. oxyacantha* pourrait être la raison de leur capacité à protéger contre le soleil. Les composés phénoliques de *C. oxyacantha* agissent de manière synergique pour offrir une protection complète.

L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase en utilisant le substrat p-NPG (p-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) repose sur le fait que l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase hydrolyse ce substrat en libérant du p-nitrophénol qui a une absorbance mesurée à 405 nm. Lorsque l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase est inhibée, la libération de p-nitrophénol est réduite. Les extraits testés ont montré une forte activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase par rapport au contrôle positif (acarbose). L'extrait *n*-butanol des feuilles a montré l'activité inhibitrice maximale ( $IC_{50} = 4,99 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ ). D'après nos résultats, il semble que les feuilles de l'aubépine contiennent un groupe important de composés qui sont recommandés pour être utilisés comme médicaments naturels contre le diabète de type 2. Ces composés méritent d'être étudiés plus en détail. L'étude de Benabderrahmane *et al.* (2021) a révélé la présence de plusieurs substances, notamment la quercétine, le quercétine-3-glucoside, l'épicatéchine, la naringénine, la rutine, l'acide caftarique et l'acide caféique. Les composés phénoliques et les flavonoïdes présents dans ces extraits sont responsables de leur activité antidiabétique. En effet, des études antérieures ont montré que

l'acide caféique, l'épicatéchine, la naringénine et la quercétine ont une capacité significative à inhiber l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase (Rasouli *et al.*, 2017). Bien que des études antérieures aient déjà démontré l'effet anti-hyperglycémique d'un extrait aqueux de *C. oxyacantha* chez des rats diabétiques (Jouad *et al.*, 2003), notre étude est la première à mettre en évidence l'effet antidiabétique *in vitro* des extraits *n*-butanol et d'acétate d'éthyle des feuilles et des fruits en inhibant l' $\alpha$ -glucosidase. Ces résultats suggèrent que les extraits de *C. oxyacantha* pourraient être prometteurs pour le traitement du diabète de type 2 en ciblant les mécanismes d'action.

L'utilisation des antioxydants peut ralentir l'évolution de la maladie d'Alzheimer et réduire la dégénérescence des neurones. Les composés ayant des propriétés anticholinestérasiques sont également associés à l'activité antiradicalaire. Afin de vérifier ces approches, l'activité anti-Alzheimer a été évaluée dans les extraits de *C. oxyacantha* par rapport au standard galantamine (médicament utilisé pour traiter les symptômes de la maladie d'Alzheimer). Dans cette étude, l'activité anticholinestérase est réalisée contre deux enzymes, à savoir l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) selon la méthode décrite par Ellman *et al.* (1961). Les extraits ont montré une activité inhibitrice faible à significative sur la BChE. L'activité maximale a été enregistrée dans l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles ( $58,29 \pm 4,26\%$  à  $200 \mu\text{g/mL}$ ). D'autre part, les deux extraits *n*-butanol et l'extrait acétate d'éthyle des fruits sont inactifs. Tandis que, l'extrait *n*-butanol des feuilles a montré un effet inhibiteur significatif contre l'AChE ( $58,54 \pm 2,47\%$  à  $200 \mu\text{g/mL}$ ). Ces résultats suggèrent que la plante *C. oxyacantha* contient des composés inhibiteurs fonctionnels dans les feuilles et a un effet potentiel sur les enzymes AChE et BChE. Les feuilles peuvent être considérées comme une source majeure de composés fonctionnels anti-Alzheimer. L'inhibition des enzymes acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase peut être due aux métabolites secondaires des composants de la plante. Récemment, des études réalisées par Ali *et al.*, (2017) ont démontré que le lupeol, le  $\beta$ -sitostérol, l'acide bétulinique, l'acide oléanolique et la chrysine présents dans la plante *C. oxyacantha* exercent des effets inhibiteurs sur les enzymes AChE et BChE, renforçant ainsi nos résultats. L'activité antioxydante a également été précédemment corrélée au potentiel anticholinestérase (AChE et BChE) et associée à l'effet neuroprotecteur des composés phénoliques (Zheleva-Dimitrova, 2013 ; Ali Resa *et al.*, 2018). Plus récemment, Saoudi *et al.* (2019) ont rapporté que l'extrait aqueux de *C. oxyacantha* présente des effets antioxydants et neuroprotecteurs chez les rats traités par la deltaméthrine et le chlorpyrifos.

L'étude expérimentale *in vivo* effectuée sur des rats de souche *Wistar albinos* a mis en évidence que le traitement par la DOX à raison de  $15 \text{ mg/kg}$  a entraîné une hépatotoxicité,

caractérisée par une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité des enzymes hépatiques présentes dans le sang, notamment les transaminases (ASAT, ALAT) et la LDH. Cette augmentation peut être attribuée aux lésions tissulaires survenues dans le cœur, le foie et les reins, ou encore à des modifications de la perméabilité des membranes cellulaires (Swamy *et al.*, 2012 ; Jambhulkar *et al.*, 2014). En outre, il est important de souligner que l'ASAT, l'ALAT et la LDH représentent les marqueurs les plus sensibles, directement impliqués dans l'étendue des dommages cellulaires et de la toxicité, puisqu'ils sont localisés dans le cytoplasme et libérés dans la circulation sanguine en cas d'atteinte cellulaire. Ces résultats concordent avec les études de Al-Syaad et Ibrahim, (2014) ainsi que Jambhulkar *et al.* (2014). Il est actuellement reconnu que La toxicité de la DOX repose en réalité sur l'augmentation du processus oxydatif incluant la production d'espèces radicalaires. Cette surproduction de radicaux libres entraîne une augmentation de la peroxydation lipidique (LPO) à travers toutes les structures cellulaires, engendrant ainsi des altérations au niveau des fonctions membranaires. Ces altérations conduisent à la libération de LDH ainsi que des enzymes hépatiques (ALAT) et cardiaques (ASAT), et donc leur augmentation significative dans le sang (Jambhulkar *et al.*, 2014). L'administration de l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* (100 mg/kg) associé avec la DOX a considérablement diminué l'activité des enzymes ASAT, ALAT et LDH, de manière similaire à celle de la vitamine E. Cela démontre que l'extrait *n*-butanol peut réduire les dommages hépatiques et cardiaques causés par la DOX. Ces résultats sont en accord avec les études antérieures de Chennuru et Saleem, (2013).

Le traitement des rats avec la DOX (15 mg/kg) entraîne une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) des taux du cholestérol, des triglycérides et de LDL, ainsi qu'une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du taux de HDL par rapport aux rats du groupe témoin. Ces résultats concordent avec les recherches antérieures menées par Iliskovic et Singal, 1997 ainsi que par Hong *et al.*, 2002. En outre, il est important de souligner que l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha* démontre une capacité à réduire les excès de cholestérol, des triglycérides et de LDL dans le sang, ce qui est en accord avec les études d'Olaleye *et al.* (2013).

Le cholestérol est un lipide essentiel qui joue un rôle crucial dans la composition de nos membranes cellulaires et dans la production de certaines molécules nécessaires pour le bon fonctionnement de notre métabolisme. Cependant, un excès de cholestérol peut être néfaste, car il peut contribuer au développement de maladies cardiovasculaires, en particulier lorsque d'autres facteurs de risque tels que l'âge, le diabète, le tabagisme, l'hypertension artérielle et la toxicité médicamenteuse sont présents.

Les lipoprotéines sont des transporteurs qui circulent dans le sang et sont responsables du transport du cholestérol. Deux types principaux de lipoprotéines, à savoir les HDL et les LDL, interviennent dans la régulation des niveaux de cholestérol. Les HDL sont associées au "cholestérol bénéfique" tandis que les LDL sont liées au "cholestérol nuisible". La classification du cholestérol en tant que "bon" ou "mauvais" est déterminée par le rôle de ces lipoprotéines dans le transport du cholestérol. Les lipoprotéines de haute densité (HDL), exercent une fonction protectrice des vaisseaux sanguins en récupérant le cholestérol excédentaire provenant des artères et des organes, puis en le transportant vers le foie. Cela contribue à nettoyer les vaisseaux sanguins et à prévenir l'accumulation de graisses, ce qui explique pourquoi le cholestérol HDL est souvent qualifié de "bon cholestérol". En revanche, les lipoprotéines LDL ont pour rôle de transporter le cholestérol du foie vers les cellules du corps, et lors de ce processus, elles ont la capacité de déposer du cholestérol sur les parois des artères. Ce phénomène est d'autant plus problématique lorsque le cholestérol est sous forme oxydée, car il favorise la création de plaques lipidiques sur les parois artérielles (appelées athéromes), et à long terme, cela peut entraîner des lésions artérielles (sclérose). Les conséquences graves de l'athérosclérose peuvent même inclure la formation de caillots sanguins (thrombus) sur ces plaques, ce qui peut bloquer la circulation sanguine, augmentant ainsi le risque d'accidents vasculaires. En résumé, le cholestérol LDL est souvent considéré comme le "mauvais cholestérol", en particulier lorsqu'il est oxydé (Deng et Chow, 2010).

Cette étude démontre que l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha* a la capacité de réguler le profil lipidique chez les rats traités par la DOX, ce qui indique une potentielle protection du cœur. C'est particulièrement important car l'hyperlipidémie joue un rôle majeur dans le développement de nombreuses maladies cardiovasculaires. Ces résultats concordent avec les recherches menées par Djebbari *et al.* (2017) ainsi que par Subashini *et al.* (2007).

Il est largement reconnu qu'il existe une corrélation entre la toxicité hépatique de la DOX et le stress oxydant. Ce dernier semble jouer un rôle majeur dans l'apparition des effets secondaires graves. Aujourd'hui, les plantes médicinales ont pris un grand intérêt comme source importante d'antioxydants. Des études menées sur les plantes à effet cardioprotecteur et hépatoprotecteur, ont révélé que certaines possèdent des propriétés antioxydantes, donnant ainsi l'espoir de prévenir les effets secondaires de la DOX (Abushouk *et al.*, 2017). Dans ce contexte, la peroxydation lipidique (MDA), les antioxydants enzymatiques (GPx) et non enzymatiques (GSH) ont été dosés dans le foie des rats traités par la DOX, l'extrait *n*-butanol des feuilles de la plante *C. oxyacantha* et la vitamine E.

Dans cette étude, le traitement par la DOX à la dose 15 mg/kg a entraîné une augmentation significative ( $p < 0,01$ ) de la peroxydation lipidique, via l'élévation du taux de malondialdéhyde (MDA). Cette augmentation est le résultat d'un stress oxydant qui conduit à des lésions tissulaires et une défaillance des mécanismes de défense antioxydante. L'MDA est considéré comme un marqueur ou un produit secondaire génère au cours de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (Misra *et al.*, 2009). Il peut pénétrer dans la bicouche phospholipidique entraînant des dommages ou une perte de fonction de la membrane cytoplasmique par la réduction de la fluidité et l'augmentation de la perméabilité membranaire, ce qui provoque un gonflement cellulaire et une nécrose (Su *et al.*, 2016). Ces résultats sont en accord avec ceux de nombreuses autres études (Yeh *et al.*, 2009 ; Srdjenovic *et al.*, 2010 ; Rashid *et al.*, 2012; Djebbari *et al.*, 2017; Wali *et al.*, 2020) qui ont montré que le traitement des rats par la DOX provoque une augmentation significative des produits de la peroxydation lipidique (MDA).

Le glutathion réduit (GSH) est un antioxydant non enzymatique qui constitue la première ligne de défense contre les agressions causées par les radicaux libres (Sathishsekar et Subramanian, 2005). Il joue le rôle de défense antioxydante par plusieurs mécanismes; il agit comme un piègeur direct des radicaux libres, co-substrat essentiel pour l'activité des enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase (GSH-Px) et la glutathion-S-transférase (GSH-ST) et participe également à la détoxification des métabolites réactifs (Ravi *et al.*, 2004). Les résultats de notre étude expérimentale ont montré que le traitement des rats par la DOX (15 mg/kg) provoque une diminution significative du taux de GSH ( $p < 0,01$ ) et l'activité enzymatique de la GPx ( $p < 0,05$ ), ce qui indique un déséquilibre entre les antioxydants et les oxydants dans le foie. Les faibles concentrations du GSH et l'activité du GPx observées peuvent être expliquées par leur épuisement dans la lutte contre le stress oxydatif induit par la DOX (Giampieri *et al.*, 2016). Cependant, les résultats rapportés sur l'activité de la GPx chez les animaux traités par la DOX sont généralement controversés. Quelques études ont rapporté que l'activité de la GPx est réduite chez les animaux intoxiqués par la DOX (Indu *et al.*, 2014 ; Jambhulkar *et al.*, 2014), alors que d'autres ont noté une augmentation de cette activité enzymatique (Ayaz *et al.*, 2005). Ces différences sont probablement dues à la nature des tissus étudiés, la durée expérimentale, la dose administrée et la sévérité de l'intoxication par la DOX.

Le prétraitement des rats par l'extrait *n*-butanol des feuilles de *C.oxycantha* ou la vitamine E (100 mg/kg) réduit significativement la peroxydation lipidique dans les tissus hépatiques. De plus, il y avait des augmentations significatives des enzymes antioxydantes

hépatiques (GPx) et des taux de glutathion (GSH). L'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha* et la vitamine E ont induit des effets protecteurs contre les altérations tissulaires induites par la DOX. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses publications antérieures, qui ont examiné les effets hépatoprotecteurs et antioxydants de la plante *C. oxyacantha* contre la toxicité induite par les xénobiotiques (Krajka-kuzniak *et al.*, 2014 ; Rezaei-Golmishah *et al.*, 2015).

L'effet protecteur de l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* contre le stress oxydatif induit par la DOX dans notre modèle de rat pourrait être soit direct par piégeage des espèces réactives de l'oxygène et l'inhibition de la peroxydation lipidique et/ou indirect par l'amélioration de l'activité des piègeurs enzymatiques de radicaux libres dans les cellules comme la GPx. Toutes ces activités pourraient être dues aux effets multifactoriels des polyphénols présents dans l'extrait. Il a été rapporté que les principaux composés polyphénoliques expliquant la capacité antioxydante des feuilles de *C. oxyacantha* sont les flavones orientine, miquelianine, rutine, apigénine et les acides hydroxybenzoïques tels que l'acide caféique, l'acide cafiarique et l'acide chlorogénique (Benabderrahmane *et al.*, 2018). Ces composés sont connus pour leurs propriétés d'élimination des radicaux libres et d'inhibition de la peroxydation lipidique (Gokcimen *et al.*, 2007) et auraient pu agir individuellement ou en synergie pour réduire le stress oxydatif induit par la DOX.

Les effets bénéfiques de l'extrait *n*-butanol des feuilles de la plante *C. oxyacantha* sont confirmés par des observations histopathologiques. Les coupes histologiques du foie des rats ayant reçu la DOX ont révélé la présence d'une nécrose, une congestion et l'inflammation, confirmant ainsi les résultats des paramètres biochimiques et du stress oxydatif, où les transaminases hépatiques et le malondialdéhyde (MDA) étaient élevées suite à la toxicité induite par la DOX (La peroxydation lipidique provoquée par la DOX entraîne des dommages morphologiques tels que la nécrose cellulaire). Les résultats de notre étude actuelle sont similaires à ceux de Llesuy et Arnaiz, (1990); Rashid *et al.*, (2013) ainsi que Al-Syaad et Ibrahim, (2014), qui ont rapporté que le traitement par la DOX induit la perte de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des cellules hépatiques.

L'inflammation est une réponse immunitaire complexe du corps en réponse à une agression, telle que l'invasion de micro-organismes pathogènes ou la présence de substances irritantes (Azab *et al.*, 2016 ; Kallassy *et al.*, 2017). C'est un processus physiopathologique caractérisé par la rougeur, la fièvre, l'œdème, la douleur et la perte de fonction. L'inflammation est déclenchée par une variété de médiateurs pro-inflammatoires, notamment les prostaglandines,

les cytokines et les leucotriènes, qui sont produits en réaction à un stimulus inflammatoire. Bien que les médicaments anti- inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens actuellement utilisés soient efficaces pour traiter les troubles inflammatoires aigus, ils n'ont pas réussi à guérir les troubles inflammatoires chroniques tels que la polyarthrite chronique évolutive et la dermatite atopique. Les produits naturels ont acquis une grande importance comme des agents porteurs d'activité potentielle intéressante (Ait el cadri *et al.*, 2012 ; Azab *et al.*, 2016). Dans ce contexte, nous avons évalué l'activité anti-inflammatoire de l'extrait *n*-butanol des feuilles de la plante *C. oxyacantha* en utilisant deux modèles d'œdèmes, à savoir l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris et l'œdème de la patte induit par le formol chez les rats.

L'œdème de l'oreille induit par le xylène est appliqué sur les souris albinos, c'est un modèle d'inflammation aiguë qui est utilisé pour évaluer l'effet anti-œdémateux de l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha*. L'application locale du xylène pure induit un œdème neurogénique qui survient en réponse à une stimulation des neurones sensoriels qui libèrent des neuropeptides pro-inflammatoires, comme la substance p. La substance p et le peptide associé au gène de la calcitonine sont les principaux initiateurs de l'inflammation neurogénique. Ils provoquent la dilatation des vaisseaux sanguins (vasodilatation) et l'exsudation plasmatique en agissant sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux et les cellules endothéliales (Rotelli *et al.*, 2003; Oluwatoyin *et al.*, 2019). Comme ils ont la capacité d'activer directement les mastocytes et d'autres cellules du système immunitaire. Il est également reconnu que les neurones sensoriels renferment des enzymes de cyclooxygénase capables de générer des prostaglandines pro-inflammatoires (Richardson et vasko, 2002). Nos résultats montrent que le prétraitement des souris par l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* (aux deux doses 50 et 100 mg/kg) entraîne une réduction du poids de l'oreille par rapport a celui des souris du groupe témoin, ce qui correspond à une inhibition de l'inflammation avec un pourcentage de 42,77 et 51,92 % pour la dose 50 et 100 mg/kg respectivement. Cette inhibition est presque similaire à celle exercée par l'aspirine (molécule standard). Cela pourrait être dû à la capacité des composés phénoliques de *C. oxyacantha* à inhiber les enzymes et les facteurs pro-inflammatoires. Aucune recherche antérieure n'a été menée sur les effets de l'extrait de *C. oxyacantha* en ce qui concerne l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. D'autres mécanismes peuvent expliquer l'effet anti-inflammatoire montré par l'extrait testé de *C. oxyacantha*. les études de Kallassy *et al.*, (2017) ont rapporté que les extraits méthanolique et éthanolique des feuilles de la plante *C. azarolus* présentent une activité inhibitrice vis-à-vis de la cyclooxygénase 2 (COX-2) et donc l'inhibition de la production des prostaglandines (PGE) pro-inflammatoires.

L'œdème de la patte induit par le formol chez les rats qui est aussi un modèle de l'inflammation aiguë, a été utilisé pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait *n*-butanol de *C. oxyacantha*. Ce type d'œdème fait participer plusieurs médiateurs qui induisent la réaction inflammatoire dans deux phases différentes (Tadic *et al.*, 2008; Ait el cadi *et al.*, 2012). Une phase initiale, survenant entre 0 et 2,5 heures après l'injection de formol, est caractérisée par une augmentation de la perméabilité vasculaire. Cette augmentation est attribuée à l'action de médiateurs inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine et la bradykinine. Une phase retard, qui est le résultat de la surproduction des prostaglandines dans les tissus, médiée par la cyclooxygénase, elle peut continuer au-delà de 5 heures après l'injection de formol (Tadic *et al.*, 2008; Sene *et al.*, 2016). Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'extrait *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* exerce une activité anti-inflammatoire remarquable. L'administration de cet extrait aux doses 50 et 100 mg/kg prévient de manière significative l'augmentation du volume de l'œdème à partir de la première heure et atteint son maximum d'activité à la 5<sup>ème</sup> heure, avec un pourcentage d'inhibition de 54,26 et 53,10 % pour la dose 50 et 100 mg/kg respectivement par rapport aux rats témoins. L'activité anti-inflammatoire des deux doses de l'extrait est presque similaire à celle de l'aspirine. Cette activité en phase précoce peut éventuellement être expliquée par l'inhibition de la libération des premiers médiateurs pro-inflammatoires tels que la sérotonine, l'histamine et les kinines (Perianayagam *et al.*, 2006). L'effet observé lors de la deuxième phase pourrait être dû à l'inhibition de la cyclooxygénase (COX), ce qui signifie que l'extrait *n*-butanol diminue la synthèse des prostaglandines en inhibant les isoformes COX-1 et COX-2 (Tadic *et al.*, 2008; Ait el cadi *et al.*, 2012). Ces résultats confèrent à la plante *C. oxyacantha* un mécanisme d'action anti-inflammatoire semblable à celui des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens, et pourrait être expliqué par la présence de composés bioactifs comme les composés phénoliques et les flavonoïdes. Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux rapportés par d'autres chercheurs. Tadic *et al.*, (2008) ont montré que les fruits de la plante *C. oxyacantha* renferment des composés bioactifs tels que l'hyperoside, la quercétine et l'isoquercitrine possèdent une forte activité antioxydante ainsi que des propriétés anti-inflammatoires intéressantes. Bor *et al.*, (2012) ont également rapporté que l'administration de l'extrait éthanolique des feuilles de la plante *C. orientalis* aux doses 50 et 100 mg/kg a entraîné une réduction de l'œdème de la patte induit par la carragénine avec des pourcentages d'inhibition égale à 45,2 et 86,6 % respectivement. Cet extrait peut avoir un potentiel anti-inflammatoire important, ce qui confirme les résultats obtenus dans notre étude.

**Partie : 02****Résultats et discussion de l'étude expérimentale *in vitro* et *in vivo* de la plante  
*Asteriscus graveolens*****I. Etude expérimentale *in vitro*****I.1. Rendements d'extraction****Tableau 19 : Rendement des phases de la plante *A.graveolens***

Partie utilisée	phase	Masse (g)	Rendement (%)
Feuilles et fleurs	Chloroforme	7,67 g	0,48%
	Acétate d'éthyle	6,14 g	0,38%
	<i>n</i> -butanol	15,18 g	0,96 %

**I.2. Etude phytochimique****I.2.1. Dosage des polyphénols, des flavonoides et des flavonols**

Pour la détermination quantitative des polyphénols totaux de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens*, nous avons utilisé la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ( $y=0,0034x + 0,1044$ ,  $R^2= 0,9972$ ). La quantité des polyphénols est exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EAG/mg Extrait}$ ). Pour les flavonoïdes, on a utilisé la courbe d'étalonnage de la quercétine ( $y = 0,0048x$ ,  $R^2= 0,997$ ) et les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent de quercétine par mg d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ). La teneur en flavonols a été également déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine avec l'équation  $y= 0,0071x + 0,0225$ ,  $R^2= 0,9986$ , le contenu des flavonols a été exprimé en terme de  $\mu\text{g}$  équivalent de quercétine ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ).

Les résultats enregistrés dans le tableau 20 ont montré que l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* contient une grande quantité des polyphénols, des flavonoides et des flavonols avec une teneur de  $749,58 \pm 1,03 \mu\text{g EAG/mg Extrait}$ ,  $534,58 \pm 15,02$  et  $161,396 \pm 6,60 \mu\text{g QE/mg Extrait}$  respectivement.

Tableau 20 : la teneur en polyphénols, flavonoïdes et flavonols de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens*

Extrait	Polyphénols totaux (µg EAG/mg extrait)	Flavonoïdes totaux (µg EQ/mg extrait)	Flavonols totaux (µg EQ/mg extrait)
<i>n</i> -butanol	749,58 ± 1,03	534,58 ± 15,02	161,396 ± 6,60

### I.3. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* a été étudiée *in vitro* par une série de tests : piégeage du radical libre DPPH, ABTS, CUPRAC, radical Galvinoxyl (GOR), phenanthroline, pouvoir réducteur et LPO.

#### I.3.1. Activité antiradicalaire au DPPH

L'activité antioxydante de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* vis-à-vis le radical DPPH est évaluée en suivant la réduction de ce radical. Les résultats sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration, ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (CI<sub>50</sub>) (Tableau 21).

Tableau 21 : Activité antiradicalaire au DPPH de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* et des standards

Extrait	% Inhibition du DPPH						
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
<i>n</i> -BuOH	8,88±1,20	19,40±1,10	34,19±2,49	63,18±2,66	83,65±0,61	85,35±0,28	19,37±0,75 <sup>b</sup>
BHT	11,69±1,88	22,21±1,30	37,12±1,80	52,63±2,70	56,02±0,53	83,60±0,23	22,32±1,19 <sup>c</sup>
BHA	28,95±1,16	54,33±1,59	76,76±1,65	84,09±0,35	87,53±0,82	87,73±0,15	5,73±0,41 <sup>a</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles : les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 21, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour les standards BHA et BHT ou pour l'extrait.

L'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* a montré une activité antioxydante plus élevée contre le radical DPPH avec une  $CI_{50} = 19,37 \pm 0,75 \mu\text{g/mL}$  en comparaison avec le standard BHT ( $CI_{50} = 22,32 \pm 1,19 \mu\text{g/mL}$ ), cette activité antiradicalaire est inférieure à celle du BHA ( $CI_{50} = 5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$ ),

Les résultats obtenus ont permis de classer les extraits et les produits de référence comme suit : BHA:  $5,73 \pm 0,41 > n\text{-BuOH}: 19,37 \pm 0,75 > \text{BHT}: 22,32 \pm 1,19 \mu\text{g/mL}$ .

### I.3.2. Test de piégeage du radical ABTS

Les résultats du test de piégeage du radical  $ABTS^{*+}$  montrent que l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* possède une excellente activité antioxydante avec une  $CI_{50} = 5,24 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ . Cette activité antiradicalaire  $ABTS^{*+}$  de l'extrait reste un peu moins actif par rapport aux standards BHA ( $CI_{50} = 1,81 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ ) et BHT ( $CI_{50} = 1,59 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ ). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau 22 : inhibition du cation radical  $ABTS^{*+}$  par l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens***

Extrait	% Inhibition de l'ABTS						
	3.125 $\mu\text{g}$	6.25 $\mu\text{g}$	12.5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	$IC_{50} \mu\text{g/mL}$
<b><i>n</i>-BuOH</b>	31,65±0,48	58,83±1,24	87,97±1,87	92,51±0,66	92,56±0,42	92,61±0,40	<b>5,24±0,09<sup>b</sup></b>
<b>BHT</b>	59,22±0,59	78,55±3,43	90,36±0,00	92,18±1,27	93,37±0,86	94,87±0,87	<b>1,59±0,03<sup>a</sup></b>
<b>BHA</b>	83,42±4,09	93,52±0,09	93,58±0,09	93,63±0,16	93,63±0,95	94,20±0,90	<b>1,81±0,10<sup>a</sup></b>

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  SD des trois mesures parallèles : les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

### I.3.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

Les résultats obtenus de l'activité réductrice du CUPRAC sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 23 : La capacité antioxydante de réduction du cuivre de la plante *A. graveolens*

Extrait	Absorbance du CUPRAC						
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	A <sub>0.5</sub> µg/mL
<b><i>n</i>-BuOH</b>	0,24±0,01	0,38±0,01	0,65±0,03	1,15±0,03	2,14±0,01	3,54±0,05	<b>9,04 ± 0,53<sup>b</sup></b>
<b>BHT</b>	0,19±0,01	0,33±0,04	0,66±0,07	1,03±0,07	1,48±0,09	2,04±0,14	<b>9,62 ± 0,87<sup>b</sup></b>
<b>BHA</b>	0,46±0,00	0,78±0,01	1,34±0,08	2,36±0,17	3,45±0,02	3,76±0,03	<b>3,64±0,19<sup>a</sup></b>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

D'après le tableau 23 ; l'absorbance de l'activité antioxydante par la réduction du complexe cuivre-neocuproïne de l'extrait de la plante *A. graveolens* est proportionnel à la concentration. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait *n*-butanol possède une forte activité avec une valeur d'absorbance A<sub>0.5</sub> = 9,04 ± 0,53 µg/mL, cette activité est considérée comme similaire à celle du standard BHT (A<sub>0.5</sub>= 9,62 ± 0,87 µg/mL). Par contre, elle est inférieure à celle du BHA (A<sub>0.5</sub>= 3,64 ± 0,19 µg/mL).

### 1.3.4. Activité de réduction par formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phénanthroline

Le test du phénanthroline a été utilisé pour mesurer le fer dans différents types d'échantillons, il est basé sur la réduction des ions de fer ferrique Fe<sup>3+</sup> en fer ferreux Fe<sup>2+</sup> par un agent antioxydant, formant un complexe coloré qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 510 nm. Cette réduction est déterminée par la mesure des valeurs d'A<sub>0.5</sub> des extraits et des standards BHA et BHT (Tableau 24).

Tableau 24 : Activité phénanthroline de l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens*

Extrait	Absorbance phénanthroline						
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	A <sub>0.5</sub> µg/mL
<b><i>n</i>-BuOH</b>	0,41±0,01	0,48±0,01	0,60±0,03	0,89±0,05	1,30±0,11	2,48±0,20	<b>7,53 ± 0,77<sup>c</sup></b>
<b>BHT</b>	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	nt	<b>0,93±0,07<sup>a</sup></b>
<b>BHA</b>	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	nt	<b>2,24±0,17<sup>b</sup></b>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes. nt : non testé.

D'après les résultats fournis, l'extrait *n*-butanol de la plante *Asteriscus graveolens* présente une grande capacité à réduire le fer et former un complexe Fe<sup>2+</sup> - phénanthroline avec une valeur d'A<sub>0,5</sub> = 7,53 ± 0,77 µg/mL. Cette activité est inférieure par rapport aux standards BHA (A<sub>0,5</sub> = 2,24±0,17 µg/mL) et BHT (A<sub>0,5</sub> = 0,93±0,07 µg/mL).

### I.3.5. Activité de piégeage du radical Galvinoxyl (GOR)

L'étude de cette activité est basée sur la mesure de la capacité d'un antioxydant à réduire ou à neutraliser le radical galvinoxyl (GOR). Les résultats ont été comparés aux concentrations inhibitrices (CI<sub>50</sub>) des antioxydants de référence BHA et BHT. Une CI<sub>50</sub> plus faible indique une plus grande capacité antioxydante. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 25.

Tableau 25 : Activité antiradicalaire (Galvinoxyl) de l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens*

Extrait	(%) Inhibition du radical Galvinoxyl						
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
<i>n</i> -BuOH	nt	14,39±1,95	46,55±2,24	61,65±0,69	64,70±0,34	65,43±0,32	18,49±0,45 <sup>b</sup>
BHT	39,11±2,34	58,67±0,94	69,65±0,04	72,44±0,23	73,61±0,10	nt	4,99±0,06 <sup>a</sup>
BHA	46,67±0,25	62,27±1,40	71,46±0,29	73,25±0,41	73,78±0,17	nt	4,35±0,13 <sup>a</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement (P < 0,05) différentes ; nt : non testé

Les résultats de l'activité de piégeage du radical galvinoxyl de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* ont montré que cet extrait présente une forte activité antioxydante avec une CI<sub>50</sub> = 18,49 ± 0,45 µg/mL. Ces résultats ont été comparés aux standards BHA (CI<sub>50</sub> = 4,35±0,13 µg/mL) et BHT (CI<sub>50</sub> = 4,99±0,06 µg/mL) qui présentent une activité supérieure à celle de l'extrait *n*-butanol.

### I.3.6. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

L'activité antioxydante de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Il s'agit d'une méthode de mesure de la puissance des substances des extraits à réduire le fer ferrique Fe<sup>3+</sup> en fer ferreux (Bammou *et al.*, 2020). Le dosage de cette réaction est mesuré à titre de valeurs d'A<sub>0,5</sub> des extraits et des standards utilisés. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 26 : Absorbance du pouvoir réducteur de l'extrait d'*A. graveolens*

Extrait	Absorbance pouvoir réducteur (FRAP)						
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	A <sub>0.5</sub> µg/mL
<i>n</i> -BuOH	0,14±0,01	0,22±0,03	0,42±0,13	0,55±0,02	0,75±0,03	0,91±0,07	<b>20,89±2,01<sup>b</sup></b>
Acide ascorbique	0,35±0,05	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,37±0,20	<b>6,77±1,15<sup>a</sup></b>
Acide tannique	0,28±0,02	0,78±0,06	1,02±0,07	1,24±0,18	0,86±0,6	1,01±0,21	<b>5,39±0,91<sup>a</sup></b>
α-Tocopherol	0,11±0,00	0,16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	<b>34,93±2,38<sup>c</sup></b>

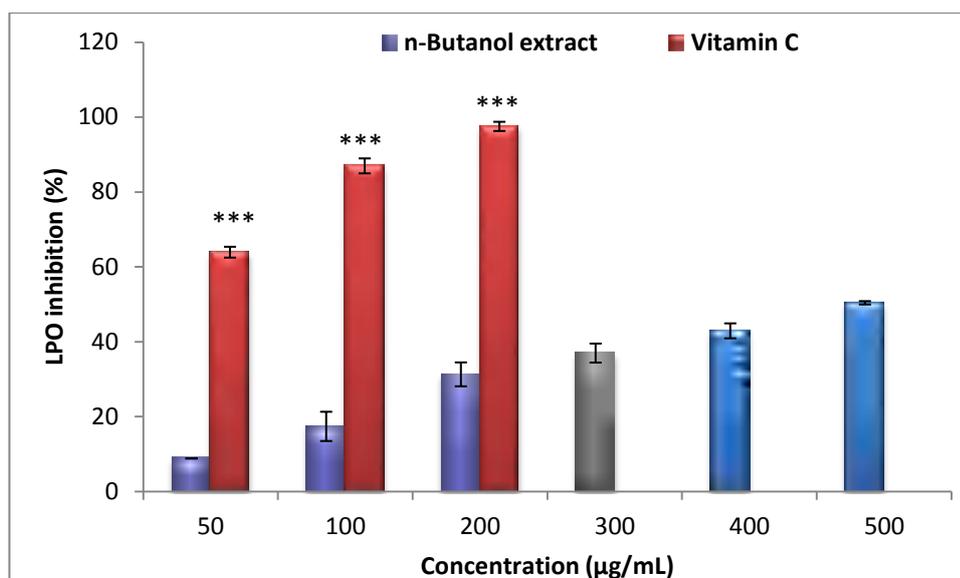
Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

En comparant ces résultats avec les standards antioxydants, on a observé que l'extrait *n*-butanol présente une activité réductrice modérée ( $A_{0.5} = 20,89 \pm 2,01 \mu\text{g/mL}$ ) par rapport à l'acide ascorbique ( $A_{0.5} = 6,77 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$ ) et l'acide tannique ( $A_{0.5} = 5,39 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$ ). Cependant, il montre une activité supérieure à celle de l'α-tocophérol ( $A_{0.5} = 34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/mL}$ ). Cela signifie que l'extrait *n*-butanol peut encore avoir un rôle important en tant qu'antioxydant, même s'il est moins actif que les deux autres standards.

### I.3.7. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO)

Le test LPO permet d'évaluer le potentiel antioxydant de différents composés, extrait ou substances. Dans cette étude, l'évaluation de la capacité de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* d'inhiber la peroxydation des lipides (LPO) a été effectuée dans le jaune d'œuf par le dosage de malondialdéhyde (MDA) (Amrani *et al.*, 2018). Les résultats sont illustrés dans la figure 51.

L'extrait *n*-butanol et la vitamine C (standard) ont inhibé la peroxydation lipidique de manière dose-dépendante (Figure 51). La vitamine C a montré une activité très hautement significative ( $CI_{50} = 20,64 \pm 2,33 \mu\text{g/mL}$  par rapport à l'extrait *n*-butanol ( $CI_{50} = 467,5 \pm 8,92 \mu\text{g/mL}$ ). Le pouvoir antioxydant de l'extrait *n*-butanol et de la vitamine C vis-à-vis du LPO, le plus élevé, est observé avec une dose de 500 µg/mL (49,71 %) et de 200 µg/mL (97%) respectivement.



**Figure 51 : Effet de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* et la vitamine C vis-à-vis la peroxydation lipidique non enzymatique induite par le FeSO<sub>4</sub>.**  
 Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n=3) (\*\*\*)p < 0,001

#### I.4. Evaluation de l'activité photoprotectrice SPF (Sun Protection Factor)

L'activité photoprotectrices de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* a été mesurée *in vitro* par la détermination du facteur de protection solaire. Les résultats sont illustrés dans le tableau 27. Une valeur de SPF = 47,80 ± 0,66 signifie que l'extrait *n*-butanol présente une protection élevée contre les rayons du soleil.

**Tableau 27 : Activité photoprotectrice SPF de l'extrait de la plante *A. graveolens***

	Extrait <i>n</i> -BuOH
<b>SPF</b>	47,80 ± 0,66
<b>Protection</b>	Haute protection

#### I.5. Evaluation de l'activité enzymatique

##### I.5.1. Evaluation de l'activité inhibitrice de l'α-glucosidase

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'α-glucosidase par différentes concentrations de l'extrait (Tableau 28). L'extrait *n*-butanol a montré une faible

activité inhibitrice vis-à-vis l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase ( $CI_{50}=742,73\pm 3,19\mu\text{g/mL}$ ) en comparaison avec le standard acarbose ( $CI_{50} =275,43\pm 1,59 \mu\text{g/mL}$ ).

**Tableau 28 : inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase par l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens***

Extrait	(%) Inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase							
	15,625 $\mu\text{g}$	31,25 $\mu\text{g}$	62,5 $\mu\text{g}$	125 $\mu\text{g}$	250 $\mu\text{g}$	500 $\mu\text{g}$	1000 $\mu\text{g}$	$IC_{50} \mu\text{g/ml}$
<i>n</i> -butanol	6,64 $\pm$ 1,83	23,63 $\pm$ 6,40	27,15 $\pm$ 4,60	24,84 $\pm$ 1,60	17,28 $\pm$ 5,37	45,04 $\pm$ 2,37	61,37 $\pm$ 1,77	742,73 $\pm$ 3,19 <sup>b</sup>
Acarbose	78,125 $\mu\text{g}$	156,25 $\mu\text{g}$	312,5 $\mu\text{g}$	625 $\mu\text{g}$	1250 $\mu\text{g}$	2500 $\mu\text{g}$	5000 $\mu\text{g}$	$IC_{50} \mu\text{g/mL}$
	27,43 $\pm$ 2,18	38,91 $\pm$ 3,20	54,86 $\pm$ 1,79	67,29 $\pm$ 2,63	80,19 $\pm$ 1,66	85,54 $\pm$ 0,45	91,05 $\pm$ 0,72	275,43 $\pm$ 1,59 <sup>a</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  SD des trois mesures parallèles ; les valeurs avec des lettres en exposant différentes dans la même colonne sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes.

### I.5.2. Evaluation de l'activité anti-cholinestérase

Dans cette étude, l'activité anti-cholinestérase a été évaluée en utilisant l'enzyme acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase (Ellman *et al.*, 1961). Le tableau 29 montre l'activité inhibitrice d'AChE et BChE de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* comparé à celle de la galantamine (standard).

**Tableau 29 : Inhibition de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase par l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens***

Enchantions	AChE		BChE	
	% Inhibition à 200 $\mu\text{g/mL}$	$IC_{50} (\mu\text{g/ml})$	% Inhibition à 200 $\mu\text{g/mL}$	$IC_{50} (\mu\text{g/ml})$
<i>n</i> -butanol	32,30 $\pm$ 3,72	< 200	28,53 $\pm$ 1,56	< 200
Galantamine	94,77 $\pm$ 0,34	6,27 $\pm$ 1,15	78,95 $\pm$ 0,58	34,75 $\pm$ 1,99

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  SD des trois mesures parallèles

D'après les résultats présentés dans le tableau 29, il est constaté que l'extrait *n*-butanol exerce un effet inhibiteur faible vis-à-vis l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase ( $CI_{50}$  supérieure à 200  $\mu\text{g/mL}$ ). Tandis que, la molécule de référence (Galantamine) présente une forte activité inhibitrice sur les deux enzymes ( $CI_{50}= 6,27\pm 1,15$  et  $34,75\pm 1,99 \mu\text{g/mL}$  pour l'AChE et la BChE respectivement).

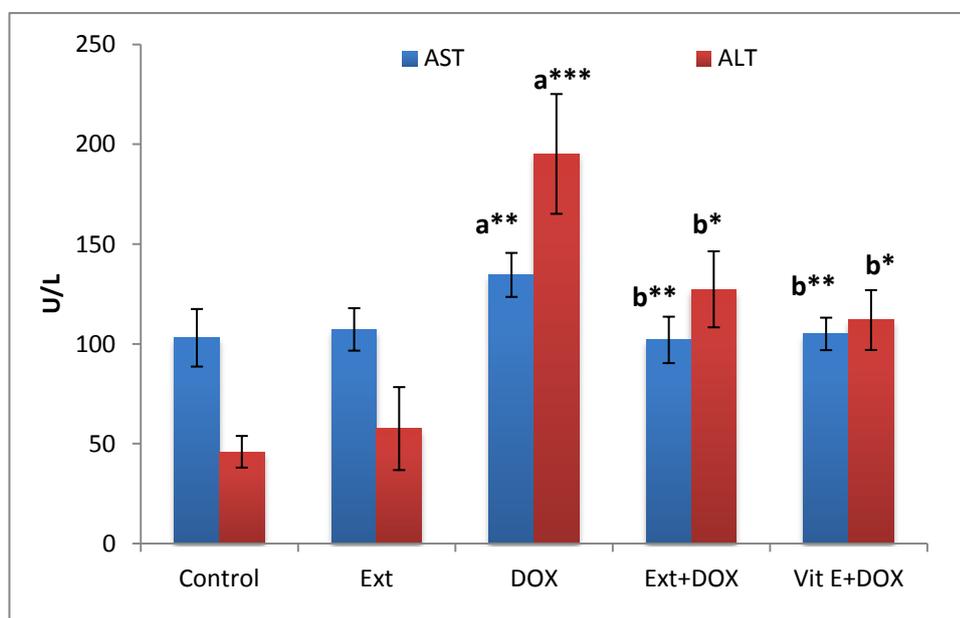
## II. Etude expérimentale *in vivo*

### II.1. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* contre l'hépatotoxicité et la toxicité des testicules induite par la DOX

#### II.1.1. L'effet du traitement sur les marqueurs biochimiques

##### II.1.1.1. Effet sur les taux sériques des enzymes ASAT et ALAT

Les résultats présentés dans la figure 52 indiquent que l'injection intrapéritonéale des rats par la doxorubicine à la dose de 15mg/kg induit une augmentation hautement significative de la teneur plasmatiques des transaminases, l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) ( $134,61 \pm 11,02$  et  $195,21 \pm 31,15$  UI/L respectivement), par rapport aux rats du groupe témoin. Par ailleurs, nous avons enregistré une diminution significative du taux sérique de ces enzymes (ASAT et ALAT) chez les rats traités par la vitamine E et la DOX ( $105,05 \pm 8,13$  et  $112,00 \pm 15,01$  UI/L respectivement) comparés aux rats du groupe traité par la DOX, Le prétraitement des rats par l'extrait *n*-butanol (75 mg/kg) a montré le même effet protecteur que la vitamine E contre l'hépatotoxicité de la DOX ( $102,05 \pm 11,62$  et  $127,39 \pm 19,04$  UI/L, pour l'ASAT et l'ALAT respectivement).

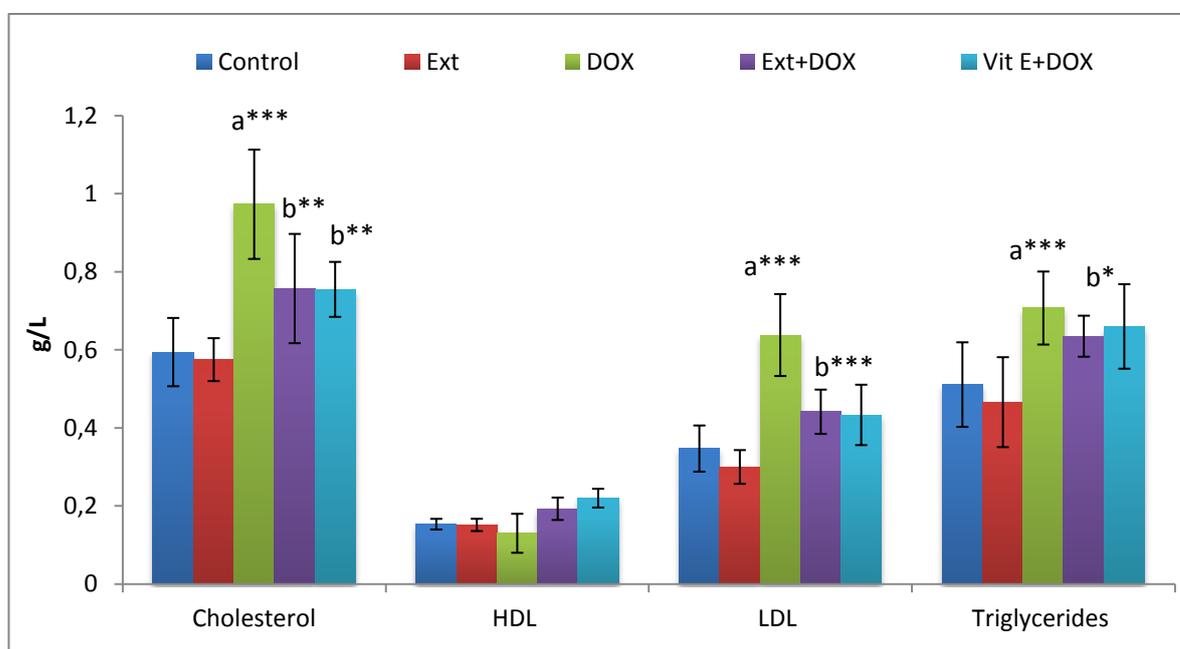


**Figure 52 : Effets de la DOX, de la vitamine E et de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* sur les taux sériques des transaminases (ASAT et ALAT)**

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart-type. a: comparativement au groupe témoin ; b: comparativement au groupe traité par la DOX. Test t de Student : (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

### II.1.1.2. Effet du traitement sur le profil lipidique

Les résultats montrent que le traitement par la DOX induit des changements sur le taux du profil lipidique chez les rats. En effet, chez le groupe traité par la DOX, on observe une augmentation très hautement significative ( $p < 0,001$ ) du niveau de cholestérol, des triglycérides et de LDL et aucun changement significatif du niveau de HDL par rapport aux rats du groupe témoin. Tandis que, chez le groupe traité par la vitamine E associé avec la DOX, le taux du cholestérol, des triglycérides et LDL est diminué de manière significative ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  et  $p < 0,001$  respectivement) par rapport au groupe traité par la DOX. L'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* a montré un effet protecteur similaire à celui de la vitamine E contre les altérations des paramètres lipidiques induite par la DOX (Figure 53).



**Figure 53 : Effets de la DOX, de la vitamine E et de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* sur les taux sériques de cholestérol, de LDL, d'HDL et des triglycérides**

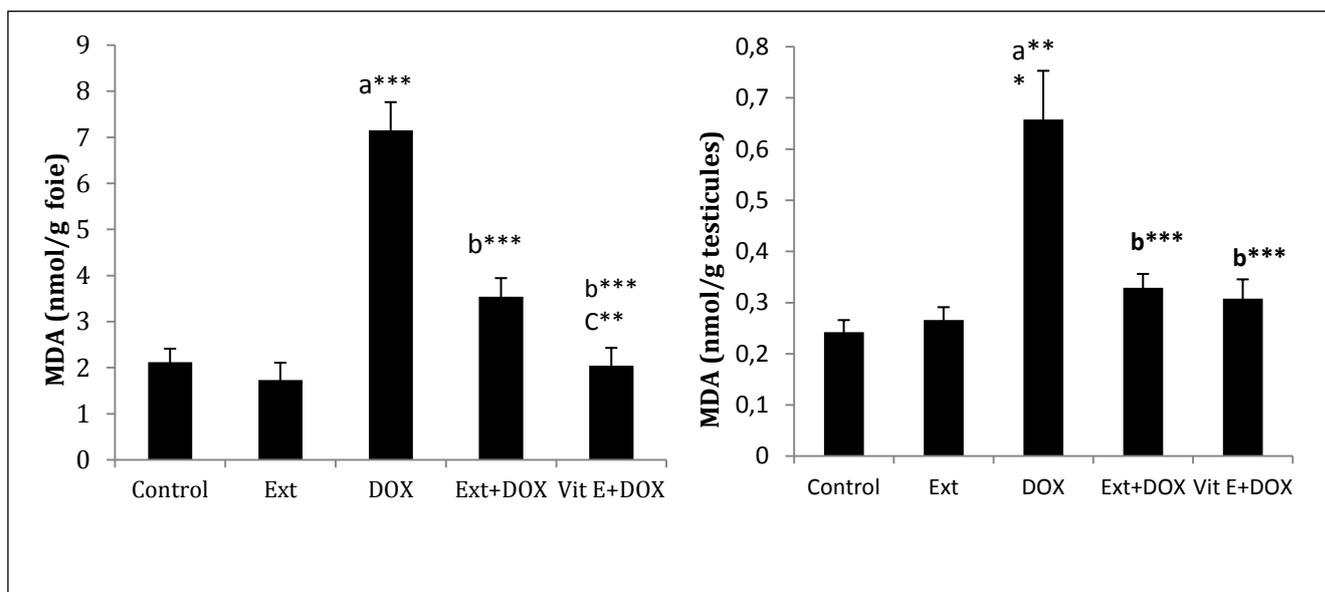
Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart-type. a: comparativement au groupe témoin ; b: comparativement au groupe traité par la DOX. Test t de Student : (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

### II.1.2. Effet du traitement sur les paramètres du stress oxydant

L'effet des différents traitements (DOX, l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* et la vitamine E) sur le malondialdéhyde (MDA), le glutathion réduit (GSH) et la GPx a été évalué au niveau du foie et des testicules des rats.

### II.1.2.1. Effet sur le malondialdéhyde (MDA)

La figure 54 a montré que l'injection intrapéritonéale du DOX (à une seule dose 15 mg/kg) induit une élévation hautement significative ( $p < 0,001$ ) de la concentration du malondialdéhyde au niveau du foie ( $7,15 \pm 0,61$  nmol d'équivalents MDA/g de tissu) et des testicules ( $0,66 \pm 0,055$  nmol d'équivalents MDA/g de tissu) par rapport au groupe témoin ( $2,11 \pm 0,29$  nmol équivalents MDA/g foie et  $0,24 \pm 0,023$  nmol MDA/g testicules). Cependant, le prétraitement des rats avec l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* (75 mg/kg) a réduit significativement ( $p < 0,001$ ) le niveau de peroxydation lipidique (taux de l'MDA) à  $3,54 \pm 0,4$  nmol équivalents MDA/g tissu et  $0,32 \pm 0,02$  nmol équivalents MDA/g tissu, dans les tissus hépatiques et testiculaires respectivement. Par ailleurs, la vitamine E a montré le même effet protecteur que l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* contre la peroxydation lipidique induite par la DOX dans les testicules, et un effet protecteur plus important à celui de l'extrait dans le foie.



**Figure 54 : Effet de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens*, la vitamine E et la DOX sur le taux de l'MDA dans les cellules hépatiques et testiculaires.**

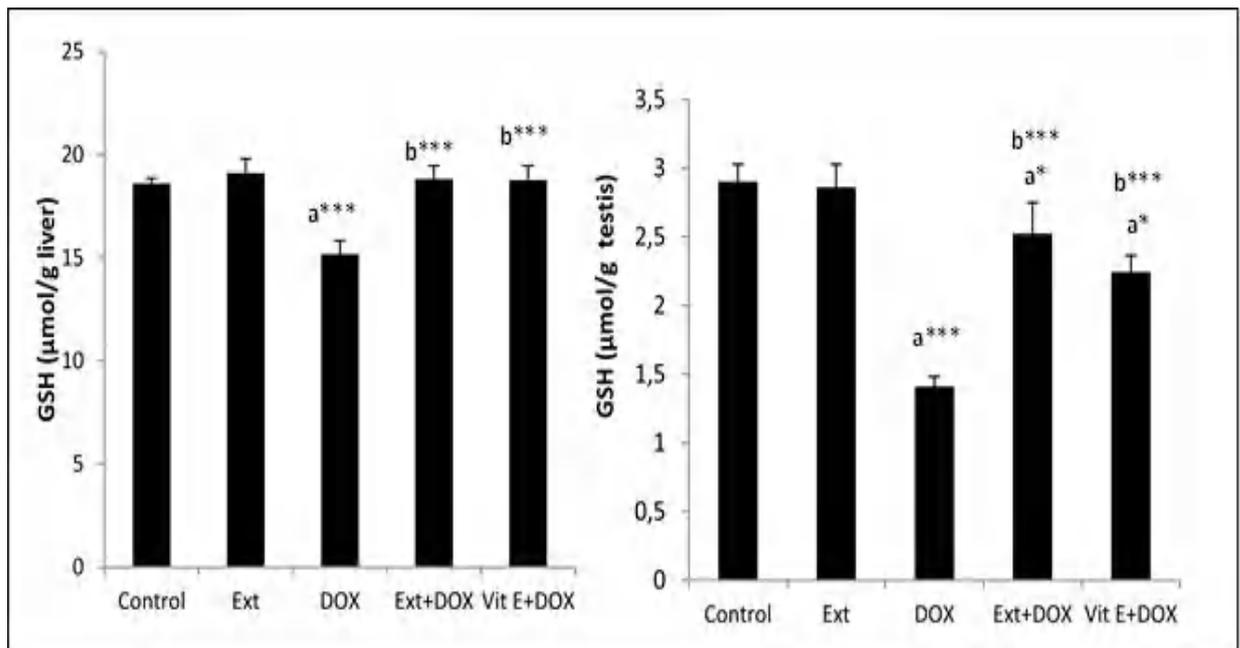
Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart-type. a: comparativement au groupe témoin ; b: comparativement au groupe traité par la DOX ; C: Ext+DOX comparé au groupe Vit E + DOX group. Test t de Student : (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

### II.1.2.2. Effet sur le glutathion réduit (GSH)

Le GSH est un antioxydant cellulaire essentiel qui joue un rôle important dans la protection des cellules contre le stress oxydant (Gaucher *et al.*, 2018). La réduction de la

concentration intracellulaire de GSH dans le foie et les testicules des rats traités par la DOX, indique des dommages dans les cellules hépatiques et testiculaires.

Les résultats illustrés dans la figure 55 montrent que le traitement des rats par la DOX (15 mg/kg) entraîne une diminution significative ( $p < 0,001$ ) de la teneur cellulaire en glutathion réduit au niveau du foie et des testicules ( $15,17 \pm 0,66 \mu\text{mol/g}$  tissu et  $1,41 \pm 0,07 \mu\text{mol/g}$  tissu respectivement) en comparaison avec les rats du groupe témoin ( $18,81 \pm 0,26 \mu\text{mol/g}$  de foie et  $2,90 \pm 0,12 \mu\text{mol/g}$  testicules). Cependant, l'administration de l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* et la vitamine E associés avec la DOX a augmenté significativement ( $p < 0,001$ ) le taux de glutathion par rapport aux rats traités par la DOX. Aucun changement significatif n'a été observé au niveau du GSH chez les rats du groupe traité par l'extrait *n*-butanol seul (75mg/kg) par rapport aux rats témoins.

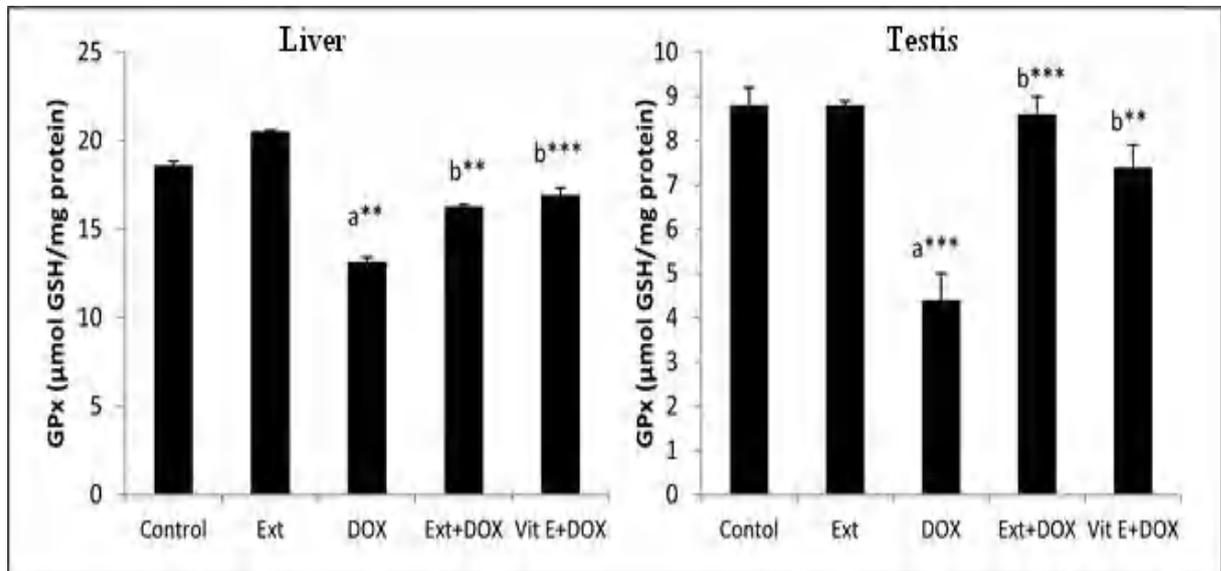


**Figure 55 : Effet de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens*, la vitamine E et la DOX sur la variation de glutathion (GSH) dans les cellules du foie et des testicules.**

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart-type. a: comparativement au groupe témoin ; b: comparativement au groupe traité par la DOX. Test t de Student : (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ).

### II.1.2.3. Effet sur l'activité de la GPx

La figure 56 illustre l'effet de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* sur l'activité enzymatique de la GPx au niveau du foie et des testicules chez les rats recevant la DOX, prétraités ou non par l'extrait *n*-butanol et la vitamine E.



**Figure 56 : Effet de l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens*, la vitamine E et la DOX sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) dans les cellules hépatiques et testiculaires**

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart-type. a: comparativement au groupe témoin ; b: comparativement au groupe traité par la DOX. Test t de Student : (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

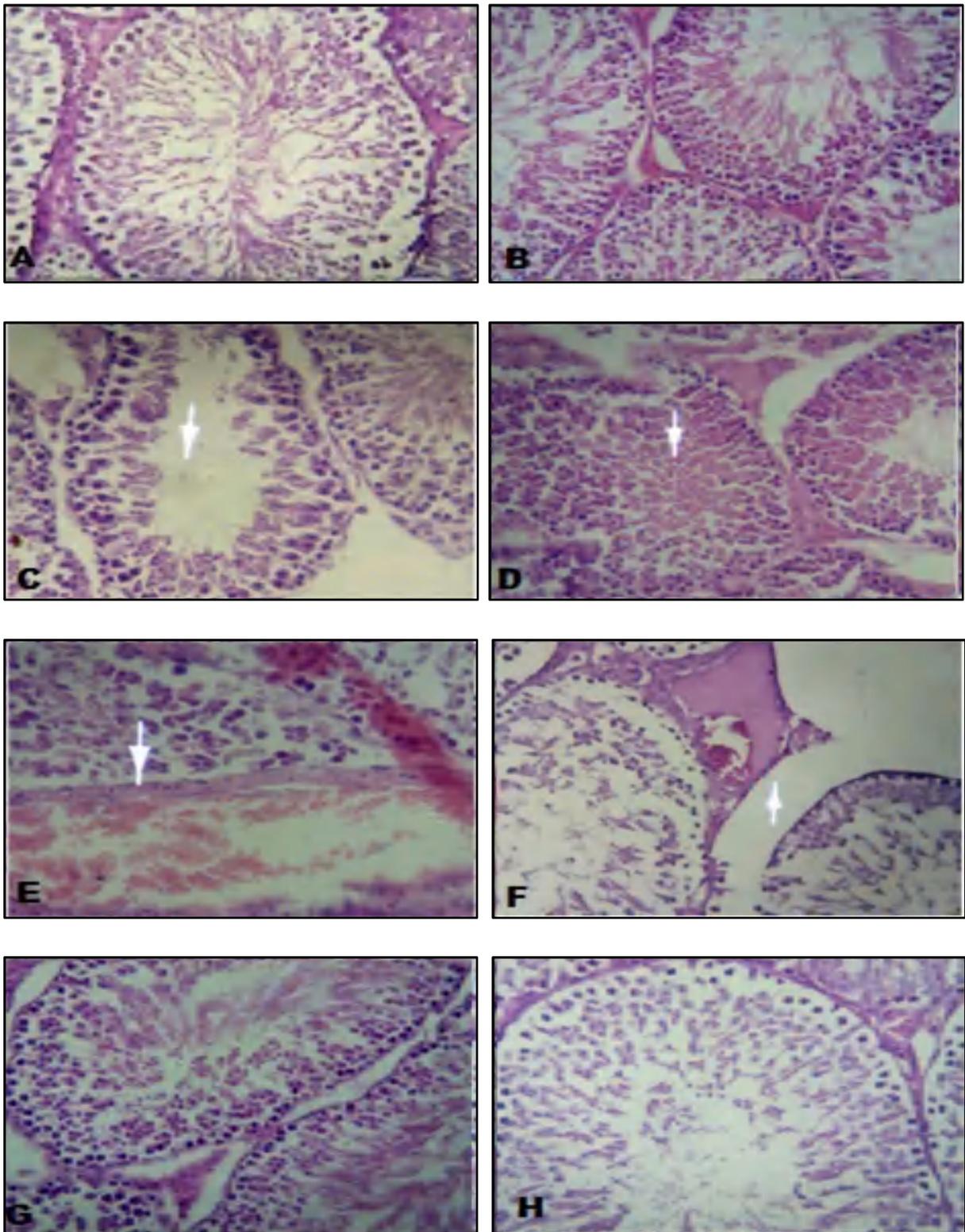
Les résultats ci-dessus montrent clairement que le traitement des rats par la DOX seule (15mg/kg i.p) a causé une déplétion hautement significative ( $p < 0,01$ ) de l'activité enzymatique de la GPx dans le foie et très hautement significative ( $p < 0,001$ ) dans les testicules ( $13,17 \pm 0,24$   $\mu\text{mol GSH} / \text{mg}$  de protéine et  $4,4 \pm 0,6$   $\mu\text{mol GSH} / \text{mg}$  protéine respectivement) par rapport aux rats témoins ( $18,61 \pm 0,3$   $\mu\text{mol GSH} / \text{mg}$  protéine et  $8,8 \pm 0,3$   $\mu\text{mol GSH} / \text{mg}$  protéine, respectivement). Tandis que, les rats prétraités avec l'extrait *n*-butanol et la vitamine E ont restauré l'activité de GPx dans les organes étudiés (foie et testicules) à sa valeur normale.

### II.1.3. Etude histologique

#### II.1.3.1. Etude histologique des testicules

L'observation microscopique des testicules des rats du groupe témoin a révélé une structure testiculaire typique dont les différentes couches tissulaires sont présentes. La structure est notée par une abondance des tubes séminifères très riches en spermatozoïdes endoluminaux,

ce qui indique que la spermatogenèse a été bien conservée (Figure 57 A). De plus, aucune modification histologique n'a été observée dans les testicules des groupes prétraités par l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* par rapport aux rats témoins (Figure 57 B). Cependant, il a été observé chez les rats du lot traité par la DOX (15 mg/kg) des altérations histologiques telles que la nécrose, la détérioration de l'épithélium séminifère avec une spermatogénèse altérée, une nécrose interstitielle et une congestion (Figure 57 C, D, E, F). Le prétraitement avec l'extrait *n*-butanol ou la vitamine E et la DOX a montré une architecture testiculaire presque normale (Figure 57 G, H).



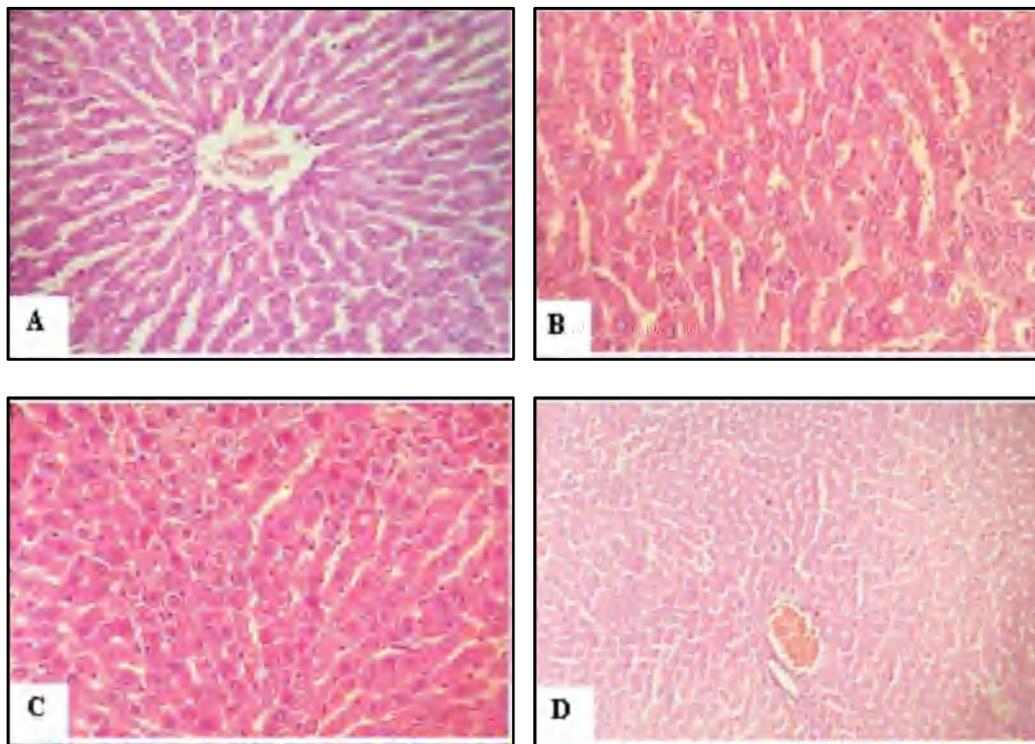
**Figure 57 : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats traités par la DOX (15 mg/kg) et/ou l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* (75 mg/kg) et la vitamine E (100 mg/kg). (A,B) : groupe témoin et groupe traité par l'extrait *n*-butanol ; montrent des caractéristiques normales de l'épithélium séminifère, de la lumière, des cellules de Leydig et du tissu interstitiel. (C, D, E, F) : groupe traité par la DOX, montre un épithélium séminifère déformé avec une spermatogenèse altérée, une nécrose et une congestion veineuse dans la région interstitielle. (G,H) : groupe traité par l'extrait et la Vit E associés avec la DOX, un épithélium séminifère presque normal (G  $\times$  400)**

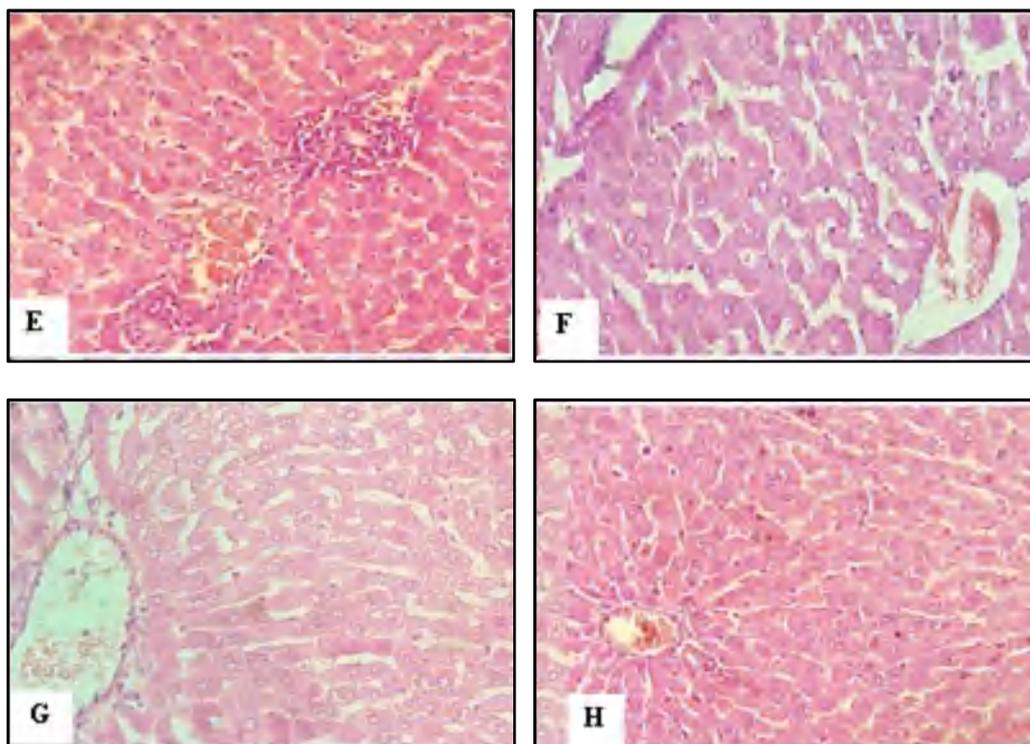
### II.1.3.2. Etude histologique du foie

La structure histologique du foie chez les rats du groupe témoin est représentée par la figure 58. Les résultats montrent une architecture normale du tissu hépatique. En effet, les hépatocytes semblent en bon état avec une disposition régulière et une structure cellulaire intacte, formant des travées bien agencées autour de la veine centrolobulaire (Figure 58 A). De plus, aucune altération n'a été observée dans l'histologie du foie chez le groupe des rats traités par l'extrait *n*-butanol seule (75 mg/kg), son architecture est identique à celui des rats témoins (Figure 58 B).

Chez les rats traités par la DOX (15 mg/kg), les coupes histologiques du foie montrent des altérations histopathologiques sévères, on observe ; des infiltrations des cellules inflammatoires, nécrose hépatocytaire et congestion (Figure 58 C, D, E).

Par ailleurs, on note des améliorations au niveau de l'histoarchitecture du foie chez les rats prétraités par l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* (Figure 58 F,G) ou la vitamine E (Figure 58 H), dont la morphologie uniforme des hépatocytes est proche à celle du groupe témoin





**Figure 58 : Effets de l'extrait *n*-butanol de la plante *Asteriscus graveolens* et la vitamine E sur les changements histologiques du foie suite à la toxicité par la DOX.**

*A : Contrôle ; B : Extrait n-butanol d'A. graveolens ; C-E : DOX ; F-G : Extrait + DOX ; H : Vit E+DOX. Congestion (D,E) , Inflammation (E), Nécrose (C) (G × 400)*

## II.2. Evaluation de l'activité anti inflammatoire

### II.2.1. Inhibition de l'œdème de l'oreille induit par le xylène

L'effet anti-œdémateux de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* a été évalué en utilisant le modèle de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris. Les résultats sont représentés par les Figures 59 et 60.

Les souris du groupe témoin ayant reçu localement 300 µl de xylène sur la face interne et externe de l'oreille droite ont développé au bout d'une demi-heure un œdème caractérisé par une augmentation du poids de l'oreille (33,93 mg) (figure 59).

L'administration de l'aspirine (300 mg/kg) par injection intrapéritonéale une demi-heure avant l'induction de l'œdème provoque une diminution significative ( $p < 0,01$ ) de l'œdème de l'oreille (poids = 12,27 mg) comparé à celui traité par le xylène, dont le pourcentage d'inhibition de l'œdème chez les souris traitées par l'aspirine atteint 64,01 %.

Le traitement des souris par l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* aux doses de 50 et 100 mg/kg entraîne une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de l'inflammation par rapport aux

souris traiter par le xylène. Cette inhibition est de 34,51 et 41,89 % respectivement. Nous observons que l'effet anti-inflammatoire assuré par la dose de 100 mg/kg est meilleur que celui assuré par la dose 50 mg/kg.

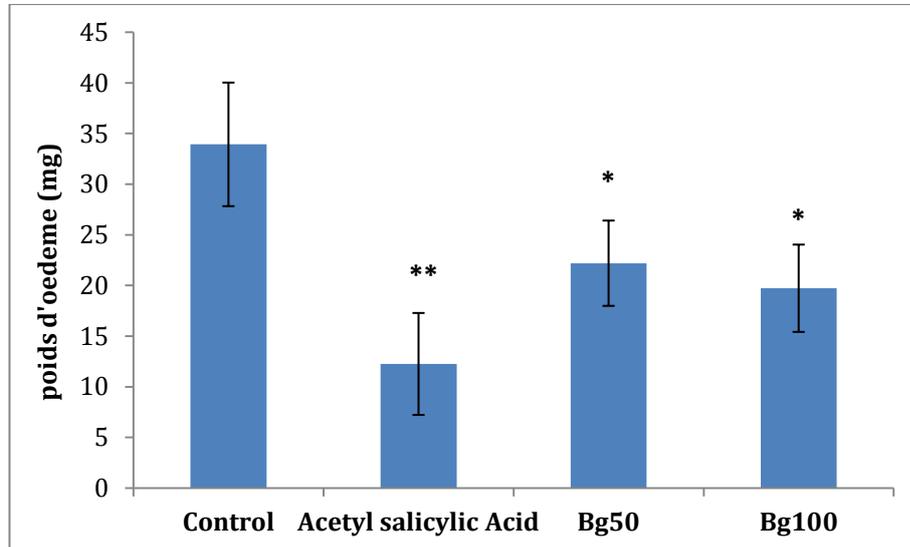


Figure 59 : Effet de l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* (50 et 100 mg/kg) sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris

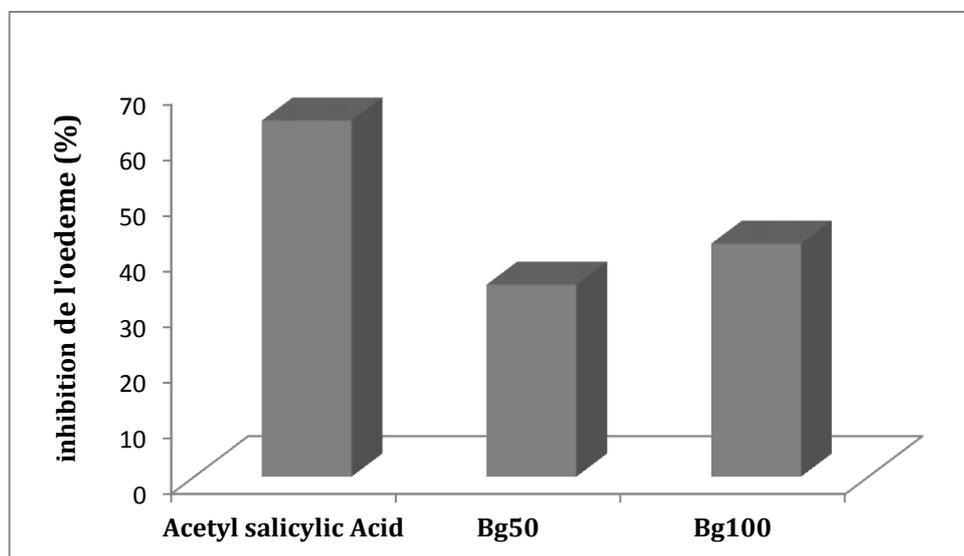


Figure 60 : Inhibition de l'œdème chez les différents groupes des souris, en présence d'un prétraitement par l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* (50 mg/kg et 100 mg/kg) et la molécule de références (aspirine 300mg/kg).

## II.2.2. Inhibition de l'œdème induit par le formol

L'œdème a été induit au niveau de la patte postérieure droite du rat. La variation de l'œdème a été évaluée une demi-heure après l'administration intrapéritonéale des différents produits. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de l'aspirine (molécule de référence), en raison de 300 mg/kg et à ceux des témoins œdémateux (Figure 61, 62).

L'injection de 0,1 ml de formol (3,5%) dans la patte postérieure droite des rats provoque une inflammation caractérisée par un œdème visible ( $2,24 \pm 0,07$  mm) dans l'heure qui suit l'injection. Cette inflammation augmente progressivement, et après cinq heures, l'œdème atteint une intensité maximale (mesuré à  $2,58 \pm 0,12$  mm) (Figure 61).

L'administration de l'aspirine (300 mg/kg) prévient de façon significative l'évolution de l'inflammation au niveau de la patte des rats à partir de la première heure et atteint son maximum d'activité à la 5<sup>ème</sup> heure après l'administration du formol (PI % =  $53,62 \pm 4,68$ ).

L'administration de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* aux doses de 50 et 100 mg/kg prévient de manière significative l'œdème plantaire chez les rats à partir de la première heure du traitement jusqu'à la 5<sup>ème</sup> heure avec un pourcentage d'inhibition de  $55,17 \pm 3,52$  et  $54,26 \pm 1,36$  % extraits 50 et 100 mg/kg respectivement (Figure 62).

L'évaluation du pourcentage d'inhibition de l'œdème montre que l'extrait d'*A. graveolens* possède une activité anti-inflammatoire qui peut être due à la richesse de cet extrait en composés bioactifs, principalement les polyphénols et les flavonoïdes.

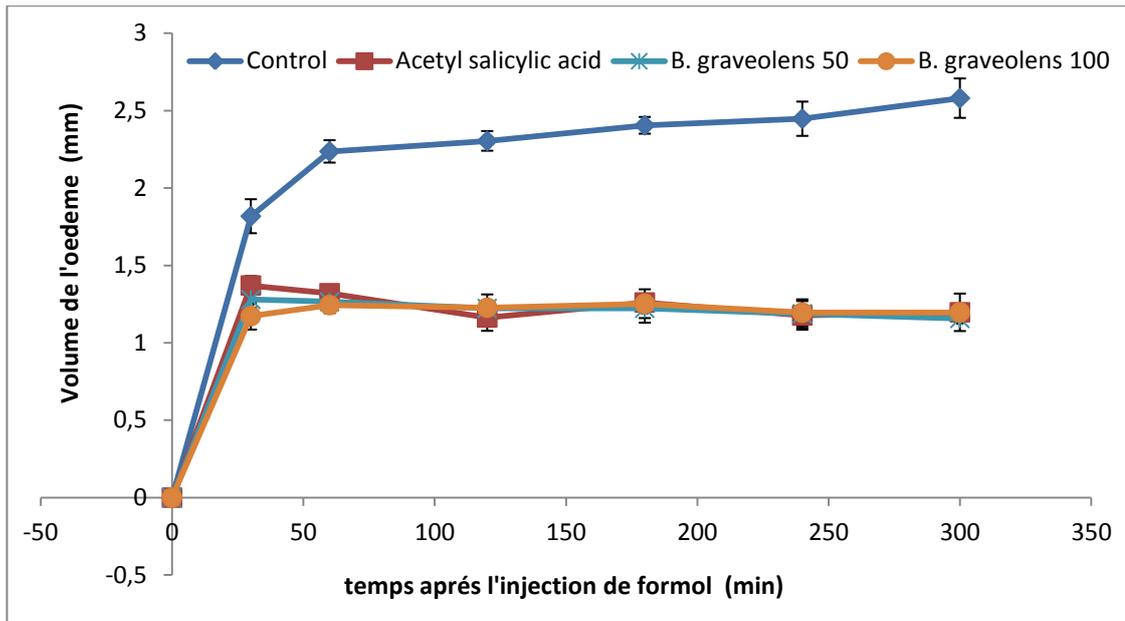


Figure 61 : Courbe de l'évolution de l'œdème en présence d'un prétraitement une demi-heure avant l'injection de formol (3,5 %), chez 4 lots de rats : Lot de référence (témoin négatif : eau physiologique), Lot témoin positif : aspirine, Lot de l'extrait *n*-butanol 50 mg/kg, et Lot de l'extrait 100 mg/kg de la plante *A. graveolens*. Chaque point représente une moyenne de 5 animaux.

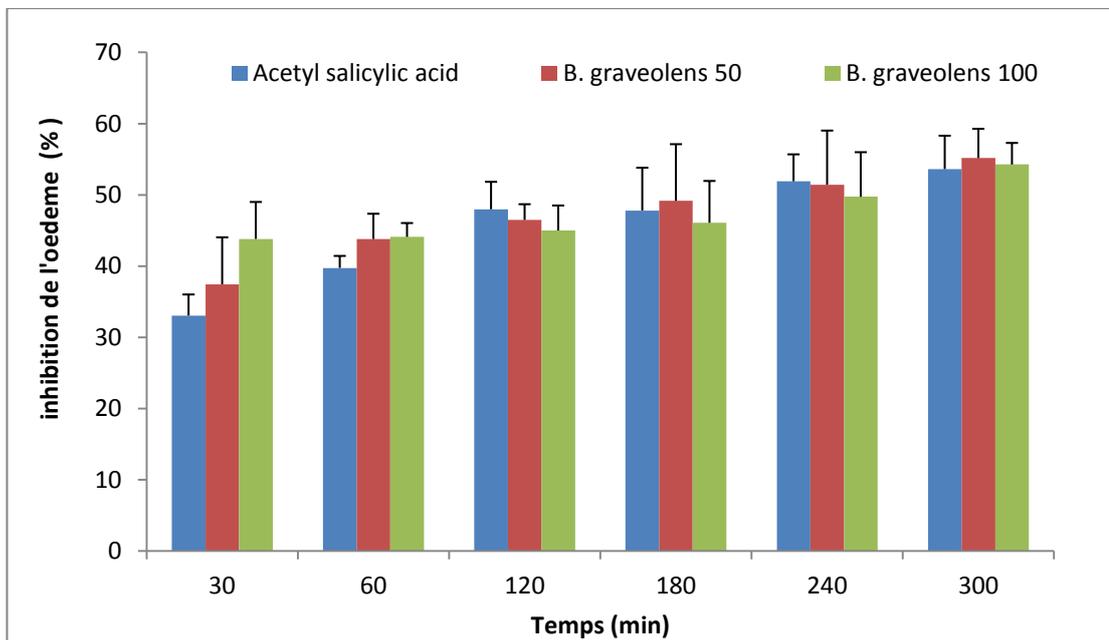


Figure 62 : Inhibition de l'œdème du pied chez les différents lots des rats en présence d'un prétraitement par l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* (50 mg/kg et 100 mg/kg) et la molécule de références (aspirine 300mg/kg).

## ➤ Discussion

Malgré la valeur thérapeutique de la DOX, il exerce des effets toxiques importants sur divers organes tels que le cœur, le foie, les poumons, les reins, les cellules sanguines et les testicules (Injac et Strukelj, 2008). Le stress oxydatif, l'inflammation et l'apoptose sont les mécanismes les plus fréquemment proposés par lesquels la DOX exerce ses effets cytotoxiques dans les tissus sains (Pugazhendhi *et al.*, 2018). L'effet toxique principal de la DOX résulte d'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via différents mécanismes. L'un de ces mécanismes correspond à une diminution de l'expression de la défense antioxydante cellulaire. Un autre processus pourrait consister à déclencher une réaction de type Fenton en générant ainsi des radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\circ$ ) hautement réactifs et toxiques. Le troisième mécanisme implique des cycles redox entraînant une production persistante d'anions superoxydes et de ROS secondaires (comme le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le  $\text{OH}^\circ$  et le peroxydrite).

De nombreuses stratégies ont récemment été étudiées pour minimiser les effets secondaires de la DOX. Des recherches antérieures suggéraient que des produits naturels pourraient être associés à la DOX afin de réduire les effets secondaires toxiques et la résistance médicamenteuse sans altérer l'activité antitumorale de la DOX. Les études de Tayeh *et al.* (2018) ainsi que Tayeh et Ofir (2018) ont rapporté que les extraits d'*A. graveolens* sont cytotoxiques pour les cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines, et peuvent agir en synergie avec la DOX sans diminuer sa cytotoxicité envers les cellules cancéreuses (Tayeh *et al.*, 2018 ; Tayeh et Ofir, 2018). Dans ce contexte, cette étude est la première à explorer le rôle protecteur de la plante *A. graveolens* contre les altérations biochimiques et histopathologique des tissus hépatiques et testiculaires induites par la DOX. Dans un premier temps de cette partie, l'activité antioxydante a été évaluée d'abord *in vitro*, en utilisant différentes méthodes afin de vérifier la capacité antioxydante de l'extrait *n*-butanol de la plante étudiée.

L'étude quantitative de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens*, effectuée via des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des flavonols. Le choix de ces substances repose principalement du fait de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* contient une grande quantité des polyphénols, des flavonoides et des flavonols avec une teneur de  $749,58 \pm 1,03 \mu\text{g EAG/mg Extrait}$ ,  $534,58 \pm 15,02$  et  $161,396 \pm 6,60 \mu\text{g QE/mg Extrait}$  respectivement.

Si on compare ces résultats avec ceux de la bibliographie, on constate que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes de notre extrait est bien supérieure par rapport à celle trouvée par Ramdane *et al.*, (2017) qui ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle d'*A. graveolens* représente l'extrait le plus riche parmi tous les extraits testés (MeOH, *n*-BuOH, EtOH) avec une teneur de  $287.22 \pm 1.94 \mu\text{g EAG/mg Extrait}$  et  $281.96 \pm 15 \mu\text{g QE/mg Extrait}$  pour les polyphénols et les flavonoïdes respectivement. Cependant, la comparaison de ces résultats avec la littérature devient complexe en raison de l'utilisation de différentes méthodes d'extraction, ce qui diminue la fiabilité des comparaisons entre les études.

Les études sur l'activité antioxydante des extraits naturels sont complexes en raison de nombreux processus d'oxydation et de la diversité chimique des antioxydants, comprenant à la fois des composants hydrophiles et hydrophobes. L'évaluation de la capacité antioxydante totale ne peut être réalisée au moyen d'une seule réaction chimique. Ainsi, plusieurs types de systèmes radicalaires sont nécessaires pour obtenir une compréhension approfondie de l'activité antioxydante globale (Hadjadj *et al.*, 2020). Dans ce contexte, sept méthodes distinctes ont été appliquées pour étudier l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens*. Les propriétés antioxydantes de la plante ont été évaluées par les tests DPPH, ABTS et galvinoxyl (GOR). Le DPPH, en tant que radical libre stable, présente une bande d'absorption à 517 nm. Son mécanisme repose sur l'acceptation d'un atome d'hydrogène d'un antioxydant, induisant une réduction en DPPH.H. Cette transformation s'accompagne d'un changement de la couleur du violet au jaune, avec une baisse simultanée de l'absorbance. Par ailleurs, l'ABTS présente l'avantage d'être soluble dans les solvants aqueux et organiques, ce qui en fait un outil utile pour évaluer les propriétés antioxydantes des échantillons dans divers milieux. Nous avons également évalué le pouvoir réducteur de notre extrait à l'aide de plusieurs tests CUPRAC, FRAP et phénanthroline. Le test de FRAP et phénanthroline impliquent la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ , tandis que la méthode de CUPRAC vise la réduction du Cu(II) en Cu(I) par les antioxydants présents dans l'échantillon.

Les résultats obtenus par ces essais démontrent clairement que l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* présente une forte activité scavenger des radicaux libres, soit vis-à-vis le radical DPPH, ABTS, ou même le radical galvinoxyl. Ces résultats sont en accord avec les études de Ramadane *et al.*, (2017) qui ont indiqué l'effet de piégeage des radicaux DPPH par des extraits de la partie aérienne d'*A. graveolens*, cette étude a montré que tous les extraits testés (MeOH, AcOEt, *n*-BuOH, aqueux) ont une forte activité antiradicalaire vis-à-vis le radical

DPPH, mais la meilleure activité a été enregistrée par l'extrait *n*-butanol avec une  $CI_{50} = 9,66 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ . Une autre étude de Gad *et al.*, (2022) a mis en évidence que l'extrait méthanolique de la plante *A. graveolens* présente une activité antioxydante puissante dans les deux tests DPPH et l'ABTS, avec une valeur de  $CI_{50} = 37,81 \pm 0,07$  et  $25,81 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$  respectivement. Cette activité antiradicalaire observée est inférieure à celle de notre extrait. Toutefois, il est important de noter que l'utilisation des protocoles d'activités différents diminue la fiabilité d'une comparaison entre deux études.

L'activité antioxydante de l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* peut être attribuée à la présence de composés phytochimiques dans l'extrait, tels que les flavonoïdes, les polyphénols et d'autres antioxydants naturels, dont l'activité antiradicalaire a déjà été largement documentée (Liang et kits, 2014 ; Russo, 2018 ; Guven *et al.*, 2019). Plusieurs études ont rapporté qu'il existe une corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante (yaici *et al.*, 2019 ; Haddouchi *et al.*, 2018). En fait, Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, sont identifiés comme des agents antioxydants potentiels capables de neutraliser les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. La capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres s'explique par leur faible potentiel redox, les rendant thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres par le transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupes hydroxyle (Popovici *et al.*, 2010 ; Ghedadba *et al.*, 2015).

Le test CUPRAC ainsi que la méthode de la phénanthroline sont également utilisés dans cette étude pour évaluer l'activité antioxydante et le pouvoir réducteur de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens*. La présence de réducteurs dans l'extrait étudié permet de réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  qui forme un complexe stable avec la phénanthroline rouge-orangé. Ce complexe est détecté par spectrophotométrie, permettant la mesure des ions ferreux et la détermination du pouvoir réducteur de l'extrait testé. Le test de réduction CUPRAC est basé sur le suivre de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Cu (II)-Néocuproïne. En présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-Néocuproïne est réduit, cette réaction est mesurée à une longueur d'onde de 450 nm (Massoud *et al.*, 2022). Le dosage de test CUPRAC et la méthode de la phénanthroline sont mesuré en valeur d' $A_{0,5}$  en présence de BHA et BHT comme standards. Les résultats obtenus démentent et confirment que l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* est un réducteur efficace, il agit non seulement en réduisant les ions ferrique, mais également en tant que réducteur puissant du cuivre ( $A_{0,5} = 7,53 \pm 0,77$  et  $9,04 \pm 0,53 \mu\text{g/ml}$  pour le test phénanthroline et CUPRAC respectivement). Le test CUPRAC présente des avantages par rapport aux autres

méthodes basées sur le transfert d'électrons en raison de l'utilisation d'une valeur de pH équivalente au pH physiologique. En outre, cette méthode offre la possibilité de tester à la fois les antioxydants hydrophiles et lipophiles (Apak *et al.*, 2016). Plusieurs caractéristiques des polyphénols influent sur la capacité réductrice du complexe néocuproïne-cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), notamment le nombre et la position des groupements hydroxyles, ainsi que le degré de conjugaison de la molécule entière. Ces constatations suggèrent une corrélation entre les polyphénols et le test CUPRAC (Apak *et al.*, 2004). Il est important de noter qu'il n'y a aucune recherche dans la littérature n'a abordé l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait *n*-BuOH d'*A. graveolens* en utilisant les tests CUPRAC, phénanthroline et galvinoxyl.

Le test FRAP représente une autre méthode utilisée pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens*. Nous avons examiné la transformation de l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  en présence d'extrait, ce qui agit comme un indicateur de son activité antioxydante. La mesure de la transition de la couleur jaune du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ /ferricyanure vers le bleu de Prusse, sous forme ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a été réalisée à une longueur d'onde de 700 nm (Bammou *et al.*, 2020). Les résultats obtenus montrent que l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* exerce un effet réducteur plus important avec une valeur d' $A_{0,5} = 20,89 \pm 2,01 \mu\text{g/ml}$ . Cette activité est supérieure à celle de standard  $\alpha$ -tocophérol ( $A_{0,5} = 34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/ml}$ ). Nos résultats sont en accord avec ceux de Haddouchi *et al.* (2018) qui ont montré que l'extrait méthanolique d'*A. graveolens* présente une capacité de réduction supérieure à celle du standard BHT utilisé. Le pouvoir réducteur de l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* observé dans ce test est probablement dû à la présence de molécules ayant une propriété réductrice. Ces molécules semblent inhiber les réactions en chaîne initiées par les radicaux libres en donnant un atome d'hydrogène ou d'électron (Prasad *et al.*, 2010). Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs capacités à céder des électrons. Notre extrait renferme divers flavonoïdes, notamment la rutine qui présente une forte capacité réductrice. Il est également riche en acides phénoliques, capables de neutraliser les radicaux libres en les transformant en produits plus stables, bloquant ainsi les réactions en chaîne de l'oxydation (Gad *et al.*, 2022).

La peroxydation lipidique est un processus généré naturellement en petites quantités dans l'organisme, principalement par l'effet de plusieurs espèces réactives de l'oxygène (radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène, etc.). Ces espèces réactives de l'oxygène attaquent facilement les acides gras polyinsaturés de la membrane lipidique (Amrani *et al.*, 2017). La peroxydation des lipides génère plusieurs produits de dégradation tels que le malondialdéhyde (MDA), elle est

considérée comme une cause importante de destruction de la membrane et de dommages cellulaires (Amrani *et al.*, 2019). Dans la présente étude, nous avons évalué l'effet de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* contre la peroxydation lipidique induite dans l'homogénat de jaune d'œuf par le FeSO<sub>4</sub>, un système générateur d'espèces réactives de l'oxygène. La peroxydation lipidique dans le jaune d'œuf induite par le système FeSO<sub>4</sub> est le résultat net des radicaux hydroxyles médiés par le fer. Cela peut être réalisé en piégeant les radicaux hydroxyles ou en chélatant les ions fer impliqués dans l'initiation de la réaction de fenton (Gangwar *et al.*, 2014). L'extrait *n*-butanol et la vitamine C (standard) ont inhibé la peroxydation lipidique de manière dose-dépendante. La vitamine C a présenté une activité hautement significative (CI<sub>50</sub> = 20,64 ± 2,33 µg/ml) par rapport à l'extrait (CI<sub>50</sub> = 467,5 ± 8,92 µg/ml). L'extrait *n*-BuOH de la plante *A. graveolens* a démontré des effets anti-peroxydation lipidique modérés, qui peuvent être bénéfiques pour prévenir l'évolution de diverses maladies liées au stress oxydatif telles que l'inflammation et le cancer. Les composés phénoliques occupent une place importante dans l'activité antioxydante des extraits végétaux. Les flavonoïdes agissent en tant que puissants chélateurs de métaux, inhibant ainsi la peroxydation lipidique (Haddouchi *et al.*, 2016; Ramdane *et al.*, 2017).

Les écrans solaires sont spécialement formulés pour préserver la peau des effets nuisibles des rayons UV. Un SPF plus élevé signifie une protection accrue contre les coups de soleil, car il indique la capacité de l'écran solaire à bloquer les rayons UVB responsables des brûlures. Il est essentiel de choisir un écran solaire avec un large spectre pour également protéger contre les rayons UVA associés au vieillissement cutané (Mishra *et al.*, 2012). La détermination du facteur de protection solaire (SPF) constitue la méthode ultime pour évaluer l'efficacité de la formulation d'un écran solaire, devenant ainsi une norme internationale pour mesurer l'efficacité des produits de protection solaire contre les rayons UV nocifs. Récemment, une attention significative a été portée aux composés naturels en tant qu'agents protecteurs (Khazaeli *et al.*, 2010). Les composés phénoliques pourraient être bénéfiques pour prévenir la formation de radicaux libres d'oxygène induite par les UV et la peroxydation des lipides des processus associée à des conditions pathologiques comme le cancer de la peau. De plus, leur activité antioxydante présente également une grande importance dans la protection contre les rayons UV (Kittiwannachot *et al.*, 2008). Dans ce contexte, notre étude actuelle souligne l'importance de la plante *A. graveolens* comme une source prometteuse de nouvelles molécules photoprotectrices et antioxydante. L'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* a présenté une plus forte activité photoprotectrice et pourrait être utilisé dans les formulations des produits de protection solaire pour prévenir les coups de

soleil cutané. La forte teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes de l'extrait *n*-butanol peut contribuer aux valeurs élevées du SPF. Une concentration élevée de ces composés tels que l'apigénine, la quercétine et l'acide caféique dans la plante étudiée peut également servir à prévenir la génération de radicaux libres induite par les rayons UV (Alilou *et al.*, 2014 ; Gad *et al.*, 2022).

Une consommation élevée de glucides est inévitablement associée à un risque accru d'obésité et de diabète de type 2. L' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase sont deux classes d'enzymes responsables de la digestion des glucides entraînant des niveaux élevés de glucose postprandiale dans l'organisme. L'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes de digestion des glucides issus de ressources naturelles pourrait être une stratégie possible pour bloquer l'absorption des glucides alimentaires et présenter une alternative économique aux médicaments hypoglycémisants synthétiques par voie orale avec moins d'effets indésirables (Amrani *et al.*, 2021). Plusieurs études sur les extraits de plantes, appartenant à la famille des Asteraceae et susceptibles de contribuer au traitement du diabète, se sont concentrées sur l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase. Cette enzyme catalyse la digestion des glucides en glucose (Yang *et al.*, 2011 ; Thi Luyen *et al.*, 2013 ; Ben Sassi *et al.*, 2018). Au cours de cette étude, nous avons examiné l'effet inhibiteur de l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* sur l' $\alpha$ -glucosidase afin d'élucider le potentiel de cette plante en tant qu'agent naturel pour réduire l'hyperglycémie postprandiale. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* présente une activité inhibitrice vis-à-vis l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase. Ceci peut être attribué à la présence de plusieurs substances dans l'extrait, notamment les composés phénoliques et les flavonoïdes qui pourraient être responsables de leur activité antidiabétique. Ces résultats concordent avec les études menées par Amrani *et al.*, (2021), qui ont examiné l'activité inhibitrice de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase des extraits des feuilles et des fleurs de la plante *Chrysanthemum fontanesii*, appartenant à la même famille des Astéracées. Ils ont montré que cette plante a un effet inhibiteur significativement plus élevé que l'acarbose sur l' $\alpha$ -glucosidase, suggérant que les extraits de *C. fontanesii* pourraient contrôler le diabète en réduisant l'hyperglycémie postprandiale.

Pour évaluer la toxicité générée par la DOX chez les rats, le médicament est administré à une dose unique de 15 mg/kg par voie intrapéritonéale afin d'induire une toxicité aiguë (Bandari *et al.*, 2013; Djebbari *et al.*, 2017 ; Laraba *et al.*, 2022). Pendant cette évaluation de toxicité, les activités enzymatiques de l'ASAT et de l'ALAT, considérés comme des biomarqueurs très sensibles directement liés à l'étendue des dommages hépatiques et de la toxicité, sont examinées,

car ils sont présents dans le cytoplasme et libérés dans la circulation après une atteinte cellulaire (Soudani *et al.*, 2011). Nos résultats indiquent clairement l'apparition d'une toxicité hépatique sévère suite au traitement à la DOX. En effet, une augmentation hautement significative des niveaux des transaminases (ASAT et ALAT) a été observée chez les rats traités par la DOX (15 mg/kg) par rapport aux rats témoins. Ces résultats concordent avec les études antérieures de (Zhao *et al.*, 2012; Mete *et al.*, 2016 ; Wali *et al.*, 2020), qui ont montré que l'augmentation de l'activité de ces enzymes dans le plasma, est un indicateur évident de la toxicité hépatique causée par la DOX. Cette augmentation peut être principalement attribuée à la génération importante de radicaux libres issue du métabolisme de la DOX, ces derniers attaquant les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et provoque la peroxydation lipidique, entraînant des altérations structurelles et fonctionnelles des membranes. Ces dommages sont associés à la lyse des cellules hépatiques et donc la libération des enzymes intracellulaires dans la circulation sanguine (Lin *et al.*, 2008).

Dans cette étude, le traitement des rats par l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* à la dose de 75 mg/kg réduit le taux des transaminases. Cela suggère que cet extrait offre une protection aux hépatocytes contre les agressions des radicaux libres, tout en réduisant les fuites d'enzymes intracellulaires et en préservant l'intégrité de la membrane plasmique. En effet, il a été rapporté que les extraits des plantes comme *Moricandia arvensis* et *Helianthemum confertum* diminuent le taux des transaminases hépatiques (ASAT et ALAT) chez les rats intoxiqués par la DOX (Djebbari *et al.*, 2017; Laraba *et al.*, 2022).

L'évaluation des lipides sanguins constitue une méthode fiable pour détecter d'éventuelles anomalies dans le profil lipidique ou une dyslipidémie associée à une altération hépatique. La majeure partie du cholestérol dans le corps provient du foie et est transportée dans le plasma par diverses lipoprotéines, notamment les lipoprotéines de haute densité (HDL). Ces dernières récupèrent l'excès du cholestérol, le ramenant au foie pour subir des modifications avant son élimination. Le dosage des triglycérides, principalement synthétisés au niveau hépatique, est un examen complémentaire au dosage du cholestérol. Dans la présente étude, l'administration de la DOX modifie le profil lipidique. En effet, notre étude a montré que les taux plasmatiques du cholestérol, des LDL et des triglycérides sériques étaient significativement augmentés chez les rats traités par la DOX (15 mg/kg). Nos résultats sont en accord avec les études de Haybar *et al.*, 2019, qui ont démontré que la DOX augmente le taux de ces paramètres lipidiques.

La toxicité induite par la DOX résulte principalement du stress oxydant. Ce phénomène se manifeste par deux mécanismes distincts : la réduction de la structure quinone de la DOX par l'enzyme NADH déshydrogénase, engendrant une semi-quinone radicalaire et la formation de radicaux superoxydes ; et l'association directe entre la DOX et les ions fer, conduisant à la création d'un complexe organométallique réductible, qui génère par la suite des radicaux libres (Xu *et al.*, 2005; Delemasure *et al.*, 2006). Afin d'évaluer ce stress oxydatif induit par la DOX dans les tissus hépatiques et testiculaires, nous avons investigué les marqueurs tels que le malondialdéhyde (MDA), le glutathion réduit (GSH), et l'activité des enzymes antioxydantes (GPx).

La peroxydation lipidique est un processus causé par les radicaux libres, qui conduit à la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés au sein des membranes avec, la production d'aldéhydes réactifs notamment le malondialdéhyde (MDA) (Mazunder *et al.*, 2005). Le malondialdéhyde, ayant des effets cytotoxiques par la formation d'adduits et de pontages inter et intrabins avec l'ADN, et peut être considéré comme le principal bio-marqueur du stress oxydant (Favier, 2003 ; Milane, 2004). Dans notre étude, nous avons noté une augmentation hautement significative ( $p < 0,001$ ) de la teneur en MDA dans le foie et les testicules chez les rats traités par la DOX (15 mg/kg) par rapport aux rats témoins. Cette augmentation indiquant une peroxydation des lipides accrue. Il est largement reconnu que la peroxydation des acides gras polyinsaturés présents dans les phospholipides membranaires entraîne une altération des fonctions membranaires, notamment une réduction de la fluidité et l'inactivation des récepteurs ainsi que des enzymes situés au niveau de la membrane ce qui augmente leur perméabilité (Su *et al.*, 2016).

Le glutathion (GSH), l'une des plus importantes molécules impliquées dans la défense antioxydante cellulaire, il joue un rôle crucial en synergie avec des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion S-transférase (GSH-ST) et la catalase (CAT). Ces enzymes sont essentielles pour éliminer efficacement les radicaux libres toxiques générés par le stress oxydant dans l'organisme (Wu *et al.*, 2014 ; Abd\_Allah *et al.*, 2015). Les résultats de la présente étude ont révélé une réduction importante du taux de GSH et l'activité de la GPx au niveau du foie et des testicules des rats traités par une seule dose (15 mg/kg) de DOX, en comparaison avec les rats du groupe témoin. Ces résultats sont en accord avec ceux de nombreuses autres études (Ismail, 2016 ; Nasr, 2017 ; Olusoji *et al.*, 2017 ; Djebbari *et al.*, 2017 ; Molehin *et al.*, 2018) qui ont également montré que le traitement

par la DOX provoque une diminution significative du taux de glutathion réduit et l'activité de la glutathion peroxydase accompagné par une augmentation de la peroxydation lipidique dans les mêmes tissus étudiés. La diminution du glutathion (GSH) dans le foie et les testicules des rats intoxiqués par la DOX est probablement due à une augmentation de son utilisation par les cellules pour détoxifier les métabolites réactifs toxiques de la DOX, ainsi qu'à une réduction de la synthèse du GSH ou à une augmentation de son oxydation en GSSG oxydé induite par les radicaux libres pendant le stress oxydant causé par la DOX. La réduction du taux de GSH pourrait être responsable de la baisse observée de l'activité du GPx (Vardi *et al.*, 2009).

Les résultats de notre étude ont démontré que l'administration de DOX a entraîné des diminutions significatives du niveau de GSH et de l'activité de la GPx, mais a provoqué des augmentations significatives des niveaux de MDA ainsi que des taux biochimiques de LDL, de cholestérol, des triglycérides, d'ASAT et d'ALAT. Ces observations sont en concordance avec les travaux récents menés par Laraba *et al.* (2022), qui ont mis en évidence des élévations significatives des niveaux sériques de biomarqueurs de lésions hépatiques (ASAT et ALAT) et des indicateurs de stress oxydatif suite à l'administration de DOX à des rats *Wistar albinos*. Nos résultats sont également en accord avec d'autres études (Rashid *et al.*, 2013 ; Djebbari *et al.*, 2017), confirmant les effets néfastes de la DOX sur les tissus du foie et des testicules en raison de l'augmentation de la peroxydation lipidique de la membrane et de l'altération des systèmes antioxydants.

La DOX est connue pour avoir plusieurs effets néfastes sur différents systèmes d'organes expérimentaux (Pugazhendhi *et al.*, 2018). Il diminue le niveau de GSH et inhibe les enzymes antioxydantes (Hamlaoui *et al.*, 2022). De plus, la DOX contribue à l'accumulation de radicaux libres, de monoxyde d'azote (NO) et de superoxyde, ces derniers réagissant ensemble pour former le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), un composé chimique hautement réactif capable d'endommager les membranes cellulaires (Fouad *et al.*, 2019). Diverses études expérimentales ont été menées en associant la DOX à des antioxydants naturels afin de préserver les tissus sains en les protégeant contre les effets des radicaux libres sans réduire leur capacité anti-tumorale (Injac et Strukelj, 2008). Les plantes médicinales ont été utilisées pour leur richesse en composés bioactifs. Dans cette étude le prétraitement des rats par l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* (75 mg/kg) a significativement amélioré les altérations induites par la DOX. Tous les paramètres évalués, qu'il s'agisse du stress oxydatif, des paramètres biochimiques ou de l'histologie, ont été ramenés à des valeurs presque normales. Les effets observés suggèrent

clairement que l'extrait butanolique d'*A. graveolens* pourrait offrir une protection en préservant l'intégrité de la membrane cellulaire contre les dommages hépatiques et testiculaires causés par la DOX. Ces résultats pourraient être attribués à l'activité antioxydante remarquable de cette plante.

Par ailleurs, le prétraitement des rats par la vitamine E à la dose 100 mg/kg a entraîné une diminution du degré de peroxydation lipidique et une amélioration des niveaux de GSH ainsi que de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx) dans le foie et les testicules. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Prahalathan *et al.*, 2004 et Djebbari *et al.*, 2017 qui ont montré l'effet protecteur de la vitamine E contre la toxicité testiculaire et hépatiques induite par la DOX. Ces améliorations suggèrent que la vitamine E pourrait rétablir la capacité antioxydante globale grâce à sa propriété liposoluble qui lui permet de s'incorporer dans la bicouche lipidique. Cela contribue à réduire le taux de formation du MDA, en entrant dans une réaction en chaîne pour prévenir la propagation de la peroxydation lipidique (El-hadjela, 2016).

La présente étude a révélé que l'injection de la DOX provoque des dommages testiculaires associés à des lésions de stress oxydatif, comme indiqué par l'oxydation des lipides et des protéines, entraînant la production de l'MDA et l'épuisement du contenu en sulfhydryles. Ces troubles sont liés à des déficiences en antioxydants. Plusieurs études antérieures ont montré que les rats traités par la DOX présentent un effet de stress oxydatif plus élevé, associé à une diminution significative des paramètres de qualité du sperme (Xin *et al.*, 2012 ; Turedi *et al.*, 2015). Les spermatozoïdes se distinguent par la composition de leur membrane, qui est abondante en acides gras polyinsaturés (AGPIs), et par leur cytoplasme, caractérisé par une faible proportion d'enzymes antioxydantes. Ces deux particularités rendent les spermatozoïdes particulièrement sensibles aux attaques des radicaux libres (Badkoobeh *et al.*, 2013). Il a été observé que le traitement avec l'extrait de la plante *A. graveolens* entraîne une augmentation de la concentration de spermatozoïdes. Cette augmentation peut être expliquée par les propriétés antioxydantes d'*A. graveolens*, responsables de son effet protecteur contre la toxicité de la DOX. De ce fait, les testicules bénéficient de la protection offerte par les différents antioxydants présents dans les composants phytochimiques de l'extrait.

Les résultats obtenus dans cette étude ont été confirmés par un rapport histopathologique, mettant en évidence une nécrose hépatique et testiculaire sévère avec congestion et inflammation chez les rats traités par la DOX. Par ailleurs, l'extrait de la plante *A. graveolens* et la vitamine E indiquent que la préservation efficace des tissus testiculaires et hépatiques constitue un indicateur de protection hépato-testiculaire.

Actuellement, nous ne savons pas quel composant d'*A. graveolens* est responsable de cette protection, en raison de la composition complexe de l'extrait *n*-butanol de la plante. L'analyse HPLC de cet extrait a révélé la présence de divers composés phénoliques tels que l'acide phénolique, l'acide trans-cinnamique, ainsi que plusieurs flavonoïdes, notamment la myricétine et son dérivé *O*-glucoside, la lutéoline et ses glycosides (cynaroside, orientin et isoorientin); la rutine (diglycoside de quercétine) ; l'hyperoside (3-*O*-galactoside de quercétine) et l'apigénine et ses dérivés C-glycosylés (vitexin et iso-vitexin) (Belhadi *et al.*, 2020). La plupart de ces composés sont reconnue pour leurs propriétés antioxydantes et leur capacité de protection hépato-testiculaire, ils peuvent agir de façon indépendante ou en synergie pour atténuer le stress oxydatif induit par la DOX. Dans ce contexte, il a récemment été démontré que la rutine et la quercétine, que ce soit individuellement ou en association (Ahmed *et al.*, 2022), ainsi que l'apigénine (Wu *et al.*, 2021) ou la lutéoline (Owumi *et al.*, 2021), pourraient avoir des effets préventifs potentiels contre la toxicité induite par la DOX en inhibant le stress oxydatif, l'inflammation et l'apoptose. Des recherches sont actuellement en cours pour identifier les composants bioactifs responsables de cet effet protecteur.

L'inflammation est un mécanisme de défense indispensable pour l'intégrité de l'organisme contre diverses agressions. Cette réaction immunitaire peut parfois causer des problèmes en raison de l'agressivité persistante des agents pathogènes et des anomalies dans la régulation des cellules inflammatoires (Weill *et al.*, 2003; Cheriti *et al.*, 2016; John *et al.*, 2021). Ces processus inflammatoires sont impliqués dans l'apparition de nombreuses maladies humaines, telles que l'arthrite, le diabète, l'asthme, les allergies et le cancer. Leur traitement repose souvent sur l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et de glucocorticoïdes. Ces substances peuvent entraîner des effets secondaires néfastes sur l'organisme, surtout lorsqu'elles sont utilisées à long terme, notamment dans le traitement des inflammations chroniques (Viladomiu *et al.*, 2016; John *et al.*, 2021).

L'utilisation d'anti-inflammatoires est fréquemment associée à des risques gastro-intestinaux tels que des ulcères gastroduodénaux, des perforations et des sténoses, ainsi qu'à des risques rénaux tels que l'insuffisance rénale aiguë, et parfois à des complications cardiaques (Soubrier *et al.*, 2013). De ce fait, la recherche de composés d'origine végétale dotés d'activités anti-inflammatoires et antioxydantes se révèle très utile pour améliorer la santé humaine tout en évitant les effets indésirables des molécules de synthèse. Dans ce contexte, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* a été évaluée dans la

présente étude en utilisant deux modèles qui sont ; l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris et l'œdème de la patte induit par le formol chez les rats.

L'application topique du xylène peut entraîner la libération de la substance P, déclenchant ainsi une inflammation neurogène caractérisée par l'extravasation plasmatique, la vasodilatation et la formation d'œdème (Rotelli *et al.*, 2003 ; Oluwatoyin *et al.*, 2019). Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que le traitement des souris par l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* aux doses de 50 et 100 mg/kg réduit de manière significative l'œdème de l'oreille induit par le xylène avec un pourcentage d'inhibition de 34,51 et 41,89 % respectivement. L'effet inhibiteur de l'œdème exercé par cet extrait peut être dû à la réduction de la libération de la substance P et d'autres facteurs pro-inflammatoires. De plus, des médiateurs inflammatoires tels que la sérotonine, l'histamine, les prostaglandines et la bradykinine peuvent contribuer à induire un œdème de l'oreille en favorisant la vasodilatation et en augmentant la perméabilité vasculaire. Les études de Eidi *et al.*, (2016) ont révélé que l'administration de l'extrait éthanolique d'*Artemisia dracunculus* (50 et 100 mg/kg) appartenant à la famille des Astéracées comme la plante étudiée, a significativement réduit l'œdème de l'oreille induit par le xylène, dont le pourcentage d'inhibition est de 32,67 et 63,36% respectivement. Ces résultats ont montré que cette plante présente une activité anti-inflammatoire supérieure à celle d'*A. graveolens*.

L'œdème de la patte induit par le formol est le deuxième modèle utilisé dans cette étude pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens*. L'injection de formol (3,5 %) dans la surface plantaire de la patte induit une réponse inflammatoire aiguë, entraînant une phase diphasique de l'œdème de la patte. La première phase se caractérise par la libération simultanée de sérotonine, d'histamine et de kinines. Tandis que, la deuxième phase est associée à l'augmentation de l'activité de la cyclooxygénase-2 (COX2), des radicaux libres dérivés de l'oxygène, des prostaglandines, ainsi que à l'infiltration et l'activation des neutrophiles sur le site inflammatoire (Tadic *et al.*, 2008 ; Sene *et al.*, 2016). Selon les résultats obtenus, nous avons observé que le traitement par l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* aux doses de 50 et 100 mg/kg prévient de manière significative l'œdème plantaire chez les rats de la première à la 5<sup>ème</sup> heure, avec un pourcentage d'inhibition de 55,17±3,52 et 54,26±1,36 % respectivement. Les propriétés anti-inflammatoires de l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* pourraient être attribuées à ses capacités antioxydantes, en particulier son activité significative de piégeage du radical DPPH. De plus, ces effets pourraient raisonnablement être associés à l'inhibition d'une ou plusieurs cascades de médiateurs pro-inflammatoires (Awaad *et al.*, 2011 ; Saleem *et al.* 2015).

L'extrait *n*-butanol exerce une inhibition significative du développement de l'œdème. Cette inhibition est supérieure à celle exercée par la molécule de référence (Aspirine). Ces résultats concordent avec ceux de Fyad *et al.*, (2020), qui ont démontré que l'extrait aqueux de la plante *A. graveolens* à une dose de 150 mg/kg manifeste une activité anti-inflammatoire remarquable en réduisant l'œdème de la patte induit par le formol (1%) et possède une activité anti-inflammatoire significative par rapport au Diclofénac de sodium.

## ***Conclusion et perspectives***

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'utilisation des plantes dans la médecine traditionnelle demeure une pratique fondamentale du système de soins de santé à travers le monde. L'évaluation des effets protecteurs et des activités biologiques des extraits végétaux est nécessaire pour garantir leur efficacité et leur sécurité. Dans ce contexte le présent travail avait pour but l'évaluation de l'activité antioxydante et des propriétés biologiques des différents extraits de la plante *C. oxyacantha* et *A. graveolens*. En considération des résultats obtenus, les extraits des deux plantes semblent présenter un intérêt potentiel, estimé par des activités qui ont été réalisées *in vitro* et *in vivo*.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles et des fleurs de *C. oxyacantha*, ainsi que de l'extrait *n*-BuOH d'*A. graveolens*, a été réalisée *in vitro* par le biais de différentes méthodes, notamment la capacité à piéger les radicaux libres (DPPH, ABTS, galvinoxyl), l'aptitude à inhiber la peroxydation lipidique, ainsi que par le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) et cuivriques (CUPRAC). Selon les résultats obtenus, les extraits des deux plantes démontrent une excellente activité antioxydante dans les différents tests utilisés et manifestent un pouvoir réducteur puissant. Ceci est justifié par la richesse de ces plantes en composés phénoliques, en flavonoïdes et même en flavonols, reconnus pour leur efficacité en tant qu'agents antioxydants exceptionnels.

L'évaluation de l'activité photoprotectrice est largement utilisée comme indicateur majeur pour classer le niveau de protection solaire des produits, principalement contre les coups de soleil causés par les rayons UV-B nocifs. Les résultats de la présente étude indiquent que tous les extraits des plantes étudiées présentent une activité photoprotectrice intéressante et peuvent être utilisés dans des formulations d'écrans solaires pour protéger la peau contre les coups de soleil.

Cette étude a montré pour la première fois, que *C. oxyacantha* et *A. graveolens* ont un effet inhibiteur important sur l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -glucosidase. Par conséquent, *C. oxyacantha* et *A. graveolens* pourrait être intéressantes pour le traitement du diabète sucré, non seulement en inhibant l'enzyme liée à la maladie, mais également en améliorant les défenses antiradicalaires.

De nombreuses voies sont explorées pour contrôler la maladie d'Alzheimer, mais l'une des approches les plus établies est l'inhibition des enzymes cholinestérases (AChE et BChE). Les résultats de cette étude indiquent que les extraits des plantes étudiée ont montré une activité

inhibitrice faible à significative sur la BChE et AChE. Les feuilles de la plante *C. oxyacantha* exerce des effets inhibiteurs potentiels sur les enzymes AChE et BChE. Les feuilles de *C. oxyacantha* peuvent être considérées comme une source majeure de composés fonctionnels anti-Alzheimer.

En ce qui concerne l'expérimentation *in vivo*, nos résultats révèlent tout d'abord que l'injection des rats par la DOX à raison de 15 mg/kg du poids corporel a entraîné des perturbations au niveau de la fonction hépatique et testiculaire. Cela s'est manifesté par des altérations des marqueurs biologiques de la fonction hépatique et du statut antioxydant. De plus, notre étude montre que le traitement par l'extrait *n*-butanol des feuilles de *C. oxyacantha* (100 mg/kg) et *A. graveolens* (75 mg/kg) a amélioré la plupart des paramètres étudiés.

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que :

**Le traitement des rats par la DOX a provoqué :**

- Des modifications notables des paramètres biochimiques caractérisées principalement par une augmentation des concentrations des transaminases ASAT et ALAT, libérées lors de l'atteinte des cellules hépatiques et de la rupture de leurs membranes. ainsi que l'augmentation du taux de cholestérol, des LDL et des triglycérides.
- Une augmentation significative de la peroxydation lipidique s'est manifestée par l'élévation de la teneur en MDA dans le foie et les testicules, associée à une diminution du taux de glutathion réduit (GSH) et de l'activité enzymatique de la GPx.
- Des changements morphologiques et des altérations qui ont affecté la structure des tissus hépatiques et testiculaire examiné.

**Le prétraitement des rats par l'extrait *n*-butanol des deux plantes étudiées a provoqué :**

- Un rétablissement des paramètres biochimiques à leurs valeurs normales.
- Une baisse de la peroxydation lipidique avec un rétablissement du taux du GSH et de l'activité de l'enzyme antioxydant GPx.
- Une amélioration de l'architecture des tissus hépatiques et testiculaires en réduisant la proportion des altérations morphologiques induites par la DOX.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire des extraits *n*-butanol de la plante *C. oxyacantha* et *A. graveolens* révèlent que les deux doses utilisées (50 et 100 mg/kg) ont fortement inhibé

l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris et l'œdème de la patte induit par le formol chez les rats. Ces résultats justifient l'utilisation de ces deux plantes en médecine traditionnelle pour la prise en charge du processus inflammatoire.

Tous les résultats obtenus dans cette thèse confirment la pertinence des remèdes traditionnels dans l'atténuation de diverses affections. Bien que ces résultats soient intéressants, il est essentiel de poursuivre les investigations par d'autres études approfondies, en se concentrant spécifiquement sur les extraits des deux plantes étudiées. L'objectif consiste à explorer d'autres espèces de la même famille botanique afin d'identifier de nouveaux composés bioactifs et de comprendre leur mécanisme d'action. Des études expérimentales approfondies sur la toxicité chronique sont nécessaires pour renforcer davantage la validité de ces plantes en tant qu'alternatives aux médicaments synthétiques, offrant ainsi des solutions naturelles à la population.

# *Références bibliographiques*

- Abd Allah, E. F, Hashem, A, Alqarawi, A.A, & Alwathnani HA. (2015).** Alleviation of adverse impact of cadmium stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pakistan Journal of Botany*, 47(2), 785–795.
- Abushouk, A. I., Ismail, A., Salem, A. M. A., Afifi, A. M., & Abdel-Daim, M. M. (2017).** Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 90, 935–946.
- Achoub, H. (2020).** *Etude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales Algériennes* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).
- Achoub, H., Mencherini, T., Esposito, T., Luca, R., Aquino, R., Gazzerro, P. & Benayache, S. (2021).** New sesquiterpenes from *Asteriscus graveolens*. *Natural Product Research*, 35(13), 2190-2198.
- Adedeji, O., & Jewoola, O. A. (2008).** Importance of leaf epidermal characters in the Asteraceae family. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36(2), 7.
- Ahmadipour, B., Kalantar, M., Hosseini, S. M., Yang, L. G., Kalantar, M. H., Raza, S. A., & Schreurs, N. M. (2017).** Hawthorn (*Crataegus Oxyacantha*) extract in the drinking water of broilers on growth and incidence of pulmonary hypertension syndrome (PHS). *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19, 639-644.
- Ahmed, I. A., Mikail, M. A., Bin Ibrahim, M., Bin Hazali, N., Rasad, M. S., Ghani, R. A., Wahab, R. A., Arief, S. J., & Yahya, M. N. (2015).** Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised *Baccaurea angulata* fruit. *Food chemistry*, 172, 778–787.
- Ahmed, O. M., Elkomy, M. H., Fahim, H. I., Ashour, M. B., Naguib, I. A., Alghamdi, B. S., Mahmoud, H. U. R., & Ahmed, N. A. (2022).** Rutin and Quercetin Counter Doxorubicin-Induced Liver Toxicity in Wistar Rats via Their Modulatory Effects on Inflammation, Oxidative Stress, Apoptosis, and Nrf2. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
- Ait El Cadi, M., Makram, S., Ansar, M., Khabbal, Y., Alaoui, K., Faouzi, M. A., Cherrah, Y., & Taoufik, J. (2012).** Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de *Zygophyllum gaetulum*. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 70(2), 113–116.
- Aktaş, I., Özmen, Ö., Tutun, H., Yalçın, A., & Türk, A. (2020).** Artemisinin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Biotechnic & Histochemistry*, 95(2), 121-128.
- Alam M. N., Bristi N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013).** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*, 21(2), 143-152.
- Al-Farsi M., Alasalva C., Morris A., Baron M., & Shahidi F. (2005).** Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried

date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(19), 7592-7599.

**Alghorabi, A. A., Kabel, A. M., & Elmaaboud, M. (2019).** Doxorubicin: insights into dynamics, clinical uses and adverse effects. *J. Cancer Res. Treat*, 7(1), 17-20.

**Ali Reza, A. S. M., Hossain, M. S., Akhter, S., Rahman, M. R., Nasrin, M. S., Uddin, M. J., Sadik, G., & Khurshid Alam, A. H. M. (2018).** In vitro antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of *Elatostema papillosum* leaves and correlation with their phytochemical profiles: a study relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 123.

**Ali, M., Muhammad, S., Shah, M. R., Khan, A., Rashid, U., Farooq, U., Ullah, F., Sadiq, A., Ayaz, M., Ali, M., Ahmad, M., & Latif, A. (2017).** Neurologically Potent Molecules from *Crataegus oxyacantha*; Isolation, Anticholinesterase Inhibition, and Molecular Docking. *Frontiers in pharmacology*, 8, 327.

**Alilou, H. (2012).** Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc: *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC.

**Alilou, H., & Akssira, M. (2016).** Isolement, Identification et activite antifongique de deux sesquiterpenes d'*Asteriscus graveolens* Subsp. *Odorus* (Schousb.) Greuter. *European Scientific Journal*, 12, 33.

**Alilou, H., Bencharki, B., Hassani, L. I., & Barka, N. (2014).** Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscusgraveolens*subsp. *odorus*. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 10(3).

**Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Zaitoun, S. Y. A., & Qasem, I. B. (2014).** In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(9), 381-400.

**Aljeldah, M. M. (2022).** Antioxidant and antimicrobial potencies of chemically-profiled essential oil from *Asteriscus graveolens* against clinically-important pathogenic microbial strains. *Molecules*, 27(11), 3539.

**Alkuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., & Al-Hussaniy, H. A. (2017).** Doxorubicin-induced cardiotoxicity: molecular mechanism and protection by conventional drugs and natural products. *Int J Clin Oncol Cancer Res*, 2(2), 31-44.

**Alrawashdeh, I. N., Qaralleh, H., Al-limoun, M. O., & Khleifat, K. M. (2019).** Antibacterial activity of *Asteriscus graveolens* methanolic extract: synergistic effect with fungal mediated nanoparticles against some enteric bacterial human pathogens. *arXiv preprint arXiv:1911.02245*.

**Alsyaad, K.M., & Ibrahim, E.H. (2014).** The Protective Effects of the Aqueous Extract of Saliva Against Biochemical and Histopathological Changes in Kidney and Liver of Male Rats Treated with the Anticancer Drug Doxorubicin. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 5(6), 237-245.

**Amor, L. (2018).** *Composition chimique et activités biologiques des extraits de Crataegus oxyacantha L.(Rosaceae)* (Doctoral dissertation).Thèse doctorat : Université de Sétif 1

**Amrani, A., Benaissa, O., Boubekri, N., Zama, D., Benayache, F., & Benayache, S. (2017).** In Vitro Antioxidant Activities of Rhanterium Suaveolens Extracts. *Journal of Materials and Environmental Sciences*,8(11), 4002-4006.

**Amrani, A., Lahneche, A. M., Benaissa, O., Boubekri, N., Demirtaş, I., Benayache, F., Benayache, S., & Zama, D. (2019).** In vitro Antiproliferative and inhibition of oxidative DNA damage activities of n-butanol extract of Limonium bonduelli from Algeria. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, e19170779.

**Amrani, A., Mecheri, A., Bensouici, C., Boubekri, N., Benaissa, O., Zama, D., Benayache, F., & Benayache, S. (2019).** Evaluation of antidiabetic, dermatoprotective, neuroprotective and antioxidant activities of Chrysanthemum fontanesii flowers and leaves extracts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101209.

**Aniogo, E. C., George, B. P. A., & Abrahamse, H. (2017).** Phthalocyanine induced phototherapy coupled with Doxorubicin; a promising novel treatment for breast cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 17(8), 693-702.

**Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002).** Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.

**Aouissi, H., Gourine, N., Wang, H., Chen, X., Bombarda, I., Boudjeniba, M., & Yousfi, M. (2018).** Chemical composition, antioxidative, antimicrobial and anti-cancer activities of Asteriscus graveolens (Forssk) essential oil. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18, 217-223.

**Apak R., Guclu, K., Ozyurek, M., & Karademir, S.E. (2004).** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970–7981.

**Apak R., Özyürek M., Güçlü K., & Çapanoğlu, E. (2016).** Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(5), 997-1027.

**Araujo, A. R., Saraiva, M. L. M., & Lima, J. L. (2008).** Determination of total and oxidized glutathione in human whole blood with a sequential injection analysis system. *Talanta*, 74(5), 1511-1519.

- Artiss J. D., & Zak, B. (1997).** Measurement of cholesterol concentration. *Handbook of lipoprotein testing*, 2, 189-205.
- Arzi, A., Olapour, S., Yaghooti, H., & Karampour, N. S. (2015).** Effect of royal jelly on formalin induced-inflammation in rat hind paw. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*, 10(1).
- Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E., Msanda, F., Saadi, B., Serghini, M., & Ait Ben Aoumar, A. (2012).** In vitro and in vivo antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. *Crop Protection*, 40, 53–58.
- Association AFC. (2022).** Livret Technique de cueillette de l'aubépine. L'AUBÉPINE *Crataegus monogyna* Jacq. *Crataegus laevigata* (Poir.) DC. Version 3, p : 6-7. Retrieved from <https://cueillettes-pro.org/LIVRET-TECHNIQUE-AUBEPINE.html>
- Atanassova, M., & Ribarova, F. (2009).** Phénols et flavonoïdes totaux dans les extraits secs des feuilles des bouleaux argentés bulgares (*Betula pendula*). *Revue de Génie Industriel*, 4, 21-25.
- Attard, E., & Attard, H. (2019).** Hawthorn: *Crataegus oxyacantha*, *Crataegus monogyna* and related species. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements* (pp.289-293). Academic Press.
- Awaad, A. S., El-meligy, R., Qenawy, S., Atta, A., & Soliman, G. A. (2011).** Anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of some desert plants. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(4), 367–373.
- Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. N. (2016).** Anti-inflammatory activity of natural products. In *Molecules*, 21(10).
- Badkoobeh, P., Parivar, K., Mehdi Kalantar, S., Davood Hosseini, S., & Salabat, A. (2013).** Effect of Nano-Zinc Oxide on Doxorubicin- Induced Oxidative Stress and Sperm Disorders in Adult Male Wistar Rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(5), 355-364.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- Bammou, M., Bouhlali, E. D. T., Sellam, K., El-Rhaffari, L., Ibijbijen, J., & Nassiri, L. (2022).** Évaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton. *Phytothérapie*, 20(1), 2-9.
- Barter, P., Gotto, A. M., LaRosa, J. C., Maroni, J., Szarek, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J., Bittner, V., Fruchart, J. C., & Treating to New Targets Investigators (2007).** HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *The New England journal of medicine*, 357(13), 1301–1310.

- Beconcini, D., Felice, F., Fabiano, A., Sarmiento, B., Zambito, Y., & di Stefano, R. (2020).** Antioxidant and anti-inflammatory properties of cherry extract: Nanosystems-based strategies to improve endothelial function and intestinal absorption. *Foods*, 9(2).
- Belhadi, F., Ouafi, S., & Bouguedoura, N. (2020).** Phytochemical composition and pharmacological assessment of callus and parent plant of *Asteriscus graveolens* (Forssk.) Less. From Algerian Sahara. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 19(9), 1895–1901.
- Benabderrahmane, W., Lores, M., Lamas, J. P., & Benayache, S. (2018).** Matrix solid-phase dispersion as a tool for phytochemical and bioactivities characterisation: *Crataegus oxyacantha* L. \_A case study. *Natural product research*, 32(10), 1220-1223.
- Benabderrahmane, W., Lores, M., Benaissa, O., Lamas, J. P., de Miguel, T., Amrani, A., Benayache, F., & Benayache, S. (2021).** Polyphenolic content and bioactivities of *Crataegus oxyacantha* L.(Rosaceae). *Natural product research*, 35(4), 627-632.
- Benaissa, K. Y., Megherbi, A., Said, M. E. A., Benyamina, A., Toumi, F., & Bettayeb, Z. (2020).** Acute toxicity and central and peripheral analgesic activity of flowers and leaves essential oils of *Asteriscus graveolens* from South-West Algeria. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(5-s), 115-118.
- Ben-Gera, H., Bensimon Mashraki, K., Sharma, R., Shachter, A., Chaimovitsh, D., Gonda, I., Nitzan, N., & Dudai, N. (2020).** Chemo-Geographic Variations in Wild Population of *Asteriscus graveolens* in Israel Based on Volatile Composition Analyses. *Chemistry & Biodiversity*, 17(11).
- Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364–371.
- Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., & Boucherit K. (2014).** Phytochemical study and evaluation of the antioxidant activity of *Fredolia aretioides* root extracts of Algeria. *Phytothérapie*, 12, 364-371.
- Berglund, L., Brunzell, J. D., Goldberg, A. C., Goldberg, I. J., Sacks, F., Murad, M. H., Stalenhoef, A. F., & Endocrine society (2012).** Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(9), 2969–2989.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020).** The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
- Biondo, L. A., Lima Junior, E. A., Souza, C. O., Cruz, M. M., Cunha, R. D., Alonso-Vale, M. I., Oyama, L. M., Nascimento, C. M., Pimentel, G. D., Dos Santos, R. V., Lira, F. S., &**

- Rosa Neto, J. C. (2016).** Impact of Doxorubicin Treatment on the Physiological Functions of White Adipose Tissue. *PloS one*, *11*(3), e0151548.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012).** Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, *5*(1), 9–19.
- Blois, M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *181*(4617), 1199-1200.
- Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. *INRA*, 79-82.
- Bor, Z., Arslan, R., Bektaş, N., Pirildar, S., & Dönmez, A. A. (2012).** Antinociceptive, antiinflammatory, and antioxidant activities of the ethanol extract of crataegus orientalis leaves. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *42*(2), 315–324.
- Bouaziz A., Khennouf S., Abdalla S., Djidel S., Abu Zarga M., Bentahar A., Dahamna S., Baghiani A. & Amira, S.(2014).** Phytochemical analysis, antioxidant activity and hypotensive effect of Algerian azarole (*Crataegus azarolus* L.) leaves extracts. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, *5*(2), 286-305.
- Boubekri, N., Belloum, Z., Boukaabache, R., Amrani, A., Kahoul, N., Hamama, W., Zama, D., Boumaza, O., Bouriche, H., Benayache, F., & Benayache, S. (2014).** In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Genista quadriflora Munby extracts. *Der Pharmacia Lettre*, *6*(1), 1-7.
- Boudjada, A., Touil, A., Bendif, H., Bensouici, C., & Rhouati, S. (2018).** Phytochemical Constituents, Phenolic Contents, and Antioxidant Activity of Cratagus Azarolus Extracts. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *11*(4), 133–137.
- Boussada, M. (2020).** *Etude in vivo et in vitro des effets protecteurs du Sélénium et d'un nouvel analogue de Thioamide contre la cytotoxicité de la Doxorubicine, chez le rat Wistar mâle.* [Doctoral Thesis, Université Tunis El Manar], 22-23.
- Bouzid W., Yahia M., Abdeddaim M., Aberkane M. C., & Ayachi A. (2011).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. *Lebanese Science Journal*, *12*(1), 59-69.
- Călinoiu, L. F., & Vodnar, D. C. (2018).** Whole Grains and Phenolic Acids: A Review on Bioactivity, Functionality, Health Benefits and Bioavailability. *Nutrients*, *10*(11), 1615.
- Carlos Carmona-Hernandez, J., Helena Gonzalez-Correa, C., & Narvaez, W. (2017).** Anti-inflammatory effects of flavonoids evaluated in murine models: A descriptive review. *Animal Science Papers and Reports*, *35*(4):349-359.

**Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009).** Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current medicinal chemistry*, 16(25), 3267–3285.

**Castel, M., Despas, F., Modesto, A., Gales, C., Honton, B., Galinier, M., Senard, J. M., & Pathak, A. (2013).** Effets indésirables cardiaques des chimiothérapies. *La Presse Médicale*, 42(1), 26–39.

**Chaib, F., Allali, H., Bennaceur, M., & Flamini, G. (2017).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from the aerial parts of *Asteriscus graveolens* (Forssk.) Less. and *Pulicaria incisa* (Lam.) DC.: Two Asteraceae herbs growing wild in the Hoggar. *Chemistry & biodiversity*, 14(8), e1700092.

**Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H., & Chen, X. (2023).** A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(13), 4982.

**Chennuru, A., & Saleem, M. T. (2013).** Antioxidant, lipid lowering, and membrane stabilization effect of sesamol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in experimental rats. *BioMed Research International*, 2013, 934239.

**Cheriti, A., Belboukhari, N., & Hacini, S. (2013).** Ethnopharmacological survey and phytochemical screening of some medicinal Asteraceae from Algerian Sahara. *Phytochem & BioSub J*, 7(2), 52-56.

**Cheriti, A., Rahmani, S. & Belboukhari, N. (2016).** Evaluation de l'activité antiinflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *Limoniastrum feei* (Plumbaginacea). *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 6(1), 80-86.

**Christidi, E., & Brunham, L. R. (2021).** Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell death & disease*, 12(4), 339.

**Comhair, S. A., & Erzurum, S. C. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 283(2), L246–L255.

**Couto, N., Malys, N., Gaskell, S. J., & Barber, J. (2013).** Partition and turnover of glutathione reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a proteomic approach. *Journal of proteome research*, 12(6), 2885–2894.

**Cristofari, G., Znini, M., Majidi, L., Mazouz, H., Tomi, P., Costa, J., & Paolini, J. (2012).** Chemical Diversity of Essential Oils from *Asteriscus graveolens* (Forssk.) Less.: Identification of cis-8-Acetoxychrysanthenyl Acetate as a New Natural Component. *Chemistry & biodiversity*, 9(4), 727-738.

- Das, J., Ghosh, J., Manna, P., & Sil, P. C. (2012).** Taurine protects rat testes against doxorubicin- induced oxidative stress as well as p53, Fas and caspase 12-mediated apoptosis. *Amino Acids*, 42(5), 1839-1855.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 43(4), 348–361.
- Deeg, R., & Ziegenhorn, J. (1983).** Kinetic enzymic method for automated determination of total cholesterol in serum. *Clinical chemistry*, 29(10), 1798-1802.
- Degenring F. H., Suter A., Weber M., & Saller R. (2003).** A randomised double blind placebo controlled clinical trial of a standardised extract of fresh Crataegus berries (Crataegisan®) in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II. *Phytomedicine*, 10(5), 363-369.
- Delemasure, S., Vergely, C., Zeller, M., Cottin, Y., & Rochette, L. (2006).** Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines: approche fondamentale des mécanismes mis en jeu; relations avec les données cliniques [Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclins. From basic concepts to clinical data]. *Annales de cardiologie et d'angiologie*, 55(2), 104–112.
- Deng, R., & Chow, T. J. (2010).** Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. *Cardiovascular therapeutics*, 28(4), e33–e45.
- Descheemaeker, K. (2001).** *Nutri-et phytothérapie. Développements récents-2*. Garant. p :17-19
- Djahra, A. B., & Bordjiba, O., & Benkherara, S. (2012).** Activité antibactérienne des flavonoides d'une plante médicinale spontanée Marrubium vulgare L. de la région D'El Taref au Nord-est Algérien. *Rev. Sci. Technol., Synthèse*, 24, 29-37.
- Djebbari, R., Chemam, Y., Boubekri, N., Lakroun, Z., Kebieche, M., Amrani, A., Benayache, F., Zama, D., & Benayache, S. (2017).** Chemoprotective Potential of Helianthemum confertum Against the Loss of Molecular and Functional Integrity of the Liver Cell in Doxorubicin-Treated Rats. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(07).
- Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., & Stocker, P. (2010).** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from Cleome arabica in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(10), 2599–2606.
- Djerroumi A., & Nacef M. (2004).** *100 Plantes Médicinaux d'Algérie*. (1st ed.). Palais du livre, pp. 83.
- Do Nascimento, R. D. P., da Fonseca Machado, A. P., Lima, V. S., Moya, A. M. T. M., Reguengo, L. M., Junior, S. B., & Junior, M. R. M. (2021).** Chemoprevention with a tea from

hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) leaves and flowers attenuates colitis in rats by reducing inflammation and oxidative stress. *Food Chemistry: X*, 12, 100139.

**Duan, X., Wu, G., Jiang, Y. (2007).** Evaluation of the antioxidant properties of litchi fruit phenolics in relation to pericarp browning prevention. *Molecules*, 12(4), 759-771.

**Duchnowicz, P., Broncel, M., Podsędek, A., & Koter-Michalak, M. (2012).** Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (in vitro study). *European journal of nutrition*, 51(4), 435–443.

**Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazza, E., Izzo, A. A., Novellino, E., & Santini, A. (2019).** Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy research : PTR*, 33(9), 2221–2243.

**Easmin, F., Al Faria, L., Rani, R., & Rahman, A. M. (2021).** Asteraceae: A Taxonomically and Medicinally Important Sunflower Family. *American International Journal of Biology and Life Sciences*, 3(1), 1-17.

**Edeas, M. (2007).** Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytotherapie*, 5(5), 264-270.

**Eidi, A., Oryan, S., Zaringhalam, J., & Rad, M. (2016).** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the aerial parts of *Artemisia dracuncululus* in mice. *Pharmaceutical biology*, 54(3), 549–554.

**Elango, C., & Devaraj, S. N. (2010).** Immunomodulatory effect of Hawthorn extract in an experimental stroke model. *Journal of neuroinflammation*, 7(1), 1-13.

**Eleiwa, N Z., Galal, AA., Abd El-Aziz, RM., & Hussin, EM. (2018).** Antioxidant activity of *Spirulina platensis* alleviates doxorubicin-induced oxidative stress and reprotoxicity in male rats. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(2): 87–95.

**El-Hadjela, D. (2016).** *Effet de la combinaison de la vitamine C et la vitamine E sur le métabolisme et la distribution du zinc chez des rats diabétiques sous un régime alimentaire pauvre en zinc.* . [Doctoral Thesis]. Université Badji Mokhtar, Annaba.

**Ellman G. L. (1959).** Plasma Antioxidants . *Archives of Biochemistry Biophysics*, 82, 70-77.

**Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95.

**Erdman, J. W., Jr, Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C. L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., & Burrowes, J. (2007).** Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America

Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of nutrition*, 137(3 Suppl 1), 718S–737S.

**Fadili, K., Zerkani, H., Smail Amalich, S., & Zair, T. (2017).** Phytochemical study and evaluation of antioxidant activity of leaves and fruits of *Capparis spinosa* L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 5(2), 108-118.

**Fahmy, H. S. (2003).** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Volatile Oil of *Nauplius Graveolens* (Forssk.). *Less. J. Environ. Sci*, 26, 307-317.

**Farbstein, D., Kozak-Blickstein, A., & Levy, A. P. (2010).** Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(11), 8098–8110.

**Favier, A. (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

**Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006).** Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. *Sports Med*, 36(4).

**Fineschi, S., Salvini, D., Turchini, D., Pastorelli, R., & Vendramin, G. G. (2005).** *Crataegus monogyna* Jacq. and *C. laevigata* (Poir.) DC.(Rosaceae, Maloideae) display low level of genetic diversity assessed by chloroplast markers. *Plant Systematics and Evolution*, 250, 187-196.

**Fiorucci S. (2006).** *Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes :Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire.*Thèse de doctorat. Université Nice-Sophia Antipolis, 212.

**Flohé, L., & Günzler, W.A. (1984).** Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*, 105, 114-120.

**Fouad, A. A., Refaie, M. M. M., & Abdelghany, M. I. (2019).** Naringenin palliates cisplatin and doxorubicin gonadal toxicity in male rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(1), 67–73.

**Fukushima, Y., Ohie, T., Yonekawa, Y., Yonemoto, K., Aizawa, H., Mori, Y., Watanabe, M., Takeuchi, M., Hasegawa, M., Taguchi, C., & Kondo, K. (2009).** Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4), 1253–1259.

**Fyad, K., Belboukhari, N., Hadj-Khelil, A. O. el, & Sekkoum, K. (2020).** Analgesic and anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Bubonium graveolens*. *Biomedical Research and Therapy*, 7(9), 4002–4009.

**Gad, M., Z Hassouna, H., Abd-Rabou, A. A., Abdel-Azeem, A. S., Hegazy, A. M., Abdel-Lattife, M. S., & Ahmed, F. A. (2021).** Preliminary study on the toxicological impacts of *Pinus*

roxburghii and Nauplius graveolens extracts on albino mice. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(7), 3489-3498.

**Gad, M., Hassouna, H. Z., Mahmoud, K., Abd-Rabou, A. A., Abdel-Azeem, A. S., Hegazy, A. M., Abdel-Lattife, M. S., Abdel-Rahim, E. A., Ahmed, F. A., Shim, J. H., & Zaky, A. A. (2022).** In Vitro Anti-Colorectal Cancer and Anti-Microbial Effects of Pinus roxburghii and Nauplius graveolens Extracts Modulated by Apoptotic Gene Expression. *Separations*, 9(12), 393.

**Gajender, Mazumder, A., Sharma, A., & Azad, M. A. K. (2023).** A Comprehensive Review of the Pharmacological Importance of Dietary Flavonoids as Hepatoprotective Agents. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2023, 4139117.

**Gangwar, M., Gautam, M. K., Sharma, A. K., Tripathi, Y. B., Goel, R. K., & Nath, G. (2014).** Antioxidant capacity and radical scavenging effect of polyphenol rich Mallotus philippenensis fruit extract on human erythrocytes: An in vitro study. *Scientific World Journal*, 2014.

**Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018).** Glutathione: Antioxidant properties dedicated to nanotechnologies. *Antioxidants*, 7 (5).

**Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H., & Oueld-Mokhtar, S. M. (2015).** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de Marrubium deserti de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118–129.

**Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*, 3(4), 162–169.

**Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Afrin, S., Bompadre, S., Rubini, C., Zizzi, A., Astolfi, P., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2016).** Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 94, 128–137.

**Gokcimen, A., Cim, A., Tola, H. T., Bayram, D., Kocak, A., Ozgüner, F., & Ayata, A. (2007).** Protective effect of N-acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity. *Human & experimental toxicology*, 26(6), 519–525.

**Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P., & Ramirez-Tortosa, M. C. (2010).** New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(6), 1425–1438.

**Grilj, J., Zonca, C., Daku, L. M. L., & Vauthey, E. (2012).** Photophysics of the galvinoxyl free radical revisited. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(18), 6352–6358.

- Guven, H., Arici, A., & Simsek, O. (2019).** Flavonoids in Our Foods: A Short Review. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 3(2), 96-106
- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., & Halla, N. (2016).** Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytotherapie*, 16(S1), S254-S262.
- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., & Halla, N. (2018).** Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, 16(S1), S254-S262.
- Hadjadj, S., Esnault, M. A., Berardocco, S., Guyot, S., Bouchereau, A., Ghouini, F., Lamini, R., & Ould El Hadj-Khelil, A. (2020).** Polyphenol composition and antioxidant activity of *Searsia tripartita* and *Limoniastrum guyonianum* growing in Southeastern Algeria. *Scientific African*, 10, e00585.
- Hagerman A. E., Riedl K. M., Jones G. A., Sovik K. N., Ritchard N. T., Hartzfeld P. W., & Riechel T. L. (1998).** High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(5), 1887-1892.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant [Oxidative stress]. *Revue Medicale de Liege*, 62(10), 628–638.
- Hamlaoui, S., Hamdi, Y., Tannich, F., Rjeb, A., Aouani, E., & Mezghani, S. (2022).** Grape Seed and Skin Extract Protects against Doxorubicin Chemotherapy-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Metabolic Enzyme Disturbances in Rat Lung. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 56(9).
- Hammoud, L., León, F., Brouard, I., Gonzalez-Platas, J., Benayache, S., Mosset, P., & Benayache, F. (2018).** Humulene derivatives from Saharian *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron Letters*, 59(27), 2668-2670.
- Hanus M., Lafon J., & Mathieu M. (2004).** Double-blind, randomised, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (*Crataegus oxyacantha* and *Eschscholtzia californica*) and magnesium in mild-to-moderate anxiety disorders. *Current medical research and opinion*, 20(1), 63-71.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504.
- Harkati B. (2011).** Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille Asteraceae : *Scorzonera undulata*. Thèse doctorat : Chimie organique : Constantine : Université de Mentouri Constantine, 4-5
- Haybar, H., Goudarzi, M., Mehrzadi, S., Aminzadeh, A., Khodayar, M. J., Kalantar, M., & Fatemi, I. (2019).** Effect of gemfibrozil on cardiotoxicity induced by doxorubicin in male

experimental rats. *Biomedicine & pharmacotherapy=Biomedecine & pharmacotherapie*, 109, 530–535.

**Hernández-Rodríguez, P., Baquero, L. P., & Larrota, H. R. (2019).** Flavonoids: Potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. *Bioactive compounds* (pp. 265-288). Woodhead Publishing.

**Hildebrand, J. L., Bains, O. S., Lee, D. S., & Kennedy, C. J. (2009).** Functional and energetic characterization of P-gp-mediated doxorubicin transport in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 149(1), 65–72.

**Hong, Y. M., Kim, H. S., & Yoon, H. R. (2002).** Serum lipid and fatty acid profiles in adriamycin-treated rats after administration of L-carnitine. *Pediatric research*, 51(2), 249–255.

**Hosseinzadeh H., Ramezani M., Fadishei M., & Mahmoudi M. (2002).** Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zhumeria majdae* extracts in mice and rats. *Phytomedicine*, 9(2), 135-141.

**Hou, X. W., Jiang, Y., Wang, L. F., Xu, H. Y., Lin, H. M., He, X. Y., He, J. J., & Zhang, S. (2009).** Protective role of granulocyte colony-stimulating factor against adriamycin induced cardiac, renal and hepatic toxicities. *Toxicology letters*, 187(1), 40–44.

**Hozayen, W.G. (2012).** Effect of hesperidin and rutin on doxorubicin induced testicular toxicity in male rats. *International journal of food and nutrition science*, 1(1), 31-42.

**Huang D., Ou B., & Prior R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.

**Ibrahim, M. A., Morsy, M. A., Hafez, H. M., Gomaa, W. M., & Abdelrahman, A. M. (2012).** Effect of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors on doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Toxicology mechanisms and methods*, 22(6), 424–431.

**Ikegami, E., Fukazawa, R., Kanbe, M., Watanabe, M., Abe, M., Watanabe, M., Kamisago, M., Hajikano, M., Katsube, Y., & Ogawa, S. (2007).** Edaravone, a potent free radical scavenger, prevents anthracycline-induced myocardial cell death. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 71(11), 1815–1820.

**Iliskovic, N., & Singal, P. K. (1997).** Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure. *The American journal of pathology*, 150(2), 727–734.

**Imai, K., Nakanishi, I., Ohkubo, K., Ohno, A., Mizuno, M., Fukuzumi, S., Matsumoto, K. I., & Fukuhara, K. (2019).** Synthesis and radical-scavenging activity of C-methylated fisetin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(8), 1720–1727.

- Indu, R., Azhar, T. S., Nair, A., & Nair, C. K. (2014).** Amelioration of doxorubicin induced cardio-and hepato-toxicity by carotenoids. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(1), 62–67.
- Injac, R., Strukelj, B. (2008).** Recent Advances in Protection Against Doxorubicin-induced Toxicity. (2008). *Technology in Cancer Research and Treatment*, 7(6).
- Ismail, D. I. (2016).** Histological study on doxorubicin-induced testicular toxicity and the protective role of sesamol in rats. *Egyptian Journal of Histology*, 39(1), 38–49.
- Jačević, V., Dragojević-Simić, V., Tatomirović, Ž., Dobrić, S., Bokonjić, D., Kovačević, A., Nepovimova, E., Vališ, M., & Kuča, K. (2018).** The Efficacy of Amifostine against Multiple-Dose Doxorubicin-Induced Toxicity in Rats. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2370.
- Jambhulkar, S., Deshiredy, S., Jestadi, D.B, & Periyasamy, L. (2014).** Quercetin Attenuating Doxorubicin Induced Hepatic, Cardiac and Renal Toxicity in Male Albino Wistar Rats. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 8(2), 985-1004.
- Jarzycka A., Lewińska A., Gancarz R., & Wilk, K. A. (2013).** Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 128, 50-57.
- Jayachandran K. S., Khan M., Selvendiran K., Devaraj S. N., & Kuppusamy P. (2010).** *Crataegus oxycantha* extract attenuates apoptotic incidence in myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating Akt and HIF-1 signaling pathways. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 56(5), 526-531.
- Jayalakshmi, R., Thirupurasundari, C. J., & Devaraj, S. N. (2006).** Pretreatment with alcoholic extract of shape *Crataegus oxycantha* (AEC) activates mitochondrial protection during isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Molecular and cellular biochemistry*, 292, 59-67.
- Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Nam, K., C., Ahn, D. U., Lee S.C. (2004).**Effect of Seed Roasting Conditions on the Antioxidant Activity of Defatted Sesame Meal Extracts. *Journal of Food Science*, 69(5). C377-C381.
- Ji, C., Yang, B., Yang, Y. L., He, S. H., Miao, D. S., He, L., & Bi, Z. G. (2010).** Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to Doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition. *Oncogene*, 29(50), 6557–6568.
- John, K. K., Shcherazade, O.-S. F., Georges, A., Ernest, Z. N., Roger, K. K., Emile, B. K., Mireille, K. T. K., Jean-Jacques, K. K., & Severin, K. (2021).** Activité Anti-Inflammatoire Et

Études Phytochimiques De L'extrait Aqueux Des Écorces Distemonanthus Benthamianus Baill. (Caesalpiniaaceae : Leguminosae - Caesalpinioideae). *European Scientific Journal ESJ*, 17(7).

**Jouad H., Lemhadri A., Maghrani M., Burcelin R., & Eddouks M. (2003).** Hawthorn evokes a potent anti-hyperglycemic capacity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of herbal pharmacotherapy*, 3(2), 19-29.

**Judson, I., Verweij, J., Gelderblom, H., Hartmann, J. T., Schöffski, P., Blay, J. Y., Kerst, J. M., Sufliarsky, J., Whelan, J., Hohenberger, P., Krarup-Hansen, A., Alcindor, T., Marreaud, S., Litière, S., Hermans, C., Fisher, C., Hogendoorn, P. C., dei Tos, A. P., van der Graaf, W. T., & European Organisation and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (2014).** Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 15(4), 415–423.

**Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D. H. (2010).** mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584(7), 1287–1295.

**Kallassy, H., Fayyad-Kazan, M., Makki, R., El-Makhour, Y., Hamade, E., Rammal, H., Leger, D. Y., Sol, V., Fayyad-Kazan, H., Liagre, B., & Badran, B. (2017).** Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antiproliferative Activities of the Plant Lebanese Crataegus Azarolus L. *Medical Science Monitor Basic Research*, 23, 270–284.

**Kanyonga, M. P., Faouzi, M. Y. A., Zellou, A., Essassi, M., & Cherrah, Y. (2011).** Effects of methanolic extract of Crataegus oxyacantha on blood homeostasis in rat. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(3), 713-717.

**Kashyap, C. P., Arya, V., & Thakur, N. (2012).** Ethnomedicinal and phytopharmacological potential of Crataegus oxyacantha Linn.—A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S1194-S1199.

**Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Kolat, D., Kaluzińska-Kolat, Ż., Celik, I., & Kontek, R. (2023).** Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells*, 12(4), 659.

**Khadhri, A., ELMOKNI, R., & SMITI, S. (2013).** Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu: Atractylis gummifera. *Revue Soc. Sci. Nat de Tunisie*, 39, 44-52.

**Khan, J., Deb, P. K., Priya, S., Medina, K. D., Devi, R., Walode, S. G., & Rudrapal, M. (2021).** Dietary Flavonoids: Cardioprotective Potential with Antioxidant Effects and Their Pharmacokinetic, Toxicological and Therapeutic Concerns. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(13), 4021.

**Khazaeli, P., & Mehrabani, M. (2010).** Screening of sun protective activity of the ethyl acetate extracts of some medicinal plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(1), 5-9.

**Kim S. H., Kang K. W., Kim K. W., & Kim, N. D. (2000).** Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sciences*, 67(2), 121-131.

**Kiciński, W., & Dyjak, S. (2020).** Transition metal impurities in carbon-based materials: Pitfalls, artifacts and deleterious effects. *Carbon*, 168, 748-845.

**Kittiwannachot, P., Borisut, P., Wanasawas, P., Ponpanich, L., Rattanasuk, O., & Chulasiri, M. (2008).** Antimutagenic potentials of hydroalcoholic herbal extracts towards UV-induced mutation. *Thai Journal of Toxicology*, 23(1), 27-34.

**Kiyomiya, K. I., Matsuo, S., & Kurebe, M. (2001).** Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer research*, 61(6), 2467-2471.

**Kostić, D. A., Velicković, J. M., Mitić, S. S., Mitić, M. N., & Randelović, S. S. (2012).** Phenolic content, and antioxidant and antimicrobial activities of *Crataegus oxyacantha* L (Rosaceae) fruit extract from Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1), 117-124.

**Kostić, D. A., Velicković, J. M., Mitić, S. S., Mitić, M. N., & Randelović, S. S. (2012).** Phenolic content, and antioxidant and antimicrobial activities of *Crataegus oxyacantha* L (Rosaceae) fruit extract from Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1), 117-124.

**Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., Oszmiański, J., & Baer-Dubowska, W. (2014).** Hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) bark extract regulates antioxidant response element (ARE)-mediated enzyme expression via Nrf2 pathway activation in normal hepatocyte cell line. *Phytotherapy research : PTR*, 28(4), 593–602.

**Kumaran A., & Karunakaran R. J. (2007).** In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT*. 40, 344–352.

**Lacaille-Dubois M. A., Franck U., & Wagner, H. (2001).** Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 8(1), 47-52.

**Lal, S., Mahajan, A., Ning Chen, W., & Chowbay, B. (2010).** Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. *Current drug metabolism*, 11(1), 115-128.

**Lamy, E., Rawel, H., Schweigert, F. J., Capela E Silva, F., Ferreira, A., Costa, A. R., Antunes, C., Almeida, A. M., Coelho, A. V., & Sales-Baptista, E. (2011).** The effect of tannins on Mediterranean ruminant ingestive behavior: the role of the oral cavity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(4), 2766–2784.

**Lankatillake, C., Luo, S., Flavel, M., Lenon, G. B., Gill, H., Huynh, T., & Dias, D. A. (2021).** Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: Protocols, and the

standardisation of the usage of blanks in  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods*, 17(1), 1-19.

**Laraba, M., Tachour, S. H., Belbache, H., Boubekri, N., Djebbari, R., Benayache, F., Benayache, S., & Zama, D. (2022).** Hepatoprotective potential of the n-butanol extract of *Moricandia arvensis* from Algeria against doxorubicin induced toxicity in Wistar albino rats. *Advances in Traditional Medicine*, 22(4), 853–864.

**Liang, N., & Kitts, D. D. (2014).** Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(11), 19180-19208.

**Lin, H. M., Tseng, H. C., Wang, C. J., Lin, J. J., Lo, C. W., & Chou, F. P. (2008).** Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. *Chemico-biological interactions*, 171(3), 283–293.

**Llesuy, S. F., & Arnaiz, S. L. (1990).** Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. *Toxicology*, 63(2), 187–198.

**Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2004).** Apoptosis, autophagy, and more. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12), 2405–2419.

**Long S. R., Carey R. A., Crofoot K. M., Proteau P. J., & Filtz T. M. (2006).** Effect of hawthorn (*Crataegus oxycantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phytomedicine*, 13(9-10), 643-650.

**Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., & Paul Ross, R. (2013).** The  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*, 141(3), 2170–2176.

**Losada-Barreiro, S., & Bravo-Díaz, C. (2017).** Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European journal of medicinal chemistry*, 133, 379–402.

**Lowry O.H, Rosegrough N.J, Farr A.L, & Randall R.J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.

**Luyen, N. T., Tram, L. H., Hanh, T. T. H., Binh, P. T., Dang, N. H., Minh, C. V., & Dat, N. T. (2013).** Inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and lipase from *Chrysanthemum morifolium*. *Phytochemistry Letters*, 6(3), 322–325.

**Malesev, D., & Kuntic, V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(10), 921–939.

**Mandel, J. R., Barker, M. S., Bayer, R. J., Dikow, R. B., Gao, T., Jones, K. E., Keeley, S., Kilian, N., Ma, H., Siniscalchi, C. M., Susanna, A., Thapa, R., Watson, L., & Funk, V. A.**

- (2017). The Compositae Tree of Life in the age of phylogenomics. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4), 405–410.
- Mansour, A., Rahili, G., & Bensouici, C. (2020).** Photoprotective potential of Saharan myrtle (*Myrtus nivellei*) Leaves . *Research Journal of Topical and Cosmetic Sciences*, 11(1), 12.
- Mansur, J .S., Breder M.N.R., Mansur, M.C.A., & Azulay R. D.(1986).** Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 61, 121-124.
- Martinez, V., Mitjans, M., & Vinardell, M. (2014).** Cytoprotective Effects of Polyphenols against Oxidative Damage. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, 275-288.
- Massoud, R., Jafari-Dastjerdeh, R., Naghavi, N., & Khosravi-Darani, K. (2022).** All aspects of antioxidant properties of kombucha drink. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 12, 4018-4027.
- Mawhinney, M., & Mariotti, A. (2013).** Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontology 2000*, 61(1), 232–251.
- Mazunder, U.K., Gupta, M., Rajeshwar, Y. (2005).** Antihyperglycemic effect and antioxidant potential of phyllanthus niruri (euphorbiaceae) in streptozotocin induced diabetic rats. *European Bulletin of Drug Research*, 13(1), 13-23.
- Mebrek, S., Djeghim, H., Mehdi, Y., Meghezzi, A., Anwar, S., Awadh, N. A., & Benali, M. (2018).** Antioxidant, anti-cholinesterase, anti- $\alpha$ -glucosidase and prebiotic properties of beta-glucan extracted from Algerian barley. *International Journal of Phytomedicine*, 10(1), 58-67.
- Meddour A., Yahia M., Benkiki N., & Ayachi A. (2013).** Etude de l'activité Antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du Capparis spinosa L. *Lebanese Science Journal*, 14(1), 49-60.
- Medic-Saric, M., Jasprica, I., Smolčić-Bubalo, A., & Mornar, A. (2004).** Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta*, 77, 361-366.
- Mejía-Giraldo J. C., Henao-Zuluaga K., Gallardo C., Atehortua L., & Puertas-Mejía M. A. (2016).** Novel in vitro antioxidant and photoprotection capacity of plants from high altitude ecosystems of Colombia. *Photochemistry and Photobiology*, 92(1), 150-157.
- Melekmi, N., Saad, A., Belboukhari, N., & Cheriti, A. (2006).** Antimicrobial activity of the essential oil of *Bubonium graveolens*. *Annales de l'université de Bechar*, 2, 22-26.
- Meredith, A. M., & Dass, C. R. (2016).** Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(6), 729-741.
- Mete, R., Oran, M., Topcu, B., Oznur, M., Seber, E. S., Gedikbasi, A., & Yetisyigit, T. (2016).** Protective effects of onion (*Allium cepa*) extract against doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology and industrial health*, 32(3), 551–557.

- Migdal, C., & Serres, M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
- Milane, H. (2004).** *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques* [Thèse de doctorat, l'université de Louis Pasteur], 13-36.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004).** Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*, 56(2), 185-229.
- Minotti, G., Parlani, M., Salvatorelli, E., Menna, P., Cipollone, A., Animati, F., Maggi, C, A. & Manzini, S. (2001).** Impairment of myocardial contractility by anticancer anthracyclines: role of secondary alcohol metabolites and evidence of reduced toxicity by a novel disaccharide analogue. *British journal of pharmacology*, 134(6), 1271-1278.
- Mishra, A. K., Mishra, A., & Chattopadhyay, P. (2012).** Assessment of in vitro sun protection factor of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) essential oil formulation. *Journal of Young Pharmacists*, 4(1), 17-21.
- Misra, D. S., Maiti, R., & Ghosh, D. (2009).** Protection of swimming-induced oxidative stress in some vital organs by the treatment of composite extract of *Withania somnifera*, *Ocimum sanctum* and *Zingiber officinalis* in male rat. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*, 6(4), 534-543.
- Mobaraki, M., Faraji, A., Zare, M., Dolati, P., Ataei, M., & Manshadi, H. D. (2017).** Molecular mechanisms of cardiotoxicity: A review on major side-effect of doxorubicin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79(3), 335-344.
- Mohajeri, M., & Sahebkar, A. (2018).** Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 122, 30-51.
- Mohamed, R., Karam, R., Hagrass, H., Amer, M., & Abd El-Haleem, M. (2015).** Anti-apoptotic effect of spermatogonial stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Gene*, 561(1), 107-114.
- Mohamed, E. A., & Kassem, H. H. (2018).** Protective effect of nebivolol on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Archives of Medical Science*, 14(6), 1450-1458.
- Mohamed, B., Khalid, S., Fatima, J., Lhoussaine, E. R., Ghizlane, E., Jamal, I., & Laila, N. (2015).** Ethnopharmacological study and antifungal activity of three plants (Asteraceae Family) from. *Asian Journal of Natural & Applied Sciences*, 4, 3.
- Mohan, M., Kamble, S., Gadhi, P., & Kasture, S. (2010).** Protective effect of *Solanum torvum* on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(1), 436-440.

- Molehin, O. R., Adeyanju, A. A., Adefegha, S. A., & Akomolafe, S. F. (2018).** Protocatechuic acid mitigates adriamycin-induced reproductive toxicities and hepatocellular damage in rats. *Comparative Clinical Pathology*, 27(6), 1681–1689.
- Moreno, M. T., Brito, R. E., & Mellado, J. M. R. (2020).** Modified CUPRAC method with electrochemical detection for the determination of antioxidant capacity of gallic acid. *Comptes Rendus. Chimie*, 23(6-7), 395-401.
- Mota, K. S., Dias, G. E., Pinto, M. E., Luiz-Ferreira, A., Souza-Brito, A. R., Hiruma-Lima, C. A., Barbosa-Filho, J. M., & Batista, L. M. (2009).** Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(3), 979–1012.
- Mouffouk, C., Hambaba, L., Haba, H., Mouffouk, S., Bensouici, C., mouffouk, S., Hachemi, M., & Khadraoui, H. (2018).** Acute toxicity and in vivo anti-inflammatory effects and in vitro antioxidant and anti-arthritic potential of *Scabiosa stellata*. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(4), 335–348.
- Mrduljaš N., Krešić G., Bilušić T. (2017).** Polyphenols: Food Sources and Health Benefits. U: Chavarri Hueda, M. *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*. Rijeka. In Tech Open, str. P: 23-41.
- Murray, R.L. (1984).** Creatinine In: Kaplan LA, & Pesce AJ. (Eds). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company, 1261-1266.
- Narayana, K. R., & Reddy, M. S., Chaluvadi, M. & Devarakonda, K. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33(1), 2-16.
- Nasr, A. Y. (2017).** The impact of aged garlic extract on adriamycin-induced testicular changes in adult male Wistar rats. *Acta Histochemica*, 119(6), 648–662.
- Nowrouzi, F., Azadbakht, M., Kalehoei, E., Modarresi, M., (2019).** Protective Effect of Rosa Canina Extract Against Doxorubicin-induced Testicular Toxicity in Mice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, 1-18
- Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., & Moens, A. L. (2012).** Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(6), 1213-1225.
- Okuda, T., & Ito, H. (2011).** Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 16(3), 2191–2217.
- Olaleye, T., Komolafe, K., Akinmoladun, F., & Akindahunsi, A. (2013).** Methanolic Leaf Extract of *Parkia biglobosa* Protects against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in rats. *Planta Medica*, 79(13).

**Oliveira-Junior R.G., Ferraz C.A.A., Souza G.R., Leite A., Guimaraes A., Paula de Oliveira S.R., Gomes de Lima-Saraiva L., Araújo Rolim P., José Rolim-Neto J.R., & Guedes da Silva Almeida, J.R. (2017).** Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and photoprotective activities of extracts from flowers of *Bromelia laciniosa* (Bromeliaceae), *Biotechnology and biotechnology equipment*, 31, 600–605.

**Olusoji, M. J., Oyeyemi, O. M., Asenuga, E. R., Omobowale, T. O., Ajayi, O. L., & Oyagbemi, A. A. (2017).** Protective effect of Gallic acid on doxorubicin-induced testicular and epididymal toxicity. *Andrologia*, 49(4).

**Oluwatoyin, A. E., Christina, A. A., & Tejumade, U. (2019).** Anti-inflammatory Activity of *Saccharum Officinarum* Linn (Poaceae) Juice in Animal Models. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacy*.

**Orhan, I. E. (2018).** Phytochemical and pharmacological activity profile of *Crataegus oxyacantha* L.(Hawthorn)-a cardiogenic herb. *Current medicinal chemistry*, 25(37), 4854-4865.

**Owumi, S. E., Lewu, D. O., Arunsi, U. O., & Oyelere, A. K. (2021).** Luteolin attenuates doxorubicin-induced derangements of liver and kidney by reducing oxidative and inflammatory stress to suppress apoptosis. *Human and Experimental Toxicology*, 40(10), 1656–1672.

**Oyaizu M. (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Journal of Nutrition*, 44, 307–315.

**Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011).** The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664.

**Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016).** Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.

**Paul, S., Sharma, S., Paliwal, S. K., & Kasture, S. (2017).** Role of *Crataegus oxyacantha* (Hawthorn) on scopolamine induced memory deficit and monoamine mediated behaviour in rats. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 17, 315-324.

**Perianayagam, J. B., Sharma, S. K., & Pillai, K. K. (2006).** Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. *Journal of ethnopharmacology*, 104(3), 410–414.

**Perva-Uzunalić A., Škerget M., Knez Ž., Weinreich B., Otto F., & Grüner S. (2006).** Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food chemistry*, 96(4), 597-605.

**Pillai, K., Ayaz, S., & Bhandari, U. (2005).** Influence of DL  $\alpha$ -lipoic acid and vitamin-E against doxorubicin-induced biochemical and histological changes in the cardiac tissue of rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(5), 294.

**Poitevin, B. (2014).** *Crataegus oxyacantha*. *La Revue d'Homéopathie*, 5(3), 113-116.

- Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, (4), 25-39.
- Prahalathan, C., Selvakumar, E., & Varalakshmi, P. (2004).** Remedial effect of DL-alpha-lipoic acid against adriamycin induced testicular lipid peroxidation. *Molecular and cellular biochemistry*, 267(1-2), 209–214.
- Prasad, K. N., Xie, H., Hao, J., Yang, B., Qiu, S., Wei, X., Chen, F., & Jiang, Y. (2010).** Antioxidant and anticancer activities of 8-hydroxypsoralen isolated from wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] peel. *Food Chemistry*, 118(1), 62–66.
- Prasanna, P. L., Renu, K., & Gopalakrishnan, A. V. (2020).** New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life sciences*, 250, 117599.
- Pugazhendhi, A., Edison, T. N. J. I., Velmurugan, B. K., Jacob, J. A., & Karuppusamy, I. (2018).** Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. In *Life Sciences*, 200, 26–30.
- Ramdane, F., Essid, R., Mkadmini, K., Hammami, M., Fares, N., Mahammed, M. H., el Ouassiss, D., Tabbene, O., Limam, F., & Ould Hadj, M. D. (2017).** Phytochemical composition and biological activities of *Asteriscus graveolens* (Forssk) extracts. *Process Biochemistry*, 56, 186–192.
- Rashid, S., Ali, N., Nafees, S., Ahmad, S. T., Arjumand, W., Hasan, S. K., & Sultana, S. (2013).** Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(5), 337–345.
- Rasouli H., Hosseini-Ghazvini S. M. B., Adibi H., & Khodarahmi R. (2017).** Differential  $\alpha$ -amylase/ $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: A virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food & function*, 8(5), 1942-1954.
- Ravi, K., Ramachandran, B., & Subramanian, S. (2004).** Effect of *Eugenia Jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life sciences*, 75(22), 2717–2731.
- Re, R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., & Rice-Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
- Redondo, L. M., Chacana, P. A., Dominguez, J. E., & Fernandez Miyakawa, M. E. (2014).** Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Frontiers in microbiology*, 5, 118.
- Refaie, M. M., Amin, E. F., El-Tahawy, N. F., & Abdelrahman, A. M. (2016).** Possible Protective Effect of Diacerein on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Journal of toxicology*, 2016, 9507563.

- Regula, K. M., Ens, K., & Kirshenbaum, L. A. (2002).** Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxia-mediated cell death of ventricular myocytes. *Circulation research*, 91(3), 226–231.
- Renu, K., & Valsala, GA. (2019).** Deciphering the molecular mechanism during doxorubicin-mediated oxidative stress, apoptosis through Nrf2 and PGC-1 $\alpha$  in a rat testicular milieu. *Reproductive Biology*, 19(1), 22-37
- Rezaei-Golmisheh, A., Malekinejad, H., Asri-Rezaei, S., Farshid, A. A., & Akbari, P. (2015).** Hawthorn ethanolic extracts with triterpenoids and flavonoids exert hepatoprotective effects and suppress the hypercholesterolemia-induced oxidative stress in rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, 18(7), 691–699.
- Riad, A., Bien, S., Westermann, D., Becher, P. M., Loya, K., Landmesser, U., Kroemer, H. K., Schultheiss, H. P., & Tschöpe, C. (2009).** Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of Doxorubicin in mice. *Cancer research*, 69(2), 695–699.
- Richardson, J. D., & Vasko, M. R. (2002).** Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 302(3), 839–845.
- Rizk, S., Zaki, H., & Mina, M. (2014).** Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 67, 176-186.
- Rolnik, A., & Olas, B. (2021).** The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3009.
- Rotelli, A. E., Guardia, T., Juárez, A. O., de la Rocha, N. E., & Pelzer, L. E. (2003).** Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological research*, 48(6), 601–606.
- Roy, A., Khan, A., Ahmad, I., Alghamdi, S., Rajab, B. S., Babalghith, A. O., Alshahrani, M. Y., Islam, S., & Islam, M. R. (2022).** Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications. *BioMed research international*, 2022, 5445291.
- Russo, D. (2018).** Flavonoids and the Structure-Antioxidant Activity Relationship. *Journal of Pharmacognosy & Natural Products*, 4(1).
- Saad, A., Touati, B., Draoui, B., Tabti, B., Abdenebi, A., & Mir, K. (2016).** Moisture sorption isotherms and thermodynamic properties of *Asteriscus graveolens* leaves. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 18(2), 276-285.
- Saafi-Bensalah, E. B., Elarem, A., Hammami, M., Helal, A. N., & Achour, L. (2011).** Influence de la saison de récolte et du stockage sur les activités antioxydantes des dattes de l'espèce *Phoenix dactylifera* L. de TUNISIE. *Tunisian Journal of Medicinal Plants and Natural Products*, 6, 133-141.
- Said, M. E., Bombarda, I., Naubron, J., Vanloot, P., Jean, M., Cheriti, A., Dupuy, N., & Roussel, C. (2017).** Isolation of the major chiral compounds from *Bubonium graveolens*

- essential oil by HPLC and absolute configuration determination by VCD. *Chirality*, 29(2), 70–79.
- Saleem, U., Ahmad, B., Ahmad, M., Hussain, K., & Bukhari, N. I. (2015).** Anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-pyretic activities of latex and leaves methanol extract of *Euphorbia helioscopia*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(4), 322–328.
- Salini, K., & Sivasithamparam, N. D. (2021).** In vitro anti-cancer effect of *Crataegus oxyacantha* berry extract on hormone receptor positive and triple negative breast cancers via regulation of canonical Wnt signalling pathway.
- Saoudi, M., Slama-Ben Salem, R. B., Salem, M. B., Brahmi, N., Badraoui, R., Nasri, M., & El Feki, A. (2019).** Beneficial effects of *crataegus oxyacantha* extract on neurobehavioral deficits and brain tissue damages induced by an insecticide mixture of deltamethrin and chlorpyrifos in adult wistar rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 114, 108795.
- Sassi, A., Amroussi, S., Besbes, M., Aouni, M., & Skhiri, F. (2018).** Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase activities and phytochemical constituents of *Chrysanthoglossum trifurcatum* (Desf.). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11(4), 285.
- Sathishsekar, D., & Subramanian, S. (2005).** Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 14(2), 153–158.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., & Rémésy, C. (2002).** Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 56(6), 276–282.
- Schalka, S., & Reis, V. M. (2011).** Sun protection factor: meaning and controversies. *Anais brasileiros de dermatologia*, 86(3), 507–515.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014).** ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462.
- Sene, M., Ndiaye, M., Barboza, F. S., Sene, M., Diatta, W., Sarr, A., Ndiaye-Sy, A., Dieye, A. M., & Sy, G. Y. (2017).** Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux des feuilles de *Elaeis guineensis* Jacq. (ARECACEAE) sur l'oedème aigu de la patte de rat induit par la carraghénine. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(6), 2568.
- Shahidi, F., & Yeo, J. (2018).** Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1573.
- Sharma, S., Sheehy, T., Kolahdooz, F., & Barasi, M. (2015).** *Nutrition at a Glance* (2<sup>nd</sup> ed, pp. 162). Wiley Backwell.
- Shevchuk, O. O., Posokhova, E. A., Sakhno, L. A., & Nikolaev, V. G. (2012).** Theoretical ground for adsorptive therapy of anthracyclines cardiotoxicity. *Experimental oncology*.

- Shi, H., Noguchi N., & Niki E. (2001).** Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods in Enzymology*, 335, 157-66.
- Shin, H. J., Kwon, H. K., Lee, J. H., Gui, X., Acheh, A., Kim, J. H., & Choi, S. (2015).** Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. *Scientific reports*, 5, 15798.
- Silva A. P. D., Rocha R., Silva C. M., Mira L., Duarte M. F., & Florêncio M. H. (2000).** Antioxidants in medicinal plant extracts. A research study of the antioxidant capacity of Crataegus, Hamamelis and Hydrastis. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(8), 612-616.
- Singleton V.L., & Rossi J.A.J. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American journal of enology and viticulture*. 16, 144-58.
- Somboro, A., Diallo, D., Sidibe, L., Traore, N., Fofana, B., Bouare, S., Chalard, P., Chalchat, J., Figueredo, G., & Troin, Y. (2013).** Activités anticholinestérasiques des alcaloïdes totaux extraits des feuilles, fruits, écorces de racines et écorces de tronc de Guiera senegalensis, une plante médicinale Malienne. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(4), 1723.
- Soubrier, M., Rosenbaum, D., Tatar, Z., Lahaye, C., Dubost, J. J., & Mathieu, S. (2013).** Anti-inflammatoires non stéroïdiens et vaisseaux. *Revue Du Rhumatisme*, 80(3), 204–208.
- Soudani, N., Ben Amara, I., Sefi, M., Boudawara, T., & Zeghal, N. (2011).** Effects of selenium on chromium (VI)-induced hepatotoxicity in adult rats. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 63(6), 541–548.
- Souza Lda, C M., Chen, M., Ikeno, Y., Salvadori, D. M. F., & Bai, Y. (2021).** The implications of mitochondria in doxorubicin treatment of cancer in the context of traditional and modern medicine. *Traditional Medicine and Modern Medicine*, 3(04), 239-254.
- Srdjenovic, B., Milic-Torres, V., Grujic, N., Stankov, K., Djordjevic, A., & Vasovic, V. (2010).** Antioxidant properties of fullereneol C60(OH)24 in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(6), 298–305.
- Sridevi, T., Nisha, P.V. & Appavu, A.G. (2012).** Effect of Doxorubicin on the morphology, histology and karyology of male reproductive system of white mice, *Mus musculus*. *Indian Journal of Science and Technology*, 5(4), 2614-2618.
- Stěrba, M., Popelová, O., Vávrová, A., Jirkovský, E., Kovaříková, P., Geršl, V., & Simůnek, T. (2013).** Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxidants & redox signaling*, 18(8), 899–929.
- Stevanato, R., Bertelle, M., & Fabris, S. (2014).** Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(1), 71-77.

- Stevanovic, T., Diouf, P., & Garcia-Perez, M. (2009).** Bioactive Polyphenols from Healthy Diets and Forest Biomass. *Current Nutrition & Food Science*, 5(4), 264–295.
- Stevenson, D. E., & Hurst, R. D. (2007).** Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more?. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 64(22), 2900–2916.
- Su, J., Wang, X., Song, W., Bai, X., & Li, C. (2016).** Reducing oxidative stress and hepatoprotective effect of water extracts from Pu-erh tea on rats with high-fat diet. *Food Science and Human Wellness*, 5(4), 199–206.
- Subashini, R., Ragavendran, B., Gnanapragasam, A., Yogeeta, S. K., & Devaki, T. (2007).** Biochemical study on the protective potential of Nardostachys jatamansi extract on lipid profile and lipid metabolizing enzymes in doxorubicin intoxicated rats. *Die Pharmazie*, 62(5), 382–387.
- Superko, H. R., Nejedly, M., & Garrett, B. (2002).** Small LDL and its clinical importance as a new CAD risk factor: a female case study. *Progress in cardiovascular nursing*, 17(4), 167–173.
- Swamy, A. V., Gulliaya, S., Thippeswamy, A., Koti, B. C., & Manjula, D. V. (2012).** Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian journal of pharmacology*, 44(1), 73–77.
- Szydłowska-Czerniaka A., Dianoczki C., Recseg K., Karlovits G., & Szlyk E. (2008).** Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta* . 76, 899-905.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013).** Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. In *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 157–170.
- Tadić, V. M., Dobrić, S., Marković, G. M., Dordević, S. M., Arsić, I. A., Menković, N. R., & Stević, T. (2008).** Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7700–7709.
- Tam, K. (2013).** The roles of doxorubicin in hepatocellular carcinoma. *ADMET & DMPK*, 1(3), 29–44.
- Tanase, C., Coșarcă, S., & Muntean, D. L. (2019).** A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1182.
- Tayeh, Z., Dudai, N., Schechter, A., Chalifa-Caspi, V., Barak, S., & Ofir, R. (2018).** Molecular mode of action of asteriscus graveolens as an anticancer agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8).
- Tayeh, Z., & Ofir, R. (2018).** Asteriscus graveolens extract in combination with cisplatin/etoposide/doxorubicin suppresses lymphoma cell growth through induction of caspase-3 dependent apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8).

- Thomas, P. A., Leski, T., La Porta, N., Dering, M., & Iszkulo, G. (2021).** Biological flora of the British Isles: *Crataegus laevigata*. *Journal of Ecology*, *109*(1), 572-596.
- Tokarska-Schlattner, M., Zaugg, M., Zuppinger, C., Wallimann, T., & Schlattner, U. (2006).** New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *41*(3), 389-405.
- Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., Ulubelen A. (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, *103*, 816–822.
- Trivedi, P., Tripathi, D., & Jena, G. (2011).** Hesperetin protects testicular toxicity of doxorubicin in rat: role of NFκB, p38 and caspase-3. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(4), 838-847.
- Tsao R. (2010).** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231–1246.
- Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2005).** Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell death and differentiation*, *12 Suppl 2*, 1528–1534.
- Türedi, S., Yuluğ, E., Alver, A., Kutlu, Ö., & Kahraman, C. (2014).** Effects of resveratrol on doxorubicin induced testicular damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *67*(3), 229–235.
- Uchiyama M., & Mihara M. (1978).** Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*, *86*(1), 271-278.
- Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2020).** Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(22), 5243.
- Uma Mahesh, B., Shrivastava, S., Kuncha, M., Sahu, B. D., Swamy, C. V., Pragada, R. R., Naidu, V. G., & Sistla, R. (2013).** Ethanolic extract of *Boswellia ovalifoliolata* bark and leaf attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, *36*(3), 840–849.
- Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., & Bordet, R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La lettre du pharmacologue*, *18*, 16-23.
- Vardi, N., Parlakpınar, H., Ates, B., Cetin, A., & Otlu, A. (2009).** Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril*, *92*(6):2028-2033.
- Vargas, F., Romecín, P., García-Guillén, A. I., Wangesteen, R., Vargas-Tendero, P., Paredes, M. D., Atucha, N. M., & García-Estañ, J. (2018).** Flavonoids in Kidney Health and Disease. *Frontiers in physiology*, *9*, 394.

- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. (2010).** Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), 1106–1131.
- Verma, S. K., Jain, V., Verma, D., & Khamesra, R. (2007).** Crataegus oxyacantha-A cardioprotective herb. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 1(1), 65-71.
- Vijay, KM., Mahesh, V., Srinivas, P., Ganesh, YV., Godwin, AP., & Lahkar, M. (2013).** Evaluation of the protective effect of silymarin on doxorubicin induced chronic testicular toxicity in rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1):473-484.
- Vijayan, N. A., Thiruchenduran, M., & Devaraj, S. N. (2012).** Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of *Crataegus oxyacantha* on isoproterenol-induced myocardial damage. *Molecular and cellular biochemistry*, 367(1-2), 1–8.
- Viladomiu, M., Hontecillas, R., & Bassaganya-Riera, J. (2016).** Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *European journal of pharmacology*, 785, 87–95.
- Wakharde, A.A., Awad, A.H., Bhagat, A. and Karuppayil, S.M. (2018).** Synergistic Activation of Doxorubicin against Cancer: A Review. *American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 1(2), 1-6.
- Wali, A. F., Rashid, S., Rashid, S. M., Ansari, M. A., Khan, M. R., Haq, N., Alhareth, D. Y., Ahmad, A., & Rehman, M. U. (2020).** Naringenin Regulates Doxorubicin-Induced Liver Dysfunction: Impact on Oxidative Stress and Inflammation. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(4), 1-17.
- Walker A. F., Marakis G., Morris A. P., & Robinson P. A. (2002).** Promising hypotensive effect of hawthorn extract: a randomized double-blind pilot study of mild, essential hypertension. *Phytotherapy Research*, 16(1), 48-54.
- Wallace K. B. (2007).** Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovascular toxicology*, 7(2), 101–107.
- Wang A, J., Zhang, J., Xiao, M., Wang, S., Wang B, J., Guo, Y., Tang, Y., & Gu, J. (2021).** Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity: novel roles of sirtuin 1-mediated signaling pathways. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 78(7), 3105–3125. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03729-y>
- Wang J., Xiong X., & Feng, B. (2013).** Effect of crataegus usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Wang, X., Wang, X. L., Chen, H. L., Wu, D., Chen, J. X., Wang, X. X., Li, R. L., He, J. H., Mo, L., Cen, X., Wei, Y. Q., & Jiang, W. (2014).** Ghrelin inhibits doxorubicin cardiotoxicity by inhibiting excessive autophagy through AMPK and p38-MAPK. *Biochemical pharmacology*, 88(3), 334–350.

- Weichselbaum, E., & Buttriss, J. L. (2010). Polyphenols in the diet. *Nutrition Bulletin*, 35(2), 157–164.
- Weill, B., Bateux, F. & Dhainaut, J. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck, Université (Paris), 12-23.
- Wu, Q. S., Zou, Y. N., & Abd-Allah, E. F. (2014). Mycorrhizal association and ROS in plants. In *Oxidative damage to plants* (pp. 453-475). Academic press.
- Wu, Q., Li, W., Zhao, J., Sun, W., Yang, Q., Chen, C., Xia, P., Zhu, J., Zhou, Y., Huang, G., Yong, C., Zheng, M., Zhou, E., & Gao, K. (2021). Apigenin ameliorates doxorubicin-induced renal injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 137.
- Xiao F, Xu T, Lu B, & Liu R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1, 60–69.
- Xin, Y. F., You, Z. Q., Gao, H. Y., Zhou, G. L., Chen, Y. X., Yu, J., & Xuan, Y. X. (2012). Protective effect of lycium barbarum polysaccharides against doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Phytotherapy Research*, 26(5), 716–721.
- Xu, X., Persson, H. L., & Richardson, D. R. (2005). Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Molecular pharmacology*, 68(2), 261–271.
- Yaici, K., Dahamna, S., Moualek, I., Belhadj, H., & Houali, K. (2019). Évaluation de la teneur des composés phénoliques, des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de l'espèce *Erica arborea* L. (Ericaceae) dans la médecine traditionnelle du Tell sétifien dans l'Est Algérien. *Phytothérapie*, 19(4), 226–234.
- Yanar, M., Ercisli, S., Yilmaz, K. U., Sahiner, H., Taskin, T., Zengin, Y., Akgul, I., & Celik, F. (2011). Morphological and chemical diversity among hawthorn (*Crataegus* spp.) genotypes from Turkey. *Scientific Research and Essays*, 6(1), 35-38.
- Yang, J., Kim, J.S., Jeong, H.J., Kang, H.H., Cho, J.C., Yeom, H.M., Kim, M.J. (2011). Determination of antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities and luteolin contents of *Chrysanthemum morifolium* Ramat extracts. *African Journal of Biotechnology*, 10(82), 19197–19202.
- Yang, H., Ma, Y., Chen, G., Zhou, H., Yamazaki, T., Klein, C., Pietrocola, F., Vacchelli, E., Souquere, S., Sauvat, A., Zitvogel, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2016). Contribution of RIP3 and MLKL to immunogenic cell death signaling in cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*, 5(6), e1149673.
- Yefrida., Suryani, H., Alif, A., Azis, H. & Efdi, M. (2018). Modification of Phenanthroline Method to Determine Antioxidant Content in Tropical Fruits Methanolic Extract. *Res. J. Chem. Environ.*, 22(4), 28-35.

- Yeh, Y., Lai, H., Ting, C., Lee, W., Wang, L., Wang, K., & Liu, T. (2007).** Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. *Biochem Pharmacol.*, 74(7), 969-980.
- Yeh, Y. C., Liu, T. J., Wang, L. C., Lee, H. W., Ting, C. T., Lee, W. L., Hung, C. J., Wang, K. Y., Lai, H. C., & Lai, H. C. (2009).** A standardized extract of Ginkgo biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *British journal of pharmacology*, 156(1), 48–61.
- Zacchino, S. A., Butassi, E., Liberto, M. D., Raimondi, M., Postigo, A., & Sortino, M. (2017).** Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 37, 27–48.
- Zhang, Y. W., Shi, J., Li, Y. J., & Wei, L. (2009).** Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 57, 435-445.
- Zhao, X., Zhang, J., Tong, N., Chen, Y., & Luo, Y. (2012).** Protective effects of berberine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 35(5), 796–800.
- Zheleva-Dimitrova D. Z.h (2013).** Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of *Amorpha fruticosa* L. and *Phytolacca americana* L. *Pharmacognosy magazine*, 9(34), 109–113.
- Zhu, H., Sarkar, S., Scott, L., Danelisen, I., Trush, M. A., Jia, Z., & Li, Y. R. (2016).** Doxorubicin redox biology: redox cycling, topoisomerase inhibition, and oxidative stress. *Reactive oxygen species (Apex, NC)*, 1(3), 189.
- Zick S. M., Gillespie B., & Aaronson, K. D. (2008).** The effect of *Crataegus oxycantha* special extract WS 1442 on clinical progression in patients with mild to moderate symptoms of heart failure. *European journal of heart failure*, 10(6), 587-593.
- Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Ansari, A., Bouyanzer, A., Paolini, J., Costa, J., & Hammouti, B. (2012).** Green Approach to Corrosion Inhibition of Mild Steel by Essential Oil Leaves of *Asteriscus Graveolens* (Forssk.) in Sulphuric Acid Medium. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(5), 3959–3981.
- Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Mazouz, H. A. M. I. D., Tomi, P., Paolini, J. U. L. I. E. N., & Costa, J. (2011).** Antifungal activity of essential oil from *Asteriscus graveolens* against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Natural product communications*, 6(11).

## RESEARCH ARTICLE

# Hepatoprotective Effects of Algerian *Crataegus oxyacantha* Leaves

Amira Mecheri<sup>1</sup>, Wassila Benabderrahmane<sup>2</sup>, Amel Amrani<sup>1,2\*</sup>, Nassima Boubekri<sup>1,2</sup>,  
Fadila Benayache<sup>2</sup>, Samir Benayache<sup>2</sup> and Djamila Zama<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, Route d'Aïn El Bey, 25000 Constantine, Algérie; <sup>2</sup>Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives, Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Frères Mentouri Constantine 1, Route d'Aïn El Bey, 25000 Constantine, Algérie

**Abstract: Background:** Hawthorn (*C. oxyacantha*), a common edible plant, is widely used for the preparation of a different foodstuff and is also used in traditional medicine to treat heart problems and gastrointestinal ailments. Recently, a few patents of *Crataegus* preparation for protective effects (prevention of cardiovascular and hepatic diseases) have been developed.

**Objective:** The current study aimed to explore the antioxidant and hepatoprotective effects of *n*-butanol extract of *Crataegus oxyacantha* leaves in acute liver damage induced by Doxorubicin (DOX).

**Methods:** *Crataegus oxyacantha* (100 mg/kg body weight) or vitamin E as a standard antioxidant (100 mg/kg body weight) were administered orally to female rats for 10 days, in the presence or absence of hepatotoxicity induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of DOX (15 mg/kg on the 8<sup>th</sup> day). On day 11, blood and liver samples were analyzed for biomarker levels and histopathological changes. Liver homogenates were used for determination of oxidative stress parameters that include Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH) level and Glutathione Peroxidase (GPx) activity.

**Results:** Treatment with *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves significantly improved the altered liver enzyme activities and oxidative stress markers. The histopathological observations confirm the results of biochemical parameters.

**Conclusion:** The obtained results support the traditional use of *C. oxyacantha* to cure gastrointestinal ailments and highlighted its possible use in the food and pharmaceutical industries as a source of natural antioxidant.

**Keywords:** *Crataegus oxyacantha*, antioxidant, hepatoprotective, doxorubicin, hepatotoxicity, oxidative stress.

## 1. INTRODUCTION

Doxorubicin (DOX) is a chemotherapeutic agent and is widely used in cancer treatment [1]. Oxidative stress generated by DOX in non-targeted tissues is considered as a significant factor responsible for their severe side effects, e.g. cardiotoxicity, hepatotoxicity [2] and nephrotoxicity [3, 4]. A strategy to protect against DOX toxic effects could be to use dietary antioxidants of which fruits and vegetable are a rich source [5]. Recently, several studies have evaluated the effects of natural antioxidant products, such as vitamin E, vitamin C and polyphenols [5, 6] in preventing or reducing the toxic effects of DOX, without decreasing its antitumour action.

Plants are the major contributors of natural products and are usually rich in nutritional or medicinal properties. Many natural products are biologically active and have been used for thousands of years as traditional medicines [7].

*Crataegus oxyacantha* (Rosaceae), also known as hawthorn, are small trees and shrubs naturally growing in Europe, Asia and the north of Africa [8]. Hawthorn is both a medicinal plant, which is used in folk medicine, and a common edible plant, which is widely used for the preparation of different food stuff. Thus, based on the common use as traditional medicine and food, *C. oxyacantha* can be considered safe [9]. Different parts from *C. oxyacantha* (flowers, leaves and fruits) have long been used in folk medicine for the treatment of various ailments such as heart (cardiovascular disorders), central nervous system, immune system, eyes, reproductive system, liver, kidney etc. It also exhibits wide range of cytotoxic, gastroprotective, anti-inflammatory and antimicrobial

\*Address correspondence to this author at the VARENBIOMOL Research Unit, Department of Animal Biology, University Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algeria; Tel/Fax: +21331811103; E-mail: [amrani.a@umc.edu.dz](mailto:amrani.a@umc.edu.dz)

activities [10]. Hawthorn contains a range of pharmacologically active substances, of which the most widespread compounds reported are flavonoids, triterpenic acids, and phenol carboxylic acids. Flavonoids such as vitexin, hyperoside, rutin and catechin/epicatechin derived Oligomeric Procyanidins (OPC) are the most important constituent. Triterpenic acids (ursolic, oleanolic, and crataegolic acids) and phenol carboxylic acids (chlorogenic and caffeic acids) [11]. Other chemical constituents include vitamin C, saponins, tannins, cardiogenic amines (phenylethylamine, tyramine, isobutylamine, *O*-methoxy phenylethylamine, choline and acetylcholine) and purine derivatives (adenosine, adenine, guanine, amygdalin) [12].

According to a few patents studies, *Crataegus* extracts (phenolic compounds such as; rutin, quercetin, kaempferol and vitexin or a mixture thereof) have shown hypolipidaemic (US20040132816) [13], cardioprotective, and hepatoprotective (US11226862) potentials [14].

Therefore, the current study was undertaken to evaluate the *in vivo* antioxidant potential and protective effect of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves on DOX-induced liver toxicity in comparison with vitamin E (known antihepatotoxic agent).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Plant Materials

Leaves of *C. oxyacantha* were harvested from, Mila, eastern Algeria, during the month of April 2014. The species were identified by Professor Mohamed Kaabache (Botany department, Ferhat Abbas University, Setif, Algeria) and voucher specimen (CO 24/09/14) has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, Frères Mentouri University, Constantine.

### 2.2. Extraction Procedure

Air-dried Leaves (800 g) of *C. oxyacantha* (Rosaceae) were macerated at room temperature with ETOH-H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) for 72 h, three times. After filtration, the filtrate was concentrated in vacuum (up to 35°C) and dissolved in distilled H<sub>2</sub>O (400 mL) under magnetic stirring and then put at the refrigerator for one night to precipitate a maximum of chlorophylls. The resulting solution was filtrated extracted successively with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol. The organic solutions were dried with sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered using common filter paper and concentrated in vacuum (up to 35°C) to obtain the following extracts: petroleum ether, CHCl<sub>3</sub> (2.13 g), EtOAc (14.01g) and *n*-BuOH (50.78 g).

### 2.3. Animals

Healthy female *Wistar* rats (170-200 g) were provided from Pasteur Institute. The animals were housed in a plastic cage under controlled conditions. The rats were kept in the laboratory (Faculty of Natural Sciences and life, Constantine, Algeria) for one week before the experimental work with free access to standard laboratory food and water *ad-libitum*.

All experimental assays were carried out in conformity with international guidelines for the care and use of laboratory animals. Also, all experimental procedures were performed between 8-10 a.m. and care was taken to avoid stressful conditions. Rats were housed six per cage and were randomly divided into 5 groups:

Group 1: Control rats or the untreated rats.

Group 2: Extr, rats received *n*-butanol extract (100mg/kg, by gavage) for 10 consecutive days.

Group 3: DOX, rats received a single injection of DOX (15 mg/kg, i.p.).

Group 4: Vit E+ DOX, rats received vitamin E (100 mg/kg, by gavage) for 10 consecutive days and a single injection of DOX on the 8<sup>th</sup> day.

Group 5: Extr+DOX, rats received *n*-butanol extract (100mg/kg, by gavage) for 10 consecutive days and a single injection of DOX on the 8<sup>th</sup> day.

The rats were sacrificed at the end of the experiment 24h after the last dose of extract or vitamin E and 72 h after the doxorubicin treatment.

The blood samples were centrifuged at 3000g for 10 min. The serum was stored in the fridge at -20°C for subsequent analysis. Liver tissues were cautiously removed and washed with ice-cold normal saline in the order to clear away blood thoroughly, blotted on filter paper, weighed, and homogenized in ice-cold KCl 1.15%. The homogenates (20%) were centrifuged and then the supernatant was refrigerated at -80 °C until assayed.

### 2.4. Serum Markers Of Liver Damage

The levels of Serum Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase (AST) were determined using commercial kits (Spinreact, SPAIN) according to the manufacturer's directions.

### 2.5. Measurement Of MDA, GSH and GPx in Liver Homogenate

The degree of lipid peroxidation was determined colorimetrically using the method of Uchiyama and Mihara [15]. 3 mL phosphoric acid (1%) and 1mL of thiobarbituric acid (TBA, 0.67%), aqueous solution were added to 0.5mL of liver homogenate (20%). The mixtures were incubated for 45 min in a boiling water bath. The absorbance was measured at 530 nm and was proportional to the amount of TBARS formed. The MDA values were calculated using 1,1,3,3-tetraethoxypropane as the standard and expressed as nmol MDA equivalents/g tissue.

GPx activity was estimated according to the method described by Flohe and Gunzler [16]. The activity was expressed as μmol of GSH oxidized per milligram of protein. Protein concentration was estimated colorimetrically using Lowry method [17] and bovine serum albumin was used as a standard.

Reduced glutathione (GSH) content in the liver was measured according to the method described by Elman [18] using Elman's reagent. This method is based on the reactive

cleavage of 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) by sulfhydryl group to yield a yellow color with maximum absorbance at 412 nm.

**2.6. Histopathology**

Rat livers were preserved in 10% buffered formaldehyde. Tissue samples were embedded in paraffin and 5 µm sections were cut using a rotary microtome and stained with hematoxylin & eosin. Histopathological evaluation was made by an expert pathologist.

**2.7. Statistical Analysis**

Results are expressed as means ±SD. Assessment of these results was performed using student's t-test for multiple comparisons using GraphPad Prism 5.01 Retail + 5.02 Update, Version 5. The statistical significance was accepted at a level of p<0.05.

**3. RESULTS**

**3.1. Effects Of *C. Oxyacantha* on Biochemical Parameters**

The levels of the hepatic enzymes (AST and ALT) in the serum are presented in Table 1. Rats that were treated with DOX showed a significant increase (p<0.05) in the serum levels of these enzymes (115.85±9.99 and 102.85±12.15 U/L for AST and ALT, respectively) when compared to control group (99±6.48 and 59.4±7.22 U/L for AST and ALT, respectively). It was interesting to note that the pretreated rats with *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves showed an

important decrease (p<0.05) in the level of these enzymes (102.15±14.75 and 86.00±9.59 U/L for AST and ALT, respectively) when compared to the rats treated with DOX.

Fig. (1) showed that treatment of rats with DOX provoked significant increases (p<0.01) of liver lipid peroxidation level (8.72±0.52 nmol MDA/g tissue) as compared with the control group (4.33±0.20 nmol MDA/g tissue). However, the pretreated rats with *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves reduced the lipid peroxidation level to 5.56±0.36 nmol MDA/g tissue.

Figs. (2 and 3) presented the effects of DOX on the level of glutathione and activity of the antioxidant enzyme (GPx). It was remarkable that DOX administration provoked significant decrease in liver glutathione level (p<0.01) and GPx activity (7.14±1.12 µmol/g tissue and 19.54±0.3 µmol GSH/mg protein, respectively) compared to control rats (14.17±1.12 µmol/g tissue and 25.3±0.7 µmol GSH/mg protein, respectively). However, the administration of *n*-butanol extract of *C. Oxyacantha* leaves caused a significant increase in GSH level (p<0.05) and GPx activity (10.68±1.10 µmol/g tissue and 24±0.1 µmol GSH/mg protein respectively) as compared to DOX treated rats.

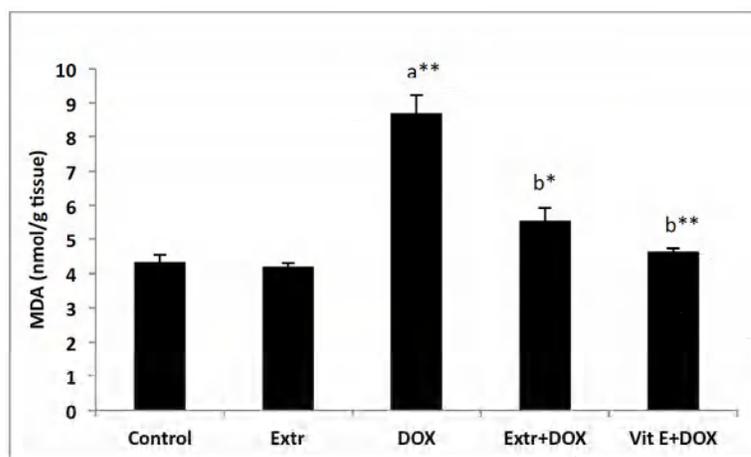
**3.2. Histopathologic Examination of Liver Tissue**

The histopathological changes are summarized in Table 2. Liver sections from control group and *n*-butanol extract of *C. Oxyacantha* leaves group exhibited normal liver architecture. DOX induced severe loss of the hepatic architecture,

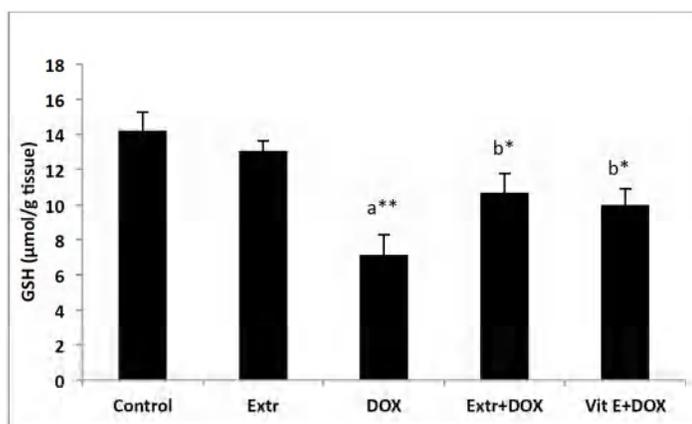
**Table 1. The protective effect of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves (100 mg/kg) against DOX (15mg/ kg, i.p.) induced serum biochemical changes.**

Parameters	Control	<i>C. oxyacantha</i>	DOX	DOX+ <i>C. oxyacantha</i>	DOX+Vit E
AST (U/L)	99± 6.48	101±17.00	115.85±9.99 <sup>a*</sup>	102.15±14.75 <sup>b*</sup>	98.6±13.09 <sup>b*</sup>
ALT (U/L)	59.4±7.22	66.5±7.04	102.85±12.15 <sup>a*</sup>	86.00 ±9.59 <sup>b*a*</sup>	73.00±9.21 <sup>b*a*</sup>

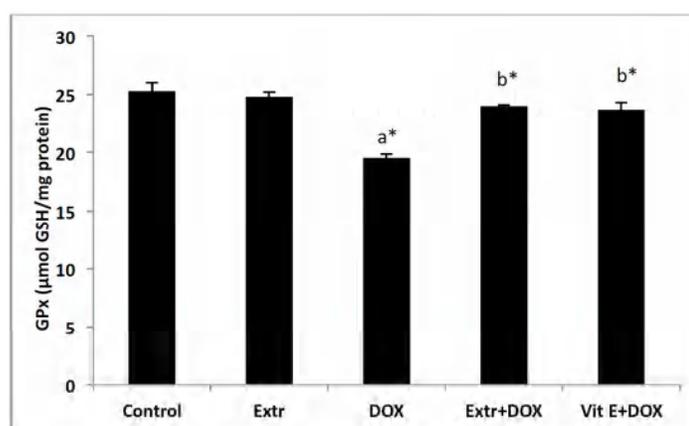
Data are reported as mean ± SD. (Students t-test, \*P<0.05). a: group compared to control group, b: group compared to DOX group.



**Fig. (1).** The protective effect of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves against DOX-induced hepatotoxicity. Effect on lipid peroxidation (TBARs content) in rat's liver. Data are reported as means ± SD. a: Group compared to control group, b: Group compared to DOX group. (\*P<0.05; \*\*P<0.01).



**Fig. (2).** The protective effect of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves against DOX-induced hepatotoxicity. Effect on GSH level in rat's liver. Data are reported as means  $\pm$  SD. a: group compared to control group, b: group compared to DOX group. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ).



**Fig. (3).** The protective effect of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves against DOX-induced hepatotoxicity. Effect on the antioxidant enzyme (GPx) activity in rat's liver. Data are reported as means  $\pm$  SD. a: group compared to control group, b: group compared to DOX group. (\* $P < 0.05$ ).

**Table 2.** Histopathological changes of DOX administration to rats with or without *C. oxyacantha* leaves and vitamin E.

Histopathological Changes	Control	<i>C. oxyacantha</i>	DOX	<i>C. oxyacantha</i> +DOX	Vit E+DOX
Hepatoportal and Sinusoidal congestion	-	-	+++	+	+/-
Focal necrosis	-	-	++	+	+
Inflammatory cellular infiltrate	-	-	+++	+	+

(-): No meaningful histopathological change; (+/-): Mild degree; (+): Moderate degree; (+++): Severe degree.

central vein congestion, necrosis and infiltration (Fig. S1). The pathological changes induced by DOX were markedly ameliorated in the groups treated with *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves and vitamin E. The liver architecture is preserved in 70 % and 80% of animals treated with 100 mg/kg of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves and vitamin E, respectively.

#### 4. DISCUSSION

In this study, DOX treatment significantly ( $p < 0.01$ ) increased lipid peroxidation, through the elevation of liver MDA level, significantly decreased liver enzymatic; GPx ( $p < 0.05$ ) as well as non-enzymatic; GSH antioxidant level

( $p < 0.01$ ). All these effects are involved in the cascade of events leading to DOX-mediated liver oxidative stress and toxicity. This indicates that hepatic injuries induced by DOX is due to oxidative stress that arises as a result of excessive free radicals production. DOX is known to stimulate free radicals generation either by the enzymatic pathway of redox cycling between a semiquinone form and a quinone form or by the non-enzymatic pathway of forming a DOX-Fe<sup>3+</sup> complex. In both pathways, molecular oxygen (O<sub>2</sub>) is reduced to superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) which is converted to other forms of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the more toxic hydroxyl radical (OH), which, further, initiates membrane and macromolecule damage, including

lipid peroxidation [19]. Due to membrane damage induced by the generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation under the effect of DOX toxicity, hepatic enzymes are released into the bloodstream, leading to elevation of serum AST and ALT levels as shown in Table 1. Disruption of the activity of these enzymes may be the result of hepatic lysis (cell necrosis) and loss of functional integrity of the tissue membrane of liver cells [19]. These results are consistent with the literature and point towards the role of oxidative stress in DOX-mediated injury and toxicity. The anthracycline, DOX was reported to increase serum AST, ALT and liver tissue MDA, while antioxidant markers were decreased in rats [20-23].

The observed reduced GSH concentration and GPx activity can be explained on the basis of their exhaustion in countering DOX induced oxidative stress, as previously reported [24]. However, results reported on the activity of GPx in intoxicated animals by DOX are often controversial. Some studies reported that the activity of GPx were reduced in DOX intoxicated animals [25, 26], whereas others reported an increase in this enzyme activity [27]. These discrepancies may be due to the nature of the tissue used, experimental period, the dose and the severity of DOX intoxication.

In the current study, the pre-administration of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves or vitamin E at a dose level of 100 mg/kg significantly reduced the serum hepatic injury markers. Moreover, they reduced the lipid peroxidation in liver tissues. In addition, there were significant elevations of hepatic antioxidant enzymes and glutathione levels. Both *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves and vitamin E induced protective effects against DOX-induced serum and tissues biochemical alterations. These results were in agreement with many previous literatures, which examined the hepatoprotective and antioxidant effects of *C. oxyacantha* against many drugs and xenobiotics-induced hepatotoxicity [28-30]. Pre-treatment with vitamin E might play a role in reducing the toxic effect of DOX, and its powerful antioxidant properties seem to mediate such an ameliorative effect, indicated by the normalization of altered biochemical changes induced by DOX intoxication in rats [31, 32].

The protective effect of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves against DOX-induced oxidative stress in our rats model could be either direct by scavenging reactive oxygen species and inhibition of lipid peroxidation and/or indirect through the enhancement of the activity the enzymatic free radicals scavengers in the cells such as GPx. All of these activities could be due to the multifactorial effects of polyphenols present in *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves. It has been reported that the major polyphenolic compounds accounting for the antioxidant capacity of *C. oxyacantha* leaves are the healthy flavones orientin, miquelianin, rutin and apigenin and hydroxybenzoic acids such as caffeic acid, caftaric acid and chlorogenic acid [33]. These compounds are known for their properties in scavenging free radicals and inhibiting lipid peroxidation [32] and could have acted individually or synergistically to reduce the oxidative stress induced by DOX.

The benefits of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves has been further confirmed by histopathological observa-

tions. The histopathology study for the liver of rats administered DOX indicated the presence of necrosis, thus confirming the results of the biochemical and oxidative stress parameters in which case liver transaminases and MDA were elevated following DOX induced toxicity (Lipid peroxidation produced by doxorubicin leads to morphological damage such as cellular necrosis). The result of our present study is similar to that of Rashid *et al.*; Llesuy and Arnaiz as well as El-Sayyad and Ibrahim [4, 34, 35] who reported that doxorubicin treatment induce the loss of structural and functional integrity of liver cells.

Pre-administration of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves and vitamin E exhibited comparatively less degree of damage compared to DOX alone group which is an indication of the hepatoprotective effect of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves and vitamin E. This observation correlates with the results of biochemical and oxidative stress parameters in which case pre-administration of *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves showed partial protection against the harmful effects of DOX.

## CONCLUSION

Based on the results of this study, *C. oxyacantha* leaves significantly reduced the biochemical as well as the histological alterations, induced by DOX in liver tissue due to the antioxidant effect of its constituents. The strong *in vivo* antioxidant and hepatoprotective activities support the application of *C. oxyacantha* in alimentary and traditional medicine purposes. Future studies should investigate the protective effects of *C. oxyacantha* against DOX-induced toxicity in animal models with malignant tumors.

## CURRENT & FUTURE DEVELOPMENTS

Clinical studies are needed to establish the hepatoprotective effects of *C. oxyacantha*.

## ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All experimental assays were carried out in conformity with national guidelines for the care and use of laboratory animals and approved by the Ethics Committee of the University.

## HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No humans were involved in the study. All the experiments conducted on animals were in accordance to the guidelines set by the Principles of Laboratory Animal Care by the National Institute of Health of the United States (NIH) publication number 85-23, revised 1985.

## CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to DGRSDT and MESRS for financial support.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

## REFERENCES

- [1] Koçkar MC, Nazıroğlu M, Celik O, Tola HT, Bayram D, Koyu A. N-acetylcysteine modulates doxorubicin-induced oxidative stress and antioxidant vitamin concentrations in liver of rats. *Cell Biochem Funct* 2010; 28(8): 673-7.
- [2] Pieniżek A, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwoździński K, Koceva-Chyla A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. *Adv Med Sci* 2013; 58(1): 104-11.
- [3] Boutabet K, Kebsa W, Alyane M, Lahouel M. Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian J Nephrol* 2011; 21(2): 101-6.
- [4] Rashid S, Ali N, Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W, Hasan SK, et al. Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicol Mech Methods* 2013; 23(5): 337-45.
- [5] Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Afrin S, Bompadre S, et al. Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2016; 94: 128-37.
- [6] Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramirez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 2002; 180(1): 79-95.
- [7] Liu K, Azamimi Abdullah A, Huang M, Nishioka T, Altaf-Ul-Amin Md, et al. Novel approach to classify plants based on metabolite-content similarity. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 5296729.
- [8] Ruiz-Rodríguez BM, de Ancos B, Sánchez-Moreno C, Fernández-Ruiz V, de Cortes Sánchez-Mata M, Cámara M, et al. Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* 2014; 69(1): 61-73.
- [9] Nabavi SF, Habtemariam S, Ahmed T, Sureda A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, et al. Polyphenolic composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: From chemistry to medical applications. *Nutrients* 2015; 7(9): 7708-28.
- [10] Kumar D, Arya V, Bhat Z, Khan NA, Prasad DN. The genus *Crataegus*: Chemical and pharmacological perspectives. *Rev Bras Farmacogn* 2012; 22(5): 1187-200.
- [11] Wang J, Xiong X, Feng B. Effect of *Crataegus* usage in cardiovascular disease prevention: An evidence-based approach. *Evid Based Comp Alternat Med* 2013; 2013: 149363.
- [12] Verma SK, Jain V, Verma, D, Khamesra R. *Crataegus oxyacantha* - A Cardioprotective Herb. *J Herbal Med Toxicol* 2007; 1(1): 65-71.
- [13] Liao, B.S., Liao, J.F., Alex, L., Austin, L., Liao, B.A., Su-Hsin, L-T., Susan, L-N., Cathy, Ni., Su-Lien, L-C., Schue-Yuan, L. Lipid metabolism and fructus crataegus. US20040132816 (2004).
- [14] Liao, B.S., Liao, J.F., Alex, L., Austin, L., Liao, B.A., Su-Hsin, L-T., Susan, L-N., Cathy, N., Su-Lien, L-C., Schue-Yuan, L. Method for preventing and/or treating the cardiovascular and hepatic diseases induced by hyperlipidemia which comprises administered an effective amount of bioflavonoids extract derived from fructus crataegus (lipid metabolism and fructus crataegus). US11226862 (2005).
- [15] Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thriarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; 86: 271-8.
- [16] Flohe L, Gunzler WA. Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-21.
- [17] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193: 265-75.
- [18] Ellman GL. Plasma Antioxidants. *Arch. Biochem Biophys* 1959; 82: 70-7.
- [19] Mohajeri M, Sahebkar A. Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: A review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; 122 : 30-51
- [20] Lee IC, Kim SH, Baek HS, Moon C, Bae CS, Kim SH, et al. Melatonin improves adriamycin-induced hepatic oxidative damage in rats. *Mol Cell Toxicol* 2013; 9: 257-265.
- [21] Karakilcik AZ, Bitiren M, Zerim M, Celik H, Aksoy N. Melatonin increased vitamin C and antioxidant enzyme values in the plasma, heart, liver, and kidney of adriamycin-treated rats. *Turk J Biol* 2015; 39: 925-31
- [22] Mustafa HN, El-Awdan SA, Hegazy GA, Abdel JGA. Prophylactic role of coenzyme Q10 and *Cynara scolymus* L on doxorubicin-induced toxicity in rats: Biochemical and immunohistochemical study. *Indian J Pharmacol* 2015; 47(6): 649-56
- [23] Djebbari R, Chemam Y, Boubekri N, Lakroun Z, Kebieche M, Amrani A, et al. Chemoprotective potential of *Helianthemum confertum* against the loss of molecular and functional integrity of the liver cell in doxorubicin-treated rats. *IJPPR* 2017; 9(7): 903-10.
- [24] Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Afrin SBS, et al. Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2016; 94 : 128-37.
- [25] Indu R, Azhar TS, Nair A, Nair CK. Amelioration of doxorubicin induced cardio-and hepato-toxicity by carotenoids. *J Cancer Res Ther* 2014; 10(1): 62-7.
- [26] Jambhulkar S, Deshiredy S, Jestadi DB, Periyasamy L. Quercetin attenuating doxorubicin induced hepatic, cardiac and renal toxicity in male albino wistar rats. *JPCT* 2014; 8(2): 985-1004.
- [27] Ayaz SA, Bhandari U, Pillai KK. Influence of DL  $\alpha$ -lipoic acid and vitamin-E against doxorubicin-induced biochemical and histological changes in the cardiac tissue of rats. *Indian J Pharmacol* 2005; 37(5): 294-9.
- [28] Krajka-Kuźniak V, Paluszczak J, Oszmiański J, Baer-Dubowska W. Hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) bark extract regulates antioxidant response element (ARE)-mediated enzyme expression via Nrf2 pathway activation in normal hepatocyte cell line. *Phytother Res* 2014; (4):593-602.
- [29] Martínez-Rodríguez JL, Reyes-Estrada CA, Gutiérrez-Hernández R, López JA. Antioxidant, hypolipidemic and preventive effect of hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) on alcoholic liver damage in rats. *J. Pharmacognosy Phytother* 2016; 8(11): 193-202.
- [30] Rezaei-Golmishah A, Malekinejad H, Asri-Rezaei S, Farshid AA, Akbari P. Hawthorn ethanolic extracts with triterpenoids and flavonoids exert hepatoprotective effects and suppress the hypercholesterolemia-induced oxidative stress in rats. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18(7): 691-9.
- [31] Kalender Y, Yel M, Kalender S. Toxicology. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats: The effects of vitamin E and catechin. *Toxicology* 2005; 209(1): 39-45.
- [32] Gokcimen A, Cim A, Tola HT, Bayram D, Kocak A, Ozguner F, et al. Protective effect of N-acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 2007; 26: 519-525.
- [33] Benabderrahmane W, Lores M, Lamas JP, Benayache S. Matrix solid-phase dispersion as a tool for phytochemical and bioactivities characterization: *Crataegus oxyacantha* L. A Case Study. *Nat Prod Res* 2017; DOI:10.1080/14786419.2017.1326040.
- [34] Llesuy SF, Arnaiz SL. Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. *Toxicology* 1990; 63(2): 187-98.
- [35] Al-Syaad K, Ibrahim E H. The protective effects of the aqueous extract of Saliva against biochemical and histopathological changes in kidney and liver of male rats treated with the anticancer drug doxorubicin. *RJPBCS* 2014; 5(6): 237-45.

# IN VITRO PHARMACOLOGICAL SCREENING OF ANTIOXIDANT, PHOTOPROTECTIVE, CHOLINESTERASE, AND $\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITIES OF ALGERIAN *Crataegus oxyacantha* FRUITS AND LEAVES EXTRACTS

Amira Mecheri,<sup>1</sup> Amel Amrani,<sup>1,\*</sup> Wassila Benabderrahmane,<sup>1</sup> Chawki Bensouici,<sup>2</sup> Nassima Boubekri,<sup>1</sup> Ouahiba Benaissa,<sup>1</sup> Djamila Zama,<sup>1</sup> Fadila Benayache,<sup>1</sup> and Samir Benayache<sup>1</sup>

Original article submitted April 17, 2020.

Various parts of *Crataegus oxyacantha* (hawthorn) plant have been used in traditional medicine in many countries including Algeria. In this study, antioxidant (GOR, ABTS, FRAP, CUPRAC and phenanthroline), photoprotective, and inhibition ability of *n*-butanol and ethyl acetate extracts from leaves and fruits of *C. oxyacantha* against Alzheimer's disease [acetylcholinesterases (AChE) and butyrylcholinesterases (BChE)] and diabetes mellitus ( $\alpha$ -glucosidase) related enzyme activities were investigated using standard methods. According to the obtained results, all plant extracts produced significant antioxidant effects. The ethyl acetate extract of *C. oxyacantha* leaves having the highest total bioactive content exhibited most pronounced antioxidant potential. Moreover, the extracts exhibited inhibitory effect against  $\alpha$ -glucosidase, which was concentration dependent. The most potent inhibitor for  $\alpha$ -glucosidase was *n*-butanol extract of *C. oxyacantha* leaves (with  $IC_{50} = 4.99 \pm 0.82 \mu\text{g/mL}$ ). The results also indicated a substantial BChE inhibitory activity of *n*-butanol extract ( $IC_{50} = 175.35 \pm 16.25 \mu\text{g/mL}$ ) and ethyl acetate extract ( $IC_{50} = 148.23 \pm 13.41 \mu\text{g/mL}$ ). The *n*-butanol extract was also the most potent inhibitor of AChE ( $IC_{50} = 159.09 \pm 7.68 \mu\text{g/mL}$ ). In addition, the plant extracts exhibited significant photoprotective potential with sun protection factor (SPF) values ranging from  $17.19 \pm 0.10$  to  $48.66 \pm 0.00$ . Therefore, *C. oxyacantha* plant has a significant potential for enhancing pharmaceutical formulations.

**Keywords:** *Crataegus oxyacantha*; antioxidant; photoprotector; anticholinestérase activity; antidiabetic; bioactive content.

## 1. INTRODUCTION

Overproduction of reactive oxygen species (ROS) in the human organism is responsible for the pathophysiological states of many disorders such as diabetes mellitus, neurodegenerative diseases, inflammation and cancers. Phytochemicals identified from food and medicinal plants have been documented to decline oxidative stress due to their natural antioxidant activities [1].

*Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae) is a common medicinal plant widely used in Algeria to treat gastrointestinal

ailments and also consumed as a fruit for food. This plant, also known as hawthorn, has been reported to exert various pharmacological properties such as cardiogenic, hypotensive, antihyperlipidemic, antihyperglycemic, anxiolytic, immunomodulatory, antimutagenic [2], neuroprotective [3], renoprotective [4] and hepatoprotective [5]. The leaves, flowers, and berries of hawthorn contain a variety of polyphenols that appear to be primarily responsible for the pharmacological activity of the plant. The main polyphenols found in Algerian *C. oxyacantha* species are quercetin, quercetin-3-glucoside, naringenin [6], epicatechin, epicatechin gallate (ECG), miquelianin, rutin, orientin, apigenin, chlorogenic acid, caftaric acid and caffeic acid [7].

Alzheimer's disease (AD) is a degenerative neurological disorder characterized by cognitive impairment and memory loss. Oxidative stress may be involved in the pathogenesis of dementia or AD in the elderly. Patients with AD have a re-

<sup>1</sup> Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives, Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Frères Mentouri Constantine 1, Route d'Ain El Bey, 25000 Constantine, Algérie.

<sup>2</sup> Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) Constantine, Algérie.

\* e-mail address: amrani.a@umc.edu.dz

markable reduction in acetylcholine (ACh) levels in the hippocampus and cortex of the brain, which can cause memory deficits. Many pathways are pursued for the control of AD, but one of the most established approaches is the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) [1]. Therefore, an antioxidant associated with anticholinesterase activity can be considered a key target in the management of AD [8].

Diabetes mellitus type 2 is a well-known metabolic disorder, which is characterized by an abnormal postprandial increase of blood glucose level. An important approach to managing type 2 diabetes mellitus is to decrease postprandial hyperglycemia by delaying glucose absorption. This is achieved by inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes such as  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase in the digestive organs [9]. Although good synthetic  $\alpha$ -glucosidase inhibitors (i.e., acarbose, miglitol and voglibose) are available, they usually cause adverse gastrointestinal effects [10]. For this reason, natural inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase, in particular, those of medicinal plants, have been studied as viable and low toxicity alternatives for the treatment of type 2 diabetes mellitus [11]. In particular, *C. oxyacantha* is a good source for searching such inhibitors. To continue our investigations on biological activities of hawthorn, we designed this study to investigate antidiabetic, anticholinesterase and photoprotective along with antioxidant potential of various extracts from different parts (fruits and leaves) of Algerian *C. oxyacantha* species.

## 2. EXPERIMENTAL PART

### 2.1. Plant Material Collection and Identification

Aerial parts of *C. oxyacantha* L. were collected from Mila, eastern Algeria. Taxonomic identification of the plant material was carried out by Prof. M. Kaabeche (University of Setif, Algeria). The voucher specimen was deposited at the Herbarium of VARENBIOMOL research unit, Constantine 1 University, Constantine, Algeria (CO 24/09/14).

### 2.2. Preparation of Extracts

Air-dried fruits (460 g) and leaves (800 g) of *C. oxyacantha* were extracted at room temperature with EtOH–H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) for 24 h three times. After filtration, the filtrate was concentrated and dissolved in H<sub>2</sub>O (400 mL). The resulting solution was successively extracted with petroleum ether (PE, 1 × 200 mL), CHCl<sub>3</sub> (3 × 200 mL), EtOAc (3 × 200 mL) and *n*-BuOH (3 × 200 mL). The organic phases were filtered using common filter paper and concentrated in vacuum up to 35°C to obtain the following dry extracts: PE extract (fruits: 0.04 g, leaves: 0.097 g), CHCl<sub>3</sub> (fruits: 1.17 g, leaves: 2.13 g), EtOAc (fruits: 2.03 g, leaves: 14.01 g), and *n*-BuOH (fruits: 9.32 g, leaves: 50.07 g).

### 2.3. Determination of Total Phenolic Content (TPC)

TPC was determined using the modified Folin–Ciocalteu method of Singleton and Rossi [12]. A sample (20  $\mu$ L,

1 mg/mL) was mixed with 100  $\mu$ L Folin–Ciocalteu reagent (diluted ten-fold) and 75  $\mu$ L of 75 g/L sodium carbonate. After 2 h incubation in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 740 nm in the microplate reader. Gallic acid (25 – 500  $\mu$ g/mL) was used as standard for the calibration curve and construction of a linear regression line. TPC is expressed as  $\mu$ g gallic acid equivalent (GAE)/mg extract according to the Müller method.

### 2.4. Determination of Total Flavonoid Content (TFC)

TFC was determined using the modified method of Topçu, et al. [13]. To 50  $\mu$ L extract (1 mg/mL) was added 10  $\mu$ L of 10% aluminium nitrate, 10  $\mu$ L of 1 M potassium acetate, and 130  $\mu$ L of methanol. After 40 min incubation at room temperature, absorbance of the mixture was read spectrophotometrically at 415 nm, Quercetin was used as the standard drug, and TFC was expressed in units of quercetin equivalent (QE)/mg extract.

### 2.5. Determination of Flavonol Content

The content of flavonols was determined using the method of Kumaran and Karunakaran [14]. According to this, 50  $\mu$ L of methanolic solution of plant extract was mixed with 50  $\mu$ L (20 mg/mL) aluminium trichloride and 150  $\mu$ L (50 mg/mL) sodium acetate, and the absorbance was read spectrophotometrically at 440 nm after 15 min incubation. The content of flavonols was calculated using a calibration curve of the quercetin standard.

### 2.6. Antioxidant Activity

Galvinoxyl free radical (GOR) scavenging assay. 160  $\mu$ L of 0.1 mM methanolic solution of Galvinoxyl was added to 40  $\mu$ L of different concentrations of extract (sample) in methanol. The absorbance was read at 428 nm after an incubation of 120 minutes in the dark at room temperature. A solution of galvinoxyl in methanol was used as a control [15].

The following equation was used to calculate the scavenging of galvinoxyl radical:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100.$$

ABTS radical cation decolorization assay. The ABTS<sup>•+</sup> scavenging activity was determined by spectrophotometry according to the modified method of Re, et al. [16]. In short, 160  $\mu$ L of diluted ABTS<sup>•+</sup> solution (7 mM ABTS in water and 2.45 mM of potassium persulfate, stored in the dark at room temperature for 12 h, absorbance of 0.700  $\pm$  0.020 at 734 nm) were added to 40  $\mu$ L of extract (sample) in ethanol at various concentrations. After 10 min incubation, the absorbance was measured at 734 nm. The scavenging of the ABTS<sup>•+</sup> radical was also calculated using the above equation, where  $A_{\text{Control}}$  is the initial concentration of ABTS<sup>•+</sup> and  $A_{\text{Sample}}$  is the absorbance of ABTS<sup>•+</sup> in the presence of a sample.

**o-Phenanthroline assay.** 30  $\mu\text{L}$  o-phenanthroline (0.5% in methanol), 50  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_3$  (0.2%), 110  $\mu\text{L}$  methanol, and 10  $\mu\text{L}$  of various concentrations of an extract tested was incubated for 20 min at 30°C, then the absorbance was measured at 510 nm and the percentage inhibition was calculated [18].

**Cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay.** CUPRAC of the extracts was determined according to the modified method described by Apak, et al. [19]. 50  $\mu\text{L}$   $\text{CuCl}_2$  (10 mM), 50  $\mu\text{L}$  neocuproine (7.5 mM), and 60  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{Ac}$  buffer (1 M, pH 7.0) solutions were put into each well on a 96-well plate. Then, 40  $\mu\text{L}$  of an extract at various concentrations was then added to the mixture and the absorbance at 450 nm was measured against a reagent blank after 1 h incubation. Results were expressed in absorbance units and compared with standards (BHT and BHA).

**Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay.** 10  $\mu\text{L}$  of sample at various concentrations, 40  $\mu\text{L}$  of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6), and 50  $\mu\text{L}$  of potassium ferricyanide (1%) were mixed and incubated at 50°C on water bath for 20 min. After cooling, 50  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid (TCA) were added, and the mixture was centrifuged for 10 min at 1000 rpm. Then, 40  $\mu\text{L}$  of supernatant was mixed with 40  $\mu\text{L}$  distilled water and 10  $\mu\text{L}$  of ferric chloride (0.1%) and the absorbance was measured at 700 nm against a blank (water) [20].

### 2.7. Determination of Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BChE) Inhibition Activity

A sample (10  $\mu\text{L}$ ) of extracts or galantamine (control) at various concentrations, 150  $\mu\text{L}$  of sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.0), and 20  $\mu\text{L}$  AChE ( $5.32 \times 10^{-3}$  U) or BChE ( $6.85 \times 10^{-3}$  U) solution were mixed and incubated for 15 min at 25°C. Then, 10  $\mu\text{L}$  of 0.5 mM DTNB was added and the reaction was initiated by the addition of 10  $\mu\text{L}$  of acetylthiocholine iodide (0.71 mM) or 10  $\mu\text{L}$  of butyrylthiocholine chloride (0.2 mM) and the absorbance was read at 412 nm using a 96-well microplate reader.

The value of percentage inhibition of AChE or BChE enzymes was determined using the formula  $(E-S)/E \times 100$ , where  $E$  is the activity of enzyme without test sample and  $S$

is the activity of enzyme in the presence of test sample [17, 21].

### 2.8. $\alpha$ -Glucosidase Inhibition Activity

A sample (50  $\mu\text{L}$ ) of extracts or acarbose (control) solution in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9) and 50  $\mu\text{L}$  of 5 mM p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside solution (in phosphate buffer) was mixed and incubated for 5 min at 37°C. Then, 100  $\mu\text{L}$  of 0.1 U/mL  $\alpha$ -glucosidase from Baker's yeast (in phosphate buffer) was added and the absorbance at 405 nm was recorded for 30 min using a microplate reader at 37°C against a blank [22]. The activity of  $\alpha$ -glucosidase was calculated as follows:

$$\% \text{ Glucosidase Inhibition} = \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100.$$

### 2.9. Photoprotective Activity (In Vitro Sun Protection Factor) Determination

The extracts were diluted in absolute methanol to a concentration of 2 mg/mL. The aliquots prepared were scanned on Shimadzu UV/VIS spectrophotometer between 290 and 320 nm at 5 nm intervals, taking methanol as blank. The SPF value was calculated using the equation proposed by Mansur, et al. [23]:

$$\text{SPF}_{\text{spectrophotometric}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

where  $EE(\lambda)$  is the erythemal effect spectrum;  $I(\lambda)$  is the solar intensity spectrum;  $Abs(\lambda)$  is the absorbance; and  $CF = 10$  is the correction factor). The product  $EE(\lambda) \times I(\lambda)$  is constant, and its values are determined according to Sayre, et al. [24].

### 2.10. Statistical Data Analysis

The experiments were performed in triplicate. Results are given as a mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three parallel measurements. The data was analysed by one-way ANOVA (GraphPad Prism 5 software) followed by Turkey's post hoc test for multiple comparisons and differences with  $P < 0.05$  were considered as statistically significant.

TABLE 1. Yield, Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC) and flavonol Content in Extracts of *C. oxyacantha* Fruits and Leaves

Sample		Yield % (g/g DW)	TPC ( $\mu\text{g}$ GAE/mg extract)	TFC ( $\mu\text{g}$ QE/mg extract)	Flavonol content ( $\mu\text{g}$ QE/mg extract)
Fruits	<i>n</i> -Butanol	2.02	136.54 $\pm$ 8.52	21.46 $\pm$ 0.58	19.21 $\pm$ 0.29
	Ethyl acetate	0.44	697.23 $\pm$ 5.82	154.51 $\pm$ 10.16	68.83 $\pm$ 3.63
Leaves	<i>n</i> -Butanol	6.33	521.05 $\pm$ 2.70	116.176 $\pm$ 0.59	45.96 $\pm$ 1.99
	Ethyl acetate	1.75	869.09 $\pm$ 12.48	165.69 $\pm$ 6.18	97.16 $\pm$ 4.40

## 3. RESULTS

## 3.1. Bioactive Content

The amounts of bioactive components present in *C. axyacantha* extracts are shown in Table 1. Maximum pheno-

lic, flavonoid and flavonol contents (Table 1) were observed for ethyl acetate extract of leaves ( $869.09 \pm 12.48 \mu\text{g GAE/mg extract}$ ,  $165.69 \pm 6.18 \mu\text{g QE/mg extract}$ , and  $97.16 \pm 4.40 \mu\text{g QE/mg extract}$ , respectively). Furthermore, the solvents that demonstrated high polarity also had higher

TABLE 2. Antioxidant and Free Radical Scavenging Potential (Percentage Inhibition) of *n*-Butanol Extracts of *C. axyacantha* Fruits and Leaves *In Vitro*

Samples	GOR scavenging activity (% Inhibition)						
	3.125 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
Fruits <i>n</i> -Butanol extract	na	$2.85 \pm 1.16$	$5.19 \pm 1.23$	$13.36 \pm 0.87$	$42.96 \pm 1.42$	$75.71 \pm 0.21$	$82.84 \pm 0.44$
Fruits Ethyl acetate extract	nt	$12.81 \pm 0.33$	$37.28 \pm 1.54$	$64.93 \pm 2.35$	$75.35 \pm 1.80$	$82.97 \pm 0.48$	$89.87 \pm 0.99$
Leaves <i>n</i> -Butanol extract	na	$4.26 \pm 0.43$	$13.80 \pm 1.92$	$44.80 \pm 3.08$	$63.11 \pm 1.18$	$64.74 \pm 0.83$	$64.93 \pm 0.26$
Leaves Ethyl acetate extract	nt	$34.52 \pm 2.13$	$61.76 \pm 1.50$	$65.53 \pm 0.37$	$66.44 \pm 1.02$	$66.56 \pm 1.31$	$70.40 \pm 0.26$
BHT	$39.11 \pm 2.34$	$58.67 \pm 0.94$	$69.65 \pm 0.04$	$72.44 \pm 0.23$	$73.61 \pm 0.10$	nt	nt
BHA	$46.67 \pm 0.25$	$62.27 \pm 1.40$	$71.46 \pm 0.29$	$73.25 \pm 0.41$	$73.78 \pm 0.17$	nt	nt
ABTS (% Inhibition)							
Fruits <i>n</i> -Butanol extract	$14.82 \pm 1.09$	$20.09 \pm 0.53$	$41.74 \pm 1.37$	$70.12 \pm 1.66$	$90.51 \pm 1.57$	$90.71 \pm 1.36$	nt
Fruits Ethyl acetate extract	$41.89 \pm 2.14$	$75.54 \pm 0.97$	$90.96 \pm 2.72$	$91.61 \pm 0.31$	$92.11 \pm 0.35$	$92.06 \pm 0.98$	nt
Leaves <i>n</i> -Butanol extract	$21.80 \pm 0.80$	$44.95 \pm 3.64$	$70.82 \pm 1.03$	$91.21 \pm 2.05$	$91.46 \pm 0.61$	$91.81 \pm 0.68$	nt
Leaves Ethyl acetate extract	$69.06 \pm 0.53$	$87.44 \pm 8.97$	$92.27 \pm 0.35$	$92.92 \pm 0.45$	$93.12 \pm 0.17$	$90.91 \pm 2.20$	nt
BHT	$59.22 \pm 0.59$	$78.55 \pm 3.43$	$90.36 \pm 0.00$	$92.18 \pm 1.27$	$93.37 \pm 0.86$	$94.87 \pm 0.87$	nt
BHA	$83.42 \pm 4.09$	$93.52 \pm 0.09$	$93.58 \pm 0.09$	$93.63 \pm 0.16$	$93.63 \pm 0.95$	$94.20 \pm 0.90$	nt
Reducing power (% of Inhibition)							
Fruits <i>n</i> -Butanol extract	$0.14 \pm 0.00$	$0.17 \pm 0.02$	$0.23 \pm 0.01$	$0.35 \pm 0.06$	$0.49 \pm 0.04$	$0.61 \pm 0.05$	$0.93 \pm 0.11$
Fruits Ethyl acetate extract	$0.27 \pm 0.02$	$0.38 \pm 0.04$	$0.52 \pm 0.03$	$0.69 \pm 0.06$	$0.84 \pm 0.02$	$1.06 \pm 0.04$	$1.21 \pm 0.12$
Leaves <i>n</i> -Butanol extract	$0.15 \pm 0.01$	$0.26 \pm 0.05$	$0.35 \pm 0.03$	$0.48 \pm 0.02$	$0.74 \pm 0.10$	$0.79 \pm 0.15$	$0.96 \pm 0.08$
Leaves Ethyl acetate extract	$0.25 \pm 0.02$	$0.41 \pm 0.07$	$0.54 \pm 0.02$	$0.81 \pm 0.09$	$0.83 \pm 0.08$	$0.89 \pm 0.07$	$1.39 \pm 0.30$
Ascorbic acid	$0.35 \pm 0.05$	$0.46 \pm 0.03$	$0.84 \pm 0.12$	$0.93 \pm 0.30$	$1.18 \pm 0.34$	$1.37 \pm 0.20$	$1.44 \pm 0.21$
Tannic acid	$0.28 \pm 0.02$	$0.78 \pm 0.06$	$1.02 \pm 0.07$	$1.24 \pm 0.18$	$0.86 \pm 0.6$	$1.01 \pm 0.21$	$1.02 \pm 0.13$
$\alpha$ -Tocopherol	$0.11 \pm 0.00$	$0.16 \pm 0.00$	$0.21 \pm 0.03$	$0.35 \pm 0.03$	$0.73 \pm 0.03$	$1.37 \pm 0.08$	$1.81 \pm 0.09$
CUPRAC (% of Inhibition)							
Fruits <i>n</i> -Butanol extract	$0.17 \pm 0.01$	$0.19 \pm 0.01$	$0.26 \pm 0.01$	$0.37 \pm 0.00$	$0.63 \pm 0.03$	$1.07 \pm 0.03$	nt
Fruits Ethyl acetate extract	$0.29 \pm 0.01$	$0.44 \pm 0.02$	$0.70 \pm 0.03$	$1.20 \pm 0.09$	$2.15 \pm 0.09$	$3.66 \pm 0.12$	nt
Leaves <i>n</i> -Butanol extract	$0.19 \pm 0.01$	$0.27 \pm 0.01$	$0.41 \pm 0.02$	$0.61 \pm 0.03$	$1.23 \pm 0.02$	$2.09 \pm 0.12$	nt
Leaves Ethyl acetate extract	$0.31 \pm 0.02$	$0.51 \pm 0.01$	$0.88 \pm 0.01$	$1.55 \pm 0.07$	$2.80 \pm 0.04$	$3.93 \pm 0.05$	nt
BHT	$0.19 \pm 0.01$	$0.33 \pm 0.04$	$0.66 \pm 0.07$	$1.03 \pm 0.07$	$1.48 \pm 0.09$	$2.04 \pm 0.14$	nt
BHA	$0.46 \pm 0.00$	$0.78 \pm 0.01$	$1.34 \pm 0.08$	$2.36 \pm 0.17$	$3.45 \pm 0.02$	$3.76 \pm 0.03$	nt
Phenanthroline (% of Inhibition)							
Fruits <i>n</i> -Butanol extract	$0.33 \pm 0.01$	$0.34 \pm 0.00$	$0.41 \pm 0.00$	$0.49 \pm 0.01$	$0.62 \pm 0.04$	$0.86 \pm 0.12$	$1.50 \pm 0.04$
Fruits Ethyl acetate extract	$0.41 \pm 0.01$	$0.51 \pm 0.03$	$0.72 \pm 0.02$	$1.11 \pm 0.01$	$1.63 \pm 0.28$	$1.79 \pm 0.65$	$3.77 \pm 0.28$
Leaves <i>n</i> -Butanol extract	$0.35 \pm 0.00$	$0.38 \pm 0.00$	$0.48 \pm 0.03$	$0.64 \pm 0.01$	$0.95 \pm 0.04$	$1.53 \pm 0.11$	$2.60 \pm 0.15$
Leaves Ethyl acetate extract	$0.39 \pm 0.02$	$0.46 \pm 0.01$	$0.67 \pm 0.04$	$1.11 \pm 0.04$	$1.87 \pm 0.11$	$3.20 \pm 0.16$	$4.24 \pm 0.08$
BHT	$0.73 \pm 0.02$	$0.93 \pm 0.01$	$1.25 \pm 0.04$	$2.10 \pm 0.05$	$4.89 \pm 0.06$	nt	nt
BHA	$0.53 \pm 0.03$	$1.23 \pm 0.02$	$1.84 \pm 0.01$	$3.48 \pm 0.03$	$4.84 \pm 0.01$	nt	nt

Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three parallel measurements; nt = not tested; na = not active

total phenol potential, indicating that the majority of phenolic compounds present in *C. oxyacantha* extracts would be polar compounds and more attracted to high polarity solvents.

### 3.2. Antioxidant Activity

In GOR and ABTS assays (Tables 2 and 3), the ethyl acetate extract of leaves showed superior scavenging activity ( $IC_{50}$ :  $9.80 \pm 0.40 \mu\text{g/mL}$ ;  $2.15 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ ), followed by the ethyl acetate extract of fruits ( $IC_{50}$ :  $18.18 \pm 0.88 \mu\text{g/mL}$ ;  $3.89 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$ ), and *n*-butanol extract of leaves ( $IC_{50}$ :  $36.80 \pm 0.69 \mu\text{g/mL}$ ;  $8.11 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ ) and fruits ( $IC_{50}$ :  $58.32 \pm 2.85 \mu\text{g/mL}$ ;  $16.89 \pm 0.38 \mu\text{g/mL}$ ). This can be attributed to the higher yields of bioactive compounds presented by these extracts (Table 1). Similarly, the ethyl acetate extract of leaves, which has maximum values of the total bioactive contents (Table 1), also exhibits the highest copper and ferric reducing power ( $A_{0.5}$ :  $6.18 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$  and  $10.66 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ , respectively) (Tables 2 and 3). Similar results concerning the solvent polarity-related antioxidant capacity were observed by previous researchers [25]. Similarly, for o-phenanthroline assay, the ethyl acetate extracts of fruits ( $A_{0.5}$ :  $5.94 \pm 0.34 \mu\text{g/mL}$ ) and leaves ( $A_{0.5}$ :  $7.09 \pm 0.76 \mu\text{g/mL}$ ) exhibited highest antioxidant capacity, whereas *n*-butanol extracts of fruits presented the lowest one ( $A_{0.5}$ :  $28.34 \pm 2.82 \mu\text{g/ml}$ ) (Tables 2 and 3).

### 3.3. nzyme Inhibition Activity

All extracts were also tested for enzyme inhibition activities (cholinesterase and  $\alpha$ -glucosidase) using spectrophotometric methods. The enzyme inhibition (%) and  $IC_{50}$  values of extracts were calculated (Table 4). The *n*-butanol extract of leaves showed maximum  $\alpha$ -glucosidase and cholinesterase

(AChE) inhibition ( $IC_{50}$ :  $4.99 \pm 0.82$  and  $159.09 \pm 7.68 \mu\text{g/mL}$ , respectively). Whereas, the ethyl acetate extract of leaves showed highest BChE inhibition with  $IC_{50}$  values of  $148.23 \pm 13.41 \mu\text{g/mL}$ , followed by *n*-butanol extract of leaves with  $IC_{50}$  value of  $175.35 \pm 16.25 \mu\text{g/mL}$ . All the other extracts were less active inhibitors of both cholinesterases. The *n*-butanol extract of fruits showed high activity for  $\alpha$ -glucosidase ( $IC_{50}$ :  $16.12 \pm 9.09 \mu\text{g/mL}$ ) followed by the ethyl acetate extracts of leaves ( $IC_{50}$ :  $24.08 \pm 5.98 \mu\text{g/mL}$ ) and fruits ( $IC_{50}$ :  $30.80 \pm 3.63 \mu\text{g/mL}$ ). All of the four tested extracts showed higher  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity than acarbose, one of the most potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor drugs (Table 4).

### 3.4. Photoprotective Activity

The photoprotective activity of *C. oxyacantha* extracts was measured by determining *in vitro* sun protection factor (SPF). It has been reported that, in this activity rating, SPF values of 2 – 12, 12 – 30, 30 – 50 and >50 are considered as corresponding to minimum, moderate, high, and maximum sun protective activity, respectively. In this study, SPF values of the test extracts were ranging from  $17.19 \pm 0.10$  to  $48.66 \pm 0.00$  (Table 5). These results indicate that all extracts have pronounced photoprotective activity and can be employed in sunscreen formulations to protect the skin from sunburn.

## 4. DISCUSSION

The antioxidant, in combination with anticholinesterase or antidiabetic ( $\alpha$ -glucosidase inhibition) activities, can be considered as an important target in the management of Alzheimer's and diabetes type 2 diseases, respectively. In our investigation, the inhibitory activity of *n*-butanol and ethyl ace-

TABLE 3. Antioxidant Activity ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) of *n*-Butanol Extracts of *C. oxyacantha* Fruits and Leaves

Sample	Radical scavenging activity $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		Reducing power $A_{0.5}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	GOR	ABTS	CUPRAC	FRAP	Phenanthroline
Fruits, <i>n</i> -Butanol extract	$58.32 \pm 2.85^e$	$16.89 \pm 0.38^e$	$37.03 \pm 1.65^f$	$62.13 \pm 2.99^g$	$28.34 \pm 2.82^f$
Fruits, Ethyl acetate extract	$18.18 \pm 0.88^c$	$3.89 \pm 0.13^c$	$7.84 \pm 0.31^c$	$12.59 \pm 1.57^d$	$5.94 \pm 0.34^c$
Leaves, <i>n</i> -Butanol extract	$36.80 \pm 0.69^d$	$8.11 \pm 0.25^d$	$18.61 \pm 0.79^e$	$27.39 \pm 2.54^e$	$14.38 \pm 0.51^e$
Leaves, Ethyl acetate extract	$9.80 \pm 0.40^b$	$2.15 \pm 0.07^b$	$6.18 \pm 0.21^b$	$10.66 \pm 0.11^c$	$7.09 \pm 0.76^d$
BHT	$4.99 \pm 0.06^a$	$1.29 \pm 0.30^a$	$9.62 \pm 0.87^d$	nt	$2.24 \pm 0.17^b$
BHA	$4.35 \pm 0.13^a$	$1.81 \pm 0.10^b$	$3.64 \pm 0.19^a$	nt	$0.93 \pm 0.07^a$
Ascorbic acid	nt	nt	nt	$6.77 \pm 1.15^b$	nt
Tannic acid	nt	nt	nt	$5.39 \pm 0.91^a$	nt
$\alpha$ -Tocopherol	nt	nt	nt	$34.93 \pm 2.38^f$	nt

Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three parallel measurements; values with different superscript letters in the same column are significantly ( $P < 0.05$ ) different; nt = not tested.

TABLE 4. Percentage Enzyme Inhibition and IC<sub>50</sub> (µg/mL) of *n*-Butanol Extracts of *C. oxyacantha* Fruits and Leaves

Samples		AChE		BChE		α-Glucosidase	
		% Inhibition at 200 µg/ml	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	% Inhibition at 200 µg/ml	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	% Inhibition at 125 µg/ml	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Fruits	<i>n</i> -Butanol	7.03 ± 8.24	< 200	40.68 ± 4.01	< 200	99.43 ± 0.14	16.12 ± 9.09 <sup>b</sup>
	Ethyl acetate	0.97 ± 9.03	< 200	28.06 ± 3.97	< 200	96.95 ± 0.26	30.80 ± 3.63 <sup>d</sup>
Leaves	<i>n</i> -Butanol	58.54 ± 2.47	159.09 ± 7.7 <sup>b</sup>	52.57 ± 2.35	175.35 ± 16.25 <sup>c</sup>	99.34 ± 0.04	4.99 ± 0.82 <sup>a</sup>
	Ethyl acetate	29.23 ± 4.47	< 200	58.29 ± 4.26	148.23 ± 13.41 <sup>b</sup>	98.58 ± 0.25	24.08 ± 5.98 <sup>c</sup>
Galantamine		94.77 ± 0.34	6.27 ± 1.15 <sup>a</sup>	78.95 ± 0.58	34.75 ± 1.99 <sup>a</sup>	nt	nt
Acarbose		nt	nt	Nt	nt	38.91 ± 3.0	275.43 ± 1.59 <sup>c</sup>

Values are expressed as mean ± S.D. of three parallel measurements; values with different superscript letters in the same column are significantly ( $P < 0.05$ ) different; nt = not tested. Galantamine is control for AChE and BChE; Acarbose is control for α-glucosidase.

tate extracts of leaves and fruits of *C. oxyacantha* against both mentioned enzymes was observed (Table 4). Previous studies reported only the α-glucosidase [11] and anticholinesterase [8] inhibitory activities of some isolated constituents from *C. oxyacantha*.

The AChE and BChE inhibition activities of the extracts of *C. oxyacantha* aerial parts (leaves and fruits) are presented in Table 4. The extracts showed weak to significant inhibitory activity on BChE. The maximum activity has been found for the ethyl acetate extract of leaves (58.29 ± 4.26% at 200 µg/mL). On the other hand, *n*-butanol and ethyl acetate extracts of fruits remained inactive, while the *n*-butanol extract of leaves (58.54 ± 2.47% at 200 µg/mL) showed significant inhibitory effect against AChE. These results suggest that *C. oxyacantha* plant contains functional inhibitory compounds in leaves and has a potential effect on cholinesterase (AChE and BChE) enzymes. The leaves can be considered as a major source of functional anti-Alzheimer's compounds.

The inhibition of cholinesterase (AChE and BChE) enzymes can be due to secondary metabolites of the plant constituents. Recently, Ali, et al. [8] demonstrated that lupeol, β-sitosterol, betulin, betulinic acid, oleanolic acid, and chrysin present in *C. oxyacantha* produce AChE and BChE inhibition effects, therefore consolidating our findings. The antioxidant activity has also been previously correlated with anticholinesterase (AChE and BChE) potential and associated with the neuroprotective effect of phenolic compounds [26, 27]. More recently, Saoudi, et al. [3] reported that *C. oxyacantha* aqueous extract exhibits antioxidant and neuroprotective effects in deltamethrin and chlorpyrifos treated rats.

Data concerning α-glucosidase inhibitory activity of the extracts from *C. oxyacantha* aerial parts are also given in the Table 4. All tested extracts showed strong inhibitory activity compared to the positive control (acarbose). The *n*-butanol extract of leaves showed the maximum inhibitory activity

(IC<sub>50</sub>; 4.99 ± 0.82 µg/ mL). Our results suggest that hawthorn leaves and fruits may contain an important group of candidates for natural anti-type 2 diabetes drugs that are worth of further investigation. Our previous study revealed the presence of quercetin, quercetin-3-glucoside, epicatechin, naringenin, rutin, caftaric and caffeic acid [6]. Phenolic compounds and flavonoids are probably related to the anti-diabetic activity investigated in the present work. Caffeic acid, epicatechin, naringenin and quercetin were demonstrated to inhibit significantly the α-glucosidase enzyme [28]. Although previous studies showed *in vivo* anti-hyperglycemic potential of an aqueous extract of *C. oxyacantha* in streptozotocin-induced diabetic rats [29], our work is the first highlighting *in vitro* antidiabetic potential by inhibition of α-glucosidase with *n*-butanol and ethyl acetate extracts of leaves and fruits. This makes *C. oxyacantha* extracts more promising for diabetes type-2 treatment via another, additional and different mechanisms of action.

Natural extracts have a widespread use in traditional medicine and cosmetic industry. They contain high amounts of chemical compounds with different properties that can provide photoprotection to the skin [30, 31]. It is well known that *Crataegus* extract show very good antioxidant properties and potential ability to protect skin against both UVA and UVB rays [32]. In this context, our present study highlights the importance of *C. oxyacantha*, as a promising source of new photoprotective and antioxidant molecules. In this study,

TABLE 5. Photoprotective Activity of Extracts of *C. oxyacantha* Fruits and Leaves

	Leaves Ethyl acetate extract	Leaves <i>n</i> -butanol extract	Fruits Ethyl acetate extract	Fruits <i>n</i> -butanol extract
SPF	17.19 ± 0.10	48.18 ± 0.83	48.66 ± 0.00	48.20 ± 0.79
Protection	Moderate	High	High	High

all extracts of *C. oxyacantha* displayed high photoprotective activity except *n*-butanol extract of fruits that exhibited moderate activity (Table 5). The presence of flavonoids in the extracts can justify the observed photoprotective activity. In general, the UV-Vis absorption spectrum of flavonoids displays two absorption peaks (at 240–280 nm and 300–550 nm) [33], similar to what was observed for *C. oxyacantha* extracts. Phenolic compounds found in *C. oxyacantha* [6, 7] are expected to account for this activity, since it has been established that quercetin, naringenin, apigenin, and caffeic acid ensure high sun protection over entire UV wavelength range [34], so that the presence of these compounds in *C. oxyacantha* extracts could be a basis for the photoprotective ability of *C. oxyacantha* extracts. The action of *C. oxyacantha* extracts observed in this study could be attributed to various compounds that can often act in a synergistic manner to exert their full protective effect.

In conclusion, this study supports the traditional use of *C. oxyacantha* to treat several ailments and shows *C. oxyacantha* extracts to contain important flavonoids and phenolic acids that are beneficial to health. The extracts strongly inhibited  $\alpha$ -glucosidase, displayed strong antioxidant activity, and relatively moderate acetylcholinesterase inhibition effect.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express thanks to the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for PRFU Project (D01N01UN250120180009).

## REFERENCES

1. Y. J. Zhang, R. Y. Gan, S. Li, et al., *Molecules*, **20**, 21138–56 (2015).
2. I. E. Orhan, *Curr. Med. Chem.*, **25**, 4854–4865 (2018).
3. M. Saoudi, R. B. Slam $\alpha$ -Ben Salem, M. B. Salem, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **114**, 108795 (2019).
4. A. Mecheri, A. Amrani, W. Benabderrahmane, et al., *Phytothérapie*, **16S1**, S22–S31 (2018).
5. A. Mecheri, W. Benabderrahmane, A. Amrani, et al., *Recent Pat. Food Nutr. Agric.*, **10**, 70–75 (2019).
6. W. Benabderrahmane, M. Lores, O. Benaissa, et al., *Nat. Prod. Res.*, (2019); <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1582044>.
7. W. Benabderrahmane, M. Lores, J. P. Lamas, et al., *Nat. Prod. Res.*, **32**, 1220–1223 (2017).
8. M. Ali, S. Muhammad, M. R. Shah, et al., *Front. Pharmacol.*, **8**, 327 (2017).
9. T. Wresdiyati, S. Sa'diah, A. Winarto, et al., *HAYATI J. Biosci.*, **22**, 73–78 (2015).
10. A. J. Scheen. *Drugs*, **63**, 933–51(2003).
11. H. Li, F. Song, J. Xing, et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **20**, 1496–503 (2009).
12. V. L. Singleton, J. A. J. Rossi, *Amer. J. Enol. Viticult.*, **16**, 144–58 (1965).
13. G. Topçu, A. Ay, A. Bilici, et al., *Food Chem.*, **103**, 816–822 (2007).
14. A. Kumaran and R. J. Karunakaran, *LWT*, **40**, 344–352 (2007).
15. H. Shi, N. Noguchi, E. Niki, et al., *Meth. Enzymol.*, **335**, 157–66 (2001).
16. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, et al., *Free Radical Biol. Med.*, **26**, 1231–1237 (1999).
17. M. Öztürk, M. E. Duru, S. Kivrak, et al., *Food Chem. Toxicol.*, **49**, 1353–60 (2011).
18. A. Szydłowska-Czerniaka, C. Dianoczki, K. Recseg, et al., *Talanta*, **76**, 899–905 (2008).
19. R. Apak, K. Guclu, M. Ozyurek, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7970–7981 (2004).
20. M. Oyaizu, *Jpn. J. Nutr.*, **44**, 307–315 (1986).
21. G. L. Ellman, D. Courtney, V. Andres, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88–95 (1961).
22. S. Lordan, T. J. Smyth, A. Soler-Vila, et al., *Food Chem.*, **141**, 2170–2176 (2013).
23. J. S. Mansur, M. N. R. Breder, M. C. A. Mansur, et al., *An. Bras. Dermatol. Rio De Janeiro*, **61**, 121–124 (1986).
24. R. M. Sayre, P. P. Agin, G. J. Levee, et al., *Photochem. Photobiol.*, **29**, 559–566 (1979).
25. W. Mahmood, H. Saleem, W. Shahid, et al., *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **18**, 101039 (2019).
26. D. Zheleva-Dimitrova. *Pharmacogn Mag*, **9**, 109–113 (2013).
27. A. Ali Reza, M. S. Hossain, S. Akhter, et al., *BMC Complement. Altern. Med.*, **18**, 123 (2018).
28. H. Rasouli, S. M. Hosseini-Ghazvini, H. Adibi, et al., *Food Funct.*, **8**, 1942–1954 (2017).
29. H. Jouad, A. Lemhadri, M. Maghrani, et al., *J. Herb. Pharmacother.*, **3**, 19–29 (2003).
30. J. C. Mejía-Giraldo, K. Henao-Zuluaga, C. Gallardo, et al., *Photochem. Photobiol.*, **92**, 150–157 (2015).
31. A. Amrani, A. Mecheri, C. Bensouici, et al., *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **20**, 101209 (2019).
32. A. Jarzycka, A. Lewińska, R. Gancarz, et al., *J. Photochem. Photobiol. B*, **128**, 50–57 (2013).
33. R. G. De-Oliveira-Junior, C. A. A. Ferraz, G. R. Souza, et al., *Biotechnol. Biotechnol. Equit.*, **31**, 600–605 (2017).
34. R. Stevanato, M. Bertelle, and S. Fabris, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **69**, 71–77 (2014).

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : MECHERI Amira

**Evaluation de l'activité antioxydante et des propriétés biologique des extraits phénoliques des plantes médicinales *Crataegus oxyacantha* et *Asteriscus graveolens* : Etude *in vitro* et *in vivo***

**Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3<sup>ème</sup> cycle**

**Résumé**

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer l'effet antioxydant, antidiabétique, neuroprotecteur, anti inflammatoire et protecteur vis-à-vis la toxicité aiguë de la doxorubicine (DOX) des extraits de *Crataegus oxyacantha* (Rosacées) et d'*Asteriscus graveolens* (Astéracées). Dans cette étude, la capacité antioxydante (DPPH, GOR, ABTS, FRAP, CUPRAC, LPO et Phenanthroline), photoprotectrice, antidiabétique ( $\alpha$ -glucosidase) et anticholinestérase [acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE)] des extraits de *n*-butanol et d'acétate d'éthyle des feuilles et des fruits de *C. oxyacantha* et l'extrait *n*-butanol d'*A. graveolens* ont été étudiées à l'aide des méthodes standard. Selon les résultats obtenus, tous les extraits de plantes ont des effets antioxydants significatifs. L'extrait d'acétate d'éthyle de feuilles de *C. oxyacantha* qui contient les valeurs les plus élevées en termes de contenu bioactif total présentait le potentiel antioxydant le plus élevé. De plus, tous les extraits de plantes étudiée avaient un effet inhibiteur sur l' $\alpha$ -glucosidase. L'effet inhibiteur est concentration dépendante. Les résultats ont également indiqué une activité inhibitrice substantielle du BChE pour l'extrait *n*-butanol et d'acétate d'éthyle des feuilles de *C. oxyacantha*, l'extrait *n*-butanol étant l'inhibiteur le plus puissant de l'AChE. De plus, les extraits de plantes présentaient un potentiel photoprotecteur significatif. Ces activités sont fortement corrélées avec les teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux. Les études *in vivo* est portée sur les extraits *n*-butanol des deux plantes étudiées. La première étude vise à évaluer l'effet hépatoprotecteur de *C. oxyacantha* contre la toxicité induite par la DOX chez les rats. Tandis que la deuxième vise à étudier l'effet préventif de l'extrait *n*-butanol de la plante *A. graveolens* contre l'hépatotoxicité et la toxicité des testicules induite par le même médicament. La DOX agit essentiellement en provoquant un dysfonctionnement s'exprime par une augmentation significative de la peroxydation des lipides, qui est détectée par l'augmentation du taux de MDA dans les tissus, ainsi qu'une diminution importante du taux de GSH et de l'activité enzymatique de la GPx, accompagné également par des changements notables des paramètres biochimiques caractérisés par une élévation des taux sérique d'ASAT, ALAT, LDH, le cholestérol et les triglycérides. Cependant, le prétraitement des rats par les extraits de *C. oxyacantha* (100 mg/kg), *A. graveolens* (75 mg/kg) et la vitamine E (100 mg/kg) a permis de rétablir les paramètres biochimiques et les paramètres du stress oxydant à leurs valeurs normales. L'étude histologique a montré une diminution des dommages sévère du foie et des testicules distingués chez les rats traités par la DOX. L'activité anti-inflammatoire des extraits *n*-butanol de *C. oxyacantha* et *A. graveolens* est également évaluée *in vivo*. Les résultats montrent que les deux extraits sont capables de réduire l'œdème de l'oreille induit par le xylène et l'œdème de la patte induit par le formol. En conclusion, ces résultats révèlent le potentiel prometteur des extraits de *C. oxyacantha* et d'*A. graveolens* en tant qu'agents antioxydants, antidiabétique, anti-inflammatoire et protecteurs contre la toxicité de la DOX, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans le domaine de la recherche médicale et de la pharmacologie pour le développement de thérapies complémentaires.

**Mots clés:** *Crataegus oxyacantha*, *Asteriscus graveolens*, antioxydants, doxorubicine, hépatotoxicité, toxicité testiculaire, anti-inflammatoire.