



DEPARTEMENT D'ÉCOLOGIE ET BIOLOGIE VÉGÉTALE

N°...../SNV/2017

THÈSE

Présentée par

AMOR Loubna

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOLOGIE VÉGÉTALE

THÈME

**Composition chimique et activités biologiques des extraits de
Crataegus oxyacantha L. (Rosaceae)**

Soutenue publiquement le : 15/01/2018

DEVANT LE JURY

Président	Benmahammed Ammar	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Belhattab Rachid	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	Dahia Mustafa	MCA Univ Djelfa
	Zellagui Ammar	Pr. Univ OEB
	Akkal Salah	Pr. Univ constantine-1

Laboratoire de Microbiologie Appliquée LMA



Communications scientifiques

- **Communication**

- Participation à la 4ème conférence internationale de la chimie organisée par Saudi Chemical Society.
- Participation à the 15th International Congress of the International Society for Ethnopharmacology on 5-8, May, 2015 in Petra, Jordan.

- **Publication**

Amor Loubna and Belhattab Rachid (2015) **Antioxidant activity of aqueous extracts from *Crataegus oxyacantha* leaves.** *Pharmacognosy Communications*, 5(4) :229-232.

REMERCIEMENTS

Je remercie DIEU tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui m'a permis de mener à bien ce travail.

Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à mon promoteur Mr. Belhattab Rachid, Professeur à l'université de sétif-1 qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Je remercie également Mr Benmahammed Ammar, Professeur à l'université de Sétif-1 d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie Mr Dahia Mustafa, Maitre de conferances à l'université de Djelfa d'avoir accepté de juger ce travail et participer au jury.

Je remercie Mr Zellagui Ammar, Profeseur à l'université d'OEB, d'avoir accepté d'être parmi les membres du jury de ce thèse.

Je remercie Mr Akkal salah, Professeur à l'université de Constantine-1 d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.

Je dois mes profonde reconnaissance à Pr Ibrahim Demirtas Directeur de laboratoire de phytochimie, université de Karatekin, Çankiri, Turkey dont j'ai eu l'opportinuaté de d'apprendre de nouvelles techniques et un soutien de haut niveau.

Je remercie egalemt le Directeur de laboratoire de Microbiologie de maternité d'EL Eulma pour avoir m'accueillir et permette la realisation de la partie microbiologique.

Finalement, je tiens à remercier mes très chers parents, mes frères et ma soeur pour leur soutien morale et physique, ainsi que tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé dans ma tâche.

Sommaire

Résumés

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie bibliographique

I. Généralités sur la plante

1. L'espèce *Crataegus oxyacantha* L.....3

2. Description de la plante.....3

3. Classification.....4

4. Habitat.....4

II. Composition chimique de la plante

1. Les métabolites primaires.....5

2. Les métabolites secondaire5

2.1. Les composés phénoliques.....5

2.2. Les terpènes8

2.3. Les alcaloïdes.....9

3. Principaux métabolites secondaires de *C. oxyacantha* L.....9

3.1. Les flavonoïdes9

3.1.1. Flavan-3-ol10

3.1.2. Les procyanidines.....11

3.1.3. Flavones et Flavonols13

3.1.4. Les anthocyanine et les anthocyanidines13

3.2. L'acide chlorogénique14

3.3. Les triterpènes.....14

III. Utilisation de la plante

1. L'utilisation traditionnelle.....	15
2. Les effets biologiques et pharmacologiques.....	15
2.1. Les effets cardiovasculaires.....	16
2.2. Les autres effets.....	17
2.4. Toxicité.....	17

IV. Les activités biologiques

1. L'activité antioxydante.....	19
1.1. Le stress oxydant	19
1.2. Les radicaux libres	19
1.3. Les antioxydants	20
1.3.1. Les antioxydants enzymatiques	20
1.3.2. Les antioxydants non-enzymatiques.....	20
2. L'activité anti-cancérigène.....	23
2.1. Le cancer du col de l'utérus.....	23
2.2. Le cancer du poumon.....	24
2.3. L'activité anti-cancérigène des polyphénols	25
3- l'activité antimicrobienne.....	26

Partie Expérimentale

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

1. Matériel végétal	29
2. Micro-organismes	29
3. Bio-assays.....	29

II. Méthodes

1. Préparation des extraits	30
1.1. Les extraits aqueux.....	30

1.2. Les extraits d'acétone.....	30
1.3. Les extraits de méthanol.....	30
1.4. L'extrait de méthanol/chloroforme des feuilles.....	31
1.4.1. L'extraction	31
1.4.2. Fractionnement et purification de l'extrait des feuilles	31
2. Analyse quantitative des extraits.....	31
2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	31
2.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	32
2.3. Dosage des flavones et flavonols.....	32
2.4. Dosage des tanins	32
3. HPLC TOF/ MS	33
4. Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN).....	33
5. Activité antioxydante	34
5.1. Test de DPPH.....	34
5.2. Test de blanchissement du β - carotène/ acide linoléique.....	34
5.3. Chélation du fer	35
5.4. Pouvoir réducteur.....	35
6. Activité antiproliférative.....	36
7. Activité antimicrobienne	37
8. Analyses statistiques	38

Résultats et discussion

I. Rendements des extractions	40
II. Composition chimique	41
II.1. Teneur en polyphénols totaux.....	41
II.2. Teneurs en flavonoïdes totaux.....	44
II.3. Teneurs en flavones et flavonols.....	45
II.4. Teneur en tannins totaux	47

III. Identification des métabolites secondaires par HPLC TOF/MS.....	50
III.1. Les extraits aqueux	50
III.2. Les extraits de méthanol	54
III.3. les extraits d'acétone	58
III.4.L'extrait de méthanol/ chloroforme des feuilles	62
III.5. Identification des constituants des fractions F6 et F9 par RMN	72
IV. L'activité antioxydante	82
IV.1-Test au DPPH.....	82
IV.2-Test de blanchissement du β - carotène/ acide linoléique.....	86
IV.3- Chélation du fer	90
IV.4- Pouvoir réducteur.....	93
V- Activité antiproliférative.....	97
VI. L'activité antimicrobienne	104
Conclusion	109
Références bibliographiques	111
Annexes	

الملخص

الهدف من هذا البحث هو تحضير مستخلصات من مختلف اجزاء النبات لغرض تحديد المحتوى الفينولي الكلي، الفلافونويدات، الفلافون والفلافانول والدباغ، ثم فصل، تنقية وتحديد هذه المركبات هذا من جهة، ومن جهة اخرى تقدير النشاطية المضادة للأكسدة، المضادة للميكروبات و المضادة للانقسام المفرط للخلايا.

تحصلنا على المستخلصات باستعمال طريقة الغلي (المستخلص المائي)، النقع (المستخلص الهيدرو-ميثانولي) و باستعمال جهاز سوكسلت (المستخلص الاسيتوني). تم اجراء عمليات التحليل الكيميائي باستعمال طرق الطيف الضوئي، تنقية وتحديد المركبات الفينولية باستخدام كروماتوغرافيا الضغط العالي وتقنية الرنين النووي المغناطيسي، في حين تم تقدير النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال طريقة DPPH ، بيتا كاروتين/حمض اللينولييك ، خلب الحديد و القوة الارجاعية. النشاطية المضادة للميكروبات باستخدام طريقة قياس قطر الشبيط وتحديد التراكيز الدنيا المثبطة اما النشاطية المضادة للانقسام المفرط للخلايا باستعمال طريقة ELISA BrdU وباستعمال سلالتين خلويتين HeLa و A549.

يتراوح المحتوى الفينولي بين 2.14 ± 39.69 و 7.97 ± 406.87 مغ مكافئ من حمض الغاليك لكل غرام من المستخلص ، محتوى الفلافونويدات ما بين 1.51 ± 3.9 مغ مكافئ من الكرستين/ غ من المستخلص، الفلافون والفلافونول ما بين 1.35 ± 20.95 و 4.18 ± 157.22 مغ مكافئ من الكرستين/ غ من المستخلص والدباغ تتراوح الكمية ما بين 9.3 ± 119.75 و 6.89 ± 313.46 مغ مكافئ من حمض التانيك/ غ من المستخلص. يظهر المستخلص الميثانولي للثمار نشاط مضاد للأكسدة عالي في اختبار DPPH (1.56 ± 17.47 ميكروغرام/مل)، البيتاكاروتين/ حمض اللينولييك (2.62 ± 96.73) و خلب الحديد (1.5 ± 530 ميكروغرام/مل). النشاطية المضادة للميكروبات كانت ضعيفة مع جميع المستخلصات. في التراكيز العليا (250 ميكروغرام/مل) اظهرت كل المستخلصات نشاطية مضادة للانقسام المفرط للخلايا معتبرة باستثناء المستخلص الاسيتوني للثمار الذي يظهر نشاطية ضعيفة. مع ذلك فان السترويد وبنسبة اقل الالبيكاتشين المعزولين من الاوراق يملكان نشاطية مماثلة للشاهد الموجب حتى في التراكيز الدنيا على الخلية HeLa.

الكلمات المفتاح: *Asteracea*، *Crataegus oxyacantha* ، المركبات الكيميائية، النشاطية المضادة للأكسدة،

النشاطية المضادة للانقسام المفرط للخلايا، النشاطية المضادة للميكروبات.

Résumé

L'objectif de ce travail est de préparer des extraits des différentes parties de la plante en vue de déterminer la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavons et des flavanols et des tanins et leur séparation, purification et identification d'une part et l'évaluation des activités antioxydante, antiproliférative et antimicrobienne d'autre part.

Les extraits sont obtenus par décoction (extrait aqueux), macération (hydro-méthanolique) et au soxhlet (extrait d'acétone). Les déterminations chimiques ont été effectuées en utilisant des méthodes spectro-photométriques, la purification et l'identification des composés phénoliques en utilisant HPLC TOF / MS et la RMN ^1H et RMN ^{13}C , alors que l'activité antioxydante a été évaluée selon la méthode utilisant le DPPH, β -carotène/acide linoléique, chélation du fer et le pouvoir réducteur. L'activité antimicrobienne a été évaluée en mesurant la zone d'inhibition autour des disques et la détermination des concentrations minimales inhibitrices(CMI). L'activité antiproliférative des extraits a été évaluée selon le test BrdU ELISA en utilisant deux lignées cellulaires HeLa et A549.

La teneur en polyphénol totaux variaient entre $39,69 \pm 2,14$ et $406,87 \pm 7,97$ mg EAG / g d'extrait; Les flavonoïdes totaux entre $3,9 \pm 1,51$ à $67,26 \pm 0,11$ mg EQ / g d'extrait; Les flavons et les flavonols entre $20,95 \pm 1,35$ à $157,22 \pm 4,18$ mg EQ / g d'extrait; et les tanins variaient entre $119,75 \pm 9,3$ et $313,46 \pm 6,89$ mg EAT / g d'extrait. L'extrait de méthanol des fruits a montré une forte activité antioxydante; DPPH ($\text{CI}_{50}=17.47\pm1.56$ $\mu\text{g/ml}$), β -carotène / acide linoléique ($\text{AA}\%= 96.73\pm2.62$), la chélation du fer ($\text{CI}_{50}=530\pm1.5\mu\text{g/ml}$). Une activité antimicrobienne faible a été observée avec l'ensemble des extraits. Pour la dose 250 $\mu\text{g/ml}$, tous les extraits ont manifesté une forte activité antiproliférative à l'exception de l'extrait d'acétone des fruits qui a montré une activité modérée. Toutefois, un stéroïde et à un degré moindre l'épicatéchine isolés à partir des feuilles ont manifesté des activités similaires au témoin positif, même à de faibles doses sur les cellules HeLa.

Mots clés : *Crataegus oxyacantha*, *Asteracea*, composition chimique, activité antiproliférative, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

The aim of this work was to prepare extracts from different parts of the plant in order to determine the total phenols content, flavonoids, flavons and flavanols and tannins, their separation, purification and identification on one hand and the evaluation of the antioxidant, anti-proliferative and antimicrobial activities on another hand.

The extracts were obtained by decoction (aqueous extract), maceration (hydro-methanolic extract) and by using soxhlet apparatus (acetone extract). The chemical determinations were carried out using spectrophotometric methods, purification and identification of phenolic compounds by using HPLC TOF/MS and RMN ^1H and RMN ^{13}C , whereas antioxidant activity was assessed according to DPPH, β - carotene/linoleic acid, iron chelating ability and reducing power methods. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition and determination of the minimal inhibitory concentrations (MIC). The anti-proliferative activity was assessed by ELISA BrdU assay against two cell lines HeLa and A549.

Total phenol content varied from 39.69 ± 2.14 to 406.87 ± 7.97 mg GAE/g extract; flavonoids ranged from 3.9 ± 1.51 to 67.26 ± 0.11 mg QE/g extract; the flavons and flavonols ranged from 20.95 ± 1.35 to 157.22 ± 4.18 mg QE/g extract; and the tannins ranged between 119.75 ± 9.3 and 313.46 ± 6.89 mg TAE/ g extract . The fruits methanol extract showed high antioxidant activity; against the free radical DPPH ($\text{IC}_{50} = 17.47 \pm 1.56$ $\mu\text{g/ml}$), β -carotene/linoleic acid ($\text{AA}\% = 96.73 \pm 2.62$), iron chelating ability ($\text{IC}_{50} = 530 \pm 1.5$ $\mu\text{g/ml}$). A weak antimicrobial activity was observed with all extracts. When used at $250 \mu\text{g/ml}$, all extracts showed a strong anti-proliferative activity, whereas the fruits acetone extract showed a moderate effect. However, a steroid and at a less extent epi-catechin compounds isolated from the leaves showed similar activities to the positive control even tested at low concentration against HeLa cells.

Key words: *Crataegus oxyacantha*, *Asteracea*, chemical composition, anti-proliferative activity, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Liste des Abréviations

AMPc- PDE	adenosine monophosphate cyclique- Phosphodiesterase.
ATCC	American Type Culture Collection.
A549	human lung adenocarcinoma cell line.
BHA	Butylated hydroxyanisole.
BHT	Butylated hydroxytoluene.
BrdU	BromodésoxyUridine.
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice 50%.
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice.
CCM	Chromatographie sur Couche Mince.
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium.
DMSO	Dimethylsulfoxyde.
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay.
5-FU	5- Fluorouracil.
GMP cyclique	Guanosine monophosphate cyclique.
GN	Gélose nutritive.
HeLa	Cervical cancer cell line.
MF	Matière fraîche.
NF-kB	Nuclear factor- kappa B.
MS	Matière Sèche.
NRRL	ARR Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service.

NSCLC	Non-small cell lung cancer.
R _f	Rapport frontal.
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire.
ROS	Reactive oxygen species.
SCLC	Small cell lung cancer.

Liste des figures

Figure 1: Fleures, feuilles et fruits de <i>C. oxyacantha</i> L.	03
Figure 2 : Structures de base des principaux flavonoïdes	07
Figure 3 : Structure chimique de quelques flavonoïdes de <i>C. oxyacantha</i> L.	09
Figure 4: Les flavonoides de type flavan-3-ol dans <i>C. oxyacantha</i> L.	10
Figure 5 : Structure chimique de la catéchine dimères (procyanidine).....	12
Figure 6 : Structure chimique des épicatechines trimères(C1) et titramère D1.....	13
Figure 7 : Strtucture chimique du cyanidine-3-O-galactoside isolé à partir de <i>C. oxyacantha</i> L.	13
Figure 8: Structure chimique d'acide chlorogénique de <i>C. oxyacantha</i> L.....	14
Figure 9 : Mécanismes d'action antioxydante de la vitamine E sur les radicaux LOO•.....	21
Figure 10: Les rendements des extraits de différente partie de <i>C. oxyacantha</i> L.....	41
Figure 11 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux....	42
Figure 12 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits des différentes parties de <i>C. oxyacantha</i>	43
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux....	44
Figure 14: Teneurs en flavonoïdes des extraits des différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> L...45	
Figure 15: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonoles.46	
Figure 16 : Teneurs en flavones et flavonols des extraits dans les différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> L.....	47
Figure 17 : Courbe d'étalonnage d'acide tannique pour le dosage des tannins.....	48
Figure 18: Teneurs en tannins des extraits des différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> L.....	49
Figure 19 : les chromatogrammes des composés phénoliques des extraits aqueux de différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> obtenu par l'HPLC TOF/MS.....	51

Figure 20 : les chromatogrammes des composés phénoliques des extraits de méthanol de différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> obtenu par l'HPLC TOF/MS.....	55
Figure 21 : les chromatogrammes des composés phénoliques des extraits d'acétone de différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> obtenu par l'HPLC TOF/MS.....	59
Figure 22 : Les chromatogrammes des composés phénoliques de l'extrait méthanol/chloroforme et de différentes fractions des feuilles de <i>C. oxyacantha</i> obtenus par HPLC TOF/MS.....	68
Figure 23 : Spectre RMN proton du composé C1	73
Figure 24 : Spectre RMN carbone du composé C1	74
Figure 25 : les structures des composés C2 et C3	75
Figure 26 : le spectre MS de composé C2	75
Figure 27 : le spectre MS de composé C3	76
Figure 28 : le spectre RMN ¹ H de composé C2	77
Figure 29 : le spectre RMN ¹³ C de composé C2	78
Figure 30 : la structure de composé C4	79
Figure 31 : le spectre MS de composé C4	79
Figure 32 : le spectre RMN ¹ H de composé C4	80
Figure 33 : le spectre RMN ¹³ C de composé C4	81
Figure 34 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration	85
Figure 35 : Activité anti-radicalaire des extraits de différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> et des témoins positifs.....	86
Figure 36 : Cinétique de blanchissement du β- carotène à 470 nm en absence et en présence des extraits aqueux de <i>C. oxyacantha</i> et du BHA.....	87
Figure 37 : Cinétique de blanchissement du β- carotène à 470 nm en absence et en présence des extraits de méthanol de <i>C. oxyacantha</i> et du BHA.....	88

Figure 38 : Cinétique de blanchissement du β - carotène à 470 nm en absence et en présence des extraits d'acétone de <i>C. oxyacantha</i> et du BHA.....	88
Figure 39: Activité antioxydante des extraits de <i>C. oxyacantha</i> L., de BHA et des contrôles négatifs dans le système β -carotène/acide linoléique.....	89
Figure 40 : Variation de chélation du fer ferreux en fonction de la concentration.....	92
Figure 41: l'activité chélatrice des extraits de différente partie de <i>C. oxyacantha</i>	93
Figure 42 : Variation de pouvoir réducteur en fonction de la concentration	96
Figure 43 : Le pouvoir réducteur des extraits des différentes parties de <i>C. oxyacantha</i>	96
Figure 44: L'activité antiproliférative des extraits de différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> et de témoin positif vis-à-vis la lignée cellulaire A549.....	98
Figure 45: L'activité antiprolifératif des extraits de différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> et de témoin positif vis-à-vis la cellule HeLa.....	100
Figure 46: L'activité antiprolifératif des composés isolés à partir des feuilles de <i>C. oxyacantha</i> et de témoin positif vis-à-vis la cellule HeLa.....	103

Liste des tableaux

Tableau I: Séparation chromatographique par HPLC TOF/MS des extraits aqueux de différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> .	52
Tableau II: Séparation chromatographique par HPLC TOF/MS des extraits de méthanol de différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> .	56
Tableau III: Séparation chromatographique par HPLC TOF/MS des extraits d'acétone de différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> .	60
Tableau IV: Regroupement des fractions issues de la colonne de l'extrait de <i>C. oxyacantha</i> L.	62
Tableau V : l'analyse HPLC TOF/MS d'extrait et des fractions.	70
Tableau VI : CI ₅₀ et CI ₇₅ des différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> .	102
Tableau VII: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries par les extraits de <i>C. oxyacantha</i> , de gentamycine et les témoins négatifs.	105
Tableau VIII: Les CMI des extraits de méthanol des différentes parties de <i>C. oxyacantha</i> .	106
Tableau IX: Diamètres des zones d'inhibition des extraits de <i>C. oxyacantha</i> , des témoins positifs et négatifs sur les champignons (mm)	107

Introduction

Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus, d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux.

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles. Aujourd'hui, une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes.

Les plantes, qui ont déjà fourni à la médecine des molécules thérapeutiques majeures, comme l'aspirine, la morphine, la quinine ou le taxol, offrent un véritable potentiel pour la recherche de molécules à activité antibactérienne, antivirale, antioxydante et cardiotonique (Frankel *et al.*, 1993). Peu d'espèces végétales sont connues et seule une minorité d'entre elles est explorée chimiquement. Il resterait entre 300 000 et 500 000 espèces de plantes à découvrir, ce qui laisse présager un nombre conséquent de nouvelles molécules à identifier (Hostettmann *et al.*, 1998).

Actuellement, de nombreux médicaments utilisés sont extraits de plantes. Environ 25% des produits pharmaceutiques renferment des préparations à base de plantes (Duke, 1993).

Crataegus oxyacantha est une plante médicinale connue en Algérie, elle possède une forte activité anti-oxydante, en raison de la présence de différents composés bioactifs tels que l'épicatechine, l'hyperoside et l'acide chlorogénique. Ces composés ont de nombreux effets pharmacologiques, ce sont des neuroprotecteurs, hépatoprotecteurs, cardioprotecteurs, néphroprotecteurs... etc. (Melzer *et al.*, 1991 ; Nakashima *et al.*, 1992).

En dépit de ces activités que peuvent véhiculer ces métabolites secondaires, le pouvoir médicinal de cette plante reste encore peu exploré surtout sur le plan pharmacotoxicologique.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont l'objectif essentiel consiste à l'étude phytochimique et biologique des extraits des différentes parties de *C. oxyacantha* L. Le choix de cette plante est justifié, en partie, par son utilisation par la population autochtone en Algérie aussi bien pour préparer des tisanes à partir des fruits et fleurs ou pour soigner les

troubles cardiaques et nerveux. Grace à ses fruits comestibles au gout sucré, *C. oxyacantha* L. et appréciée par les animaux et l'homme.

La présente étude s'articule autour de deux aspects chimique et biologique présentés en deux parties:

La première partie est consacrée à l'étude bibliographique sur les connaissances acquises à ce jour sur *C. oxyacantha* L. et les activités biologiques étudiées.

La deuxième partie portera sur la recherche de constituants chimiques et sur l'évaluation *in vitro* et *ex vivo* de l'activité biologique des extraits organiques et de l'extrait aqueux, préparés à partir des différentes parties de *C. oxyacantha* L.

REVU

BIBLIOGRAPHIQUE

I- Généralités sur la plante

I.1- L'espèce *Crataegus oxyacantha* L.

Le nom du genre *Crataegus* est dérivé de mot grec *Kratos* signifiant la dureté du bois. Le nom de l'espèce *oxyacantha* dérivé des mots grecs *oxus* signifiant le pointu, et *akantha* signifiant une épine (Horne et Montgomery, 2005) ; couramment appelé Aubépine est une plante de la famille des *Rosacées*. Localement cette plante est connue ce le nom « Bou Mekherri » (Quezel et Santa, 1962).

I-2- Description de la plante

Crataegus oxyacantha est un arbre de taille moyenne (4 à 10 mètres de hauteur), spontané poussant en buisson épis dans les forêts et maquis du tell Algérien, il est parfois planté en haies ou en clôtures dans les jardins en zones rurales. Ses rameaux gris-bruns sont parsemés de fortes épines. Ses petites feuilles découpées en lobes sont vertes foncées et luisantes et ses fleurs blanches à 5 pétales sont petites, portées dans des inflorescences et dégagent une odeur rappelant le noyau d'amande amer. Ses fruits à noyaux de la taille d'un pois chiche rouge à la pulpe farineuse douceâtre, sont consommés par les oiseaux (Fig.1) (Gire, 2000 ; Bruneton, 1993).



a) Les fruits

b) les fleurs et les feuilles

Figure 1: Fleures, feuilles et fruits de *C. oxyacantha* L. (Photographie personnelle 2014).

I.3- Classification

La position systématique de *C. oxyacantha* L. est la suivante (Potter, 2007 ; Rasmussen, 2011) :

- Règne : Plantae
- Division: Angiospermae
- Classe: Magnoliopsida
- Ordre: Rosales
- Famille: Rosaceae
- Sous famille: Maloidae
- Tribue: Crataegeae
- Genre: *Crataegus*
- Espèce: *Crataegus oxyacantha*
- Sous espèce : *C. oxyacantha* ssp *monogyna* Jacq.

I.4- Habitat

Cette espèce se trouve principalement dans les zones dont la latitude est entre 30 ° et 50 ° N, comme l'Amérique du Nord, l'Asie occidentale, l'Inde, la Chine, l'Afrique du Nord. Dans l'Algérie, *C. oxyacantha* L. est rependu les forets et manquis du Tell algérien. Dans les années 1800, les colons britanniques l'ont introduit en Tasmanie et dans d'autres parties de l'Australie en tant que haie, et il court maintenant à Victoria, en Tasmanie, aux collines d'Adélaïde et aux plateaux de la Nouvelle-Galles du Sud. *Crataegus* est agressif, tenace et difficile à éliminer; Il a été déclaré une mauvaise herbe dans de nombreux états Australiens. En Inde, il se trouve dans l'Himalaya humide, le Cachemire et l'Himachal Pradesh, à une altitude de 1800-3000 mètres (Hobbs et Foster, 1990 ; Leung et Foster, 1996).

II- Composition chimique de la plante

II.1- Les métabolites primaires

Les sucres sont produits dans les feuilles et sont transportés aux vacuoles et à l'espace libre du fruit pendant son développement. Les sucres qui ont été quantifiés dans les fruits des espèces de *Crataegus* comprennent le glucose, le saccharose, le fructose et le xylose. Les sucres alcooliques, y compris le sorbitol et le myo- inositol, ont également été quantifiés. Le sorbitol est d'une importance particulière dans les fruits de *Crataegus*, car c'est le principal sucre de translocation. Typiquement, les sucres et les sucres alcooliques sont mesurés dans ces espèces de *Crataegus* qui sont plus couramment consommées comme aliments. En moyenne, le fructose est le sucre le plus abondant dans les fruits de *Crataegus*, tandis que le glucose, le saccharose et le xylose sont nettement moins abondants (Urbonaviciute *et al.*, 2006).

Les amines cardiotoniques : triméthylamine ; phénylalanine et tyramine sont présent seulement dans les fleurs (Davies, 2000).

Les teneurs en protéine et lipides dans les parties comestible du *Crataegus monogyna* sont de 2.5 g/ 100 g de MS et 2.3 g/ 100 g de MS respectivement (Herrara, 1984).

II.2- Les métabolites secondaires

Les plantes possèdent des métabolites secondaires par opposition aux métabolites primaires. Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (Ali *et al.* 2001 ; Lim *et al.* 2007)

II.2.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal, où ils existent sous forme libre ou glycosylée. Les polyphénols ou les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates de

carbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate, celles de l'acide shikimique conduisant après trans-amination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs dérivés et celles de l'acétate conduisant aux poly-cétoesters ou polyacétates (malonate) (Cheynier *et al.*, 1997 ; Harborne, 2001).

Les représentants les plus nombreux et les plus connus sont les flavonoïdes. Sous cette qualification un peu abusive se cachent en fait trois familles de molécules de structures voisines : les flavonoïdes stricto sensu, pigments végétaux jaune-orangé, les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet et un groupe de tanins, les proanthocyanidines, molécules incolores et très hydrosolubles (Kris-Etherton *et al.* 2002). Néanmoins, de nombreuses autres structures existent, tels que les acides phénols (dérivés de l'acide cinnamique, par exemple), tanins hydrolysables, coumarines, lignanes, quinones et autres phloroglucinols. Il est à noter que certains composés appartenant à ces groupes chimiques ne comportent en fait aucun hydroxyle libre, de même qu'on peut signaler la présence de fonctions phénoliques chez des composés naturels appartenant à d'autres groupes phytochimiques (terpènes, alcaloïdes...) (Ribéreau- Gayon, 1968).

II.2.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques se rencontrent dans les plantes sous forme libre comme les glycosides et peuvent être intégrés dans des molécules plus grandes sous une forme ester. Ils sont communs comme les depsides - l'ester intermoléculaire de deux ou plusieurs unités composées des mêmes ou différents acides phénoliques tels que: caféique, coumarique, ferulique, gallic et syringique. Les depsides sont, par exemple, des substances chlorogènes omniprésentes, isochlorogènes, ellagiques, lithospermiques et rosmariniques. En raison de la présence d'un nombre élevé de groupes hydroxyle et d'un fragment carboxyle, leurs propriétés antioxydantes sont très prononcées (Rice-Evans *et al.*, 1996; Sroka, 2005).

II.2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6, soit deux noyaux aromatiques (benzo- γ -pyrone) reliés par un pont de 3 carbones. La structure en C6-C3-C6 est le produit des deux voies de synthèse des composés phénoliques, le noyau B et le pont carboné constituant une unité phénylpropanoïde synthétisée à partir de la phénylalanine provenant de la voie de l'acide shikimique, alors que le noyau A vient de la condensation de 3 motifs acétates via la voie de l'acide malonique. La

fusion de ces deux parties implique la condensation d'un phénylpronanoïde, le 4-coumaryl, avec 3 malonyl COA donnant chacun 2 atomes de carbone. La réaction est catalysée par la chalcone synthase, donnant ainsi le tétrahydroxychalcone, qui va à son tour donner tous les flavonoïdes (Fig.2) (Crozier, 2003).

Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes (Bruneton.1999, Erlund .2004).

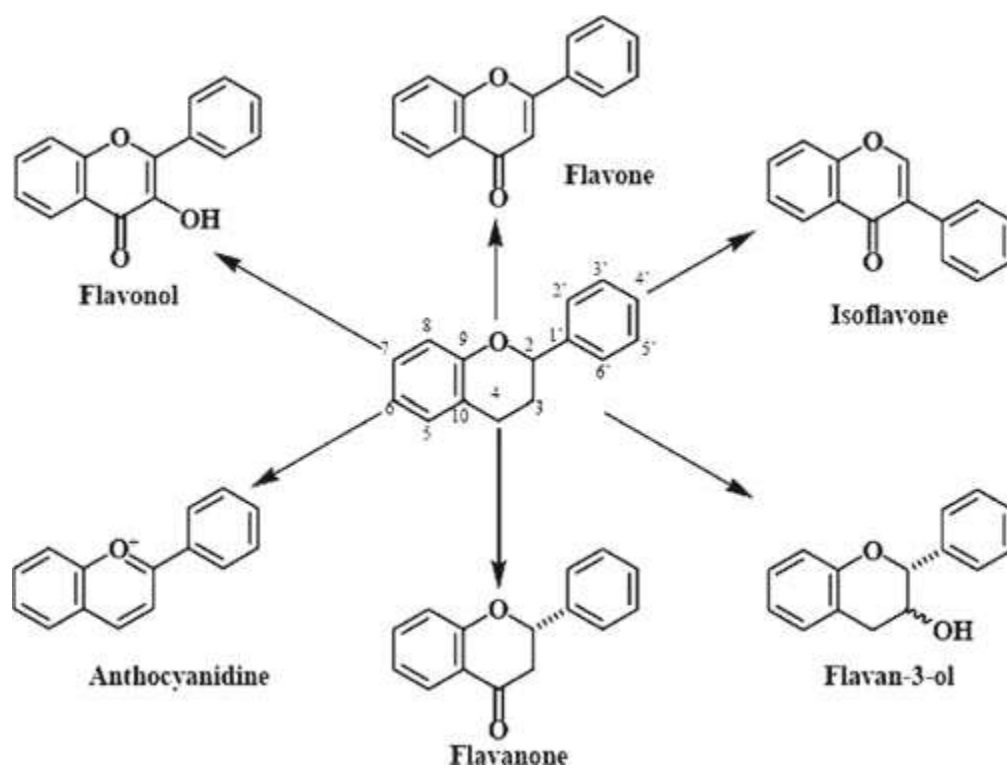


Figure 2 : Structures de base des principaux flavonoïdes (Chira *et al.*, 2008)

II.2.1.3. Les tanins

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes basés sur des différences structurales :

a- Les tanins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose et d'acides phénols qui sont :

- soit d'acide gallique, pour le groupe de tanins galliques (gallotanins).
- soit d'acide éllagique, pour le groupe de tanins ellagiques (ellagitannins).

Dans les deux cas, la fraction osidique est estérifiée par plusieurs molécules d'acide gallique ou éllagique (Ghestem *et al.*, 2001).

b- Les tanins condensés

Les tanins condensés, appelés aussi les pro-anthocyanidines sont des polymères formés d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation (Hemingway, 1992). Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols (catéchine) se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B et de flavan-3,4-dioles (leuco-anthocyanidines), ou un mélange des deux. On distingue ainsi les catéchines (di-hydroxylées) des gallo-catéchines (tri-hydroxylées). Les polymères de ces tanins se forment sous l'action d'acides ou d'enzymes, ils sont constitués généralement de 2 à 50 unités monomériques (Okamura *et al.*, 1993, Vermerris et Nicholson, 2008).

II.2.2. les terpénoïdes

Les terpénoïdes sont une classe importante de métabolites secondaires qui proviennent du même précurseur biosynthétique, l'acide mévalonique. Chaque classe de terpènes est issue du couplage « tête-à-queue » d'unités isopréniques. La première étape de leur biosynthèse commence toujours par condensation de deux dérivés phosphorylés de l'acide mévalonique, l'isopentényl pyrophosphate et le diméthylallyl pyrophosphate (Bruneton, 1999).

II.2.2.1. les triterpènes

Les triterpènes « 4000 composés construits sur plus de squelettes différents » sont des composés en C₃₀ issus de la cyclisation du squalène. Ils sont très souvent hydroxylés et présentent une très forte unité structurale. L'unité structurale est également fortement marquée chez les stéroïdes : des composés aussi différents quant à leurs propriétés que les phytostérols, les saponosides, les ecdystéroïdes, les glocides cardiotoniques ou les alcanes stéroïdiques ont tous le même squelette de base (Bruneton, 1999).

II.2.2.2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des terpènes en C₄₀ qui possèdent un chromophore avec au moins dix doubles liaisons. Ce sont des pigments végétaux qui donnent une couleur jaune orangée aux organes qui les contiennent. Les caroténoïdes peuvent être séparés en deux grandes

classes, les carotènes et les xanthophylles qui diffèrent respectivement par l'absence ou la présence de fonctions hydroxyles (Bruneton, 1999).

II.2.3. les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, des structures moléculaires complexes plus ou moins basiques et douées de propriétés physiologiques prononcées même à faibles doses (Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007).

Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (Roberts et Wink, 1999 ; Stöckigt *et al.*, 2002).

II.3. Principaux métabolites secondaires de *C. oxyacantha* L.

II.3.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes majoritaires présents dans *C. oxyacantha* L. sont la quercétine, la quercitrine, l'hyperoside, la rutine et le vitexine (Chang *et al.*, 2002) (Fig 3).

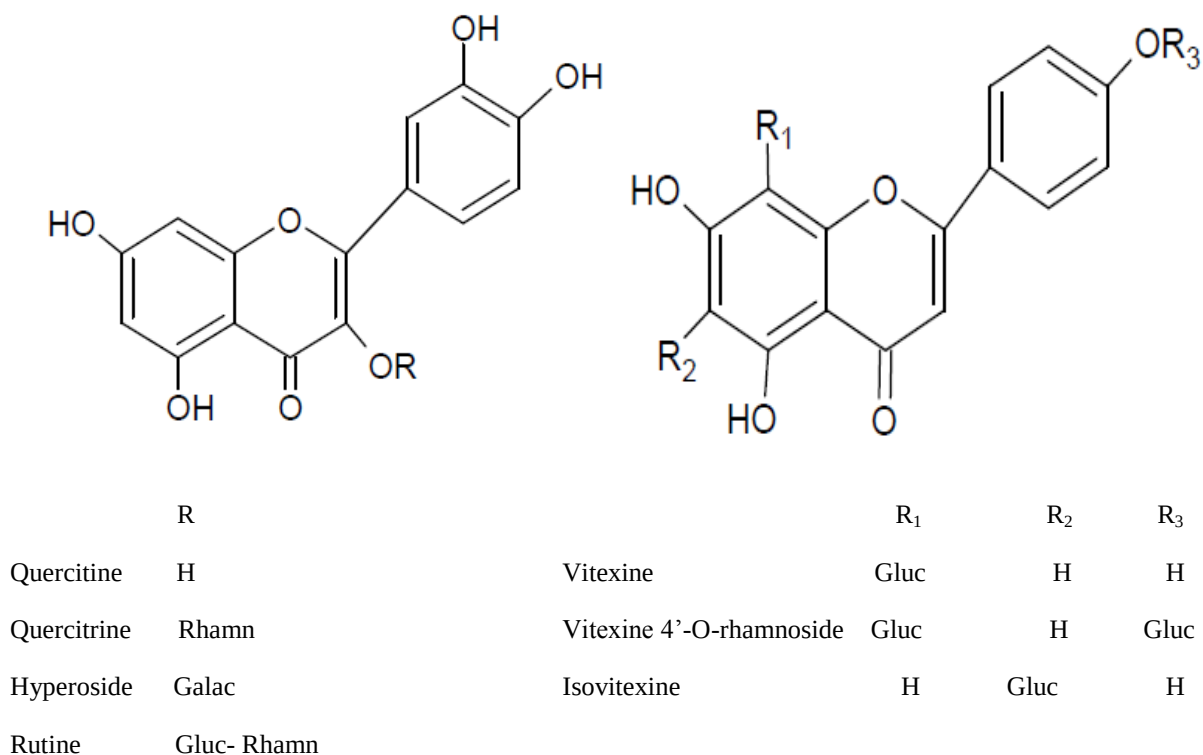


Figure 3 : Structure chimique de quelques flavonoïdes de *C. oxyacantha* L. (Chang *et al.*, 2002).

II.3.1.1- Flavan-3-ol

Les composés flavan-3-ol, contenant le groupe fonctionnel diortho-hydroxyl (catéchol) à l'anneau B, sont parmi les flavonoïdes les plus communs à ce jour. Sur la base des centres chiraux C-2 et C-3, on peut utiliser quatre stéréoisomères, (±) - catéchines et (±) - épicatechines (Fig.4). Il est intéressant de noter que toutes ces formes, soit par leurs propres composants, soit en tant que composantes structurelles complexes, ont été trouvées chez *C. oxyacantha* L. En tant que monomère, la (±) - épicatechine semble être abondamment présente dans la plante, alors que, (±) -catéchine est une composante mineure trouvée à la fois dans les parties aériennes et les cultures en suspension cellulaire (Bahorun *et al.*, 1994 ; 2003).

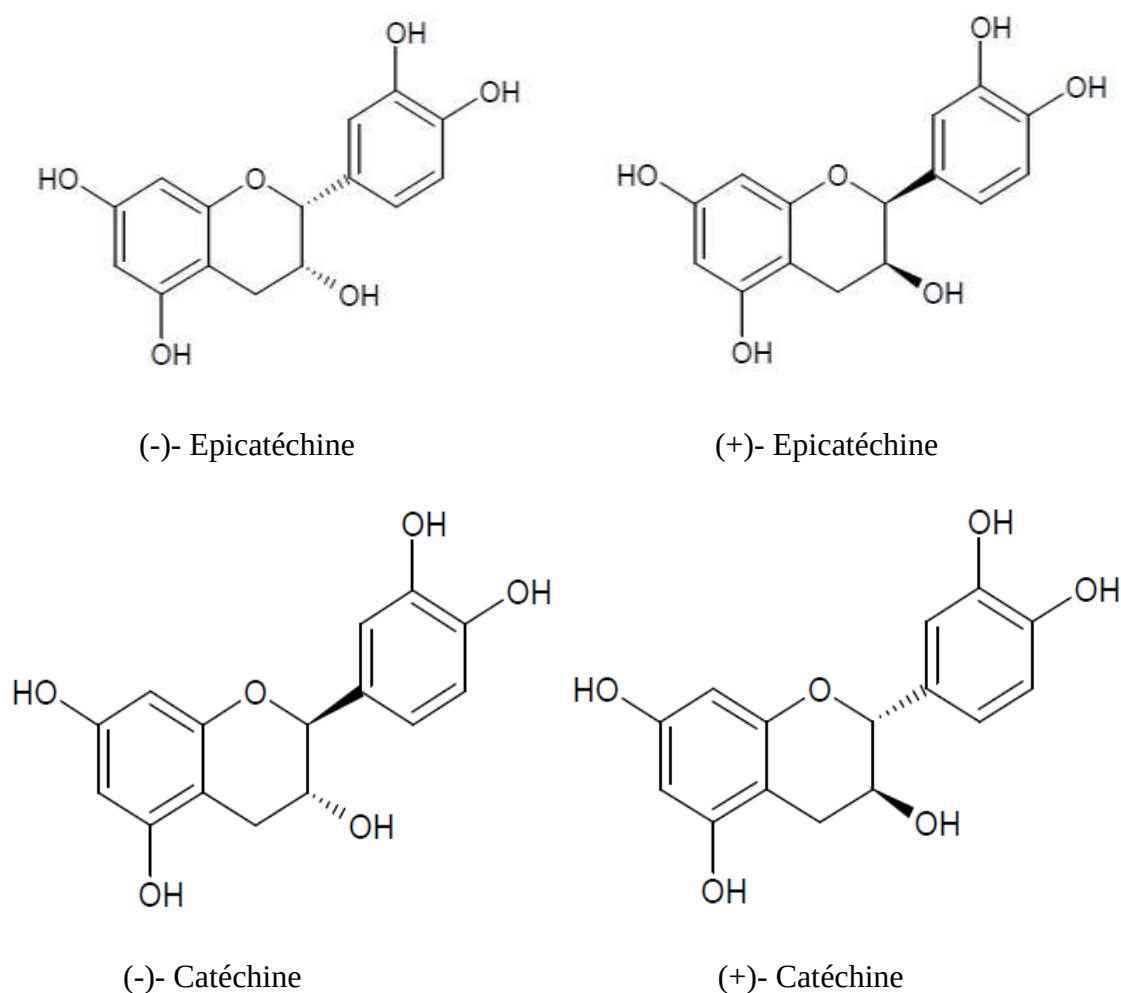
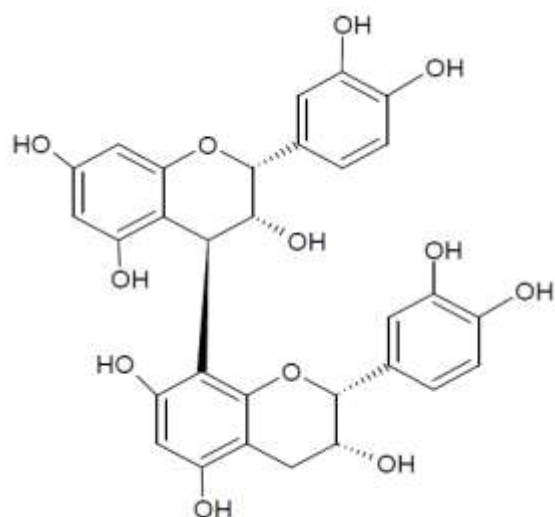


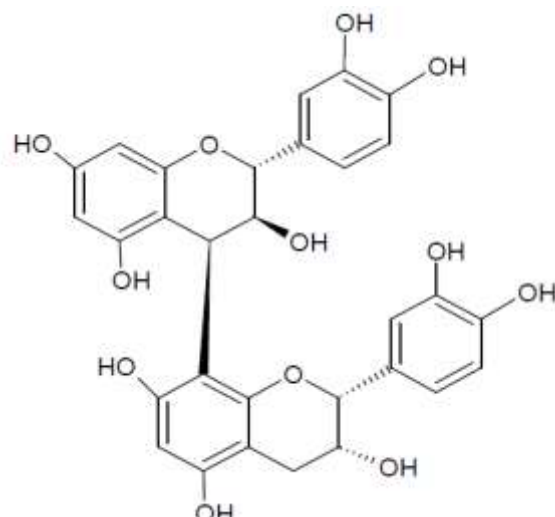
Figure 4: Les flavonoides de type flavan-3-ol dans *C. oxyacantha* L. (Bahorun *et al.*, 1994 ; 2003).

II.3.1.2. Les procyanidines

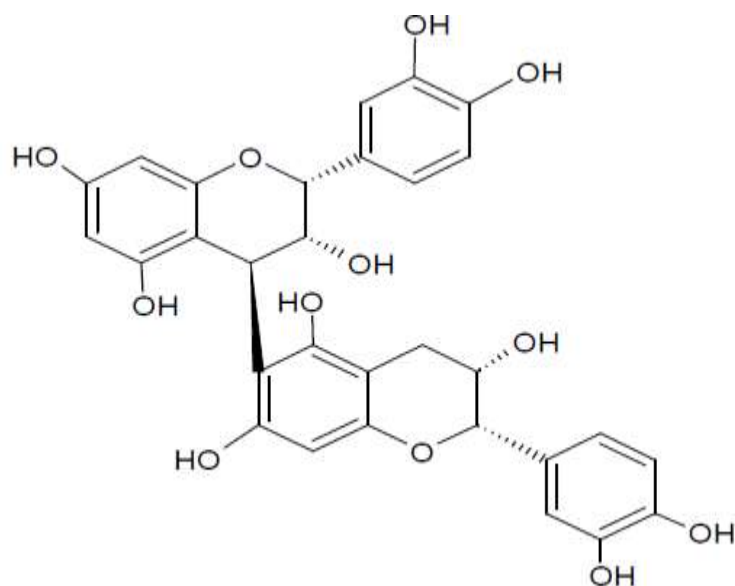
Les procyanidines isolées de diverses parties de *C. oxyacantha* L. comprennent les types B2, B4 et B5 (Fig. 5), et d'autres combinaisons de catéchine qui pourraient éventuellement être présentes. Le (-) - épicatechine trimère C1 et tétramère D1 ont été également identifiés dans la plante (Fig.6). A ce jour, les composés identifiés appartiennent exclusivement au groupe de type B, dans lequel les monomères sont liés par des liaisons C-4 / C-8 ou 6 inter-flavanol. Ces composés se retrouvent également dans des cultures en suspension cellulaire et sont principalement composés d'unités de (-) - épicatechine en tant que composant majeur et de (+) - catéchine en tant que composant mineur (Rohr *et al.*, 1999 ; Bahorun *et al.*, 2003 ; Sokol- letowska *et al.*, 2007).



Procyanidine B2

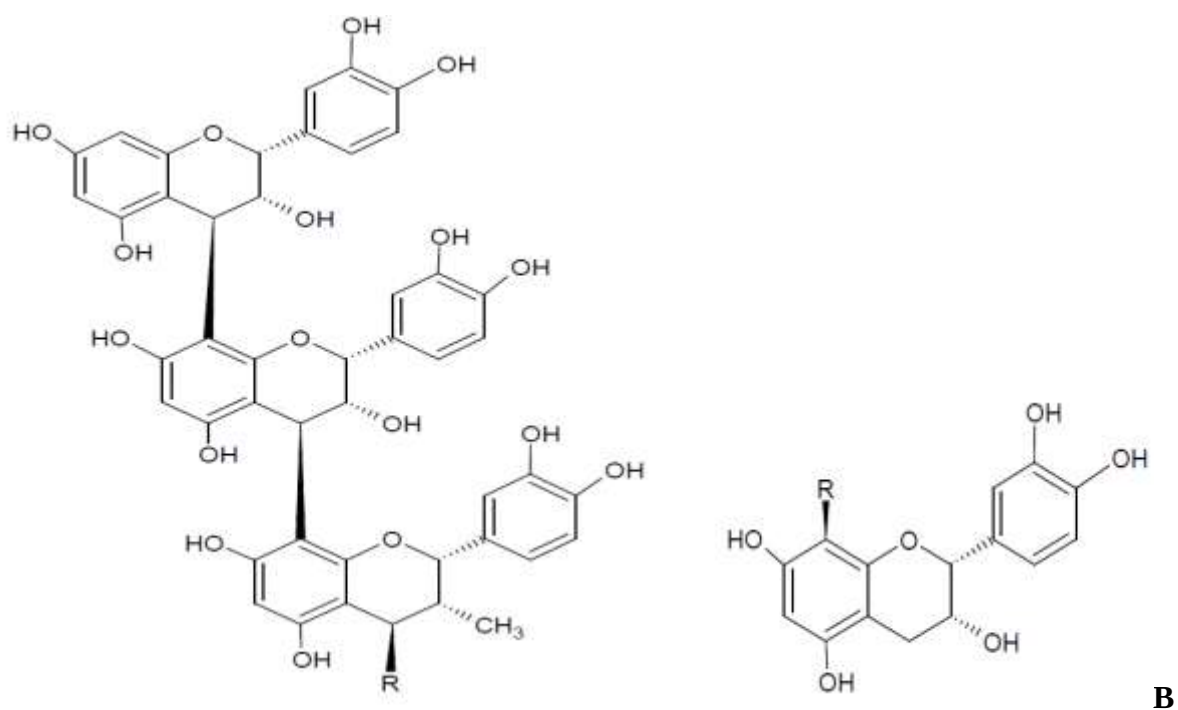


Procyanidine B4



Procyanidine B5

Figure 5: Structures chimiques de la catéchine dimères (procyanidine) (Bahorun *et al.*, 2003).



R= H procyanidine C1

R= B procyanidine D1

Figure 6 : Structure chimique des épicatechines trimères(C1) et tétamère (D1) (Sokol-letowska *et al.*, 2007).

II.3.1.3. Flavones et Flavonols

Chez *C. oxyacantha* L., un certain nombre de flavones et de flavonols avec un fragment catécholique à l'anneau B ont été isolés. Le quercétine-3-O-glucoside, un glucoside de flavonol, a été isolé à partir des cultures de cals de la plante (Bahorun *et al.*, 1994). L'hyperoside est également connu pour être l'un des principaux composants des fleurs (Rohr *et al.*, 1999). En plus de ce composé, un rare dérivé de flavone C-glycosylée, lié au glucose et au rhamnose a été également isolé à partir des feuilles (Nikolov et Vodenicharov, 2003). Le 8-méthoxykaempférol 3-néohesperidoside et d'autres flavonoïdes ont été isolés à partir du pollen d'abeille de *C. oxyacantha* L., tandis que Nikolov *et al.* (1981) ont identifié six analogues de di-C-glycosylapigénines à partir des feuilles.

II.3.1.4. Les anthocyanine et les anthocyanidines

Les anthocyanides glycosides (anthocyanines) sont les constituants principaux des fleurs, qui donnent leur couleur distinctive. Froehlicher *et al.* (2009) ont identifiés le cyanidine-3-O-galactoside à partir de pigment de fleurs de *C. oxyacantha* L. (Fig 7).

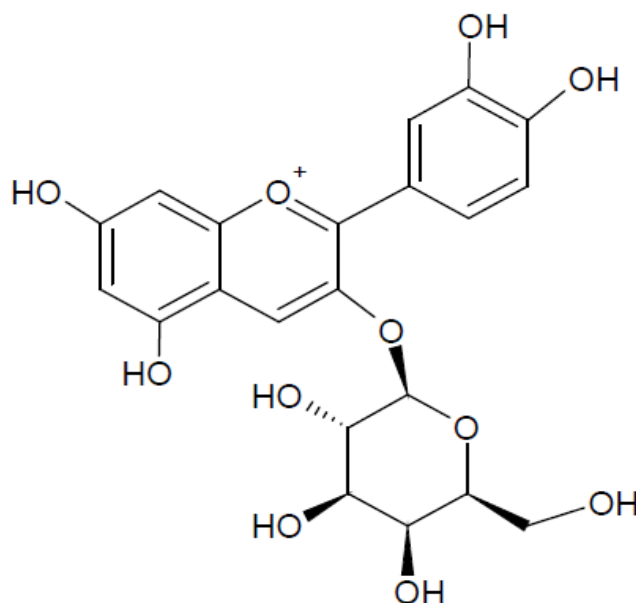
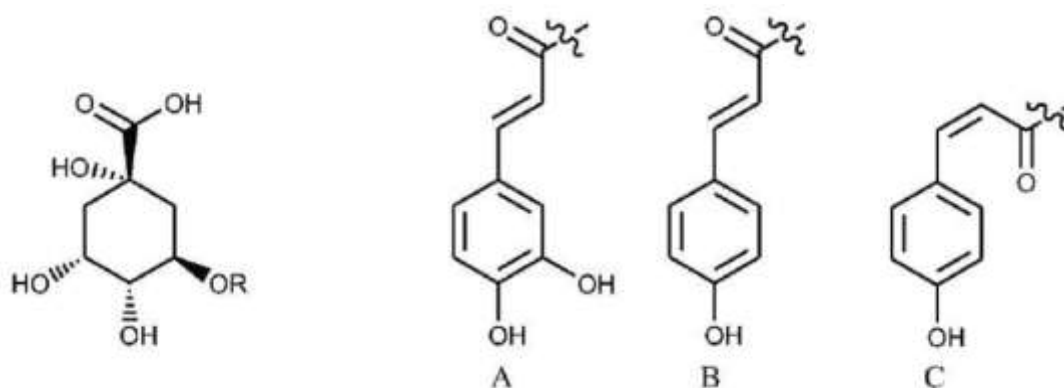


Figure 7 : Structure chimique du cyanidine-3-O-galactoside isolé à partir de *C. oxyacantha* L. (Froehlicher *et al.*, 2009).

II.3.2. L'acide chlorogénique

L'acide chlorogénique et ses isomères sont les principaux composants des fleurs (Froehlicher *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2012) et des cultures en suspension cellulaire de *C. monogyna* (Bahorun *et al.*, 1994). Une étude sur la composition des fleurs, en utilisant l'analyse HPLC-DAD-ESI / MS, a indiqué la présence d'autres acides caffeoylquiniques, y compris les dérivés 3-et 4-O-caffeoyl (Rohr *et al.*, 1999) (Fig 8).



R= A 5-O- caffeoylquinic acid = chlorogenic acid

R= B 5-O-trans-coumaroylquinic acid

R= C 5-O- cis-coumaroylquinic acid

Figure 8 : Structure chimique d'acide chlorogénique de *C. oxyacantha* L. (Barros *et al.*, 2012).

II.3.3. Les triterpènes

En utilisant la méthode GC-MS, Caligiani *et al.* (2013) ont identifié des composés betuliques, oléanoliques et ursoliques dans les extraits de fleurs de *C. oxyacantha* L. On a également isolé le butyrospermol, le 24-méthylène-24-dihydrolanosterol et le cycloartenol avec des alcools aliphatiques simples des parties aériennes (y compris les rameaux, les tiges et les feuilles) (Garcia *et al.*, 1997).

III- Utilisation de la plante

III.1- L'utilisation traditionnelle

En médecine traditionnelle, *Crataegus* a été utilisé pour le traitement des maladies cardiaques, l'hypertension, l'hyperlipidémie, et en tant qu'agent anti-athérosclérotique (Schmidt *et al.*, 1994 ; Chang *et al.*, 2005). Il a été rapporté pour être particulièrement efficace contre les problèmes cardiovasculaires, tels que l'insuffisance cardiaque, l'hypertension artérielle avec lésions myocardiques, l'angine de poitrine, l'arythmie et l'athérosclérose. En outre, il a été utilisé pour améliorer le système de circulation sanguine, ainsi que l'élimination des stases sanguines (Chang *et al.*, 2005). *Crataegus* a été également utilisée pour le traitement des maladies gastro-intestinales, la stimulation de la digestion, et la promotion des fonctions de l'estomac. De plus, cette plante avait une application dans le traitement de l'indigestion, de la distension épigastrique, des douleurs abdominales et de la diarrhée. Dans la tradition européenne, *Crataegus* est également utilisée comme agent anti-spasmodique, cardiotonique, astringent et diurétique (Fakir *et al.*, 2009 ; Edwards *et al.*, 2012).

En Algérie *C. oxyacantha* L. était utilisé pour soigner les angoisses, les insomnies, les vertiges, les hypertensions, les palpitations, les troubles cardiaques et nerveux ainsi que pour calmer les coliques et la diarrhée. En usage externe elle est utile dans les cas de maux de gorge « en pargarismes additionnée de miel » (kaddem ; 1990).

III.2- Les effets biologiques et pharmacologiques

C. oxyacantha L. a une longue histoire comme une plante médicinale utilisée pour traiter les calculs rénaux, les troubles digestifs, la dyspnée et les troubles cardiovasculaires en raison de sa capacité à réduire les facteurs de risque importants tels que l'inflammation, l'hypertension et la thrombose (Rigelsky et Sweet, 2002). La recherche documentaire montre qu'il existe des preuves substantielles de l'utilisation de *Crataegus* dans l'insuffisance cardiaque congestive chronique (Dahmer et Scott, 2010). Même si *C. pinnatifida* est la plus documentée (Chu *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2010), on peut également trouver des études pharmacologiques où *C. oxyacantha* L. a été étudiée dans des conditions *in vitro* et *ex vivo* et dans des études animales et humaines (Dahmer et Scott, 2010).

Les fruits rouges sont riches en bio-flavonoïdes et constituent la partie la plus employée dans la phytothérapie. Les études expérimentales ont confirmé l'activité hypo-lipidémique,

anti-inflammatoire et antianxiété des fruits de *C. oxyacantha* L. (Zhang *et al.*, 2001 ;Tadic *et al.*, 2008). Les bio-flavonoïdes de *C. oxyacantha* L. détendent et dilatent les artères, en particulier les artères coronaires. Cela augmente le flux sanguin du muscle cardiaque et réduit les symptômes de l'angine et contractions du muscle cardiaque. Les bio-flavonoïdes sont également fortement antioxydants, aidant à réduire la dégénérescence des vaisseaux sanguins (Pittler *et al.*, 2003 ; Tabach *et al.*, 2009).

Les extraits de *C. oxyacantha* L. ont des effets divers sur certaines pathologies.

III.2.1- Les effets cardiovasculaires

L'activité principale de *C. oxyacantha* L. consiste à augmenter le flux sanguin coronaire. Cela peut être dû à la relaxation des artères coronaires, ce qui augmente directement le flux sanguin ou par une augmentation des vitesses de contraction et de relaxation, ce qui augmente l'intervalle diastolique et permet ainsi plus de temps pour le passage du sang dans les artères coronaires (Schussler *et al.*, 1995). L'action inotrope positive de *C. oxyacantha* L. peut également être due à l'inhibition de la Na^+ / 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 début de l'insuffisance cardiaque congestive (Leuchtgens, 1993).

Étonnamment, *C. oxyacantha* L. a la capacité de réguler à la fois la pression artérielle basse et élevée. Avec les bioflavonoïdes qui auraient dû dilater les vaisseaux sanguins périphériques et coronaires conduisant à son utilisation dans l'angine, La teneur en procyanidines prétend soutenir les effets vasorelaxants. Le composant glycoside de l'épillemètre a également été signalé pour augmenter le ton vagal du cœur (Verma *et al.*, 2007).

Un mécanisme, communément proposé pour son effet cardio-actif, est sa capacité à inhiber l'enzyme phosphodiesterase (PDE) qui aboutit finalement à une augmentation des nucléotides cycliques intracellulaires et à un effet inotrope positif ultérieur (Reutxer, 1994).

L'ignifuge a également été signalé avoir un effet inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (Lacaille-Dubois *et al.*, 2001). Il peut également avoir un effet cardio-protecteur en raison de sa capacité à diminuer les besoins en oxygène du tissu cardiaque (Nasa *et al.*, 1993). On a observé des résultats variables concernant l'effet de l'aubépine et de ses constituants sur la fréquence cardiaque. Dans la majorité des études *in vitro*, une

augmentation de la fréquence cardiaque a été observée, tandis que la plupart des études in vivo rapportent une diminution de la fréquence cardiaque (Ammon et Kaul, 1994).

III.2.2- Les autres effets

C. oxyacantha L. a démontré qu'elle présente une activité antioxydante associée à sa teneur en flavanoïde et procyanidine. L'activité antioxydante la plus importante a été observée en utilisant un extrait de feuilles fraîches et jeunes suivies de bourgeons floraux frais et de fleurs séchées (Brchm *et al.*, 1995). *C. oxyacantha* aurait la capacité d'augmenter la vitamine C intracellulaire et a un effet protecteur sur les processus oxydatifs. L'activité de balayage des radicaux libres contribue à l'effet cardio-protecteur de l'aubépine après l'ischémie et cette propriété est principalement corrélée avec les procyanidines oligomères (Chatterjee *et al.*, 1996).

C. oxyacantha L. présente également une propriété anti-inflammatoire en empêchant la synthèse et la libération de promoteurs inflammatoires tels que les histamines, les serines proteases, les prostaglandines, les leucotriènes, etc., ainsi que l'inhibition du clivage enzymatique par une enzyme sécrétée par des leucocytes pendant l'inflammation. en effet, *Crataegus* a également une importante action stabilisante du collagène en affectant le métabolisme du collagène. Il relie les fibres de collagène pour renforcer la matrice de collagène des tissus conjonctifs (Rewerski *et al.*, 1971).

Un effet sédatif léger à modéré a été démontré chez les humains et les études animales avec des constituants d'aubépine et OPC'S sont déclarés responsables partiellement de cet effet (Della Loggia *et al.*, 1983).

III.2.4- Toxicité

C. oxyacantha L. est une plante à action lente et doit être utilisée au minimum 4 à 8 semaines pour en bénéficier pleinement. Le dosage dépend du type de préparation et la partie de la plante utilisé. Les doses testées dans les études cliniques européennes ont varié de 160 à 900 mg par jour de *C. oxyacantha* L., normalisé pour contenir 2,2% de flavonoïdes ou 18,75% de proanthocyanidines oligomères. Dans les deux premières semaines de la supplémentation de *C. oxyacantha* L., des effets positifs seront observés. *C. oxyacantha* L. est sûre et ses effets secondaires sont minimaux lorsqu'elle est consommée en posologie recommandée (Kim *et al.*, 2000). Dans une étude clinique chez les homme, on n'a pas

remarqué de changements dans les paramètres sanguin, les enzymes hépatiques, les électrolytes et le taux de sédimentation du glucose ou des érythrocytes (Weikl *et al.*, 1996). Il n'y a pas d'effet aux doses faibles mais les doses les plus élevées augmentent le risque d'hypotension et la sédation. Les symptômes généraux de toxicité aigus sont la bradycardie et la dépression respiratoire entraînant l'arrêt cardiaque et la paralysie respiratoire. Les effets indésirables les plus fréquents sont des étourdissements, des vertiges, des troubles gastro-intestinaux, des maux de tête, des nausées, des migraines et des palpitations (Schmidt, 1994). Il ne doit pas être utilisé ni par les enfants moins de 2 ans, ni au cours de la grossesse en raison de son action démontrable sur l'utérus (moindre tonus et motilité) *in vivo* et *in vitro* (Ammon et Handel, 1981). Il y'a des agents responsables des interactions de *C. oxyacantha* L. sur le système cardiovasculaire. Il a montré une synergie avec la digitaline en augmentant l'effet des glycosides cardiaques. On pense que cet effet est dû à un effet inhibiteur sur AMPc-PDE et donc des effets sur les canaux calciques. L'utilisation de *C. oxyacantha* L. avec les β -bloquants peut provoquer une légère augmentation de la tension artérielle chez les patients hypertendus, car les β -bloquants réduisent le dépistage cardiaque chez ces patients. Cependant, aucune interaction significative entre les états pathologiques n'ont été rapportées (Daniele *et al.*, 2006).

IV-Les activités biologiques

IV.1- L'activité antioxydante

IV.1.1- Le stress oxydant

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/ prooxydants est en équilibre. Le stress oxydatif désigne un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants au niveau cellulaire ou individuel, conduisant à une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et / ou des dommages moléculaires (Visentin *et al.*, 2003). Il se produit lorsque le système de défense antioxydant est submergé par un accroissement du poids des oxydants ou une diminution de l'apport d'antioxydants (Kirschvink *et al.*, 2008)

Tous les composés de nature lipidique contenant des liaisons insaturées, comme les membranes cellulaires, sont susceptibles d'être oxydés par ces molécules et conduisent à l'accumulation de peroxydes. Les radicaux libres provoquent notamment des dommages sur l'ADN et les protéines cellulaires essentielles, pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire (Joanny Menvielle-Bourg, 2005).

IV.1.2-Les radicaux libres

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003). L'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

Depuis quelques années, les chimistes développent des analogues d'antioxydants naturels en les modifiant chimiquement afin d'augmenter leurs propriétés de piégeage des radicaux libres. Ils s'intéressent à la mise au point de pièges plus spécifiques basés sur la réactivité particulière de certains groupements chimiques vis-à-vis des espèces radicalaires (Novelli, 1997).

IV.1.3-Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres qui sont responsables de nombreuses maladies. Les antioxydants sont des composés qui inhibent ou retardent le processus d'oxydation en bloquant l'initiation ou la propagation des chaînes de réactions oxydatives (Behera *et al.*, 2006).

IV.1.3.1- Les antioxydants enzymatiques

Ces mécanismes impliquent principalement des enzymes spécifiques (superoxyde dismutase ou SOD, catalase, glutathion peroxydase ou Gpx) (Vouldoukis *et al.*, 2004).

- a- La superoxyde dismutase (SOD) :** Le rôle déterminant de la SOD dans les systèmes de défenses antioxydants de l'organisme est connu depuis 1968. On sait que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) est le point de départ de la chaîne de production des radicaux libres. Or, dès ce stade précoce, la SOD inactive le radical superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
- b- La catalase :** Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est ensuite rapidement catabolisé par la catalase et les peroxydases en dioxygène (O_2) et en molécules d'eau (H_2O).
- c- La glutathion peroxydase (Gpx) :** L'activité du GPx, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur.

IV.1.3.2-Les antioxydants non-enzymatiques

Les antioxydants non-enzymatiques sont des molécules antiradicalaires, qui piègent les radicaux libres (les vitamines antioxydantes (A, C, E), thiols et β -carotène).

a- Vitamine E

La vitamine E est une vitamine lipophile, qui est synthétisée par les plantes, en particulier dans les graines et les huiles. Il y a deux formes naturelles: les tocophérols et les tocotriénols. Les facettes importantes de la vitamine E comprennent un méthyle 6-chromanol avec un groupe hydroxyle libre (-OH). Le groupe hydroxylé C-6 est crucial pour tenir compte d'un électron. La vitamine E élimine non seulement les radicaux libres, mais aussi les superoxydes (Lass et Sohal, 2000; Visioli, 2001). La vitamine E est un bon antioxydant alimentaire, le rôle physiologique de cette vitamine est connu chez l'homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress

oxydant. Elle prévient l'apparition d'hydro-péroxydes en piégeant les radicaux $\text{LOO}^\bullet$ (Fig 9) (Stocker et Keane, 2004).

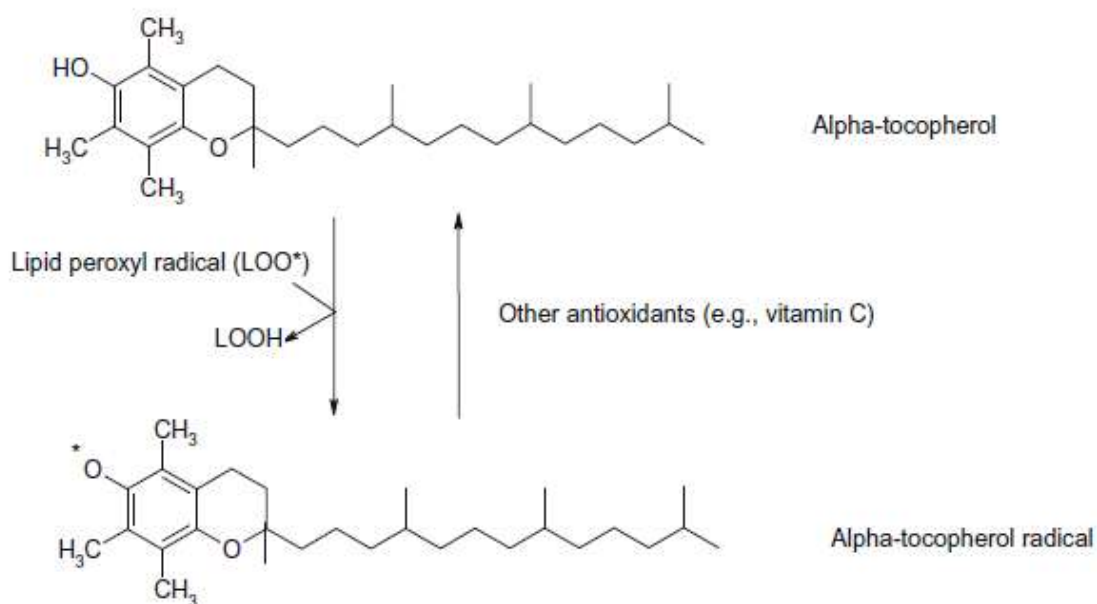


Figure 9 : Mécanismes d'action antioxydante de la vitamine E sur les radicaux $\text{LOO}^\bullet$ (Yukiko et Stanley, 2009).

b- Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. Les carotènes sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidiques. En outre, les caroténoïdes ont un rôle qui leur permet de réagir avec les radicaux $\text{ROO}^\bullet$, $\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{R}^\bullet$ par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons UV de la lumière solaire. L'ensemble de ces propriétés antioxydantes permet d'expliquer, en partie, les bénéfices apportés par les régimes alimentaires basés sur une consommation de fruits, de légumes, de thé et d'autres produits végétaux (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Valko *et al.*, 2006).

c- Les polyphénols et les flavonoïdes

Les polyphénols sont des composés possédant des activités biologiques qui les rendent bénéfiques à la santé humaine. Beaucoup d'études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées

au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (Leong et Shui, 2002). Les activités biologiques relatives à ce type de composés sont relativement diversifiées. Chaque classe chimique de polyphénols semble être utilisée pour ses vertus spécifiques (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur activité antimicrobienne et anti-oxydante, cette dernière est d'un intérêt général avec les récentes découvertes sur la prévention des cancers (Karakaya, 2004).

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques (Sandhar *et al.*, 2011). Les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés, ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives. De plus ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer (Le *et al.*, 2007).

Les flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein). Cependant, leur teneur dans les lipoprotéines est mal connue, à la différence d'autres antioxydants incorporés dans les lipoprotéines tels que α tocophérol et le β carotène (Laguerre *et al.*, 2007).

Parmi les composés les plus antioxydants on peut citer la catéchine, la quercétine, et l'apigénine mais aussi les acides phénoliques tels que les acide caféique et chlorogénique. Le thé est une source importante de flavonoïdes, sa consommation pourrait contribuer à diminuer les taux de cholestérol plasmatique et participerait à la protection des lipoprotéines (Formica et Regelson, 1995).

Les flavonoïdes exercent des effets antioxydants aussi par la chélation des ions métalliques. Il a été postulé par Verdan *et al.* (2011) que la quercétine et myricétine forment des complexes avec les différents métaux (Fe₂⁺, Zn₂⁺, Fe₃⁺, etc.) via les groupements hydroxyles des trois cycles: les groupes hydroxyles du cycle B ainsi que les groupes 3-hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C. Néanmoins, les deux groupes 3-hydroxy et 5-hydroxy sont particulièrement intéressants car ils sont en compétition pour la fixation du métal.

IV.2-L'activité anti-cancérigène

Le cancer est une maladie provoquée par une croissance anormale des cellules dans un tissu donné (Loeb et Loeb, 2000). Une cellule cancéreuse est une cellule dont la croissance et la division ne sont plus contrôlées. Elle se divise donc de façon anarchique, produisant des milliards de cellules qui constitueront ainsi une tumeur : une perturbation de la signalisation cellulaire, une expression ectopique anormale de certains gènes, un relâchement de la suppression tumorale, une inhibition de la mort cellulaire et l'instabilité génétique. De plus, les cellules cancéreuses perdent leur spécialisation. On dit qu'elles se dédifférencient. Enfin, elles peuvent essaimer à distance, produisant alors des métastases (Schwartzman et Cidlowsk, 1993 ; Etienne, 2000).

Les agents pouvant potentiellement endommager l'ADN cellulaire sont multiples : certains éléments chimiques contenus dans les aliments, le stress oxydatif causé par les radicaux libres et ions superoxydes formés lors du métabolisme cellulaire, les formes oxydées des bases qui provoquent une mauvaise incorporation de nucléotides lors de la réplication, l'hydrolyse des liens glycosyliques ainsi que la formation de sites abasiques sur l'ADN (dépuration et désamination) par l'eau, l'exposition à des radiations et au tabac,...etc. (Lavie *et al.*, 1996).

IV.2.1- Le cancer du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus est le troisième cancer le plus fréquent chez les femmes (Shanta *et al.*, 2000). Le cancer du col de l'utérus se développe à partir des cellules muqueuses du col ou de celles du museau de tanche. Le terme médical pour ce cancer est carcinome cervical. Il apparaît soit dans les cellules du museau de tanche, il s'agit alors d'un carcinome épidermoïde, soit (beaucoup plus rarement) dans les cellules glandulaires du canal cervical: cette tumeur est un adénocarcinome.

A un stade initial, lorsque seule la couche supérieure de la muqueuse est touchée, il n'y pas encore de cancer proprement parler, mais on diagnostique une lésion précancéreuse ou en l'occurrence une néoplasie cervicale intra-épithéliale. Le risque d'une évolution vers un cancer du col existe: examens de contrôle et traitements sont donc indispensables.

Lorsque les cellules d'une lésion précancéreuse poursuivent leur progression dans la muqueuse, un cancer du col de l'utérus apparaît, aussi appelé carcinome invasif. Peu à peu, la tumeur détruit le tissu du col de l'utérus.

A des stades ultérieurs, la tumeur peut s'étendre à des tissus et à des organes voisins, notamment aux ganglions lymphatiques, au vagin, au corps de l'utérus, au rectum, à la vessie et au péritoine. À travers les vaisseaux lymphatiques ou sanguins, les cellules tumorales peuvent parvenir dans d'autres organes et y former des métastases, notamment dans le poumon, le foie ou les os.

Le papillomavirus humain (VPH), particulièrement le VPH-16 et le VPH-18 est la cause principale de cancer du col. Le VPH est un virus commun qui passe d'une personne à une autre pendant les rapports sexuels. La plupart des personnes actives sexuellement auront le VPH à un moment donné de leur vie, mais peu de femmes auront un cancer du col de l'utérus (Haverkos *et al.*, 2000).

Le traitement consiste généralement en une chirurgie à un stade précoce et une chimiothérapie et / ou une radiothérapie à des stades plus avancés de la maladie. La survie s'améliore lorsque la radiothérapie est associée à la chimiothérapie à base de cisplatine (Hopkins et Morley, 1991 ; Gof *et al.*, 2000).

À ce jour, plusieurs modèles de xénogreffes de carcinome du col de l'utérus ont été développés avec différentes lignées cellulaires. La lignée cellulaire HeLa est la première lignée cellulaire néoplasique humaine cultivée en continu, dérivée du carcinome cervical d'une femme en 1965. Malgré la présence d'un grand nombre d'études portant sur l'établissement du modèle de xénogreffe de cellules HeLa et le dépistage de différents agents anticancéreux sur elle, les données intégrées ne sont pas disponibles sur les caractéristiques de ce modèle (Fogh *et al.*, 1977 ; Fiebig *et al.*, 2004).

IV.2.2- Le cancer du poumon

Le cancer du poumon est l'un des cancers les plus courants et a donné un taux de mortalité le plus élevé au monde (Greenlee *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Jemal *et al.*, 2006). Le cancer du poumon provenait de cellules pulmonaires hautement différenciées telles les cellules bronchiques ciliées, les cellules de réserve pseudostratifiées et les pneumocytes de type 1, plusieurs évidences portent maintenant à croire qu'il proviendrait plutôt de cellules souches. Il est effectivement plus logique de croire que des mutations accumulées dans une

cellule qui prolifère activement puissent entraîner une croissance dérégulée et ultimement un cancer, que dans une cellule spécialisée dont la seule issue est l'apoptose. Seules des cellules capables de division peuvent subir les changements hyperplasiques, métaplasiques et néoplasiques nécessaires au développement tumoral (Linnoila, 1990). Le fait qu'un cancer du poumon présente parfois les caractéristiques de plusieurs sous-types histologiques supporte l'idée que ce cancer provient de cellules pluripotentes plutôt que de cellules spécialisées (différenciées) (Ginsberg *et al.*, 2001). Sur la base du caractère histologique et du comportement clinique, le cancer du poumon est divisé en deux types principaux:

- Type I, le cancer à cellules non petites (NSCLC) (80%).
- Type II, le cancer à petites cellules (SCLC) (20%).

Le cancer de type NSCLC est divisé en trois types: adénocarcinome, carcinome à grandes cellules et carcinome à cellules squameuses (Testa *et al.*, 1997; Mitsuuchi et Testa, 2002 ; Shen *et al.*, 2008).

Le tabagisme est considéré comme la plus importante cause de cancer du poumon, contribuant à environ 80% des cas de cancer du poumon. Les autres 20% des cas de cancer du poumon sont induits par la pollution par le gaz de radon (10%) et d'autres causes inconnues (Minna *et al.*, 2002; Zielinski *et al.*, 2006).

A549 est une lignée cellulaire maligne qui dérive du carcinome pulmonaire humain (Raghu *et al.* 1986). Les cellules A549 ressemblent aux cellules de cancer de type II de cancer dans un certain nombre de caractéristiques importantes, car elles sont facilement cultivées et elles sont largement utilisées comme modèle de cellules de type II (Umimo *et al.* 2000).

IV.2.3-L'activité anti-cancérigène des polyphénols

Les polyphénols peuvent affecter et moduler de multiples processus biochimiques divers et des voies impliquées dans la carcinogenèse. En outre, ils peuvent agir comme des modificateurs de réponses biologiques supportant la fonction du système immunitaire, ainsi que pour protéger les cellules vivantes contre les dommages causés par les radicaux libres. Bien que les polyphénols dans les fruits et les légumes soient largement impliqués dans la prévention du cancer, peu d'effets protecteurs des composés individuels ont été fermement confirmés dans les essais cliniques en raison des différences de dosage, de synchronisation et d'autres facteurs de confusion (Han *et al.*, 2007).

Plusieurs mécanismes de prévention du cancer ont été identifiés comme étant affectés par les polyphénols, y compris la prévention de l'oxydation, la désintoxication des xénobiotiques, l'induction de l'apoptose, ainsi que l'activité œstrogénique / anti-œstrogénique, les effets stimulants sur la fonction du système immunitaire, les propriétés anti-inflammatoires et leurs effets sur le système de signalisation cellulaire. Parmi ceux-ci, il y a des effets sur les facteurs nucléaires, tels que le NF-Kappa B ou la protéine activatrice 1 (AP-1), qui jouent un rôle central dans les cascades de signalisation cellulaire, la régulation de la transcription de l'ADN, l'expression des gènes en réponse à différents stimuli, la prolifération cellulaire et la survie (Chen *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 2007).

La plupart des recherches ont été menées avec des polyphénols individuels afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes biologiques et cellulaires de leur efficacité anticancéreuse. Cependant, les effets finaux de ces composés sont largement influencés par leurs interactions avec d'autres composés naturels, tant au niveau cellulaire qu'organique. Ces aspects ont été rarement évalués et étudiés.

IV.3- l'activité antimicrobienne

Les bactéries sont responsables de nombreuses maladies comme la pneumonie et la tuberculose, et avant la découverte des antibiotiques, ces maladies étaient parmi les plus meurtrières. L'antibiothérapie a constitué une véritable révolution dans la lutte contre les maladies infectieuses. Dans les années 1970, éradiquer un jour les bactéries pathogènes a même semblé possible. L'apparition et l'extension rapide du phénomène de résistance aux antibiotiques au cours de ces cinquante dernières années a mis fin à " l'âge d'or des antibiotiques ". Il devient urgent d'agir pour découvrir et développer de nouveaux médicaments afin de faire face à la menace des bactéries résistantes (Acar et Courvalin, 1998).

Les agents antimicrobiens sont essentiels pour le traitement d'un certain nombre de maladies d'origine bactérienne ou fongique. Récemment, cependant, les bactéries ont acquis une résistance aux médicaments et ainsi le développement de nouveaux agents antimicrobiens est nécessaire (Fridkin *et al.*, 2005). La résistance aux antibiotiques est un phénomène biologique que la médecine aura du mal à faire disparaître. Il y a quelques décennies, plusieurs maladies semblaient maîtrisées grâce à l'utilisation des antibiotiques. Les progrès scientifiques et technologiques laissaient même croire à une possible éradication de

nombreuses pathologies. La résistance développée de plus en plus par les microorganismes et l'émergence régulière de nouveaux agents infectieux ont démenti ce pronostic optimiste. Depuis plus de vingt ans, de nombreux déterminants de résistance ont été décrits avec l'émergence de bactéries de plus en plus résistantes (Aleksun et Levy, 2007). Aucune espèce bactérienne connue et aucun antibiotique n'échappent aujourd'hui au phénomène de résistance.

Face à ce phénomène, mis en péril par l'émergence de germes multi-résistants, la découverte de nouvelles molécules antibactériennes, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces, est devenue une nécessité absolue.

IV.3.1-Les substances antimicrobiennes

IV.3.1.1-Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances naturelles produites par des bactéries du sol et certains champignons qui, à faibles concentrations, agissent sur d'autres bactéries sans être toxiques pour l'homme. Ils peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique totale ou partielle. Il existe sept grandes familles d'antibiotiques : Les sulfamides, les β -lactamines, les aminosides, les tétracyclines, les macrolides, les quinolones et les glycopeptides (Newman *et al.*, 2000 ; Kotra *et al.*, 2000).

Une meilleure compréhension du fonctionnement des bactéries au niveau cellulaire et moléculaire est indispensable pour mettre au point de nouveaux traitements thérapeutiques (Andremont *et al.*, 1997).

Rappelons d'abord comment agissent les antibiotiques. Ils ont différentes cibles et, souvent, inhibent une enzyme de la bactérie (Laurent-Pezet, 2000). Ils peuvent ainsi:

- inhiber les enzymes chargées de la synthèse de la paroi bactérienne (pénicillines, céphalosporines, vancomycine).
- bloquer la synthèse des protéines bactériennes (tétracyclines, aminosides, macrolides).
- inhiber les enzymes qui interviennent dans la réplication de l'ADN bactérien (quinolones) ou de la synthèse de l'ARN.
- modifier le métabolisme énergétique de la bactérie (sulfanilamide).

IV.3.1.2-Les composés phénoliques

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésions microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

PARTIE

EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Crataegus oxyacantha a été collectée dans la région de Beni-Fouda située au nord-est de la wilaya de Sétif, (les feuilles au mois de Mars, les fleurs au mois d’Avril et les fruits au mois d’Octobre). L’identification botanique de l’espèce a été réalisée au niveau du laboratoire d’Ecologie et de Biologie Végétale, Université Ferhat Abbas, Sétif 1 par le Pr. Laouer Hocine.

I.2. Micro-organismes

Les souches microbiennes utilisées sont :

- Six souches bactériennes de référence : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Trois espèces fongiques : *Candida albicans* ATCC 1024, *Aspergillus flavus* NRRL391, *Aspergillus niger* 2CA936.

I.3. Bio-assays

Les cellules prolifératives ELISA, les kits BrdU (colorimétriques) ont été obtenus auprès de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). Le médicament d’activité anti tumorale 5-Fluorouracil a été fourni de Sigma et les autres produits chimiques et le milieu de culture ont été fournis par Sigma–Aldrich, Merck et Roche.

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits

II.1.1. Extrait aqueux

L'extrait aqueux de *C. oxyacantha* a été obtenu par décoction de 20 g de broyat de (feuilles et fleurs) et 40 g de fruits dans 250 ml d'eau distillée pendant 10 min. La solution est laissée reposer sur la plaque chauffante pendant 15 minutes. En fin, le mélange est filtré sur papier Wattman (N°1). Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif "BÜCHI" à une température de 40 - 50 °C sous vide. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur (Belhattab *et al.* 2004).

II.1.2. Extrait d'acétone

L'extrait d'acétone a été préparé à l'aide d'un Soxhlet à partir de 20 g de broyat de la plante, Le matériel végétal broyé est placé dans une cartouche puis exposée au solvant d'extraction mené à une température d'évaporation (40 °C). Après 6 heures d'extraction, la cartouche est retirée et le solvant chargé d'extrait de la plante est récupéré pour être concentré à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif "BÜCHI". L'extrait obtenu est conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation (Belhattab *et al.* 2004).

II.1.3. Extrait de méthanol

L'extrait de méthanol de la plante a été préparé à partir de 50 g de broyat des feuilles, des fleurs et des fruits, qui ont été mis à macérer dans 200 ml de solution hydro-alcoolique (20% eau distillé- 80% méthanol) à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures. Ensuite, le mélange est filtré sur papier Wattman (N°1). L'opération est répétée une seconde fois avec 100 ml de la même solution. Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif "BÜCHI" à une température de 40 - 50 °C. La phase aqueuse est dégraissée trois fois par l'éther de pétrole. Ensuite, elle est traitée par le même volume d'une solution d'acétate d'éthyle, sulfate d'ammonium (20 %) et d'acide ortho-phosphorique (2 %). En fin, la phase d'acétate d'éthyle est évaporée à sec puis conservé au réfrigérateur (Djeridane *et al.* 2006).

II.1.4. Extrait de méthanol/ chloroforme des feuilles

II.1.4.1. L'extraction

Les feuilles de *C. oxyacantha* ont été séchées et pulvérisées puis macérées dans un mélange de méthanol / chloroforme (v/v) à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures. Ensuite, le mélange est filtré sur papier Wattman (N°1). L'opération est répétée cinq fois (24 h x 5). Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif (Erenler *et al.*, 2014).

II.1.4.2. Fractionnement et purification de l'extrait des feuilles

L'extrait de méthanol/chloroforme des feuilles a été soumis à une chromatographie sur colonne, en utilisant le gel de silice (Merck, 60-230 mesh) comme phase stationnaire dans des colonnes de verre sous pression d'atmosphère ouverte et en éluant avec de l'hexane 100%, hexane/chloroforme (v/v), chloroforme 100%, chloroforme/acétate d'éthyle (V/V), acétate d'éthyle 100% et méthanol 100%. Les fractions ont été analysées par CCM, on a utilisé des plaques pré-revêtues de gel de silice F254 (Merck) pour déterminer les rapports frontaux (R_f) des composés. Un composé particulier parcourra la même distance le long de la phase stationnaire par un solvant spécifique. Par conséquent, les fractions contenant des composés ayant la même valeur de R_f ont été combinées. Les composés ont été détectés sous UV (254 nm) et pulvérisés avec du réactif à 5% de sérosulfate- H_2SO_4 , puis chauffé à 105 ° C pendant 1-2 minutes (Tab I) (Erenler *et al.*, 2015).

II.2. Analyse quantitative des extraits

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode utilisant le réactif Folin- Ciocalteu. Mettre 100 µl de chaque extrait dans des tubes à essais, ajouter 7.9 ml d'eau distillée et 500 µl de réactif de Folin- Ciocalteu dilué dans l'eau distillée (v/v); agiter vigoureusement puis laisser agir 1 min avant d'ajouter 1.5 ml de carbonate de sodium à 20%. Après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, lire les absorbances à partir du spectrophotomètre à 760 nm (Singleton *et al.*, 1999).

On effectue la même opération pour l'acide gallique à différentes concentrations en introduisant 100 µl de ce dernier dans une série de tubes et ajout des autres réactifs.

Le blanc est représenté par le méthanol additionné de Folin- Ciocalteu et de carbonate de sodium. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait.

II.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits est réalisée par la méthode du trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ (Kosalec *et al.* 2004).

1 ml de la solution d'extraits (préparés dans l'éthanol) est ajouté à 1 ml d' $AlCl_3$ à 2% dans l'éthanol, le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance est lue à 430 nm.

La même opération est réalisée pour la quercétine à différentes concentrations en introduisant 1 ml de cette dernière dans une série de tubes et ajout de 1 ml d' $AlCl_3$ à 2%.

Le blanc est représenté par l'éthanol additionné d' $AlCl_3$.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine / g d'extrait.

II.2.3. Dosage des flavones et flavonols

La méthode utilisée pour l'estimation de taux de flavones et flavonols est celle décrite par Kosalec *et al.* (2004). Mettre 0.5 ml d'extrait dans un tube à essai ; ajouter 1.5 ml d'éthanol, 0.1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 10 % puis 0.1 ml d'acétate de potassium CH_3COOK (1 M) et 2.8 ml d'eau distillée, laisser incuber 30 min à température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre à 415 nm. La quercétine est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des flavones et flavonols des extraits est calculée.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine/g d'extrait.

II.2.4. Dosages des tanins

Le contenu des extraits en tanins a été évalué en utilisant le dosage d'hémoglobine précipité (Hagerman et Butler, 1978). Une aliquote de 0,5 ml de chaque échantillon (extraits ou acide tannique) est mélangé avec 0,5 ml de sang bovin hémolysé (4 ml de sang mélangé avec 425 ml d'eau distillée pour parvenir à une absorbance de 1,6 à 578 nm contre un blanc constitué d'eau distillée). Le mélange est incubé à 25°C pendant 20 min, puis soumis à une centrifugation 480g pendant 10 min à 4°C. La lecture du surnageant est faite à 578 nm contre

l'eau distillée. L'acide tannique à diverses concentrations (100-600 $\mu\text{g} / \text{ml}$) a été utilisé de la même manière que les extraits. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait (mg EAT / g d'extrait).

II.3. HPLC TOF/ MS

L'analyse HPLC-TOF / MS des extraits de *C. oxycantha* a été réalisée par la méthode de Koldes *et al.* (2014). Cette méthode a été développée et validée pour analyser les acides phénoliques dans les extraits des plantes.

Les composés phénoliques des extraits de la plante ont été quantifiés en utilisant un système infini HPLC de type Agilent 1260 couplé à un détecteur de temps de vol TOF- MS de type Agilent 6210 et une colonne (100mm $\times$ 4.6mm $\times$ 3.5 μm) de type Agilent Zorbax SB- C18. Les phases mobiles sont : la phase A composée d'eau / acide formique 1ml L⁻¹ et la phase B qui comporte l'acétonitrile. Le débit était de 0,6 ml/min, la température de la colonne était de 35 °C et le volume d'injection était 10 μL . Le programme d'élution était: 0 à 1 min 10% de B; 1 à 20 min 50% B; 20 à 23 min 80% B; 23 à 25 min 10% B; 25 à 30 min 10% B. Le mode d'ionisation de l'instrument HPLC-TOF / MS était négatif et fonctionnait avec une température de gaz d'azote de 325 °C, un débit d'azote gazeux de 10,0 L min⁻¹, nébuliseur de 40 psi, tension capillaire de 4000 V et enfin, le voltage de fragmentateur de 175 V. Pour l'analyse des échantillons, des extraits bruts (200 ppm) ont été dissous dans le méthanol à température ambiante. Les échantillons ont été filtrés en les passant par un filtre PTFE (0,45 μm) en utilisant un injecteur pour éliminer les particules.

II.4. Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'analyse par RMN des composés présents dans les fractions F6 et F9 a été effectuée par un spectromètre Bruker Avance III dans du DMSO-d₆ (1H: 400 MHz, 13C: 100 MHz). Les changements chimiques ont été donnés en ppm avec du tétra-méthylsilane (TMS) comme étalon interne (Noman *et al.*, 2015).

II.5. Activité antioxydante

II.5.1. Test au DPPH

1ml de solution méthanolique de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (8%) est ajouté à 1ml de la solution d'extrait, le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes (Kulsic *et al.*, 2004).

Le blanc est représenté par le méthanol, le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml de méthanol et le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard: le BHA et le BHT.

La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 515 nm.

Les résultats de l'activité anti-radicalaire sont exprimés en pourcentages d'inhibitions (%) en utilisant la formule suivante

$$\% = [1 - (\text{Abs}_{\text{Échantillon}} - \text{Abs}_{\text{Contrôle négatif}})] \times 100.$$

Où :

% : pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

Abs_{Échantillon} : absorbance de l'échantillon ;

Abs_{Contrôle négatif} : absorbance du contrôle négatif ;

II.5.2. Test de blanchissement du β - carotène

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antioxydante en utilisant le système β – carotène – acide linoléique est décrite par Miraliakbari et Shahidi (2008).

Une solution de β carotène (0.5 mg/ml de chloroforme) est introduite dans un ballon contenant 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme est complètement évaporé sous pression réduite à 45°C au rotavapeur, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés au mélange précédant, l'émulsion obtenue est rigoureusement agitée. 0.5 ml des solutions contenant 2mg de chaque extrait ou d'un antioxydant standard (BHA) ont été ajoutés à une série de tubes contenant 2.5 ml de l'émulsion préparée. Juste après l'addition, l'absorbance au temps zéro à 470 nm a été enregistrée. Le mélange est placé dans un bain-

marie et incubé à 50°C pendant 2 heures. L'oxydation de l'émulsion précédente est suivie par la mesure de l'absorbance de chaque échantillon à des intervalles de 15 min jusqu'à la fin de l'expérience ($t = 120$ min). Le contrôle négatif contient 0.5 ml d'eau distillée à la place de l'extrait aqueux, et de 0,5 ml de méthanol à la place des extraits de méthanol, les extraits d'acétone et des antioxydants standards.

Le pourcentage d'inhibition des extraits a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$AA\% = (\text{Abs}_{\beta\text{-carotène après 2 h}} / \text{Abs}_{\beta\text{-carotène initial}}) \times 100.$$

II.5.3. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des extraits de *C. oxyacantha* est déterminée selon la méthode de Geckil *et al.* (2005) qui est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe^{2+} -ferrozine après traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} . 50 μl des solutions d'extraits ou du chélateur standard (EDTA) à différentes concentrations sont additionnées à 50 μl de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.2 mM) et 900 μl de méthanol. Après 5 min d'incubation, cent microlitres de ferrozine (5 mM) sont ajoutés, et le mélange est agité et laissé réagir pendant 10 min pour permettre la complexation du fer résiduel. L'absorbance du complexe Fe^{2+} -ferrozine est mesurée à 562 nm. L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

A_c : absorbance du contrôle.

A_t : Absorbance du test.

II.5.4. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits de *C. oxyacantha* est déterminé selon la méthode de Lim *et al.* (2007). 100 μl de différentes concentrations d'extraits ou de l'antioxydant standard (BHT, acide gallique) sont mélangés avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6) et 2,5 ml de ferricyanide de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) (10%) sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont bien agités pendant 10min. Une aliquote (2,5ml) de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1%.

L'absorbance est lue à 700 nm après incubation des tubes à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 min. Le blanc contient tous les réactifs sauf le FeCl_3 .

La valeur EC_{50} est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5 et est calculée à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

II.6. Activité antiproliférative

II.6.1. Préparation des solutions mères

Les solutions mères des extraits et le 5-FU ont été préparés dans le DMSO et dilués avec Dulbecco's modified eagle medium (DMEM). La concentration finale du DMSO est inférieure à 1% dans tous les essais.

II.6.2. Culture des lignées cellulaire

Les lignées cellulaires A549 (human lung adenocarcinoma cell line) et HeLa (Cervical cancer cell line) ont été cultivées dans le DMEM supplémenté par 10% de sérum de fœtus bovin (FBS), 2% de pénicilline/streptomycine. Le milieu est changé deux fois par semaine.

II.6.3. Test de prolifération cellulaire

Les effets antiprolifératifs des extraits ont été étudiés sur des lignées cellulaires A549 et HeLa à l'aide du dosage de prolifération BrdU ELISA (Ceyhan *et al.* 2013 ; Karakus *et al.* 2013). Le 5-fluorouracile (5-FU) a été utilisé comme témoin positif. Les cellules sont cultivées dans des plaques à 96 puits (COSTAR, Corning, USA) à une densité de 30 000 cellules / puits. Dans chaque modèle expérimental, les cellules sont cultivées deux fois en triplicata. Les lignées cellulaires ont été exposées à huit concentrations des extraits et 5-FU pendant 24 h à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO_2 . Les cellules sont incubées pendant une nuit avant d'appliquer le réactif du test ELISA BrdU de prolifération cellulaire, selon le procédé du fabricant. La quantité de prolifération cellulaire a été évaluée par détermination de l'absorbance à 450 nm en utilisant un lecteur de microplaque (Awareness Chromate, USA), après addition de la solution de substrat dans le milieu de culture. Les résultats sont rapportés en pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire, où la densité optique mesurée à partir des cellules traitées du véhicule était considérée comme correspondant à 100% de prolifération. Tous les dosages ont été répétés au moins deux fois en

utilisant les cellules HeLa et A549. Le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire a été calculé comme suit :

$$\% = [1 - (A_{\text{treatments}} / A_{\text{vehicle control}})] \times 100.$$

II.6.4. Détermination des valeurs CI_{50} et CI_{75}

La concentration inhibitrice à 50% (CI_{50}) est une mesure de l'efficacité d'un composé à inhiber une fonction biologique. Dans ce travail, les valeurs de CI_{50} et CI_{75} sont déterminées.

II.7. L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Celiktaş *et al.* 2007).

II.7.1. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sontensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. Les champignons sont activés pendant 7 jours dans le PDA à une température de 28°C avant le test. Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de Mc Farland 0.5 ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm (10^6 UFC/ml) pour les bactéries et 10^4 - 10^5 UFC/ml pour les champignons.

II.7.2. Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension microbienne, puis essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée (gélose Mueller Hinton pour les bactéries ; Sabouraud pour la levure et PDA pour les moisissures), de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques stériles imprégnés de concentrations croissantes d'extraits repris avec le diméthyle sulfoxyde (DMSO) à raison de 10 µl par disque, ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose. Les boîtes ont été incubées 24 h à 37 °C pour les

bactéries. Les levures ont été incubées pendant 48 h à 37 °C, tandis que le champignon ont été incubés 72h à 25 °C.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant la gentamycine, la nystatine, l'amphotéricine ou la clotrimazole (témoin positif) prêts à l'emploi, ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif).

II.7.3. Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques.

II.7.4. Détermination des CMI par la technique de micro-dilution en milieu liquide

C'est une technique quantitative standardisée de détermination de CMI en micro-dilution par l'utilisation de microplaques contenant 96 cupules à fond plat, stérile avec couvercle (Barchan *et al.*, 2015).

Des séries de dilutions allant de 300 à 50 mg/ml dans le DMSO sont préparées de manière à générer une gamme de dilution de base. Dans chaque puits d'une plaque à 96 puits, on dépose 50 µl de la souche bactérienne (10^6 UFC/ml), 100 µl de la gélose nutritive et 50 µl d'une dilution d'extrait déjà préparée.

Les puits servant de contrôle négatif ne contiennent pas d'extrait, et ceux servant de contrôle positif contiennent l'extrait sans bactérie. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 h, les CMI des extraits sont déduites à partir du premier puits de la gamme dépourvue de croissance bactérienne visible à l'œil nu après la période d'incubation. Chaque test est réalisé en triplicata.

II.8- Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne $\pm$ SD.

La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test d'ANOVA univariée suivie du test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification ($p \leq 0.001$ ou bien $p \leq 0.05$).

Les valeurs de la concentration inhibitrice à 50% (CI_{50}) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration].

RESULTATS ET DISCUSSION

I- Rendement des extraits

I.1- La décoction : Les rendements des extraits respectifs des feuilles, fleurs et fruits après décoction ont été estimés à 6.7 % ,9.75% et 8.9 % (m/m) respectivement (fig 10 ; annexe II).

I.2. La macération : L'opération de l'extraction par macération des feuilles, fleurs et fruits de *C. oxyacantha* dans le méthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brut avec des rendements respectifs de 7.45 % , 10% et 0.33% (m/m) (fig 10 ; annexe II).

I.3. Extraction au Soxhlet : Le rendement de l'extrait d'acétone des feuilles, fleurs et fruits obtenu par Soxhlet a été estimé à 3.6%, 6.8% et 9.78% (m/m) respectivement (fig 10 ; annexe II)

I.4. l'extrait de méthanol/chloroforme des feuilles : le rendement de l'extrait de méthanol/ chloroforme des feuilles a été estimé à 20.62%.

L'extraction des feuilles et des fleurs par macération a donné des rendements supérieurs à ceux obtenus par décoction et par soxhlet. Toutefois, l'extraction des fruits par soxhlet a montré un rendement élevé par rapport à l'extraction par décoction et surtout par macération (0.33%.m/m). La différence de rendement entre les extraits est due non seulement aux techniques d'extraction, mais à la nature du solvant utilisé.

Des études antérieures ont montré que le méthanol et l'eau ou leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques (Sahreen *et al.* 2010; Bouzid *et al.* 2011).

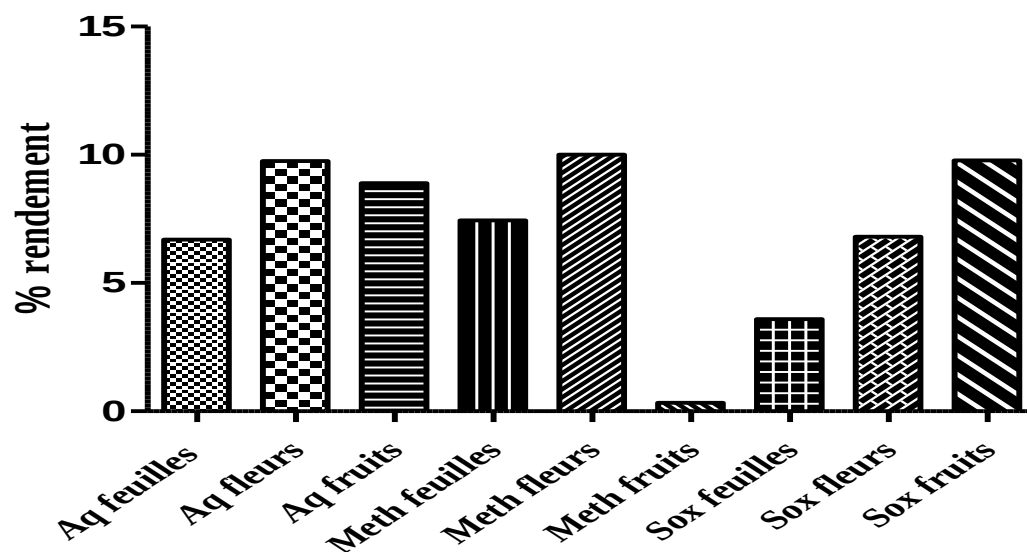


Figure 10 : Les rendements des extraits des différentes parties de *C. oxyacantha* L.

II- Composition chimique

II.1. Teneur en polyphénols totaux

Le dosage des PPT a été effectué selon la méthode de Folin- Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard et la teneur en PPT est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g extrait). La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations, elle montre une proportionnalité de l'absorbance en fonction des concentrations. (Fig11).

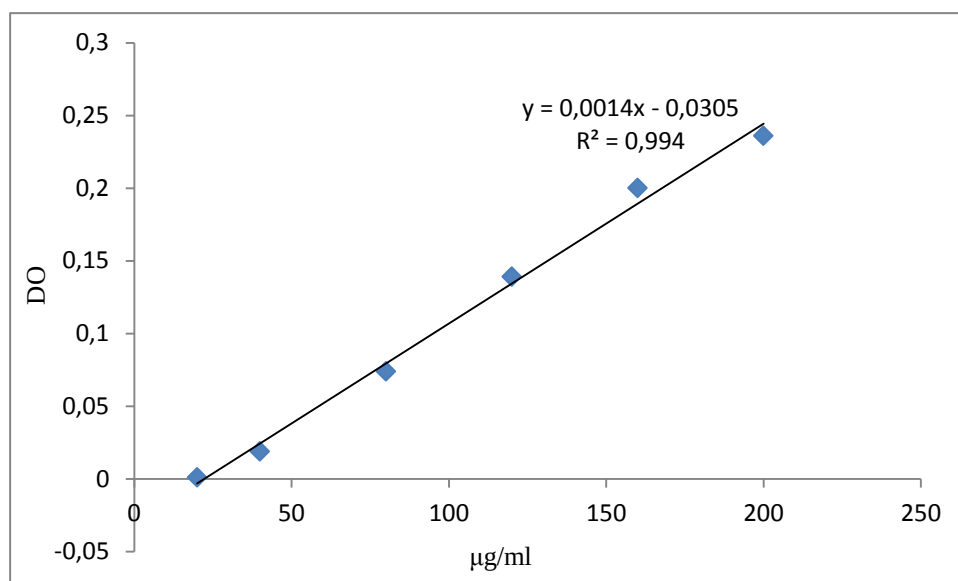


Figure 11 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Les teneurs en PPT des différents extraits de *C. oxyacantha* sont 406.87 ± 7.97 mg EAG/g extrait pour l'extrait de méthanol des fruits suivi par les extraits d'acétone des fruits (362.17 ± 8.24 mg EAG/g extrait) et des feuilles (239.83 ± 7.81 mg EAG/g extrait). Les autres extraits de méthanol des feuilles et fleurs ont montré des teneurs respectives de 245.7 ± 5.9 et 207.10 ± 4.17 mg EAG/g extrait tandis que les extraits aqueux de ces mêmes parties de la plante sont 165.35 ± 0.00 , 76.56 ± 8.78 mg EAG/g extrait et celui des fruits est de 76.95 ± 4.47 mg EAG/g extrait. La teneur en PPT la plus faible a été enregistrée dans l'extrait d'acétone des fleurs avec une valeur de 39.69 ± 2.14 mg EAG/g extrait (fig 12 ; annexe III). Il ressort de ces résultats que les fruits renferment la teneur la plus élevée en PPT que celle des autres parties de la plante.

Il paraît clairement que le mélange méthanol/eau est le solvant qui permet d'avoir le meilleur rendement en PPT, suivi par l'acétone et en fin l'eau distillée.

En fait, la solubilité des polyphénols est gouvernée par le type de solvant utilisé, leur degré de polymérisation ainsi que de leur interaction avec d'autres constituants et la formation de complexes insolubles. Pour une plus haute récupération de polyphénols, le méthanol et le mélange méthanol-eau est le solvant approprié (Falleh *et al.* 2008).

Si on compare les résultats du dosage des polyphénols avec ceux de la bibliographie, on constate que la teneur de l'extrait de méthanol des fruits (406.5 ± 7.97 mg EAG/g extrait) est bien supérieure par rapport à celle trouvée par Bouzid *et al.* (2011), soit 21.72 ± 6.10 µg EAG/mg et l'extrait aqueux (76.35 ± 4.47 mg EAG/g MF) et inférieures que les résultats de Bouzid (11.61 ± 0.51 µg EAG/mg).

Dans une autre étude réalisée par Kostic *et al.* (2012), la teneur en polyphénols est de 30.63 ± 2.56 , 24.89 ± 0.67 , 18.21 ± 0.51 mg AGE/g MF pour l'extrait méthanol-eau (1:1),

l'extrait aqueux et l'extrait de méthanol des fruits successivement récolté de la Serbie. Ces résultats sont inférieurs que nos résultats.

Nos résultats sont nettement supérieurs au résultat trouvé par Mraihi *et al.* 2013 sur les fruits de la même espèce végétale récoltée à Jendouba (Tunisie) en automne 2011. Ces chercheurs ont séparé le fruit en 3 partie le peler (128.35 ± 0.02 mg EAG/100g MS), la pulpe (122.26 ± 0.16 mg EAG/100g MS) et la graine (45.72 ± 0.04 mg EAG/100g MS). Les résultats de Bouaziz *et al.* (2014) sur les feuilles *C. azarolus* (Extrait de méthanol $188.91 \pm 0,633$ mg GAE/g ; extrait aqueux 38.25 ± 0.015 mg GAE/g) sont plus proche que nos résultats.

Toutefois, les résultats du dosage des composés phénoliques n'indiquent pas les valeurs exactes des teneurs en polyphénols, puisque malgré sa grande sensibilité, la méthode Folin-Ciocalteu peut présenter des problèmes d'interférence. En effet le réactif Folin-Ciocalteu peut réagir avec les acides aminés (tyrosine, tryptophane), les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose (Boizot et Charpentier, 2006).

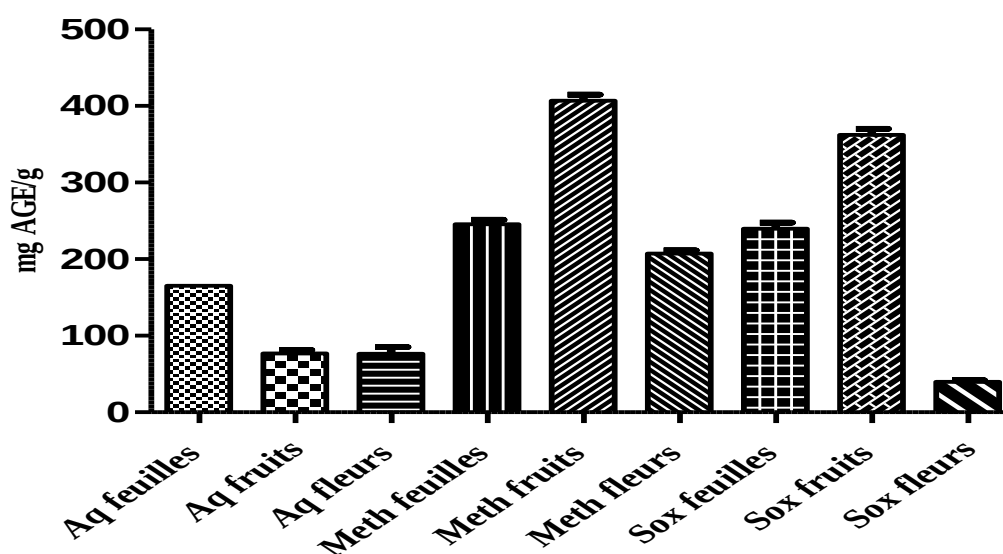


Fig. 12 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits des différentes parties de *C. oxyacantha* L.

II.2. Teneurs en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et l'étalon a été la quercétine (Fig.13). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg QE/g extrait).

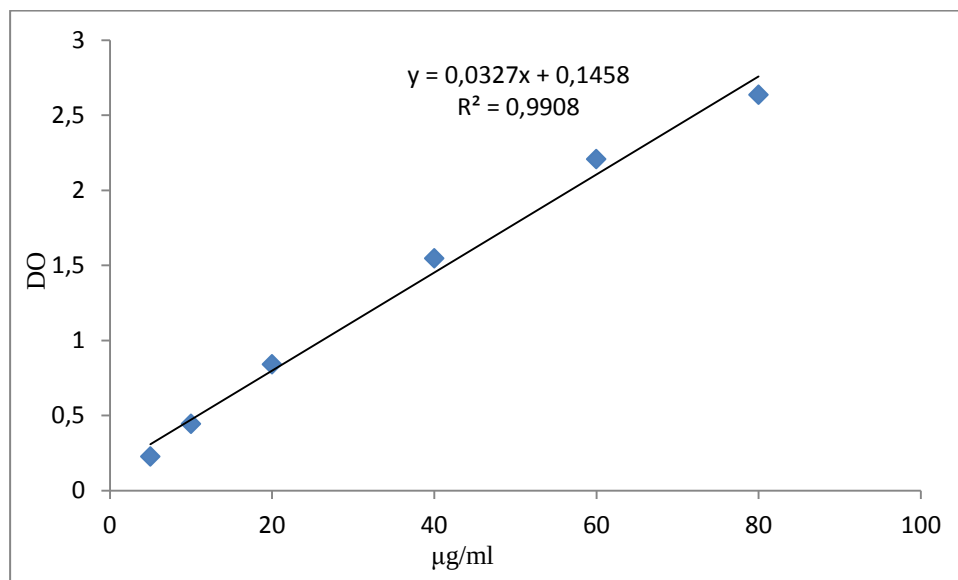


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

Les concentrations des flavonoïdes sont très faibles dans les extraits dans leur majorité, les teneurs en flavonoïdes sont de 67.26 ± 0.11 et 43.37 ± 0.24 , mg QE /g extrait dans les extraits de méthanol des fleurs et feuilles respectivement , 22.03 ± 1.4 mg QE /g extrait dans l'extrait des fruits suivies de celles des extraits d'acétone des feuilles, fruits et fleurs respectivement 46.86 ± 0.65 mg QE/g extrait, 17.56 ± 1.1 mg QE/g extrait et 15.04 ± 1.19 mg QE/g extrait et enfin celle d'extraits aqueux avec 17.84 ± 1.37 mg QE/g de extrait , 9.65 ± 2.18 mg QE/g de extrait et 3.94 ± 1.44 mg QE/g de extrait dans les fleurs , les feuilles et les fruits.(Fig.14 ; annexe III).

Nos résultats sont nettement supérieurs par rapport à ceux obtenus par Bouzid *et al* (2011) qui sont de 3.2 ± 0.02 µg QE/mg d'extrait pour l'extrait méthanolique et 1.45 ± 0.06 µg QE/mg d'extrait pour l'extrait aqueux des fruits. De même, ils sont nettement supérieurs aux résultats trouvés par Kostic *et al.* (2012) qui sont respectivement 0.990 ± 0.038 , 0.855 ± 0.033 et 0.766 ± 0.047 mg QE/g MF pour les extraits de méthanol, méthanol-eau et aqueux des fruits de la même espèce. Mais légèrement inférieurs aux résultats trouvés par Mraihi *et al* (2013) sur les différente

partie du fruit : le peler (198.53 ± 0.11 mg RE /100 g MS), la pulpe (160.35 ± 0.1 mg RE /100 g MS) et la graine (96.01 ± 0.01 mg RE /100 g MS).

Si en compare nos résultats à ceux de Bouaziz *et al.* (2014) on constate que les teneurs d'extraits de méthanol (21.03 ± 0.810 mg QE/g MS) et aqueux (2.12 ± 0.0134 mg QE/g MS) des feuilles de *C. azarolus* sont proche par rapport de nos résultats.

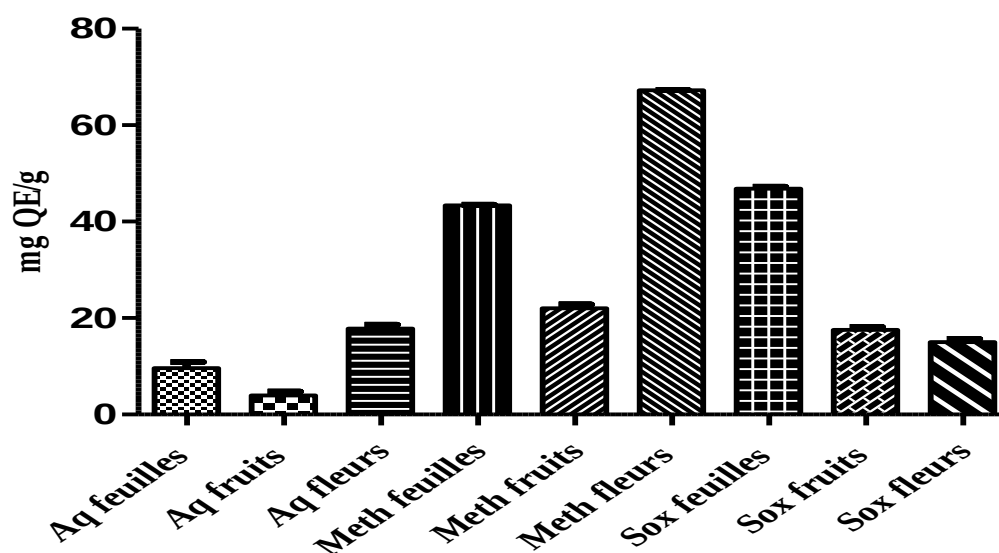


Figure 14: Teneurs en flavonoïdes des extraits des différentes parties de *C. oxyacantha* L.

II.3. Teneurs en flavones et flavonols

La quercétine a été utilisée comme étalon à différentes concentrations (fig 15), La teneur en flavones et flavonols est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g extrait).

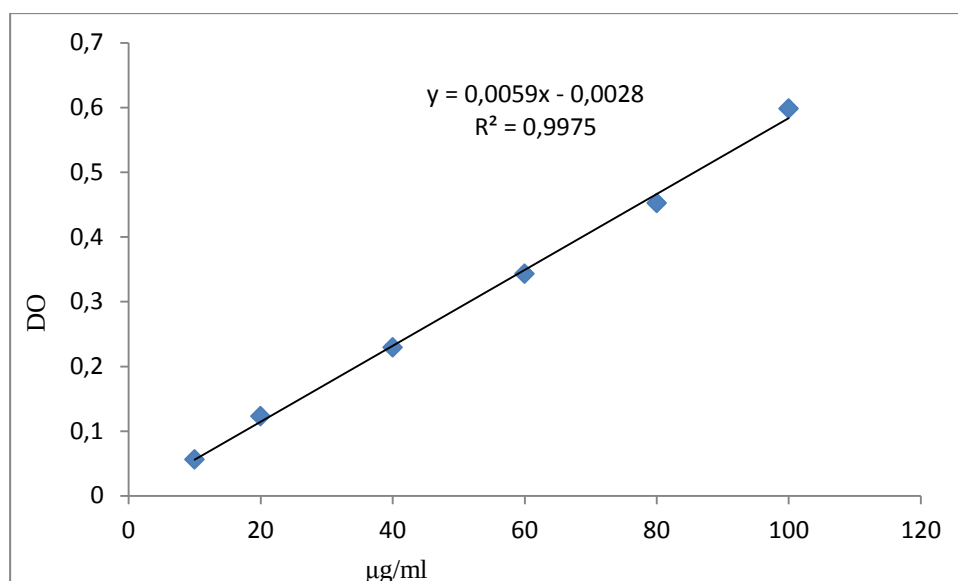


Figure 15: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonols.

Les teneurs en flavones et flavonols sont faibles pour les extraits aqueux 60.1 ± 1.46 , 40.16 ± 1.95 mg EQ/g extrait et 20.95 ± 1.35 mg EQ/g extrait dans les fleurs, les feuilles et les fruits respectivement comparés aux extraits de méthanol 157.22 ± 4.18 , 84.37 ± 0.53 mg EQ/g extrait et 61.13 ± 0.79 mg EQ/g extrait dans les fleurs, les feuilles et fruits respectivement et d'acétone 93.25 ± 2.41 , 46.12 ± 2.24 mg EQ/g extrait et 65.21 ± 1.75 mg EQ/g extrait dans les extraits des feuilles, fleurs et fruits respectivement (Fig 16 ; annexe III).

À notre connaissance aucun résultat de dosage des flavones et flavonols n'a été rapporté par d'autres auteurs sur le genre *Crataegus* pour pouvoir comparer nos résultats.

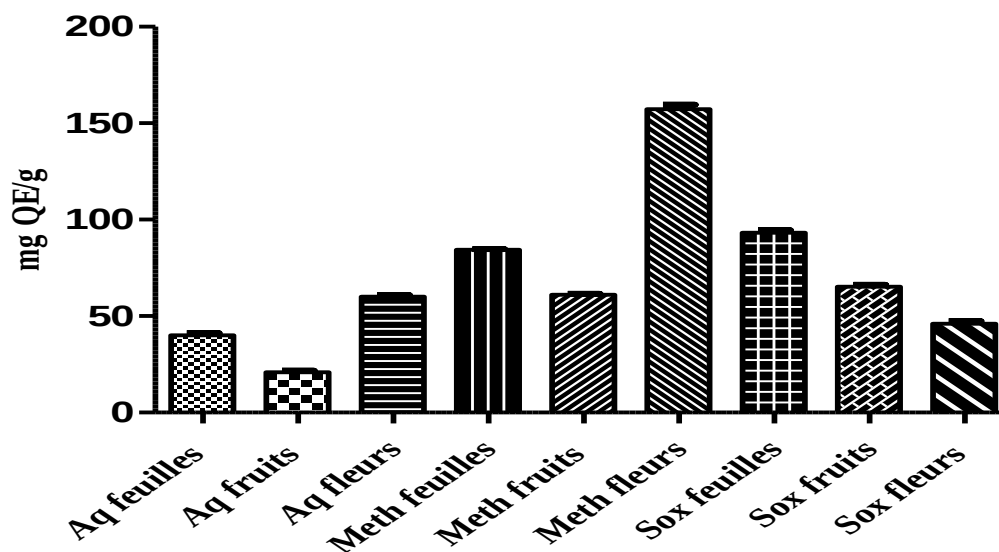


Figure 16 : Teneurs en flavones et flavonols des extraits dans les différentes parties de *C. oxyacantha* L.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

II.4. Teneur en tannins totaux

La quantité de tannins des extraits aqueux, de méthanol et d'acétone de différentes parties de *C. oxyacantha* a été effectuée par la méthode de précipitation de l'hémoglobine. Cette méthode est basée sur la précipitation de l'hémoglobine du sang hémolysé par les tannins des extraits entraînant une perte de coloration du surnageant qui reflète la teneur en tannins. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide tannique à différentes concentrations, elle montre une proportionnalité d'absorbance en fonction des concentrations (fig17). La teneur en tannins est exprimée en mg équivalent d'acide tannique par g d'extrait (mg EAT/ g extrait).

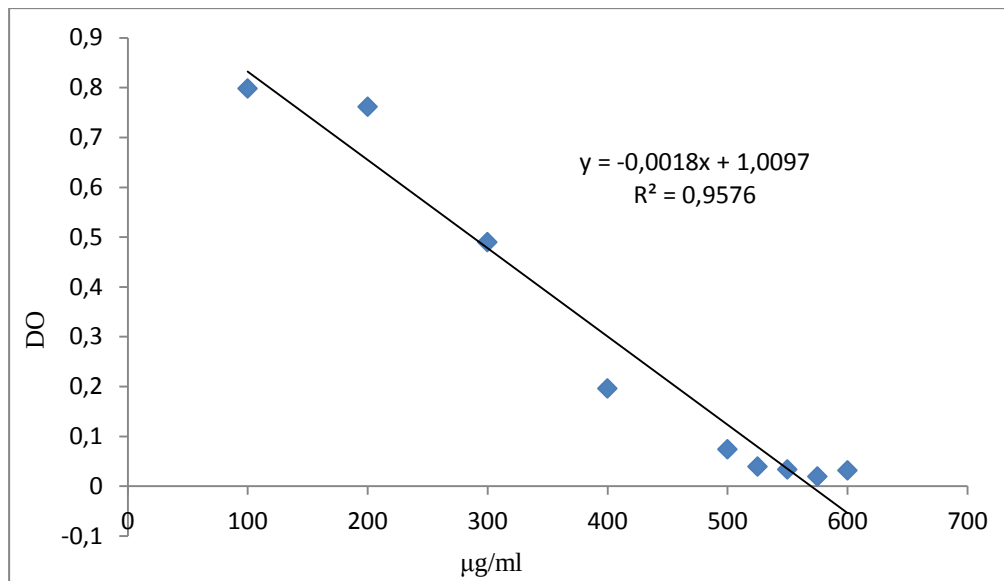


Figure 17 : Courbe d'étalonnage d'acide tannique pour le dosage des tannins.

Les résultats montrent que l'extrait des fruits est le plus riche en tannins avec un teneur de 313.46 ± 6.89 mg EAT/g extrait suivi par l'extrait des fleurs 249.38 ± 5.44 mg EAT/g extrait et en fin l'extrait des feuilles 191.05 ± 17.24 mg EAT/ g extrait, ça est pour les extraits de méthanol, les extraits aqueux aussi possèdent quantité considérable des tannins par rapport au extraits de méthanol, la plus grande quantité dans l'extrait des fleurs 229.94 ± 8.62 mg EAT/ g extrait, suivie par l'extrait des feuilles 182.27 ± 14.97 mg EAT/g extrait et en fin l'extrait des fruits 150.87 ± 3.4 mg EAT/g MF et la plus faible teneur en tannins dans l'extrait d'acétone des fruits 154.38 ± 7.25 mg EAT/ g extrait, l'extrait des fleurs 128.64 ± 11.84 mg EAT/g extrait et l'extrait des feuilles 119.75 ± 9.3 mg EAT/g extrait (fig.18 ; annexe III).

Si en compare les résultats du dosage des tannins avec ceux de la littérature, on constate que la teneur d'extrait de méthanol et d'aqueux des fruits sont bien supérieurs à celles trouvé par Bouzid et al. (2011) soit 2.1 ± 0.01 et 0.3 ± 0.1 µg EC/mg d'extrait qui utilisé la méthode de trichlorure du fer (FeCl_3).

Nos résultats sont proches que celles de Bouaziz *et al.* (2014), l'étude est basée sur les feuilles d'une autre espèce de *Crataegus*.

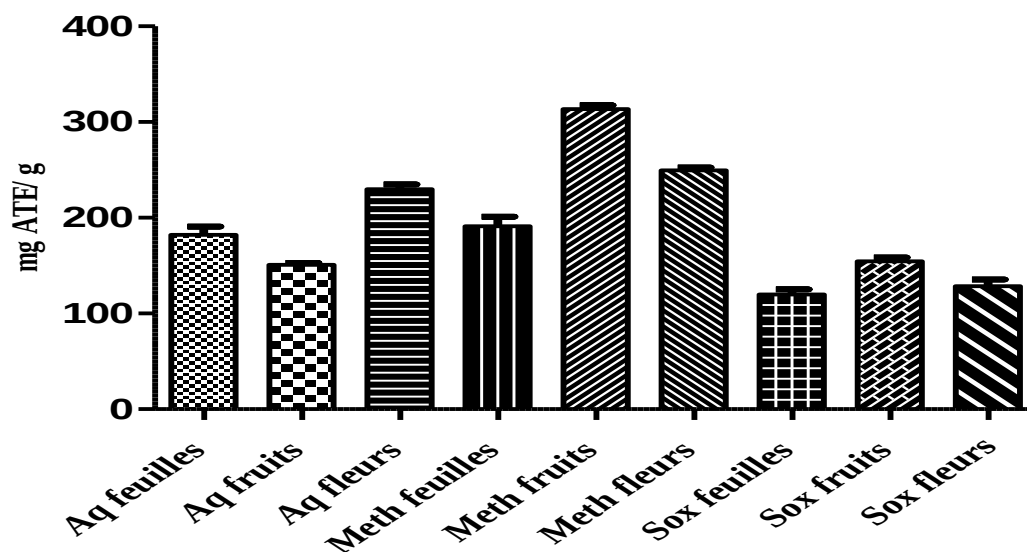


Figure 18: Teneurs en tannins des extraits des différentes parties de *C. oxyacantha* L.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques, des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que des facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga *et al.* 2001).

III- Identification des composés phénoliques par HPLC TOF/MS

La caractérisation du contenu phénolique des extraits de *C. oxyacantha* a été réalisée par analyse HPLC TOF/MS. La combinaison de la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) à la spectrométrie de masse à temps de vol (TOF / MS) à haute résolution fournit des capacités puissantes pour l'analyse chimique.

Cette analyse a permis d'identifier des polyphénols représentant des teneurs différentes et qui correspondent pour la plupart aux standards injectés (témoins). En effet, 21 témoins ont été utilisés pour l'étude du profil polyphénolique des extraits. Tous les composés détectés ont été trouvés à des taux variables dans chaque extrait de *C. oxyacantha*.

III.1. Les extraits aqueux

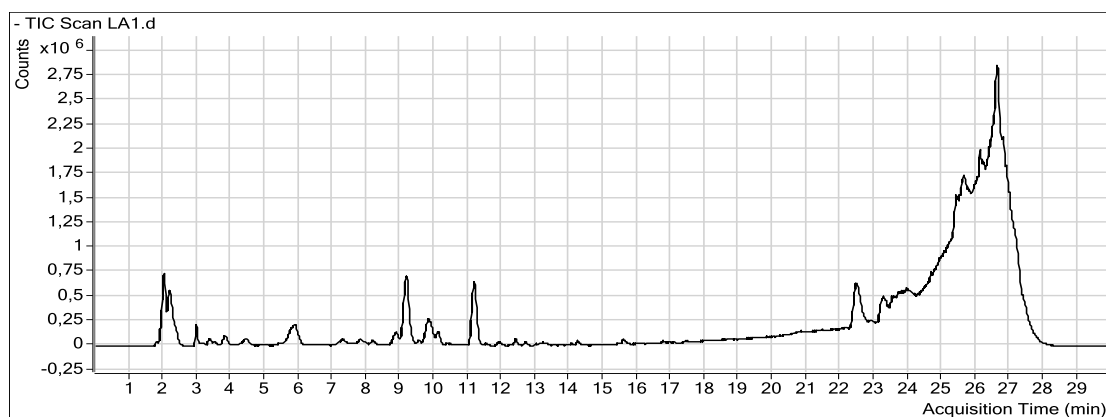
Sur les 21 témoins utilisés on a noté la présence de 16 composés dans l'extrait des feuilles, 10 dans l'extrait des fleurs et 9 dans l'extrait des fruits qui correspondent à des teneurs respectives de 721.414mg/ kg, 486.2965 mg/kg et 98.0966 mg/kg de plante (Fig19).

Dans l'extrait des feuilles, l'acide chlorogénique, l'acide gentisique et la rutine sont les composés les plus abondants alors que l'acide gallique, l'acide caféique, la catéchine et l'acide 4-hydrobenzoïque sont présents à de faibles concentrations. D'autres composés phénoliques sont présents sous forme de traces comme l'acide rosmarinique. Tandis que l'extrait des fleurs se caractérise par la présence de l'acide chlorogénique et la rutine qui sont les composés majoritaires. L'acide 4-hydrobenzoïque, l'acide gentisique, la quercétine et l'acide caféique sont présents à des concentrations faibles, tandis que l'acide salicylique, l'apigénine-7-glucoside et l'acide *p*-coumarique sont présents sous forme de traces (Tab I).

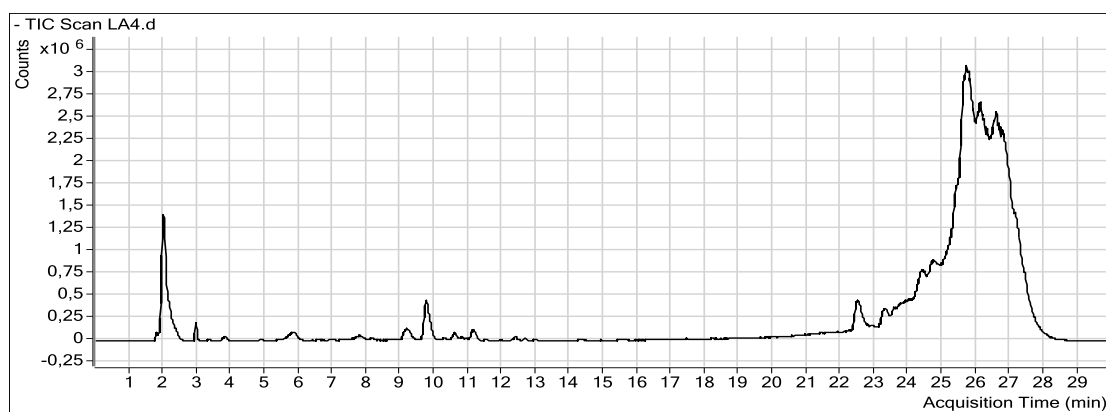
L'extrait des fruits aussi se distingue par les mêmes composés majoritaires qui sont l'acide gentisique et l'acide chlorogénique. Trois autres composés (l'acide gentisique, la rutine et l'acide 4-hydroxybenzoïque) sont détectés à de faibles concentrations et quatre autres composés (l'acide caféique, l'acide vanillique, 4-hydrobenzaldehydyde et l'acide protocatechique) sont présents sous forme de traces (Tab I).

Nous constatons qu'il y a une différence dans les composés phénoliques des extraits de différentes parties de la plante. Ces composés sont présents dans une partie et absents dans l'une ou l'autre partie, dans le cas de présence des composés phénoliques dans toutes les parties, nous notons une différence dans la teneur (Fig 19 ; Tab I).

a)



b)



c)

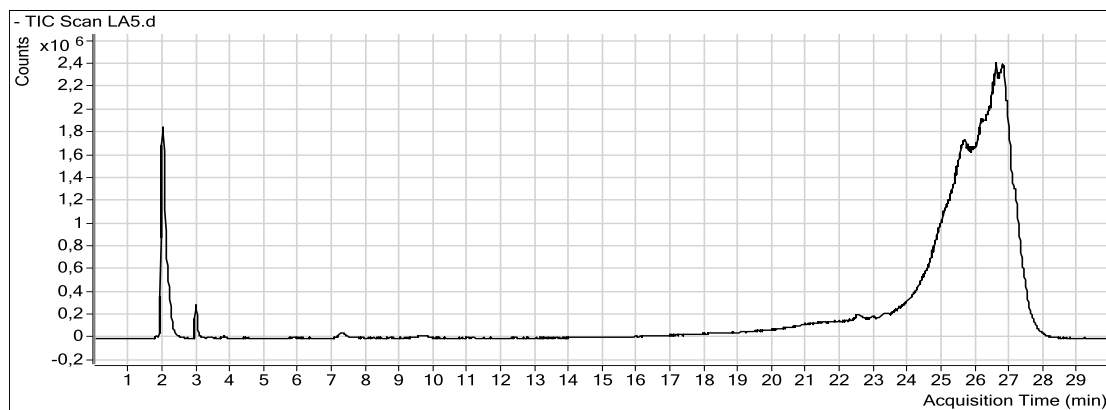


Figure 19 : les chromatogrammes des composés phénoliques des extraits aqueux de différentes parties de *C. oxyacantha* obtenu par l'HPLC TOF/MS.

a) Les feuilles. b) les fleurs. c) les fruits.

Tableau I: Séparation chromatographique par HPLC TOF/MS des extraits aqueux des différentes parties de *C. oxyacantha*.

composés	MZ	Feuilles			Fleurs			Fruits		
		TR	Resp	results mg phenolic/ kg plant)	TR	Resp	results mg phenolic/ kg plant)	TR	Resp	results mg phenolic/ kg plant)
Acide gallique	169.0258	2,2163	32028	7,442	2,1858	816	1.1877	2,2268	195899	56.0967
Acide gentisique	153.0297	4,4306	425995	99,004	4,4161	16590	5.7469	4,4251	24647	7.7305
Catéchine	289.0882	5,9550	20390	3,372	/	/	/	/	/	/
Acide chlorogenique	353.1060	5,8748	1570230	575,125	5,8282	738038	390.0525	5,8693	75344	31.2087
Acide 4-hydroxybenzoïque	137.0344	6,3562	217	1,126	6,9033	10572	6.6385	6,3186	201	1.4893
Acide Protocatechique	153.0296	6,9980	1890	Trace	/	/	/	/	/	
Acide caféique	179.0467	7,6719	46547	4,043	7,6414	14343	0.9596	7,6985	2431	Trace
Acide vanillique	167.0467	/	/	/	/	/	/	8.6292	3	Trace
4-hydroxybenzaldehyd	121.0387	9,0037	217	Trace	/	/	/	8,7896	923	Trace
Rutine	609.1718	9,3247	232280	31,302	9,2781	408671	80.5262	9,2871	11228	1,5713
Acide sisorique	473.0676	10,1377	5830	/	10,1377	5830	/	10.1377	5830	/
Acide chicorique	/	10,4800	4643	Trace	/	/	/	/	/	/
Acide ellagique	301.0151	9,8221	199	Trace	/	/	/	/	/	/
Acide p-coumarique	163.0508	9,9184	657	Trace	9.9039	4885	Trace	/	/	/
Acide ferulique	193.6240	10,5121	469	Trace	/	/	/	/	/	/
Hespidine	609.2079	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Résultats et discussion

Apigenin-7-glucoside	431.1761	11,1058	595	Trace	11.0752	175	Trace	/	/	/
Acide protocatechique éthyle ester	181.0626	/	/	/	/	/	/	13.1862	199	Trace
Acide rosmarinique	359.0732	11,8920	234	Trace	/	/	/	/	/	/
Acide salisilique	137.0344	13,1917	5641	Trace	13,1612	558	Trace	/	/	/
Quercétine	301.0517	/	/	/	14.7016	820	1.1852	/	/	/
Naringenine	271.0796	/	/	/	/	/	/	/	/	/
somme				721,414			486.2965			98.0966

III.2-Les extraits de méthanol

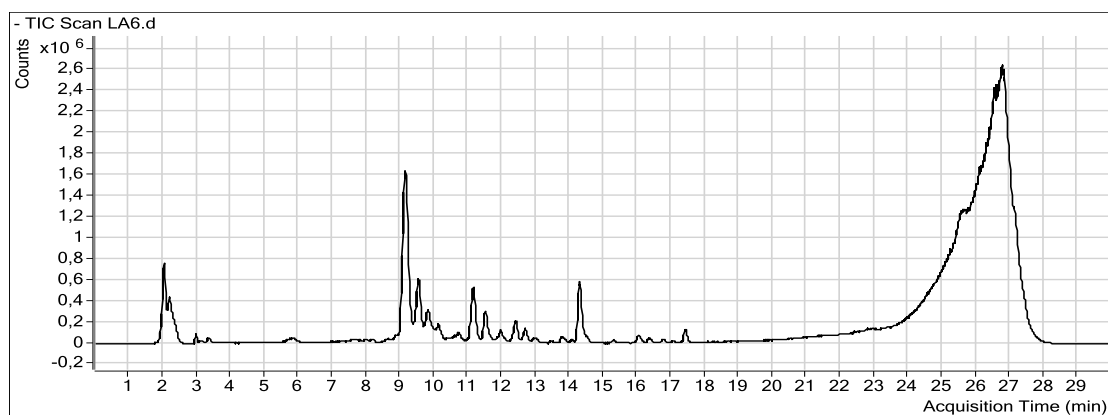
L'analyse de cet extrait a permis de mettre en évidence 18 composés dans l'extrait des feuilles, 13 composés dans l'extrait des fleurs et 17 composés dans l'extrait des fruits qui correspondent à des teneurs respectives 177.3071 mg/ kg de plante, 81.6406 mg/ kg de plante et 2.1624 mg/kg de plante (Fig20).

Dans l'extrait des feuilles, les composés majoritaires sont l'acide chlorogénique et la rutine suivis par l'acide gentisique, l'acide protocatéchique et l'acide sisorique alors que, les autres composés phénoliques sont présents à de faibles concentrations ou bien sous forme de traces (Tab II).

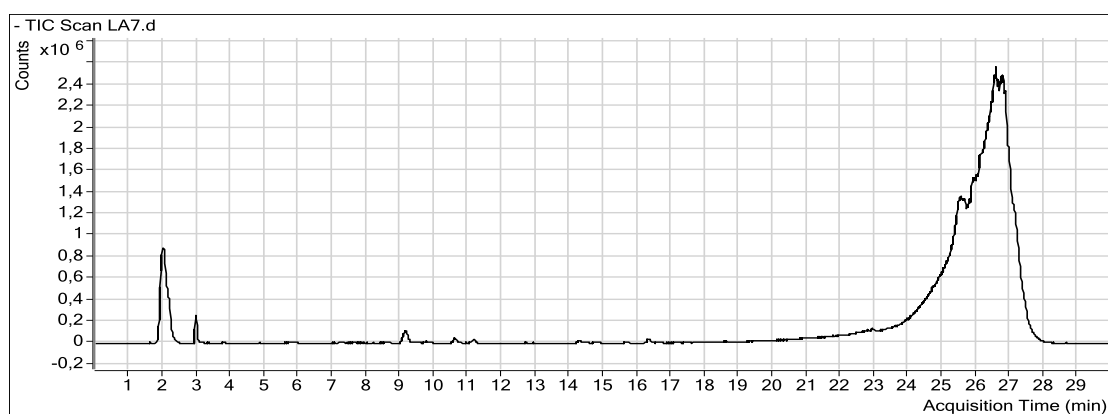
L'extrait des fleurs possède une diversité des composés phénoliques inférieure à celle de l'extrait des feuilles et la plus part des composés sont présents à l'état de traces. L'acide chlorogénique est le composé majoritaire dans cet extrait à côté de la rutine, l'acide gentisique, l'acide protocatéchique et l'acide sisorique tandis que, les autres composés phénoliques sont présents à de faibles concentrations ou bien sous forme des traces (Tab II).

Dans l'extrait des fruits, tous les composés sont présents à de petites quantités ou à l'état de traces (Fig 20 ; Tab II).

a)



b)



c)

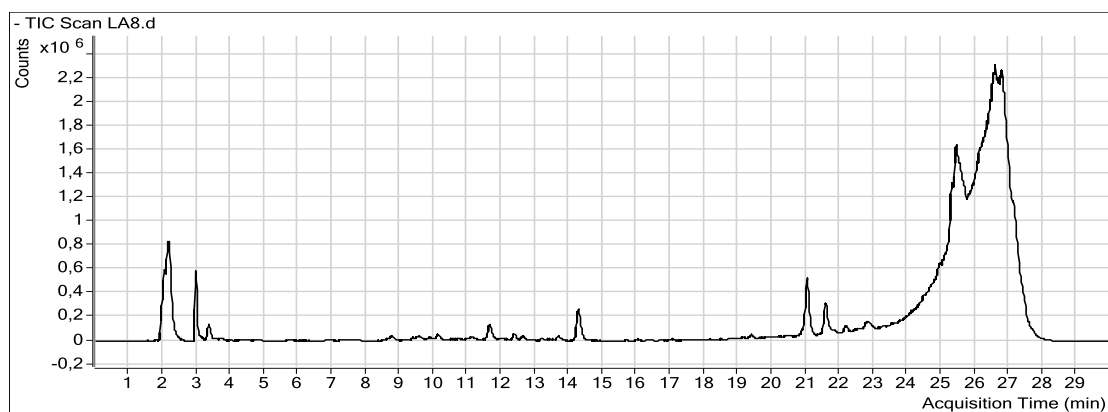


Figure 20 : les chromatogrammes des composés phénoliques des extraits de méthanol de différentes parties de *C. oxyacantha* obtenu par l'HPLC TOF/MS.

a) Les feuilles. b) les fleurs. c) les fruits.

Tableau II: Séparation chromatographique par HPLC TOF/MS des extraits de méthanol de différentes parties de *C. oxyacantha*.

Composés	MZ	Feuilles			Fleurs			Fruits		
		TR	resp	mg phenolic/ kg plant)	TR	Resp	mg phenolic/ kg plant)	TR	resp	mg phenolic/ kg plant)
Acide gallique	169.0258	2,2271	199	0,7620	2,9786	212	1,0268	2,1765	1353	0,0458
Acide gentisique	153.0297	4,3933	28930	7,5769	4,4067	8945	3,2448	4,4230	71519	0,8226
Catéchine	289.0882	/	/	/	/	/	/	6,1399	227	Trace
Acide chlorogénique	353.1060	5,7732	285271	112,2612	5,8508	123895	61,8060	5,8510	65741	0,9826
Acide 4-hydroxybenzoïque	137.0344	6,6076	969	1,5299	6,6370	12455	7,7412	6,6533	700	0,0634
Acide protocatechique	153.0296	7,0088	29439	6,1403	6,9259	443	Trace	7,0064	14147	0,1185
Acide caféique	179.0467	7,6346	41997	3,9641	7,6479.	16845	1,3766	7,6803	1101	Trace
Acide vanilique	167.0467	7,9876	236	Trace	/	/	/	7,8086	925	Trace
4-hydroxybenzaldehyd	121.0387	9,6563	1208	Trace	8,7070	1995	Trace	9,0923	1678	Trace
Rutine	609.1718	9,3354	260650	39,1043	9,2846	27469	5,0684	9,3009	10372	0,0525
Acide sisorique	473.0676	10,1377	5830	4,2425	/	/	/	10,1193	1530	0,0769
Acide chicorique	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Acide ellagique	301.0151	9,9452	557	Trace	/	/	/	/	/	/
Acide p-coumarique	163.0508	10,4587	1971	0,6452	9,9104	4258	Trace	10,4723	2091	Trace
Acide ferulique	193.6240	10,6672	1278	Trace	/	/	/	11,1141	745	Trace
Hesperidin	609.2079	12,0793	197	Trace	/	/	/	11,6597	206	Trace
Apigenin-7-glucoside	431.1761	12,0793	15197	Trace	11,0818	215	Trace	11,6918	672	Trace

Résultats et discussion

Acide rosmarinique	181.0626	/	/	/	12,4136	267	Trace	/	/	/
Acide protocatechique ethyl ester	359.0732	/	/	/	/	/	/	14,3554	326	Trace
Acide salisilique	137.0344	13,2025	12396	Trace	13,1517	440	Trace	14,0024	220	Trace
Quercétine	301.0517	16,3636	3949	1,0809	16,3609	2965	1,3768	/	/	/
Naringénine	271.0796	16,8610	3166	Trace	/	/	/	/	/	/
somme				177,3071			81,6406			2,1624

III.3-Les extraits d'acétone

Parmi les composés phénoliques injectés, nous avons enregistré 16 composés dans l'extrait des feuilles, 16 composés dans l'extrait des fleurs et 11 composés dans l'extrait des fruits qui correspondent à des teneurs respectives 671.4983 mg/ kg de plante, 58.6197 mg/ kg de plante et 27.4665 mg/kg de plante (Fig 21).

Les composés majoritaires dans l'extrait des feuilles sont l'acide chlorogénique et la rutine alors que l'acide gentisique, l'acide 4- hydroxybenzoïque, l'acide caféique, l'acide gallique et le quercétine sont présents à faibles concentrations. Nous avons enregistré l'absence des composés suivants dans cet extrait, l'acide vanillique, l'acide ellagique, l'acide rosmarinique et l'acide protocatéchique ethyl ester. Cependant que, les autres composés sont présents sous forme de traces (Tab III).

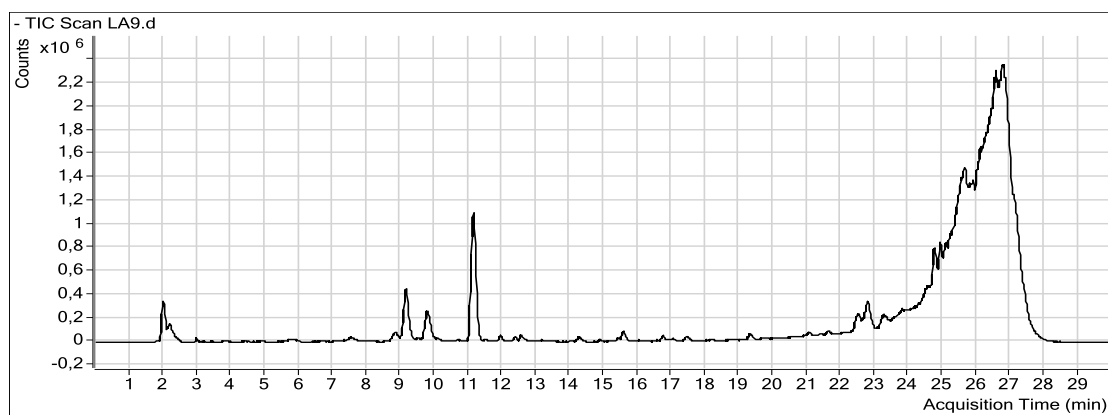
L'acide rosmarinique, l'acide chlorogénique et la rutine sont les composés majoritaires dans l'extrait des fleurs. Cet extrait possède plusieurs composés phénoliques à faibles concentrations comme l'acide gentisique, l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'acide salicilique, la quercétine et l'acide gallique. Nous avons enregistré l'absence d'acide protocatéchique, le catéchine, l'acide sisorique et l'acide ferulique, et les autres composés sont présents sous forme de traces (Tab III).

D'après les témoins utilisés, l'extrait des fruits ne montre pas une diversité des composés phénoliques quand il est comparé aux autres extraits. Cet extrait montre une teneur considérable de l'acide chlorogénique et de la rutine (Fig. 21 ; Tab. III).

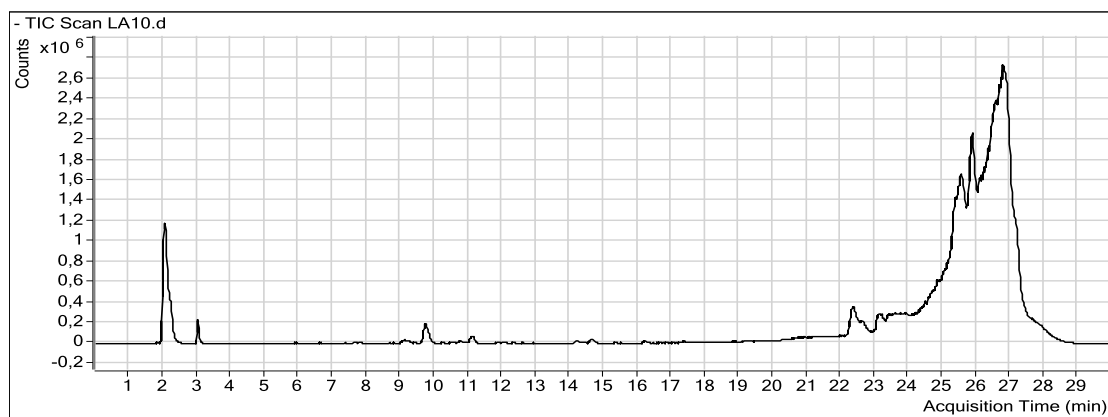
Plusieurs acides phénoliques sont trouvés par Rodrigues *et al.* (2012) dans les fruits et les fleurs de *C. monogyna*. L'acide 5-O-caffeoylquinique, 2''-O-rhamnosyl-C-hexosyl-apigenine, l'acide 3-O-caffeoylquinique, l'acide 3-*p*-coumaroylquinique et le (-)-Epicatechine sont les composés la plus abondant dans les fleurs. Cependant, le (-)-Epicatechine et le procyanidine dimère sont les composés majoritaires dans les extraits de déférente parties des fruits.

Une étude menée par Swaminathan *et al.* (2010) sur les fruits de *C. oxyacantha* a montré le catéchine, l'epicatéchine et le catéchine gallate.

a)



b)



c)

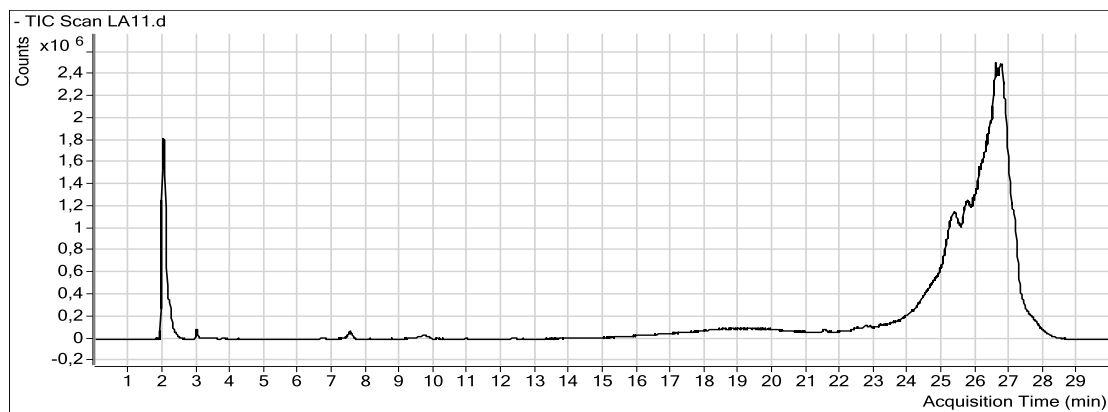


Figure 21 : les chromatogrammes des composés phénoliques des extraits d'acétone de différentes parties de *C. oxyacantha* obtenu par l'HPLC TOF/MS.

a) Les feuilles. b) les fleurs. c) les fruits.

Tableau III: Séparation chromatographique par HPLC TOF/MS des extraits d'acétone de différentes parties de *C. oxyacantha*.

Composés	MZ	Feuilles			Fleurs			Fruits		
		TR	resp	mg phenolic/ kg plant)	TR	Resp	mg phenolic/ kg plant)	TR	resp	mg phenolic/ kg plant)
Acide gallique	169.0258	2,2016	5942	1,0233	2,2700	448	0,7491	/	/	/
Acide gentisique	153.0297	4,4320	24707	3,1344	4,4683	9482	2,3330	4,2462	207	0,2121
Catéchine	289.0882	5,9563	5074	Trace	/	/	/	6,3642	718	Trace
Acide chlorogénique	353.1060	5,7638	168739	31,1417	5,8322	56303	16,7134	5,7705	46311	18,6556
A.4-hydroxybenzoïque	137.0344	6,6142	12778	2,8444	6,7949	9588	4,2987	6,3161	235	1,6530
Acide protocatechique	153.0296	6,8870	222	Trace	/	/	/	/	/	/
Acide caféique	179.0467	7,6572	40418	1,8264	7,6614	4446	Trace	7,7121	478	Trace
Acide vanilique	167.0467	/	/	/	7,6775	470	Trace	7,4233	307	Trace
4-hydroxybenzaldehyd	121.0387	9,2618	6110	Trace	9,2821	9512	Trace	/	/	/
Rutine	609.1718	9,2939	251052	18,1933	9,2500	92579	12,4505	9,2685	31747	5,8079
Acide ellagique	473.0676	/	/	/	9,6511	388	Trace	9,7178	213	Trace
Acide chicorique	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Acide sisorique	301.0151	10,4171	1602	Trace	/	/	/	/	/	/
Acide p-coumarique	163.0508	10,3369	3175	Trace	10,3250	200	Trace	10,3757	209	Trace
Acide ferulique	193.6240	10,6417	213	Trace	/	/	/	/	/	/

Résultats et discussion

Hesperidine	609.2079	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Apigenin-7-glucosid	431.1761	12,0538	7496	Trace	12,0099	236	Trace	/	/	/
Acide rosmarinique	181.0626	/	/	/	12,2987	694	632,5360	/	/	/
Acide protocatechique ethyl ester	359.0732	/	/	/	12,7159	210	Trace	/	/	/
Acide salisilique	137.0344	13,1610	6113	Trace	13,1652	1765	1,6230	13,1677	574	Trace
Quercétine	301.0517	15,7443	1510	0,4563	15,4758	197	0,7947	14,5958	128	1,1379
Naringenine	271.0796	16,8676	1608	Trace	16,7755	708	Trace	/	/	/
somme				58,6197			671,4983			27,4665

III.4- L'extrait de méthanol/chloroforme des feuilles

La chromatographie sur colonne de l'extrait de méthanol/chloroforme des feuilles a permis d'obtenir 40 fractions, ces fractions ont été vérifiées par CCM pour déterminer les rapports frontaux (R_f) des composés. Un composé particulier parcourra la même distance le long de la phase stationnaire par un solvant spécifique. Par conséquent, les fractions contenant des composés ayant la même valeur de R_f ont été combinées. Ainsi, nous avons acquis 11 fractions (Tab IV).

Tableau IV: Regroupement des fractions de l'extrait de *C. oxyacantha* L issues de la colonne de chromatographie.

Nombre de fraction	Masse (g)	Observation
F1 (1-7)	5.66	Composé majoritaire
F2 (8-11)	0.7626	Composé majoritaire
F3 (12-14)	0.8477	Mélange complexe
F4 (15)	1.3177	Mélange complexe
F5 (16-19)	16.2645	Mélange complexe
F6 (20-25)	2.4654	Composé majoritaire (C1).
F7 (26-28)	0.9461	Mélange complexe
F8 (29)	1.6993	Mélange complexe
F9 (30)	10.3029	Mélange séparable (C2, C3, C4).
F10 (31-32)	6.65	Mélange séparable
F11 (33-40)	6.4435	Mélange séparable

L'analyse de l'extrait de méthanol/ chloroforme des feuilles et des fractions a été réalisées par HPLC TOF/MS. Cette analyse a permis d'identifier des polyphénols représentant des teneurs différentes et qui correspondent pour la plupart aux standards injectés (témoins). En effet, 44

témoins ont été utilisés pour l'étude du profil poly-phénolique de l'extrait et des différentes fractions (Fig 22; Tab V).

Parmi les composés phénoliques injectés, nous avons enregistré 25 composés dans l'extrait des feuilles, les composés majoritaires sont l'acide chlorogénique, la quercétine-3- β -D-glucoside et l'acide fumarique. Diosmine, rutine, catéchine, l'acide vanillique et l'acide 4-hydroxybenzoïque sont présents des quantités importantes et le reste sous forme des traces.

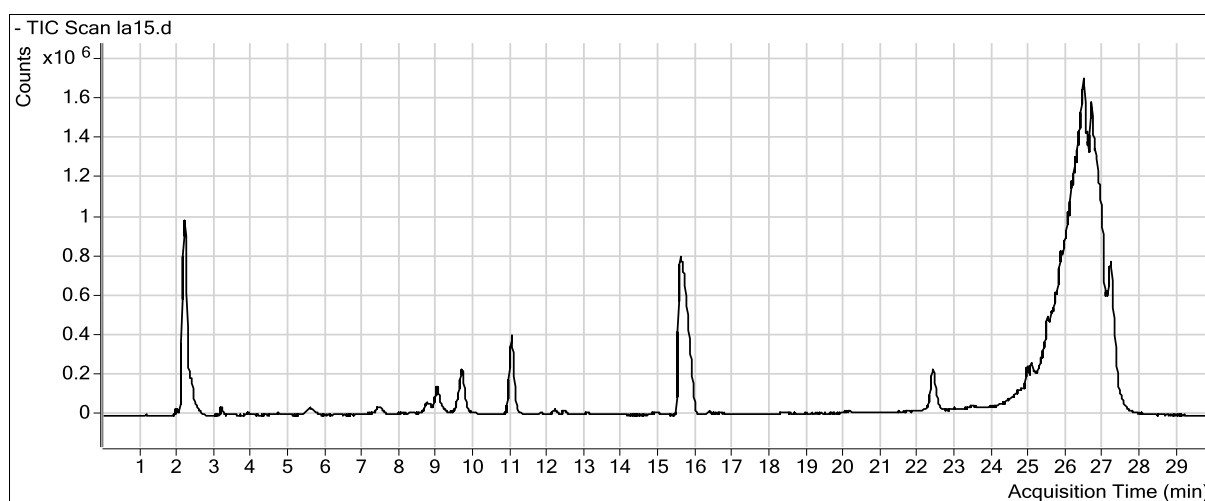
Nous avons enregistré 22, 14, 16, 27, 16, 17 et 34 composés dans les fractions F2, F3, F4, F5, F6, F7 et F8 respectivement et la plus part des composés sont présents sous forme des traces ou comme petites quantités.

29 composés sont enregistrés dans la fraction F9, la quercétine-3- β -D-glucoside, la rutine et la diosmine sont les composés majoritaires. Catéchine, morine, l'acide cinnamique, l'acide vanillique, l'acide chlorogénique et l'acide gentisique sont des composés présents avec des quantités considérables et le reste sous forme des traces.

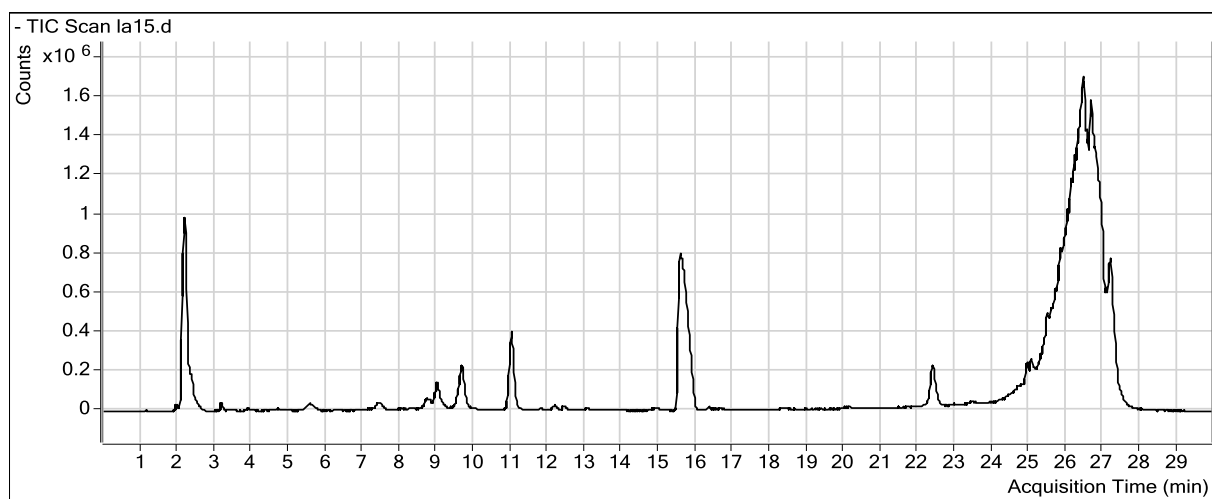
La quercétine-3- β -D-glucoside, l'acide chlorogénique et la rutine sont les composés les plus abondants parmi les 30 composés enregistrés dans la fraction F10 alors que les autres composés phénoliques sont présents à faibles concentrations ou sous forme des traces.

L'acide fumarique est le composé majoritaire dans la fraction F11 tandis que les 23 autres composés phénoliques sont présents à faible concentration ou sous forme des traces.

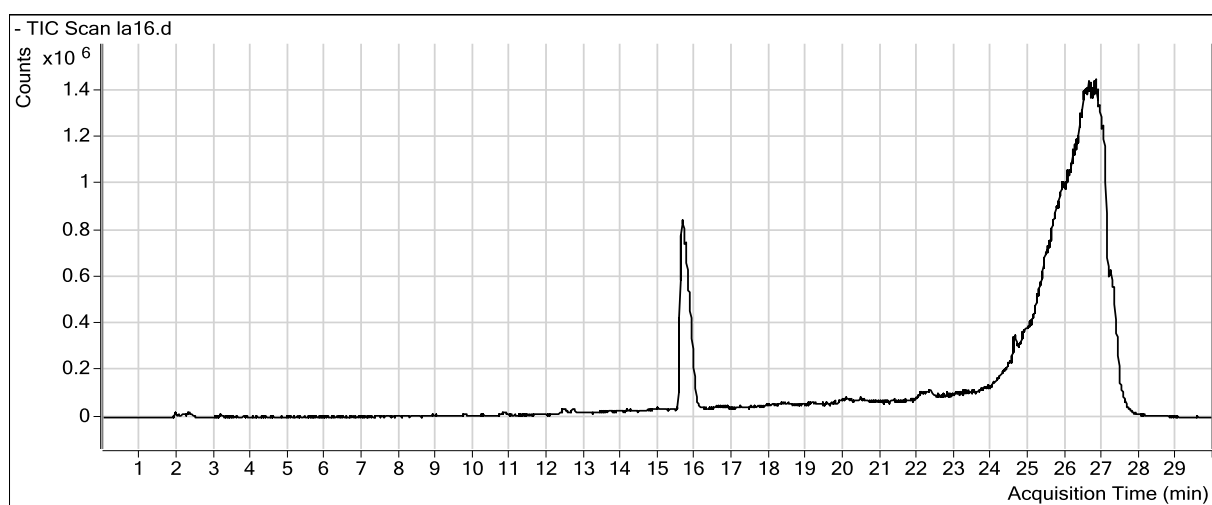
a)



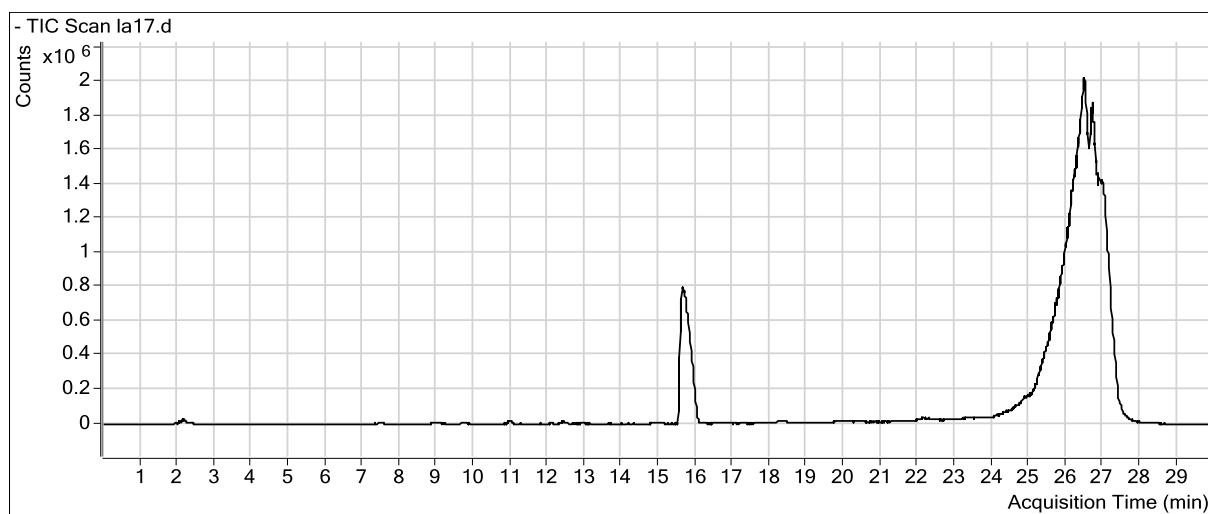
b)



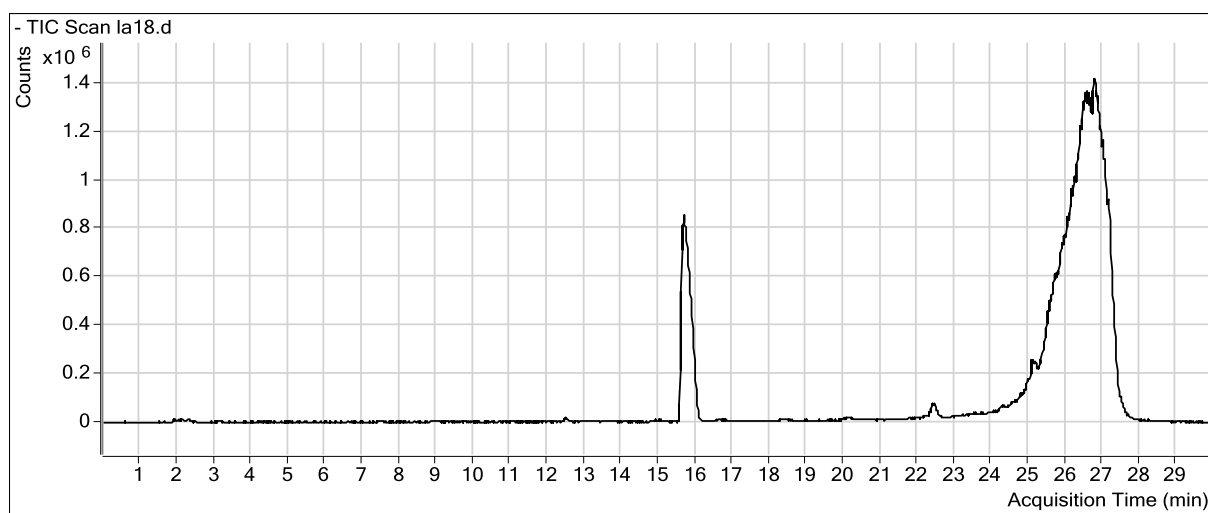
c)



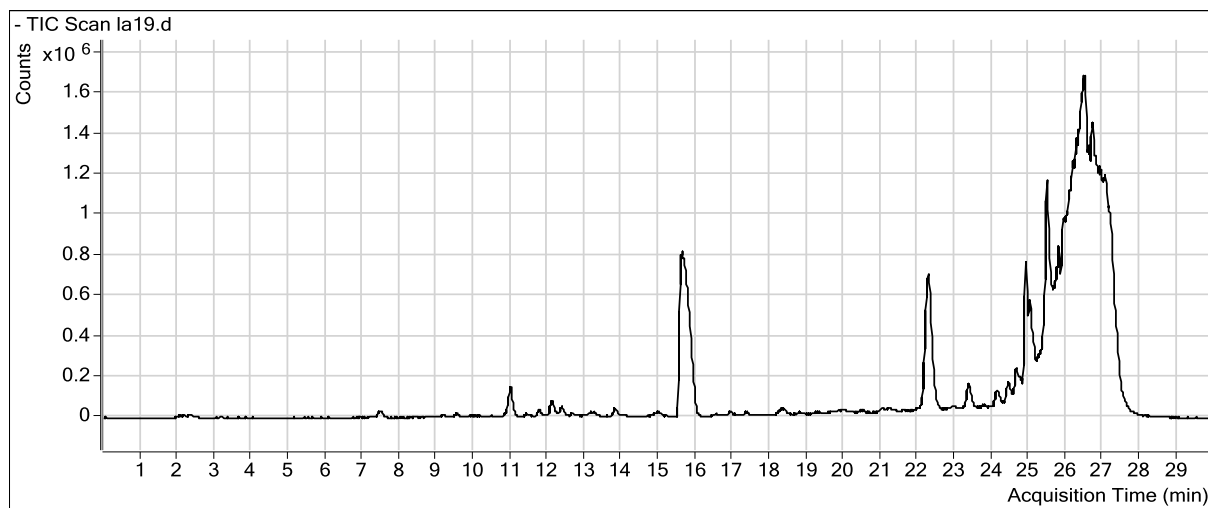
d)



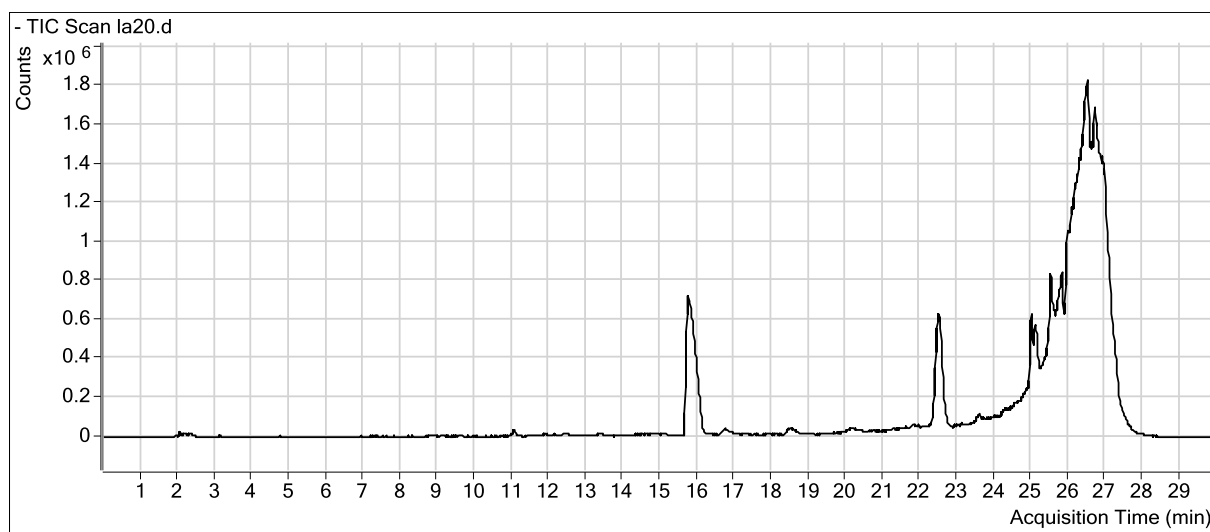
e)



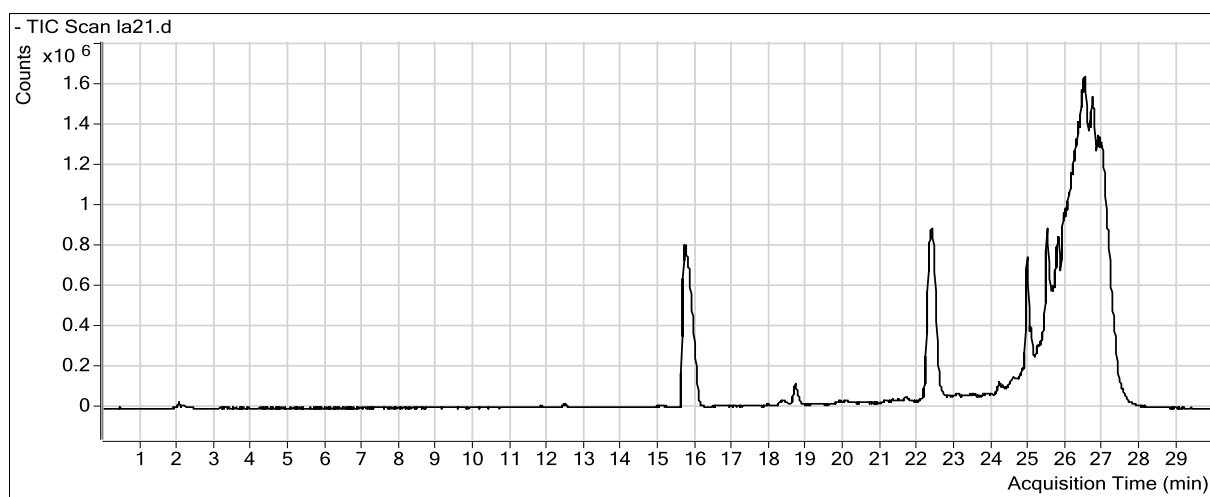
f)



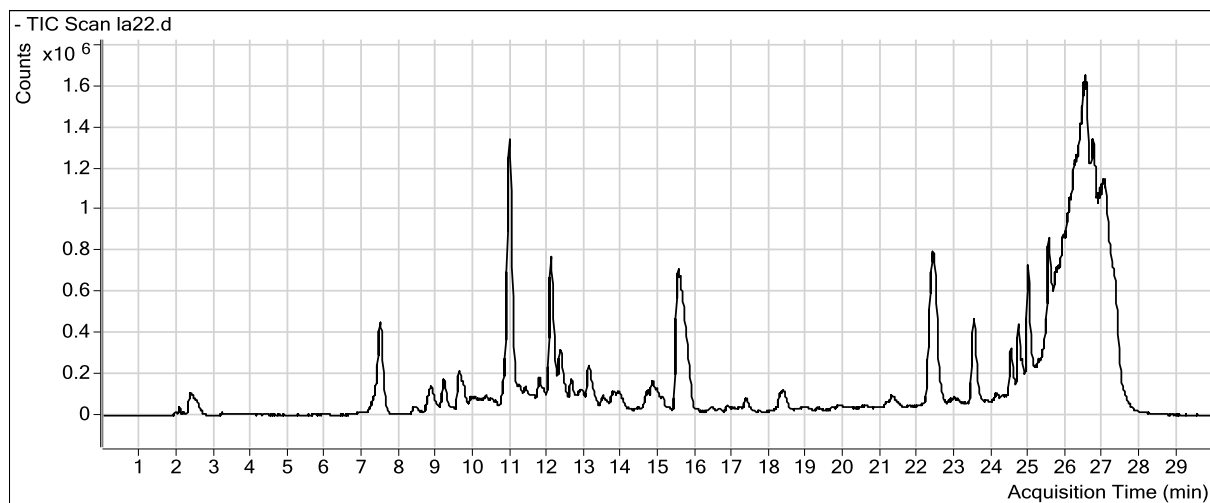
j)



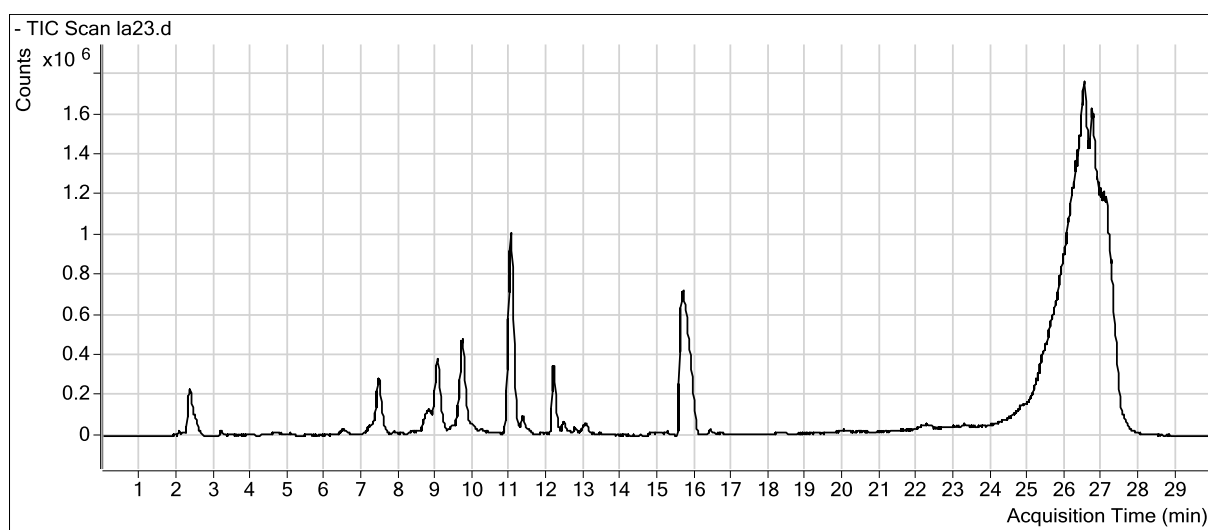
h)



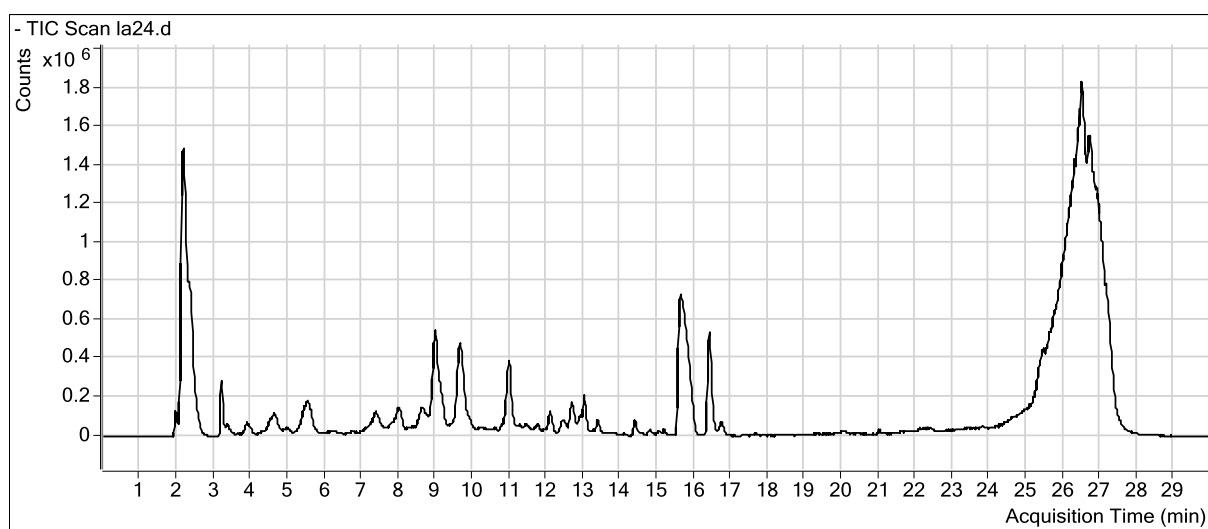
i)



g)



k)



l)

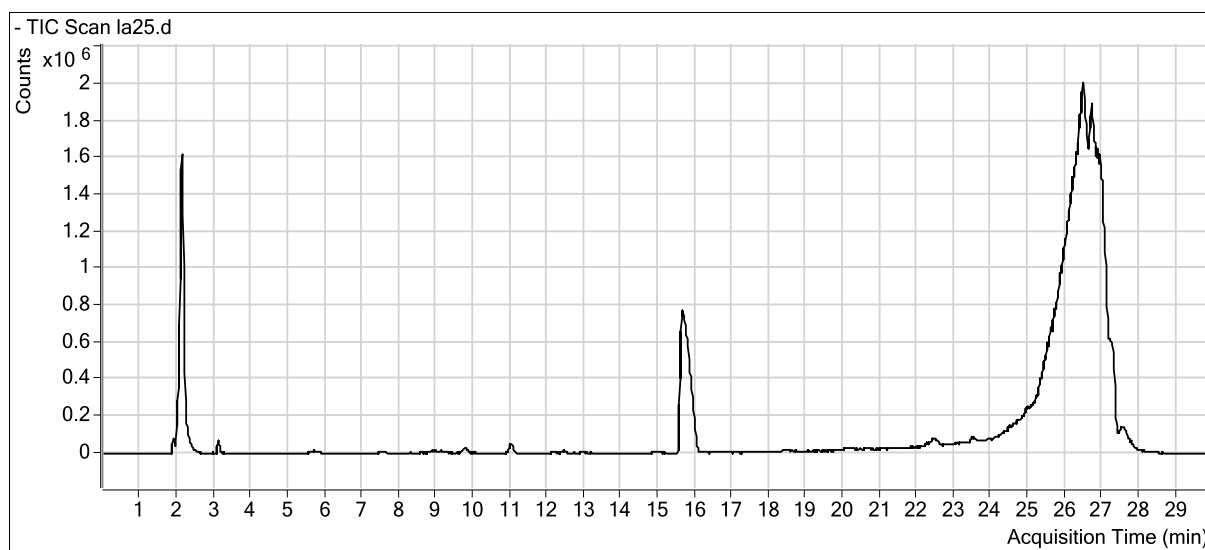


Figure 22 : Les chromatogrammes des composés phénoliques de l'extrait méthanol/chloroforme et de différentes fractions des feuilles de *C. oxyacantha* obtenus par HPLC TOF/MS.

a) L'extrait, b) F2, c) F3, d) F4, e) F5, f) F6, j) F7, h) F8, i) F9, k) F10, l) F11.

Résultats et discussion

Tableau V : l'analyse HPLC TOF/MS d'extrait et des fractions.

Composés	MZ	RT	Résultats (mg phénoliques/ kg de la plante)										
			Extrait de C. <i>oxyacantha</i>	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
Acide gallique	169.0258	2,372	/	/	/	/	/	/	/	/	Trace	Trace	Trace
Acide fumarique	115.0130	3,19	196,2778819	Trace	/	/	/	/	Trace	/	/	1.834362	50.19435
Acide gentisique	153.0297	4,506	16,73374483	0,165441773	/	0,272045675	/	/	0.204963	0.368591	2.235458	4.102583	1.524506
Acide chlorogénique	353.1060	5,469	212,8279077	/	/	/	0,248087702	/	/	/	2.232027	84.16427	13.62161
Catechine	289.0882	5,79	20,58335261	0,207324959	0,367616582	0,340755749	0,80477071	0.692456	0.265336	1.305833	7.378071	2.427463	1.843578
A. 4-hydroxybenzoïque	137.0344	6,96	11,12699443	Trace	0,015093577	0,003540927	0,609467861	0.538613	0.085153	1.079914	1.362964	0.191369	0.326523
Acide protocatechique	153.0296	7,089	/	0,389166857	/	/	0,913291514	1.257979	0.482623	0.867108	5.237233	3.457119	/
Acide caffeique	179.0467	7,651	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	0.900402	Trace
Acide vanillique	167.0467	7,876	12,80712071	0,15678769	/	0,249932659	/	/	/	2.291631	4.684182	1.338683	/
Acide syringique	197.0580	8,084	/	0,57604239	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Rutine	609.1718	9,239	49,59491579	/	Trace	/	Trace	/	/	Trace	12.5241	43.40549	0.09408
4-hydroxybenzaldehyde	121.0387	9,368	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace

Résultats et discussion

Polydatine	389.1429	9,641	Trace	Trace	/	/	Trace	/	/	Trace	Trace	0.613969	/
Acide ellagique	301.0151	9,689	Trace	/	Trace	/	/	/	/	/	Trace	Trace	/
Scutellarine	461.0937	9,737	Trace	Trace	/	/	/	/	/	Trace	Trace	Trace	/
Quercetine-3-β-D-glucoside	463.1092	9,769	206,7733471	/	Trace	Trace	Trace	/	/	Trace	44.48188	101.2224	0.981631
Naringine	579.1968	10,507	0,562991037	Trace	/	Trace	0,118742922	/	/	0.804042	0.221243	1.238249	Trace
Acide sinapique	223.0746	10,507	/	Trace	/	/	/	Trace	/	/	/	Trace	Trace
Acide ferulique	193.6240	10,587	/	/	/	/	//	/	/	/	/	/	/
Diosmine	607.1461	10,619	65,32428318	/	/	/	/	/	/	1.87347	10.47003	8.423528	6.916916
Taxifoline	303.0672	10,619	Trace	/	/	/	Trace	Trace	/	Trace	Trace	Trace	/
Hesperidine	609.2079	10,764	/	/	/	/	Trace	/	Trace	Trace	Trace	Trace	/
Apigetrine	431.1189	10,876	Trace	/	Trace	Trace	Trace	Trace	/	Trace	Trace	Trace	Trace
Neohesperidine	609.2083	11,085		/	/	/	Trace	/	Trace	Trace	/	Trace	/
Myricetine	317.0470	11,951	Trace	Trace	/	/	Trace	Trace	/	Trace	Trace	/	/
Baicaline	445.0982	12,048	/	Trace	/	/	Trace	/	/	Trace	/	Trace	Trace
Acide p-coumarique	163.0508	12,08	Trace	Trace	Trace	/	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
Fisetine	285.0560	12,112	/	/	/	/	/	/	/	Trace	/	Trace	/

Résultats et discussion

Acide protocatechique ethyl ester	181.0626	12,77	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
Morine	301.0516	13,01	22,58394717	/	/	0,431365469	0,810158069	0.845809	/	0.871524	3.83154	2.451609	2.210216
Resveratrole	227.0849	13,026	/	Trace	/	/	Trace	/	/	Trace	/	Trace	/
Acide salicylique	137.0344	13,123	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
Quercétine	301.0517	14,021	Trace	/	/	Trace	Trace	Trace	/	Trace	Trace	Trace	Trace
Silibinine	481.1364	15,08	/	Trace	/	/	/	/	/	Trace	/	/	/
Acide cinnamique	147.0552	15,16	16,72709064	0,208330068	0,44304756	0,317571884	0,519210329	/	0.606162	/	2.679158	/	1.703009
Apigenine	269.0613	15,642	/	Trace	Trace	/	Trace	/	Trace	Trace	/	/	/
Naringenine	271.0796	15,69	Trace	/	/	Trace	0,152168599	Trace	Trace	Trace	Trace	/	/
Caempferole	285.0564	15,693	/	/	Trace	/	Trace	/	/	Trace	/	/	/
Diosmetine	399.0725	16,123	/	/	/	/	4,569608235	Trace	Trace	Trace	/	/	/
Neochanine	267.0814	17,712	/	Trace	/	/	/	/	/	/	/	/	Trace
Eupatorine	343.1000	18,915	/	/	/	/	/	/	Trace	/	Trace	/	Trace
Wogonine	283.0768	19,782	/	/	/	/	/	/	/	Trace	Trace	/	/
Galangine	269.0611	20,263	/	/	/	Trace	/	/	/	Trace	/	/	Trace
Biochanin A	283.0769	20,536	/	/	/	/	/	/	/	Trace	/	/	/

III.5- Identification des constituants des fractions F6 et F9 par RMN

III.5.1- Etude de la fraction F6

La CCM de cette fraction a montré une tache majoritaire. La purification de ce composé a été effectuée par recristallisation. Il est soluble dans le méthanol mais insoluble dans tous les autres solvants. Il a été dissout dans le méthanol et laissé au repos, il se forme un précipité blanc. Après plusieurs lavages au méthanol, on obtient une poudre blanche correspondant au composé C1.

III.5.1.1- Identification du composé C1

L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C (Fig23-24) ont montré que le composé **C1** est un stéroïde.

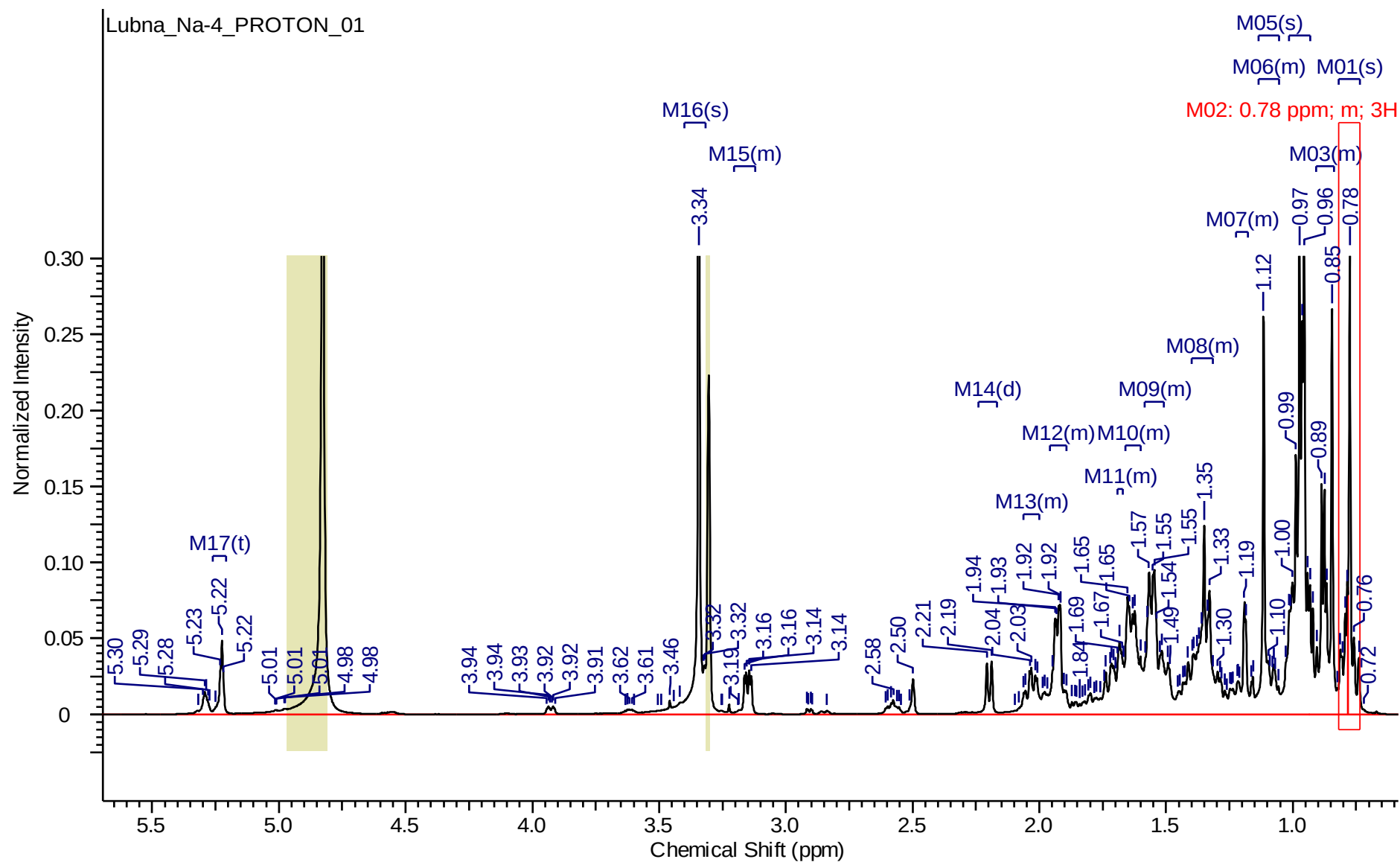


Figure 23 : Spectre RMN proton du composé C1.

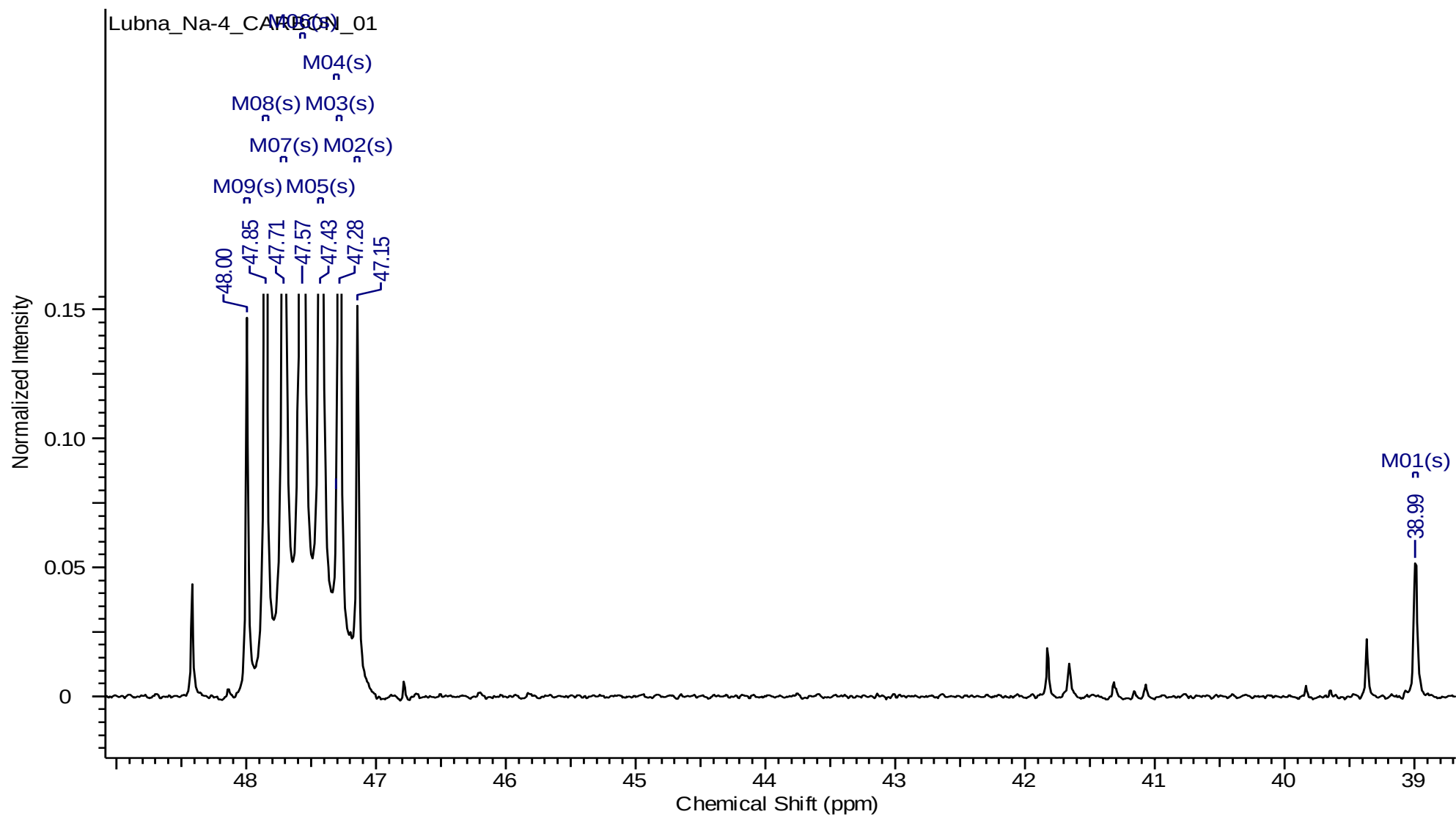


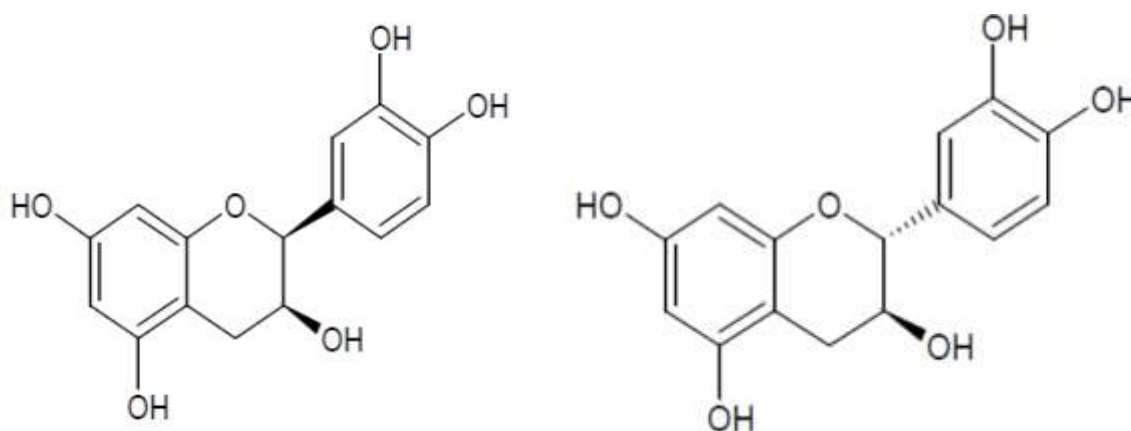
Figure 24: Spectre RMN carbone du composé C1.

III.5.2- Etude de la fraction F9

La CCM de cette fraction a montré des taches majoritaires. La séparation est effectuée sur une colonne de gel de silice comme phase stationnaire et en éluant avec un système solvant à gradient de polarité hexane/ acétate d'éthyle/ méthanol. La séparation et la purification sur cette colonne a permis l'isolement des composés C2; C3 et C4.

III.5.2.1- Identification des composés C2 et C3

Le spectre de masse et les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont montré que le composé C2 est un épicatechine et le composé C3 est un catéchine (Fig 25, 26, 27,28, 29).



C2 : (+)- Epicatechine.

C3 : (+)- Catéchine.

Figure 25 : les structures des composés C2 et C3.

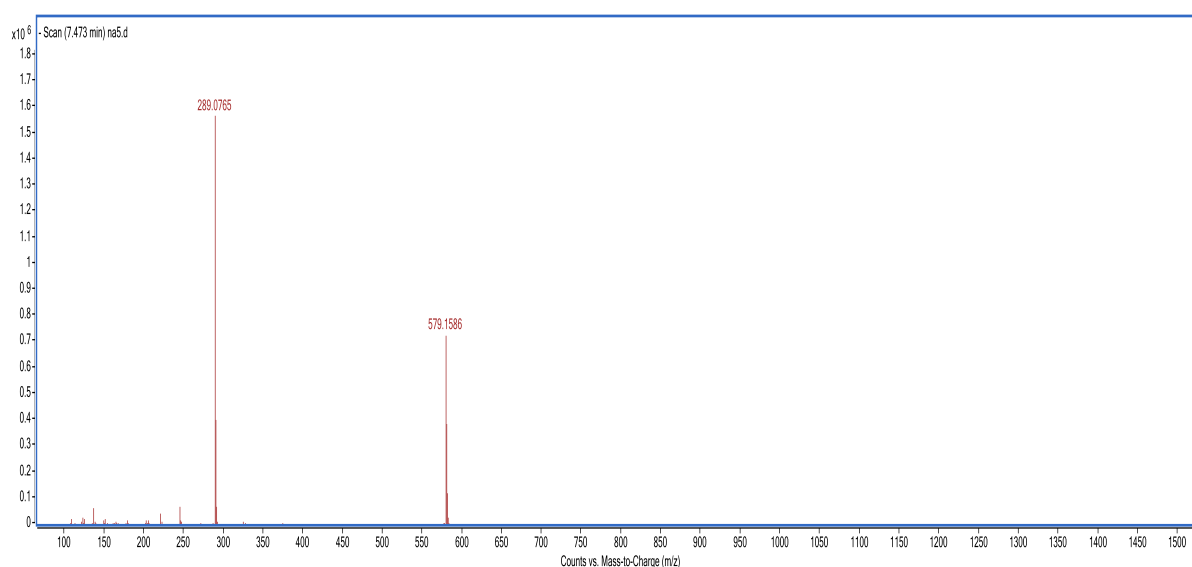


Figure 26 : le spectre MS de composé C2.

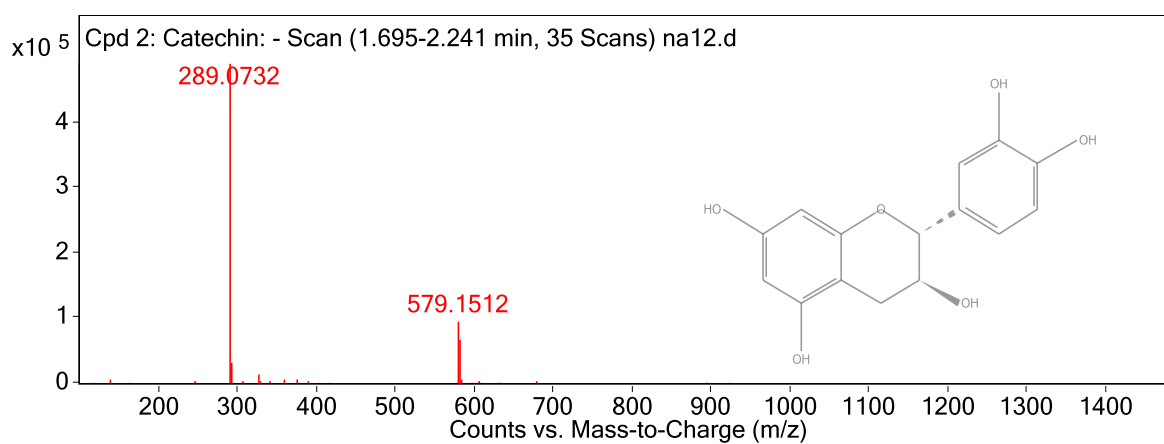


Figure 27 : le spectre MS de composé **C3**.

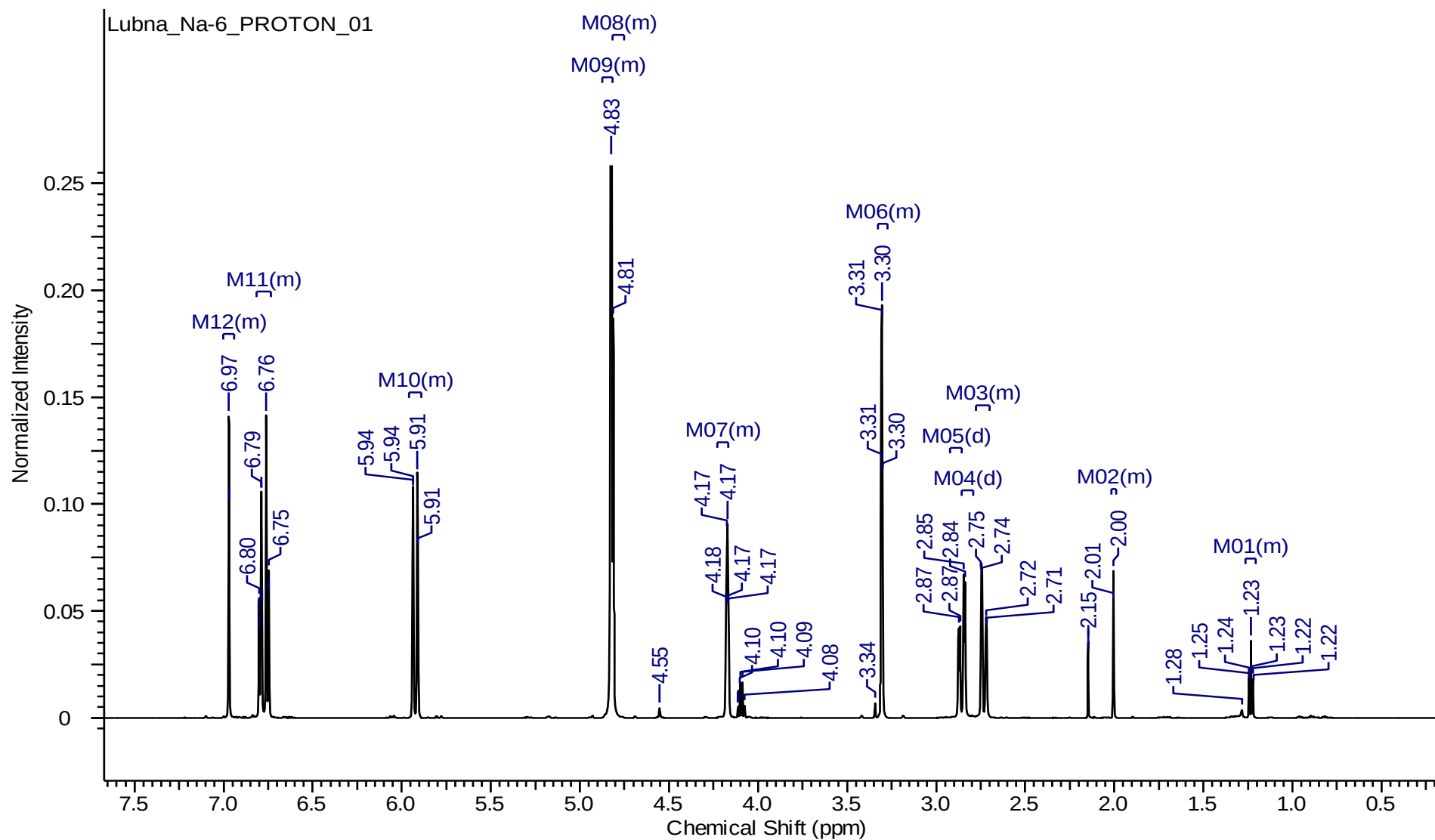


Figure 28 : le spectre RMN ^1H de composé C2.

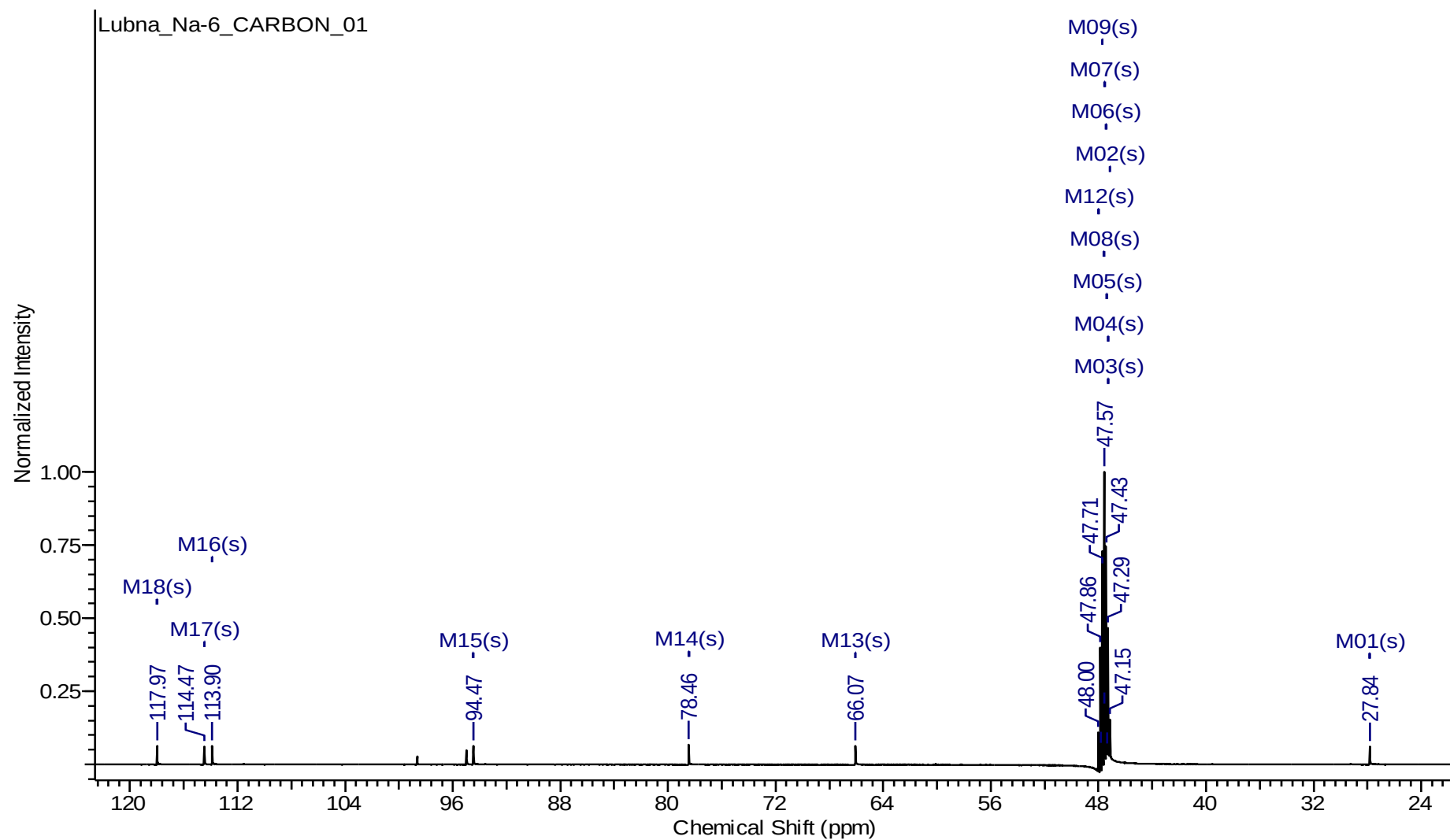


Figure 29 : le spectre RMN ^{13}C de composé **C2**.

III.5.2.2- Identification de composé C4

Selon le spectre de masse et les spectres de RMN ^1H et ^{13}C , le composé C4 est identifié comme eriodictyol (Fig 30, 31, 32, 33).

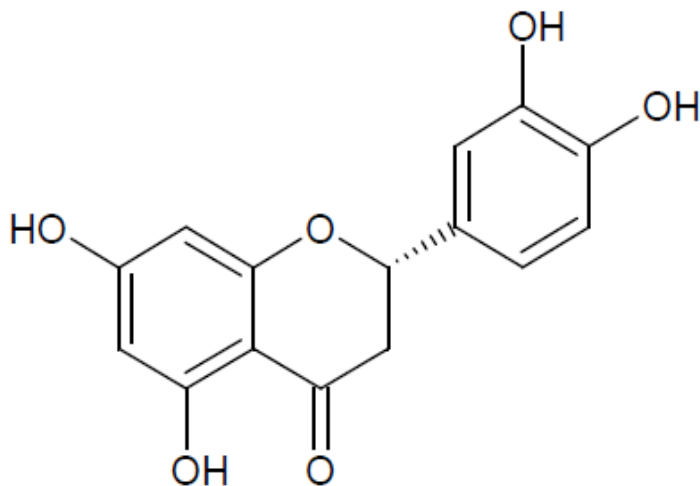


Figure 30 : la structure de composé **C4**.

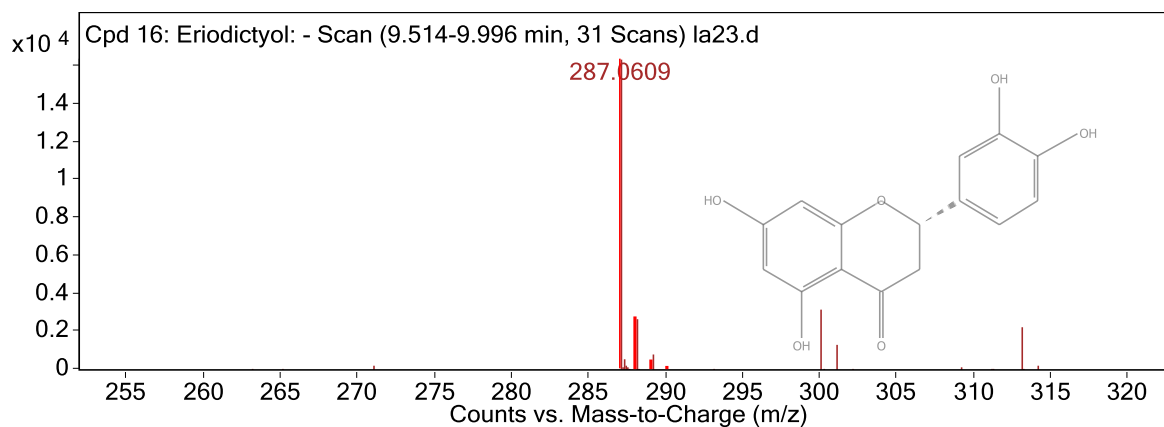


Figure 31 : le spectre MS de composé **C4**.

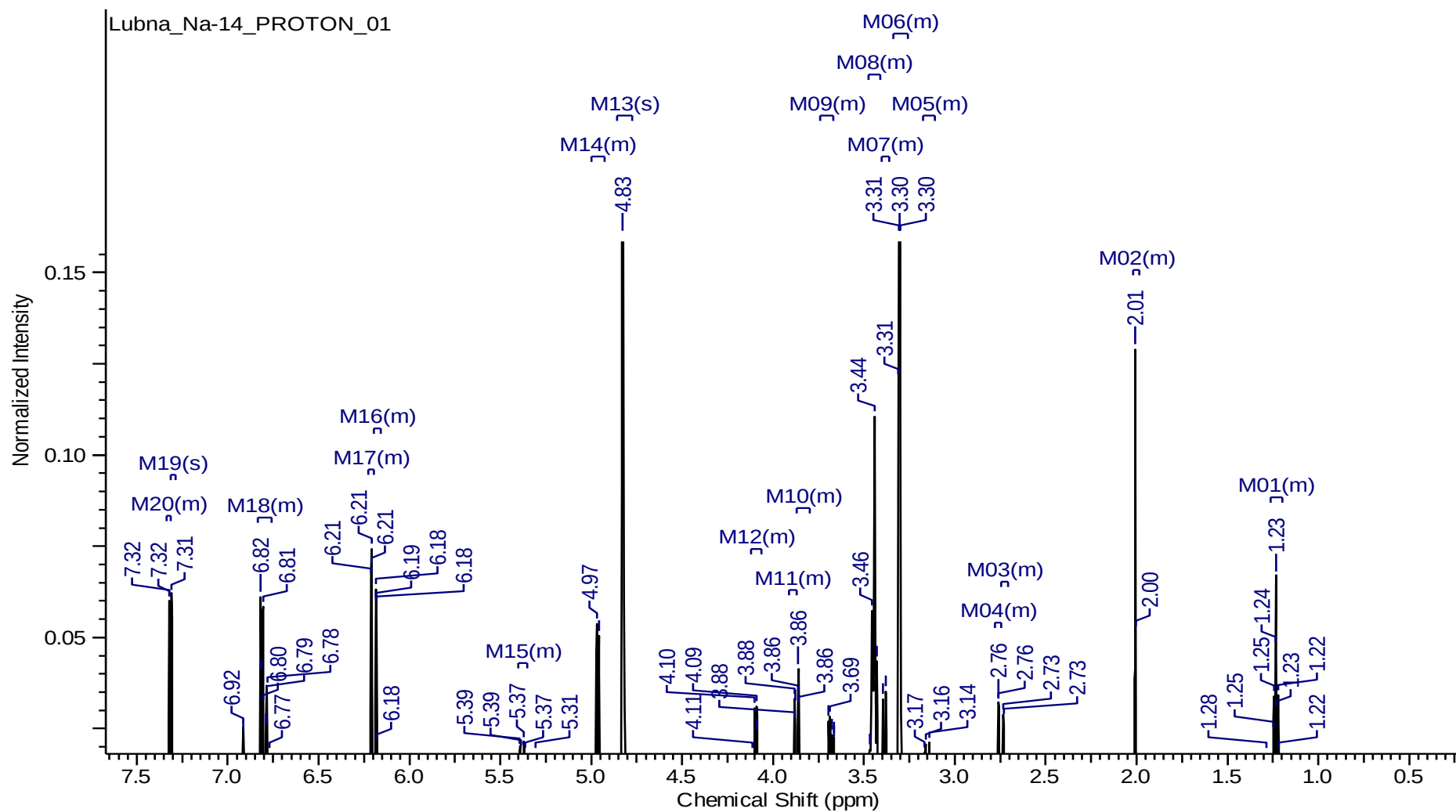


Figure 32 : le spectre RMN ^1H de composé **C4**.

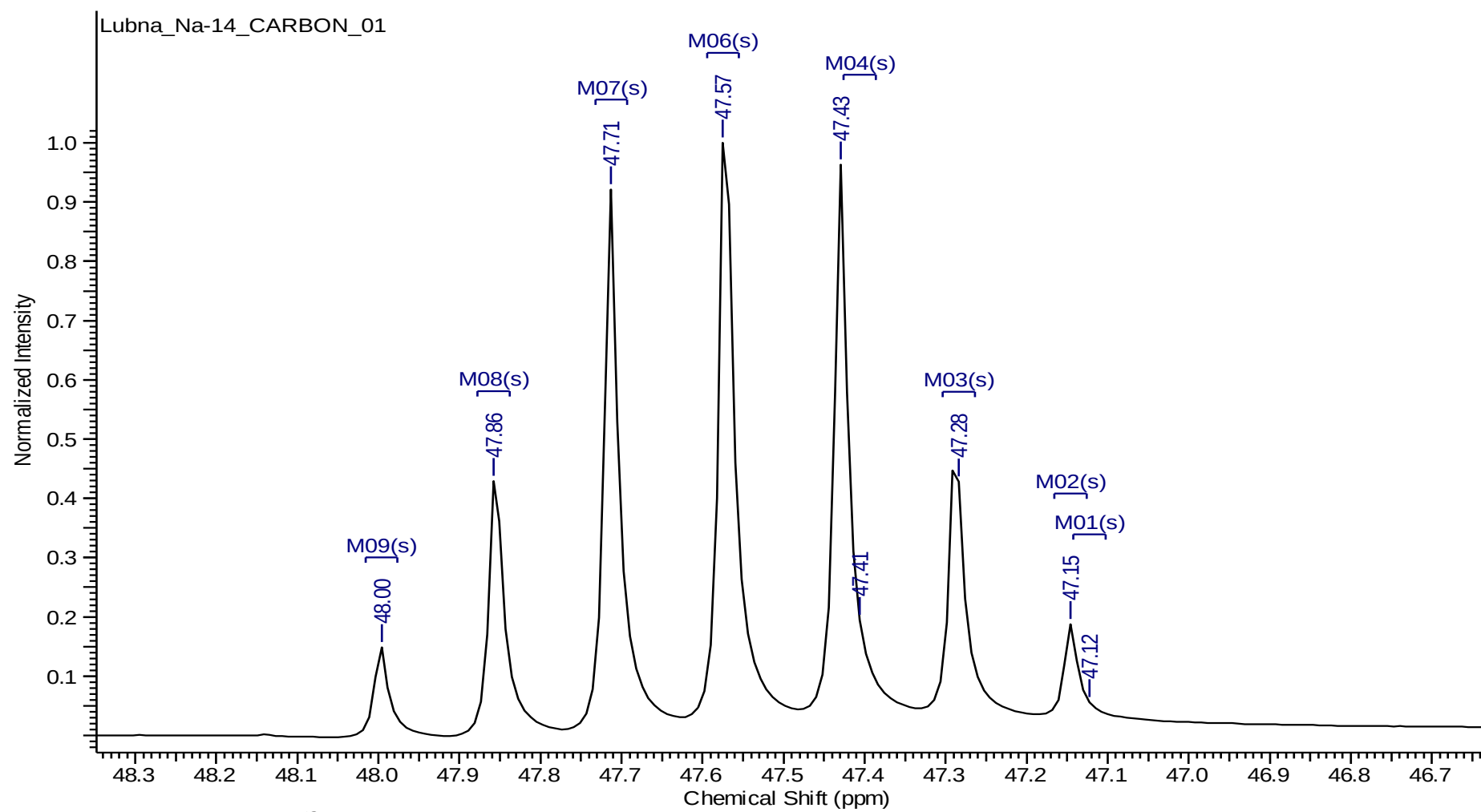


Figure 33 : le spectre RMN ^{13}C de composé C4.

IV-Activité antioxydante

IV.1-Test au DPPH

L'activité anti-radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée (Bortolomeazzi *et al.* 2007). L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est fonction de la concentration des différents extraits utilisés (0 à 200 µg/ml) ou du témoin BHT ou BHA (antioxydants de référence) (Fig.34).

L'activité anti-oxydante des extraits est exprimée en CI_{50} , elle définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% d'activité du radical DPPH[•]. La CI_{50} la plus faible présente l'activité la plus forte, elle est capable de récupérer les radicaux, en particulier les radicaux peroxydé qui sont les propagateurs d'auto-oxydation des molécules lipidiques et rompre ainsi la réaction en chaîne des radicaux libres. Ces CI_{50} sont déterminées graphiquement, elles sont de 43.37 ± 2.05 , 64.79 ± 1.07 et 106.49 ± 1.13 µg/ml pour les extraits aqueux des fleurs, feuilles et fruits respectivement, 17.47 ± 1.56 , 24.47 ± 0.51 et 37.23 ± 3.1 µg/ml pour les extraits de méthanol des fruits, feuilles et fleurs respectivement et 21.55 ± 0.68 , 39.55 ± 1.37 et 188.18 ± 3.79 µg/ml pour les extraits d'acétone des fruits, feuilles et fleurs respectivement (Fig.35 ; annexe IV). Parmi les extraits de *C. oxyacantha*, l'extrait de méthanol des fruits représente l'extrait le plus actif avec une CI_{50} de l'ordre de 17.47 ± 1.56 µg/ml, par contre l'extrait d'acétone des fleurs montre une très faible activité anti-radicalaire avec 188.18 ± 3.79 µg/ml. L'activité des extraits sont comprises entre celle du BHA ($CI_{50} = 14,12$ µg/ml) et celle du BHT ($CI_{50} = 41.65$ µg/ml) à l'exception des extraits aqueux des feuilles et des fruits d'une part et de l'extrait d'acétone des fleurs. Ces résultats suggèrent que les extraits contiennent des agents piègeurs de radicaux libres agissant comme antioxydants primaires.

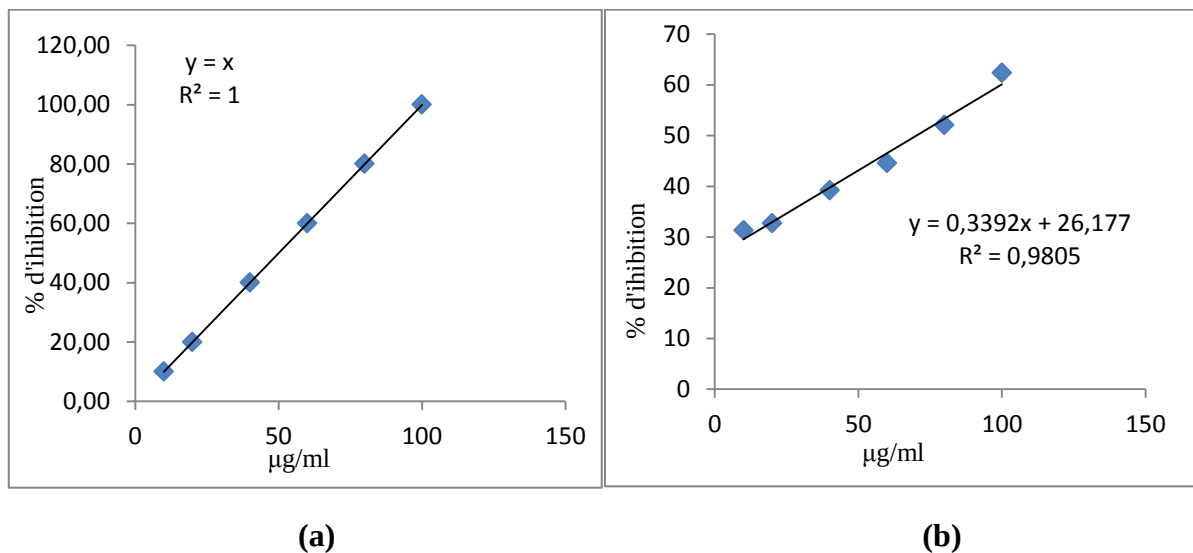
Les extraits de méthanol et d'acétone sont plus riches en polyphénols que les extraits aqueux et leur capacité de piéger les radicaux DPPH est plus élevée. L'identification des polyphénols par HPLC TOF/MS montre que les extraits de *C. oxyacantha* sont riches en plusieurs composés phénoliques comme l'acide chlorogénique, l'acide gentisique, rutine et l'acide gallique (Tab I; II ; III). Ces composés sont responsables de l'activité anti-oxydante et la différence dans les taux de chaque polyphénol engendre une différence dans l'activité.

Selon Turkmen *et al.* (2007) les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur structure chimique idéale. Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques devrait être prise en considération dans l'activité biologique (Bourgou *et al.*, 2008).

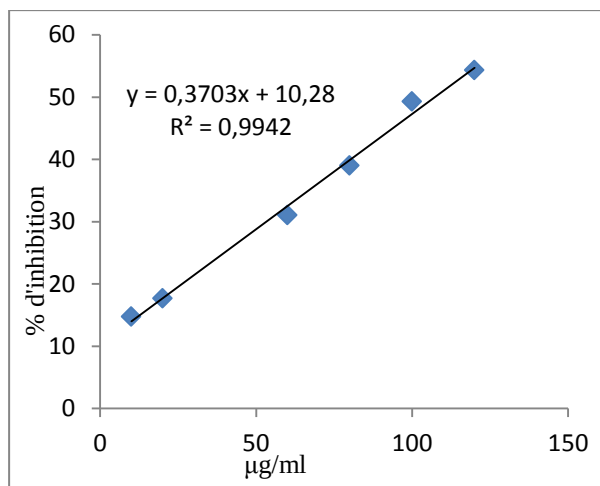
Si on compare nos résultats avec ceux de la bibliographie, on constate que l'activité de l'extrait de méthanol des fruits ($17.47 \pm 1.56 \mu\text{g/ml}$) est supérieure à celles trouvées par Mraihi *et al* (2013), soit des valeurs comprises entre 540 de 750 $\mu\text{g/ml}$.

Une étude menée par Giurescu Bedreag *et al.* (2014) sur un autre genre de *Crataegus* (*Crataegus pentagyna*) a montré une EC_{50} de $0.9 \pm 0.0 \text{ mg/ml}$ pour l'extrait des feuilles et $0.86 \pm 0.05 \text{ mg/ml}$ pour l'extrait des fleurs (extrait de méthanol), ces valeurs ont nettement inférieure de nos résultats.

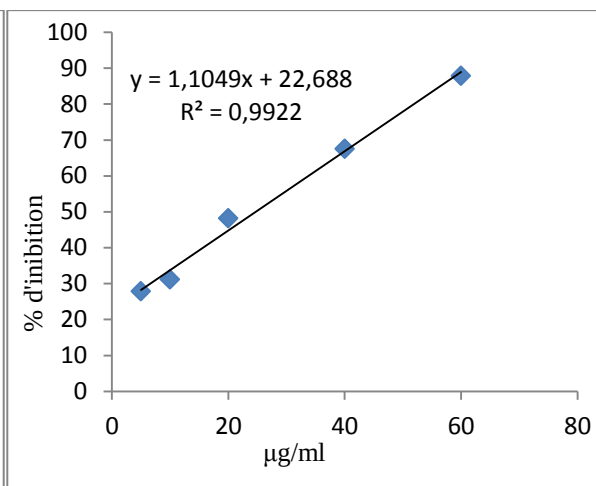
Kostic *et al.* (2012) ont montré que les fruits de *Crataegus* présentent pour l'extrait d'éthanol ($60.61 \pm 0.00 \%$), l'extrait d'éthanol-eau ($88.60 \pm 0.58 \%$), l'extrait de méthanol ($89.56 \pm 0.16 \%$), l'extrait de méthanol-eau ($89.89 \pm 0.22 \%$) et l'extrait aqueuse ($75.95 \pm 0.85 \%$) une forte activité anti-radicalaire (test au DPPH).



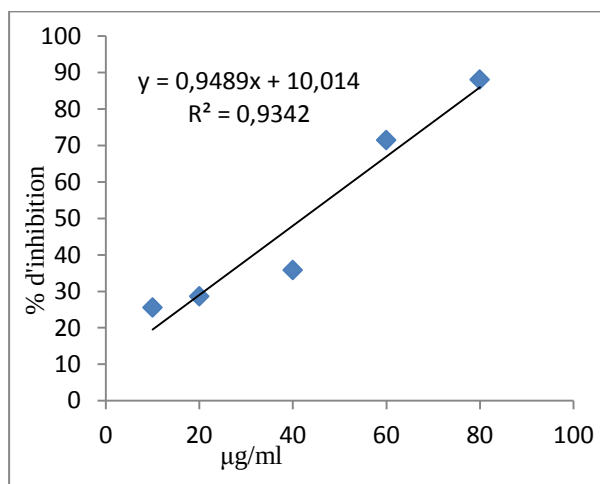
Résultats et discussion



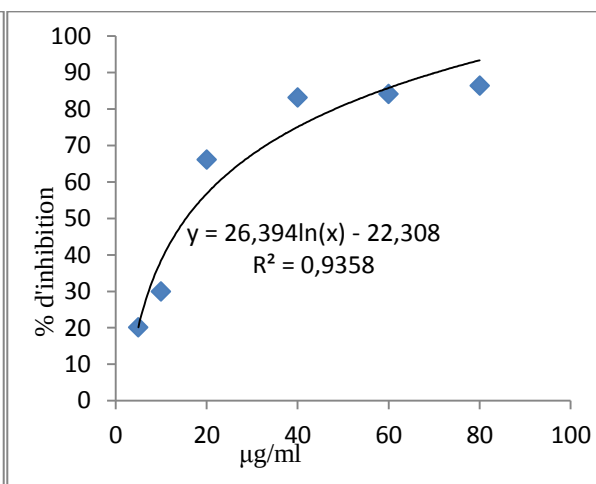
(c)



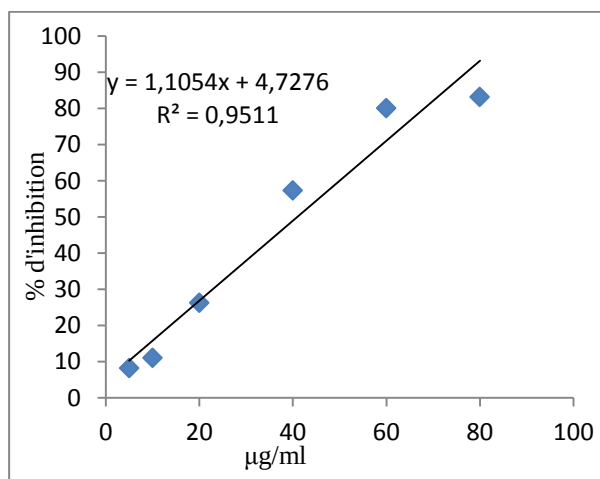
(d)



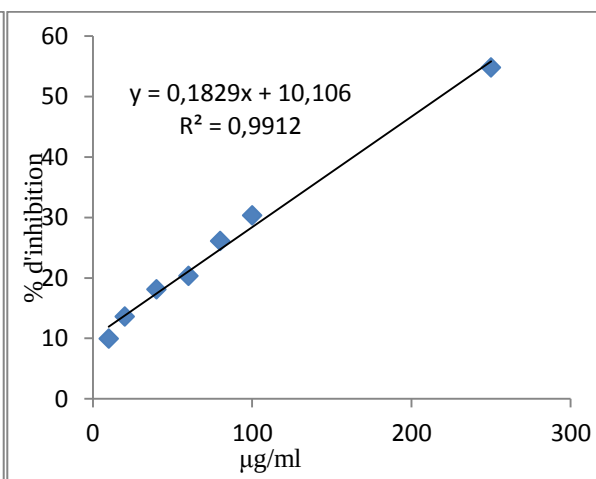
(e)



(f)



(g)



(h)

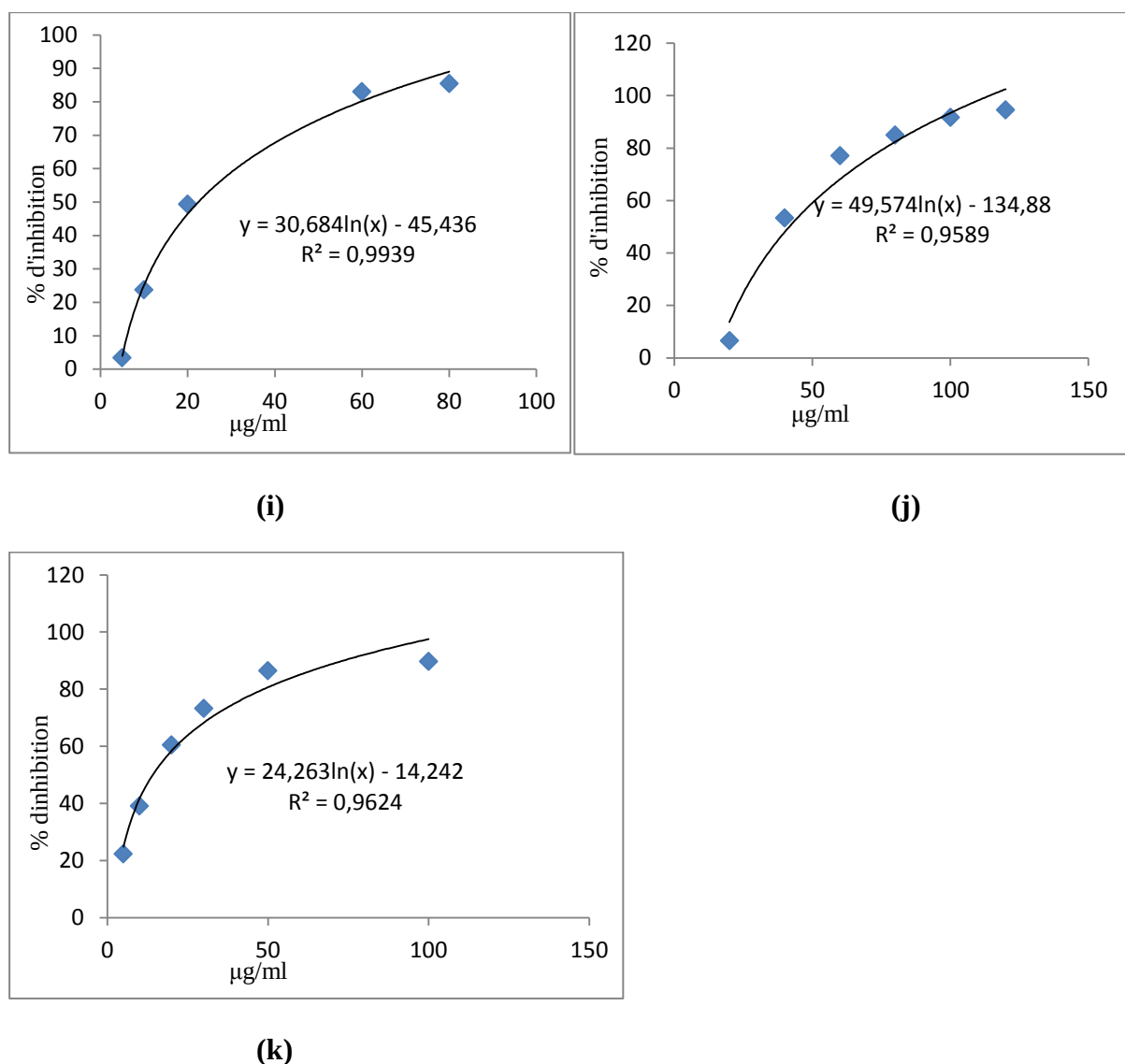


Figure 34: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration

- a) Ext aqueux de feuilles, b) Ext aqueuse fleur, c) Ext aqueuse fruit, d) Ext de méthanol feuille, e) Ext de méthanol fleur, f) Ext de méthanol fruit, g) Ext d'acétone feuille, h) Ext d'acétone fleur, i) Ext d'acétone fruits, j) BHT, k) BHA.

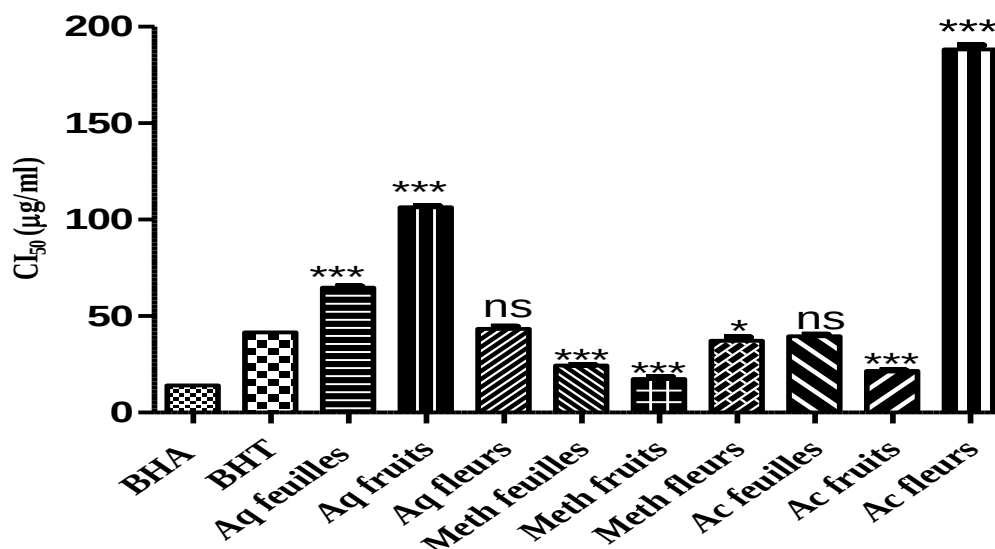


Figure 35: Activité anti-radicalaire des extraits de différentes parties de *C. oxyacantha* et des témoins positifs. Les valeurs sont la moyenne de trois essais $\pm$ SD. La comparaison est réalisée avec le BHT. ns: non significatif, *** : $P \leq 0,0001$, ** : $P \leq 0.05$, * : $P \leq 0.01$.

IV.2-Test de blanchissement du β - carotène

La capacité anti-oxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β - carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Miraliakbari et Shahidi (2008).

Les absorbances des milieux réactionnels en absence des extraits diminuent rapidement dans le temps, alors que l'ajout des extraits ou du BHA ralentit ce déclin.

Pour les extraits aqueux, l'extrait des fleurs a empêché la décoloration de β -carotène de façon significative par rapport des autres parties de la plante (Fig. 36).

Cependant pour les extraits de méthanol, la meilleure activité de blanchissement a été enregistrée dans l'extrait des fruits (Fig. 37).

Alors que, la meilleure activité de blanchissement des extraits d'acétone a été enregistrée dans l'extrait des feuilles (Fig. 38).

Ces résultats suggèrent que les extraits de *C. oxyacantha* ont une capacité considérable de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires.

L'activité anti-oxydante (% d'inhibition) la plus élevée est retrouvée dans l'extrait de méthanol des fruits et des feuilles avec des valeurs de 96.73% et 91.79% respectivement. Ces dernières sont proches de celle du BHA (92.4%), suivi par les extraits d'acétone et aqueux des feuilles avec des valeurs de 85.71% et 82.93% respectivement et des extraits aqueux et de méthanol des fleurs avec une des valeurs de 83.88% et 73.34% respectivement et en dernier lieu par les extraits d'acétone des fleurs et fruits et l'extrait aqueux des fleurs (69.92%, 66.33% et 51.68% respectivement) (Fig. 39 ; annexe III).

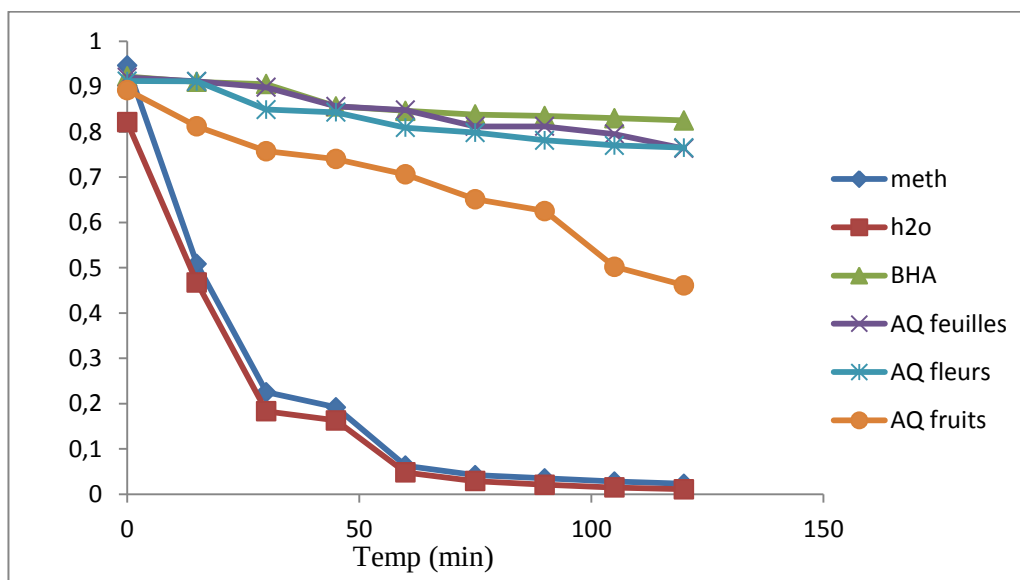


Figure 36 : Cinétique de blanchissement du β - carotène à 470 nm en absence et en présence des extraits aqueux de *C. oxyacantha* et du BHA.

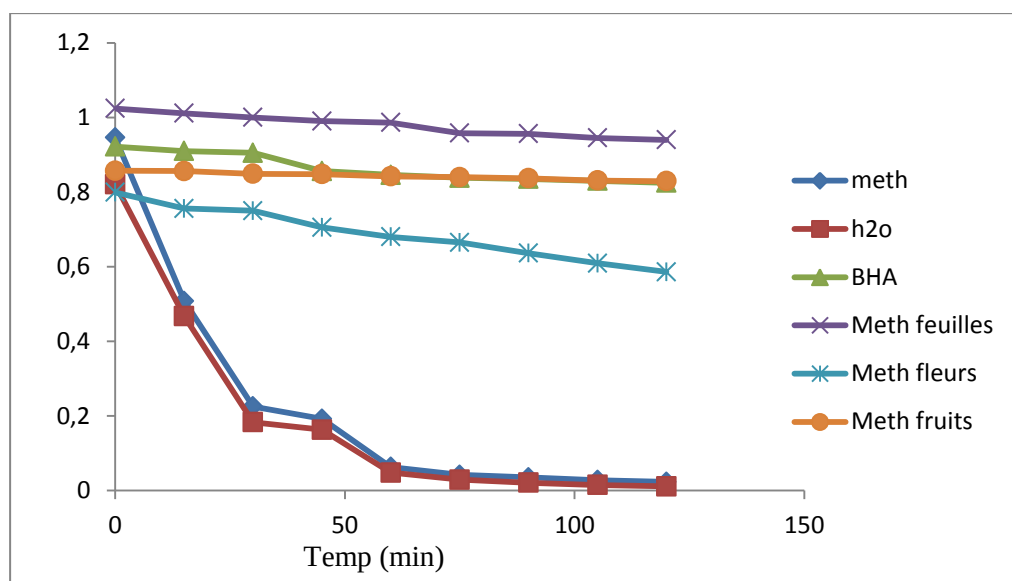


Figure 37 : Cinétique de blanchissement du β - carotène à 470 nm en absence et en présence des extraits de méthanol de *C. oxyacantha* et du BHA.

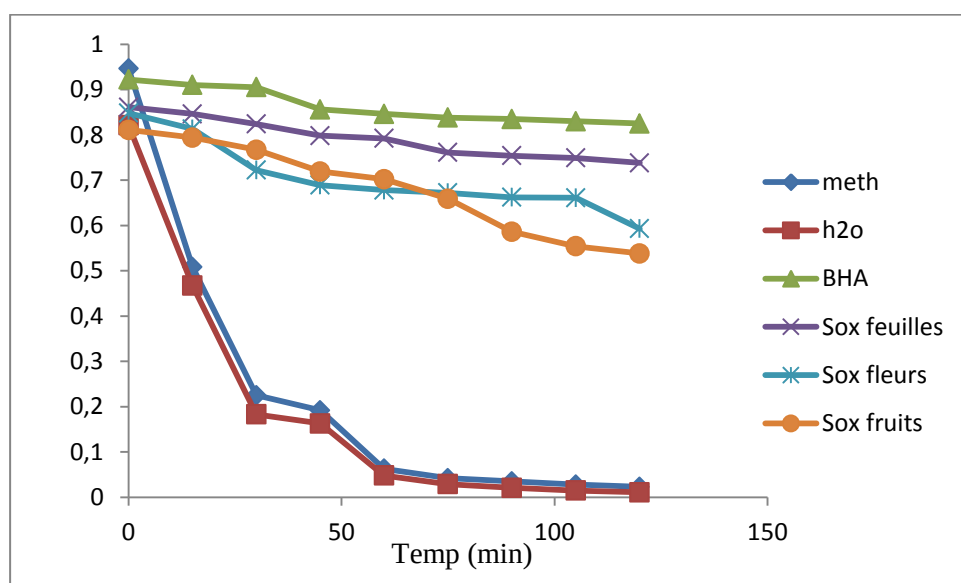


Figure 38 : Cinétique de blanchissement du β - carotène à 470 nm en absence et en présence des extraits d'acétone de *C. oxyacantha* et du BHA.

Si on compare les résultats de blanchissement du β -carotène avec ceux de la bibliographie, on constate que l'AA des extraits de méthanol (96,73%) et aqueux (51,68%) des fruits est bien supérieure à celle trouvée par Bouzid *et al.* (2011) soit 36.40% et 16.7% respectivement.

Nos résultats sont nettement supérieurs à ceux trouvés par Mraihi *et al.* (2013) sur les différentes parties des fruits de la même espèce récoltée à Jandouba (Tunisie) (AA% : le peler 28.94%, la pulpe 48.02% et la graine 82.23%).

Nos résultats sont proches aux résultats d'une étude réalisée par Bouaziz *et al.* (2014) sur les extraits aqueux et méthanolique des feuilles de *C. azarolus*.

Le niveau de corrélation entre le contenu phénolique et l'activité anti-oxydante est un aspect intéressant, mais il faut prendre en considération que les composés phénoliques répondent différemment dans l'analyse, selon le nombre de groupes phénoliques et que les composés phénoliques totaux n'incorporent pas nécessairement tous les antioxydants qui peuvent être présents dans un extrait (Tawaha *et al.* 2007).

Selon Frankel et Meyer (2000), le test de blanchissement du β -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau. Ces deux auteurs ont proposé que les antioxydants apolaires montrent des propriétés anti-oxydantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène.

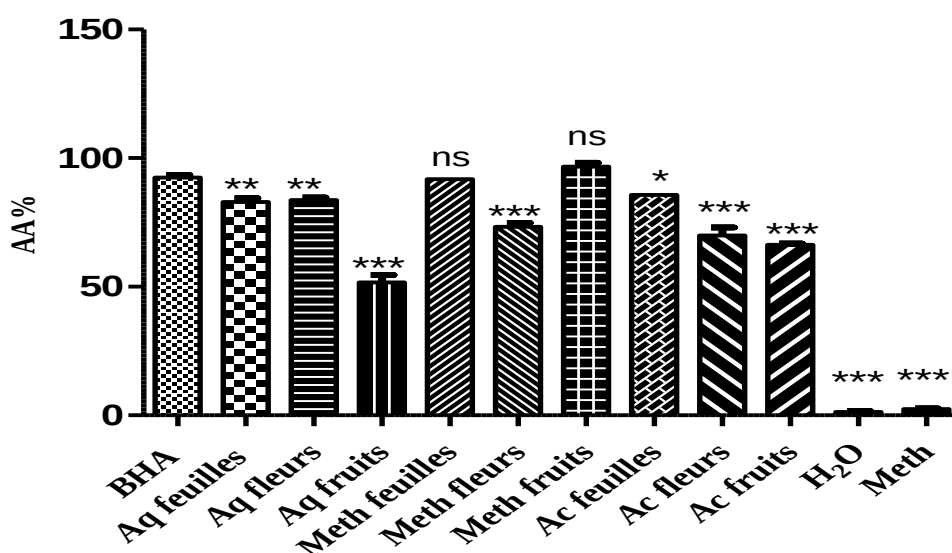


Figure 39: Activité antioxydante des extraits de *C. oxyacantha* L., de BHA et des contrôles négatifs dans le système β -carotène/acide linoléique. Les valeurs sont la moyenne de trois essais $\pm$ SD. La comparaison est réalisée avec le BHA. ns: non significatif, *** : $P \leq 0,0001$, ** : $P \leq 0,05$, * : $P \leq 0,01$.

IV.3- Chélation du fer ferreux

L'activité chélatrice des métaux est significative car elle réduit la concentration du métal de transition catalyseur dans la peroxydation lipidique par la réaction de Fenton (Hseu *et al.* 2008). L'absorbance du complexe Fe^{+2} -ferrozine diminue en fonction de la concentration des échantillons, c'est-à-dire que l'activité augmente en fonction cette concentration (Fig.40)

La chélation du fer ferreux par les extraits aqueux, de méthanol et d'acétone a été évaluée en utilisant la méthode utilisant la férrozine. Cette dernière forme un complexe avec les ions Fe^{2+} libres. C'est la raison pour laquelle une diminution de l'absorbance du complexe Fe^{2+} -férrozine indique la présence d'antioxydants chélateurs (Le *et al.*2007).

En fait, la réaction est affectée à la fois par les constantes de formation des deux complexes: antioxydant- Fe^{2+} et férrozine- Fe^{2+} et donc par la compétition entre les deux chélateurs. Néanmoins, cette réaction sert d'essai convenable pour la détermination de l'activité chélatrice d'un agent antioxydant (Le *et al.*2007).

Les valeurs de CI_{50} obtenues à partir des courbes des pourcentages d'inhibitions en fonctions des concentration (Fig. 40) sont 1215, 1400.71 ± 4.09 et 1409 $\mu\text{g/ml}$ pour les extraits aqueux des fruits, feuilles et fleurs respectivement, 530, 589.41 et 646.18 $\mu\text{g/ml}$ pour les extraits de méthanol des fruits, fleurs et feuilles respectivement et 660.29, 980 et 1321 pour les extraits d'acétone des feuilles, fleurs et fruits respectivement (fig.41 ; annexe III). Nous remarquons que les extraits de méthanol possèdent une forte activité chélatrice par rapport aux autres extraits, suivi par les extraits d'acétone et en fin les extraits aqueux. L'activité élevée des extraits de méthanol peut être due à la grande quantité de polyphénols et de flavonoïdes.

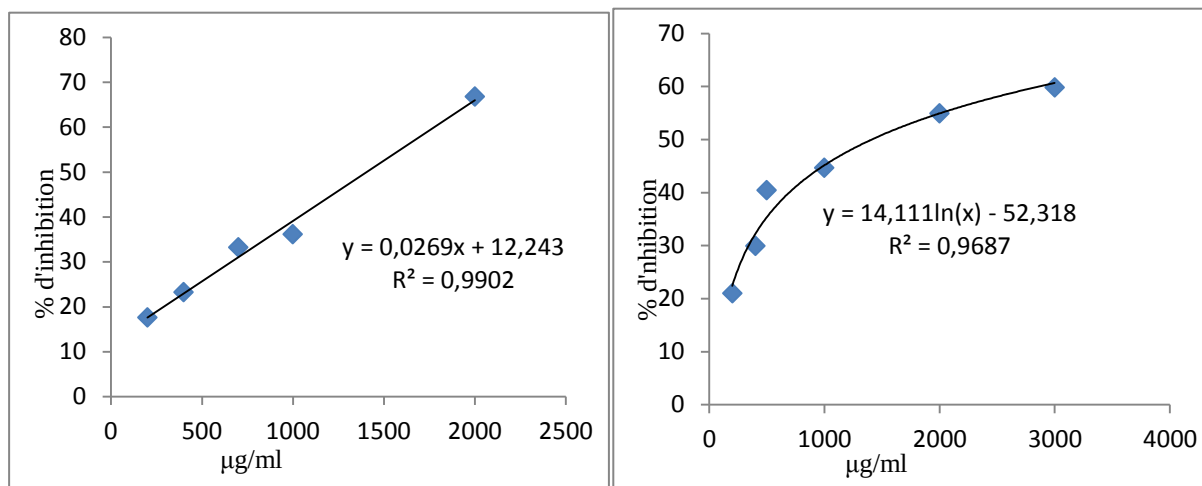
Il est clair que, les valeurs de CI_{50} des extraits pour cette activité sont supérieurs que celle obtenu par l'EDTA ; ces résultats sont cohérents avec les résultats de littératures. Plusieurs études ont rapporté que l'activité chélatrice des métaux joue un rôle mineur dans les activités antioxydants globales de certains polyphénols et la capacité de ces composés était bien inférieure à celle d'EDTA (Rice-Evans *et al.* 1996 ; Andjelkovic *et al.* 2006)

Giurescu Bedreag *et al.* (2014) montrent que les extraits de méthanol des feuilles ($\text{CI}_{50}=1.3 \pm 0.0 \text{ mg/ml}$) et des fleurs ($\text{CI}_{50}=1.9 \pm 0.0 \text{ mg/ml}$) de *Crataegus pentagyna* ont une activité chélatrice proche de celle obtenue par Ebrahimzadeh et Bahramain (2009) sur les fruits ($\text{CI}_{50}=1.8 \pm 0.01 \text{ mg/ml}$) de la même espèce. Bien que les valeurs de ces CI_{50} sont

Résultats et discussion

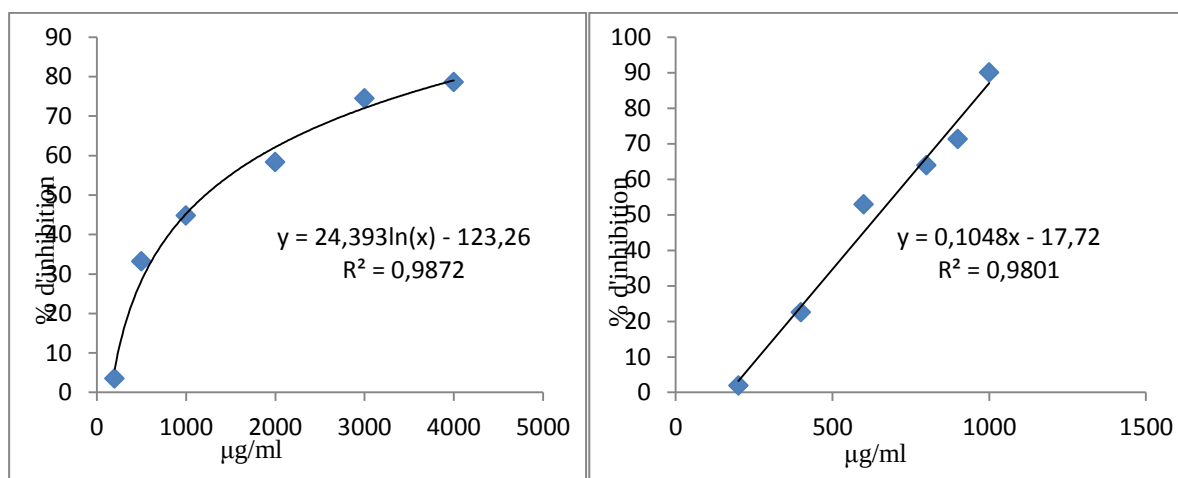
supérieures aux nôtres. Toutefois Il faut souligner qu'il ne s'agit ni de la même espèce ni du même protocole d'extraction pour expliquer l'écart observé.

Plusieurs rapports ont montré que la capacité anti-oxydante des matériaux végétaux est bien corrélé avec leur teneur en flavonoïdes et en phénol (Velioglu *et al.* 1998 ; Li *et al.* 2008).



(a)

(b)



(c)

(d)

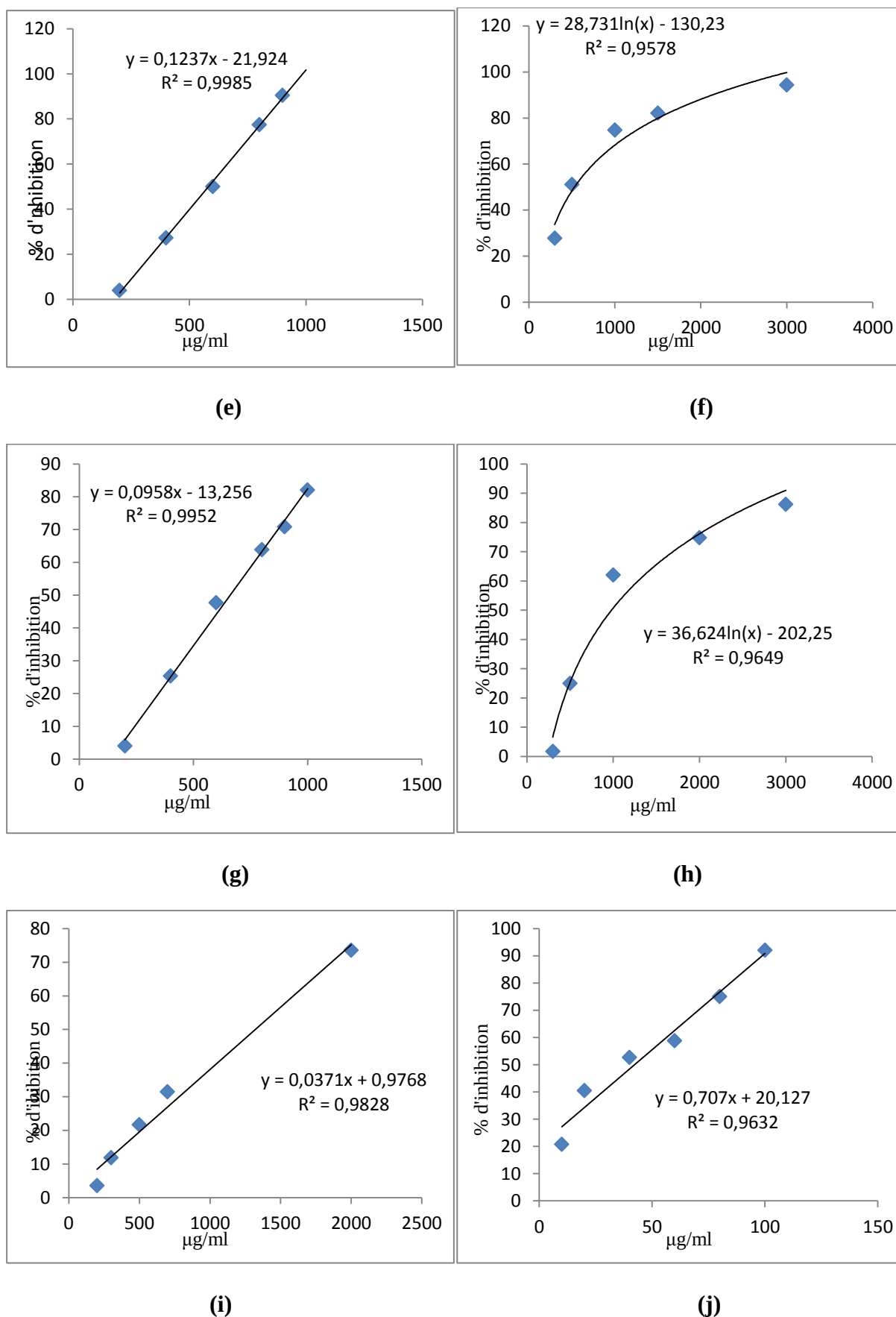


Figure 40 : Variation de chélation du fer ferreux en fonction de la concentration

- a) Ext aqueux feuille, b) Ext aqueux fleur, c) Ext aqueux fruit, d) Ext de méthanol feuille, e) Ext de méthanol fleur, f) Ext de méthanol fruit, g) Ext d'acétone feuille, h) Ext d'acétone fleur, i) Ext d'acétone fruits, j) EDTA.

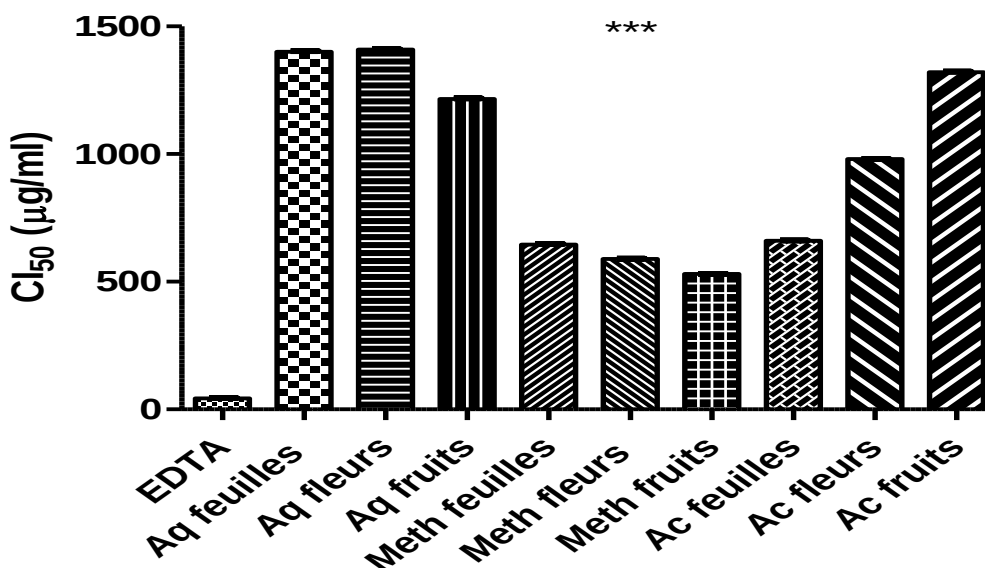


Figure 41: l'activité chélatrice des extraits de différente partie de *C. oxyacantha*. Les valeurs sont la moyenne de trois essais $\pm$ SD. La comparaison est réalisée avec l'EDTA *** : $P \leq 0,0001$.

IV.4- Pouvoir réducteur

La capacité de donation d'électrons dans une réaction d'oxydoréduction peut être aussi utilisée dans la mesure de l'activité antioxydante d'un composé. Cette capacité de donation d'électrons est appelée pouvoir réducteur (Meir *et al.* 1995 ; Gülçin *et al.* 2003). Le pouvoir réducteur des extraits est mesuré dans cette étude par la réduction directe de $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6^-$ en une forme ferreuse $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6^{4-}$ qui est déterminée par la détection spectro-photométrique du complexe $(\text{Fe}^{3+})_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3$ ayant une forte absorption à 700 nm. La couleur jaune du milieu réactionnel change en vert dont l'intensité est fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié (Zou *et al.* 2004).

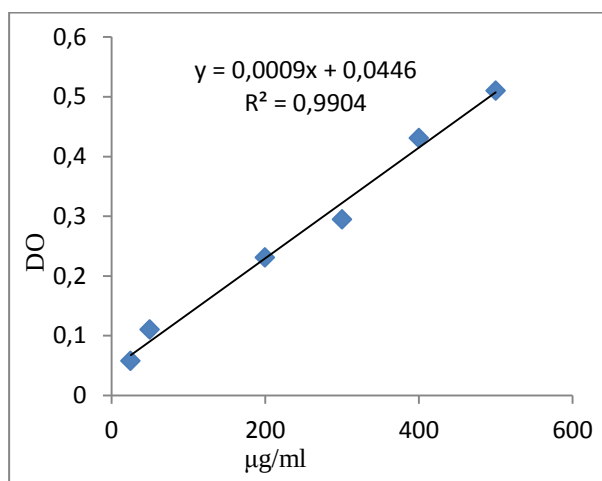
Le pouvoir réducteur d'extraits bruts et témoins positifs de *C. oxyacantha* est proportionnel à la concentration (Fig. 42). L'extrait d'acétone des fruits a montré le plus fort pouvoir réducteur ($\text{EC}_{50} = 49.16 \pm 1.66 \mu\text{g} / \text{ml}$) suivi par les extraits de méthanol des fruits, fleurs et feuilles avec une EC_{50} de 90.87 ± 0.54 , 94.05 ± 0.97 et $98.94 \pm 0.95 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Les extraits d'acétone possèdent un faible pouvoir réducteur

comparativement aux extraits des fruits (valeurs EC_{50} entre 143.93 ± 1.29 et $500 \pm 2.87 \mu\text{g/ml}$). Les extraits aqueux ont montré un pouvoir réducteur considérablement moins efficace que les autres extraits (Fig.43 ; annexe III).

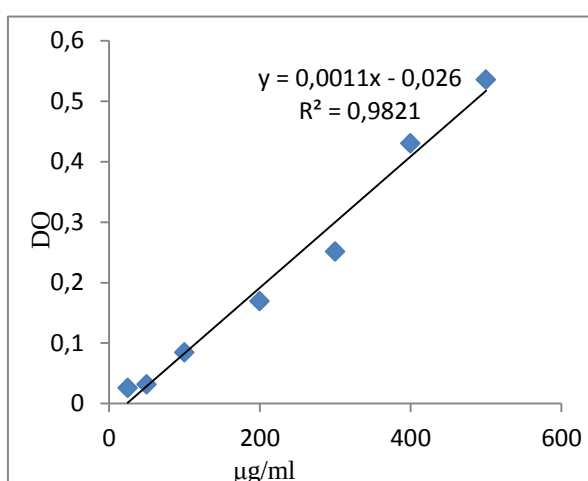
L'acide gallique et le BHA ont montré un fort pouvoir réducteur avec une valeur EC_{50} de 32.83 ± 0.45 et $41.41 \pm 0.51 \mu\text{g/ml}$, respectivement.

Dans une étude réalisée par Bouaziz *et al.* (2014) sur les feuilles de *C. azarolus*, le pouvoir réducteur des extraits de méthanol ($1.262 \pm 0.09 \text{ mg/ml}$) sont nettement supérieure à nos résultats. Tandis que les extraits aqueux ($0.558 \pm 0.05 \text{ mg/ml}$) sont proches.

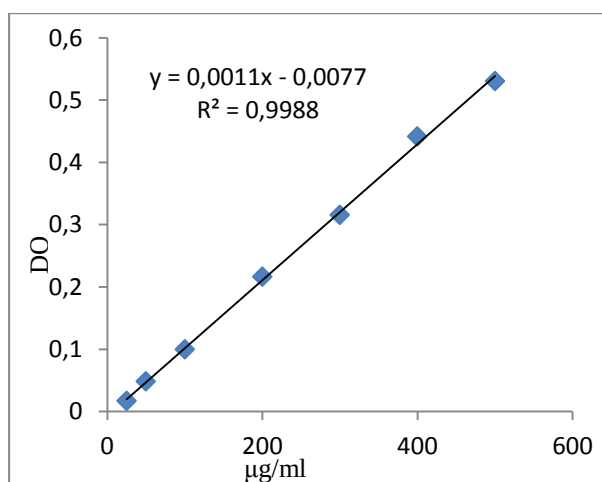
En regard de pouvoir réducteur, les pouvoirs les plus élevés pourraient être attribués à des quantités plus élevées de composés phénoliques et flavonoïde totaux et le pouvoir réducteur d'un composé peut refléter son potentiel antioxydant (Lee *et al.* 2007).



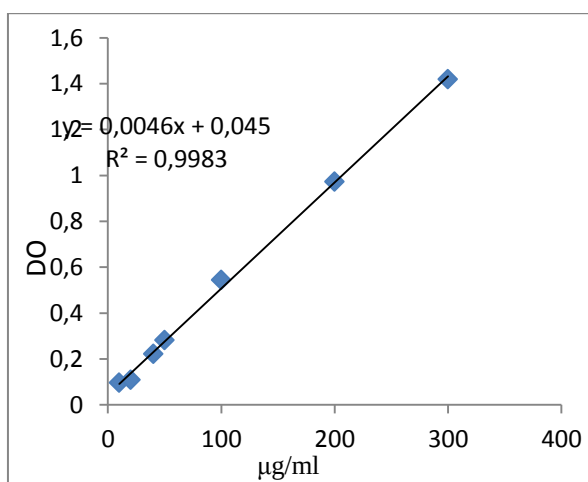
(a)



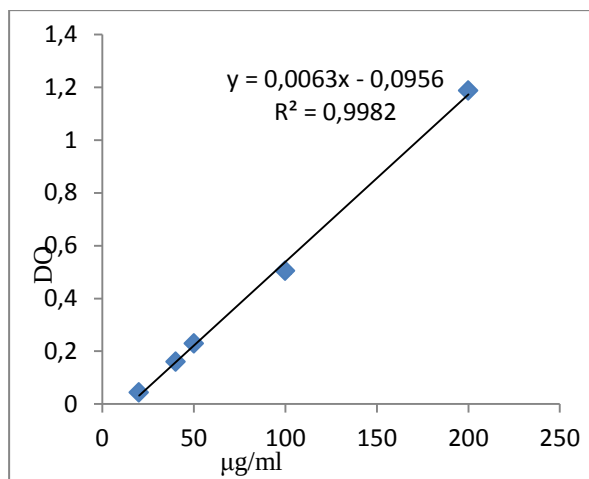
(b)



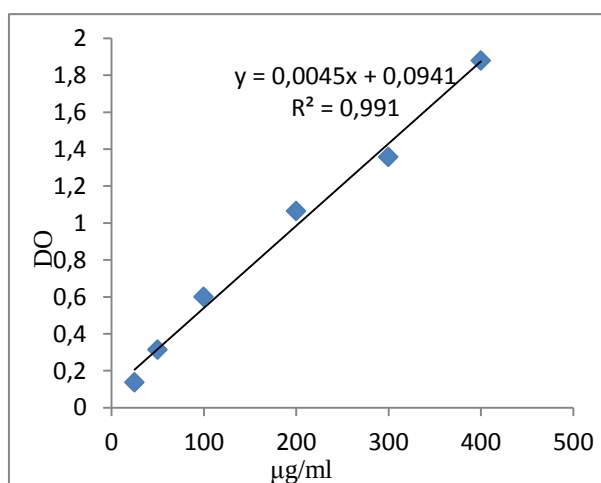
(c)



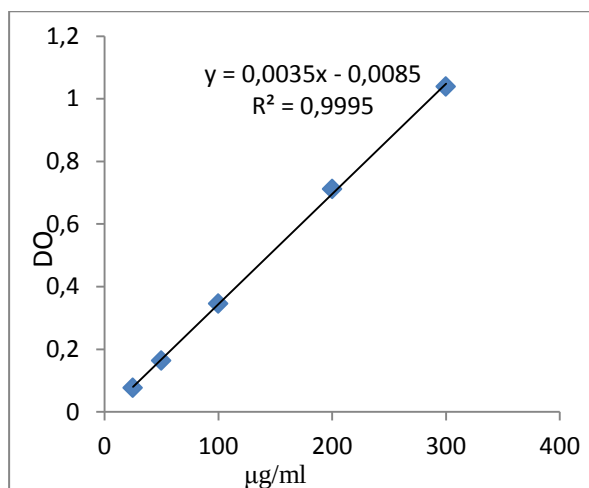
(d)



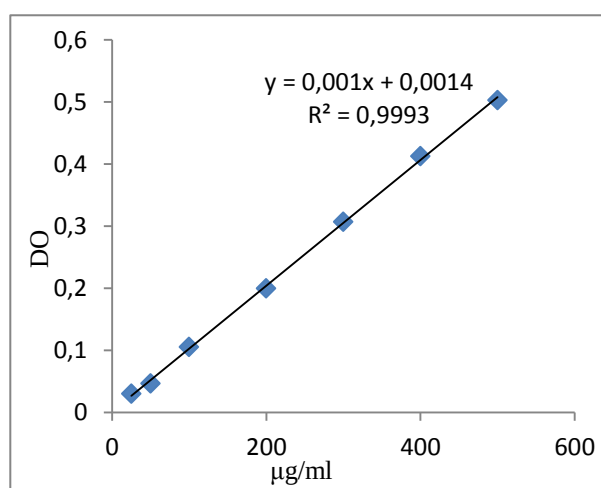
(e)



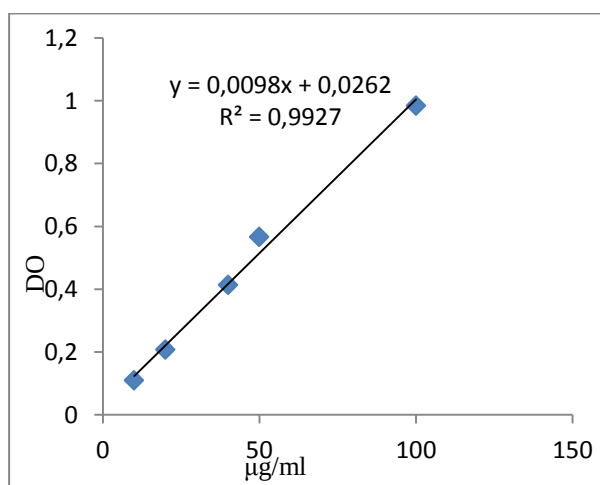
(f)



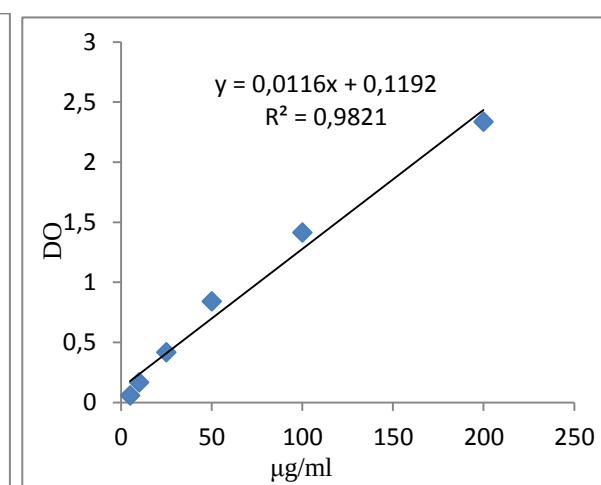
(g)



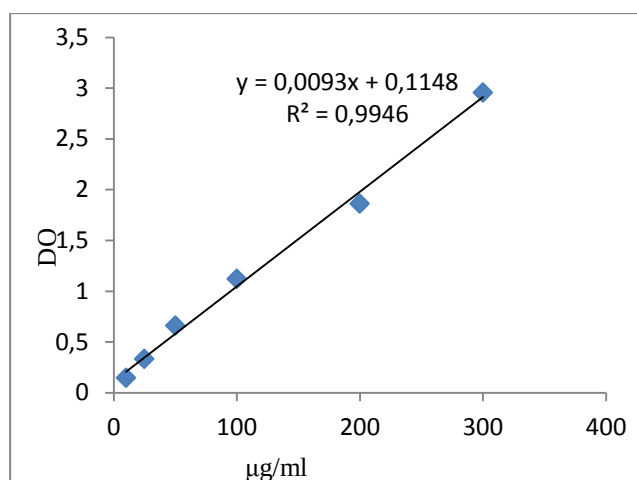
(h)



(i)



(j)



(k)

Figure 42 : Variation de pouvoir réducteur en fonction de la concentration

- a) Ext aqueux feuille, b) Ext aqueux fleur, c) Ext aqueux fruit, d) Ext de méthanol feuille, e) Ext de méthanol fleur, f) Ext de méthanol fruit, g) Ext d'acétone feuille, h) Ext d'acétone fleur, i) Ext d'acétone fruits, j) acide gallique, k) BHA.

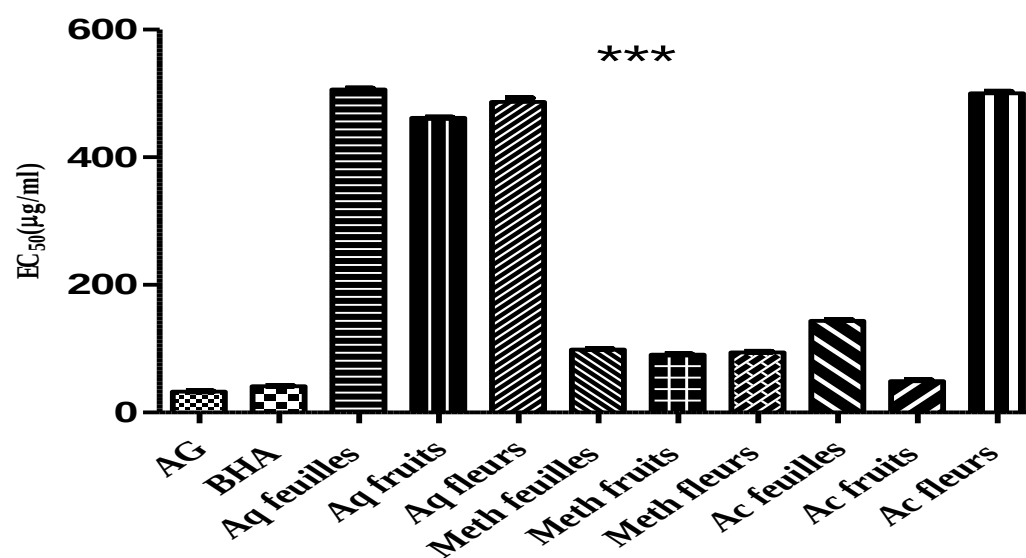


Figure 43 : Le pouvoir réducteur des extraits des différentes parties de *C. oxyacantha*. Les valeurs sont la moyenne de trois essais $\pm$ SD. La comparaison est réalisée avec le BHA et l'AG. *** : $P \leq 0,0001$.

V- Activité antiproliférative

L'activité antiproliférative des extraits et du témoin positif a été déterminée vis-à-vis des lignées cellulaires A549 et HeLa en utilisant le test de prolifération BrdU ELISA. Des concentrations croissantes (25, 50, 100 et 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$) des extraits de la plante et du 5-FU ont été choisies pour cette étude.

Les activités antiprolifératives des extraits aqueux, de méthanol et d'acétone de différentes parties de *C. oxyacantha* contre la lignée cellulaire A549 sont illustrées dans la Figure 44.

Pour la concentration 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la majorité des extraits n'ont pas produit d'effets antiprolifératifs sur la lignée cellulaire A549. L'extrait d'acétone des fruits possède la plus faible activité. L'extrait des feuilles du même solvant a manifesté une activité de 37.28%.

Pour les concentrations 50 et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tous les extraits montrent une activité antiproliférative sauf l'extrait aqueux des fleurs et l'extrait d'acétone des fruits. Les extraits de méthanol des feuilles et des fruits et l'extrait d'acétone des feuilles ont donné une forte activité par rapport aux autres extraits et une activité moyenne par rapport au témoin positif.

Les capacités d'inhibitrices de chaque extrait et du 5-FU à une concentration de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ est dans l'ordre décroissant suivant : extrait de méthanol des fruits > extrait de méthanol des feuilles > 5-FU > extrait aqueux des fruits > extrait d'acétone des feuilles > extrait aqueux des fleurs > extrait aqueux des feuilles > extrait de méthanol des fleurs > extrait d'acétone des fleurs > extrait d'acétone des fruits.

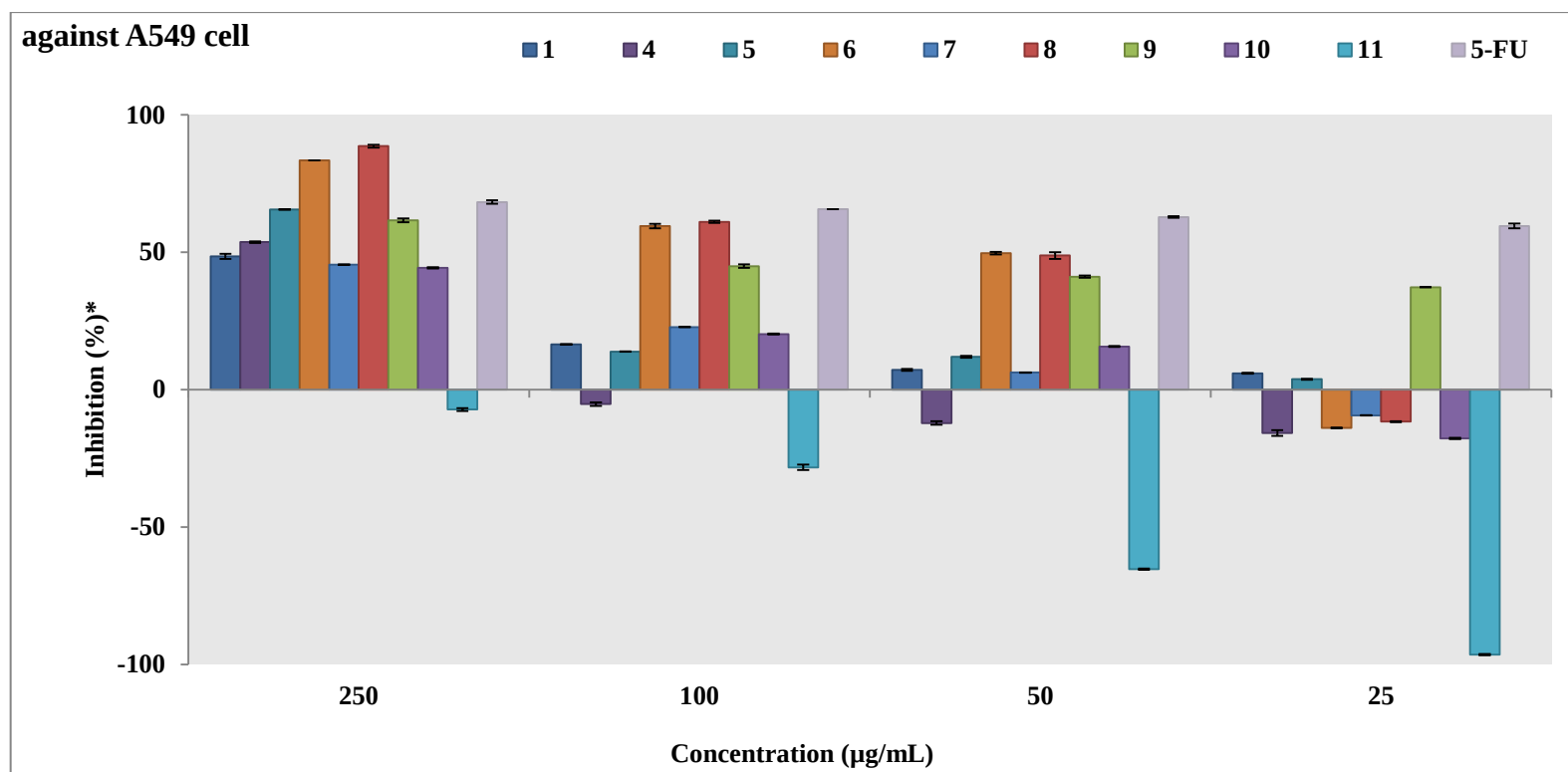


Figure 44: L'activité antiproliférative des extraits de différentes parties de *C. oxyacantha* et du témoin positif (5-FU) vis-à-vis la lignée cellulaire A549. Les valeurs sont la moyenne de trois essais $\pm$ SD.

1 : l'extrait aqueux des feuilles, 2 : l'extrait aqueux des fruits, 3 : l'extrait aqueux des fruits, 4 : l'extrait de méthanol des feuilles, 5 : l'extrait de méthanol des fleurs, 6 : l'extrait de méthanol des fruits, 7 : l'extrait d'acétone des feuilles, 8 : l'extrait d'acétone des fleurs, 9 : l'extrait d'acétone des fruits.

Il a été observé une activité positive des extraits aqueux, de méthanol et d'acétone de différentes parties de *C. oxyacantha* et de témoin positif contre la lignée cellulaire HeLa à toutes les concentrations testées (Fig. 45).

A la concentration minimale 25 µg/ml, nous avons constaté que la faible activité est enregistrée dans l'extrait d'acétone des fruits avec un pourcentage d'inhibition de 6.07% et la plus forte activité est enregistrée dans l'extrait aqueux des feuilles avec un pourcentage d'inhibition de 63.61%.

Pour la concentration 50 µg/ml, la faible activité est remarquée chez l'extrait d'acétone des fleurs avec un pourcentage d'inhibition de 11.39%. Le pourcentage la plus élevé est enregistré dans l'extrait aqueux des feuilles avec une valeur de 71.23%.

Pour la concentration 100 µg/ml, nous avons remarqués que l'extrait d'acétone des fleurs et celui des fruits possèdent la même activité et qui est plus faible que celles des autres extraits. Les extraits d'acétone et de méthanol des feuilles et l'extrait de méthanol des fruits possèdent la meilleure activité, elle est proche de celle du témoin positif (5-FU).

A la forte concentration, l'extrait de méthanol des fruits et l'extrait d'acétone des feuilles ont développé une activité élevée par rapport à 5-FU. L'extrait de méthanol des feuilles a développé la même activité que celle du 5-FU, alors que les autres extraits se sont révélés avoir une activité très importante contre la lignée cellulaire HeLa. Tous les extraits ont montré une activité sélective des cellules contre la lignée cellulaire HeLa, en particulier l'extrait d'acétone des fruits.

La comparaison des activités des extraits sur la lignée cellulaire A549 avec celles sur la lignée cellulaire HeLa, révèle que la lignée cellulaire HeLa est plus sensible que A549. L'extrait d'acétone des fruits présente la plus faible activité sur toutes les lignées cellulaires et à toutes les doses étudiées. Tous les autres extraits possèdent une activité considérable, en particulier à la forte concentration (250 µg/ml). L'extrait de méthanol des fruits a une activité supérieure à celle de 5-FU vis-à-vis des deux lignées cellulaires testées.

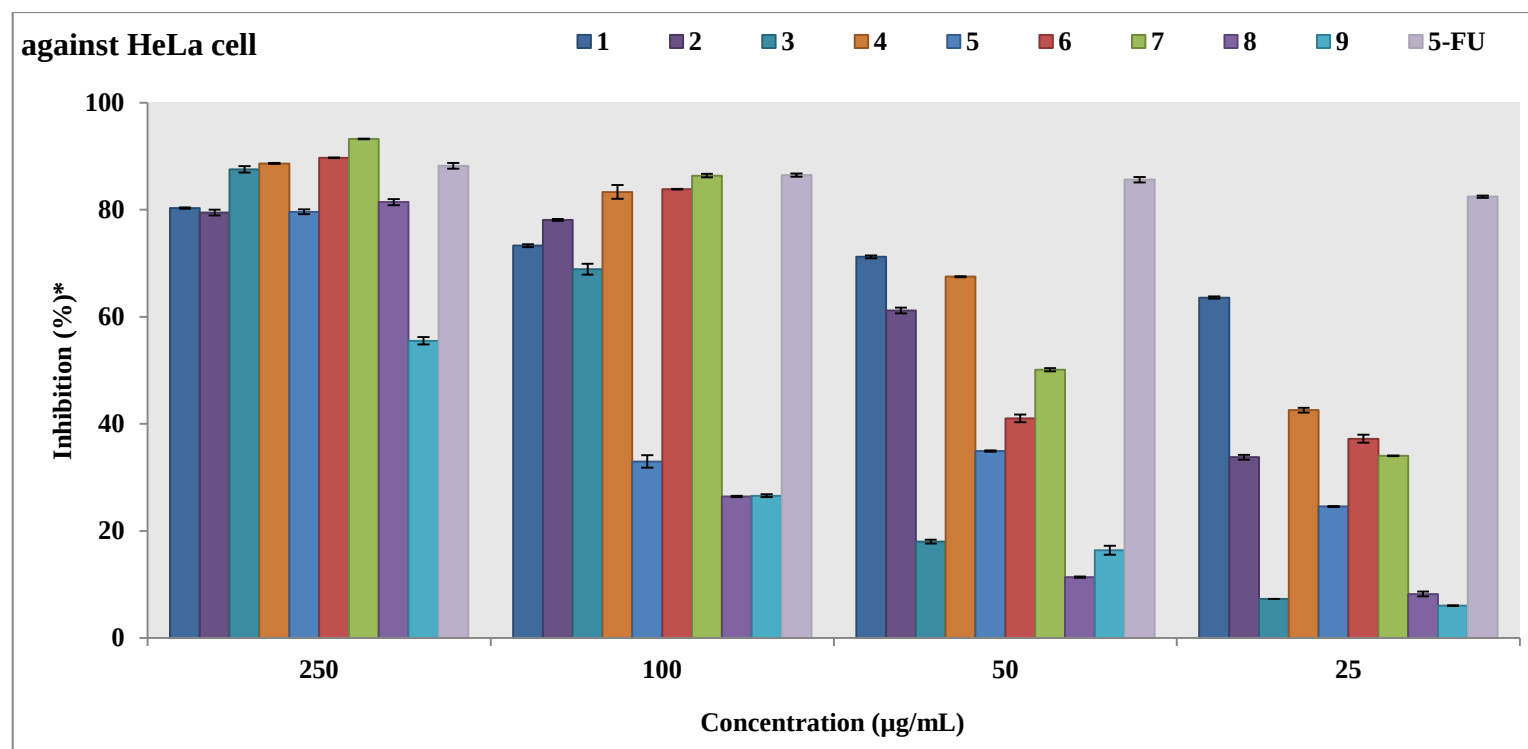


Figure 45: L'activité antiprolifératif des extraits de différentes parties de *C. oxyacantha* et de témoin positif vis-à-vis la lignée cellulaire HeLa. Les valeurs sont la moyenne de trois essais $\pm$ SD. La comparaison est réalisée avec le 5-FU.

1 : l'extrait aqueux des feuilles, 2 : l'extrait aqueux des fruits, 3 : l'extrait aqueux des fruits, 4 : l'extrait de méthanol des feuilles, 5 : l'extrait de méthanol des fleurs, 6 : l'extrait de méthanol des fruits, 7 : l'extrait d'acétone des feuilles, 8 : l'extrait d'acétone des fleurs, 9 : l'extrait d'acétone des fruits.

- **CI₅₀ et CI₇₅:**

Les extraits des différentes parties de *C. oxyacantha* (feuilles, fleurs et fruits) ont manifesté des effets inhibiteurs sur la croissance des lignées cellulaires A549 et HeLa. Ces effets sont exprimés en concentrations qui causent 50% ou 75% d'inhibition de la croissance cellulaire (CI₅₀ et CI₇₅), et sont représentés dans le tableau VI.

Les plus faibles concentrations inhibitrices de la prolifération des cellules de la lignée HeLa sont observés avec l'extrait aqueux des feuilles avec des valeurs de CI₅₀ et de CI₇₅ inférieure de 25 µg /mL. L'extrait aqueux des fleurs a environ la même activité que l'extrait de méthanol des feuilles avec une CI₅₀ < de 25 µg/ml et une CI₇₅ de 83.72 µg/ml et 81.58 µg/ml respectivement. La mauvaise activité a été remarquée chez l'extrait d'acétone des fleurs avec une CI₅₀ de 132.59 µg/ml.

L'extrait d'acétone des feuilles est l'extrait la plus actif contre la lignée cellulaire A549 avec une CI₅₀ inférieure à 25 µg/ml et CI₇₅ de 105.75 µg/ml, suivi par l'extrait de méthanol de la même partie de la plante avec une CI₅₀ de 97.17 µg/ml et CI₇₅ de 160.99 µg/ml et l'extrait de méthanol des fruits (CI₅₀= 99.28 µg/ml et CI₇₅= 163.23 µg/ml). Les plus fortes CI₅₀ et CI₇₅ contre cette lignée cellulaire sont 231.87 µg/ml et 237.05 µg/ml développées par l'extrait d'acétone des fruits.

Les composés phénoliques présents dans les plantes sont souvent responsables de leur bio-activité, cette dernière résulte principalement de l'effet synergique ou additif des différentes de composés classes responsables présents dans l'extrait (Ramful *et al.*, 2011). Par conséquent, la forte activité antiproliférative observée pourrait être liée aux concentrations élevées de composés phénoliques, en particulier celle de l'acide chlorogénique et des autres acides phénoliques. Kurata *et al.* (2002) ont montré que l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales par l'acide chlorogénique a été augmenté avec en fonction de la dose; Ils ont spéculé que cette inhibition des cellules tumorales prolifération peut être obtenue en améliorant l'activité à l'échelle de l'ADN et de la caspase-3 ainsi que l'augmentation de l'expression de c-Jun.

Une étude menée par Rodrigues *et al* (2012) sur le même genre de plante récolté dans la région de Bragança, (Nord- East du Portugal) a montré que l'extrait de méthanol des fleurs possède une activité antiproliférative plus élevée par rapport aux extraits de méthanol des fruits à différents stades de croissance contre quatre lignées cellulaires (MCF7, NCI-H460,

HeLa et HepG2). La CI_{50} d'extrait de méthanol des fleurs est $63.55 \pm 3.56 \mu\text{g/ml}$ contre la lignée cellulaire HeLa, ce résultat est plus proche que nos résultats ($CI_{50} = 92.75 \mu\text{g/ml}$) contre la même lignée cellulaire. Si on compare les résultats d'extrait de méthanol des fruits avec ceux de Rodrigues sur la même partie de la plante (Fruits non affinés ($95.76 \pm 6.08\%$), Fruits affinés ($176.75 \pm 9.84 \%$) et Fruits trop mûrs ($228.61 \pm 3.54 \%$)) contre HeLa, nous remarquons que nos résultats sont nettement supérieurs avec une CI_{50} de $27.84 \mu\text{g/ml}$.

Tableau VI : CI_{50} et CI_{75} des différentes parties de *C. oxyacantha*.

extraits	A549		HeLa	
	$CI_{50} (\mu\text{g/ml})$	$CI_{75} (\mu\text{g/ml})$	$CI_{50} (\mu\text{g/ml})$	$CI_{75} (\mu\text{g/ml})$
1	130.27	192.08	<25	<25
2	174.33	216.43	<25	83.72
3	139.03	198.77	101.45	164.67
4	97.17	160.99	<25	81.58
5	135.13	186.03	92.75	176.10
6	99.28	163.23	27.84	124.94
7	<25	105.75	25.41	122.96
8	135.47	185.11	132.59	193.21
9	231.87	237.05	113.92	180.01

1 : l'extrait aqueux des feuilles, 2 : l'extrait aqueux des fruits, 3 : l'extrait aqueux des fruits, 4 : l'extrait de méthanol des feuilles, 5 : l'extrait de méthanol des fleurs, 6 : l'extrait de méthanol des fruits, 7 : l'extrait d'acétone des feuilles, 8 : l'extrait d'acétone des fleurs, 9 : l'extrait d'acétone des fruits.

• L'activité antiproliférative des composés C1 et C2

L'activité antiproliférative des composés C1, C2 et du témoin positif a été déterminée vis-à-vis de la lignée cellulaire HeLa en utilisant le test de prolifération BrdU ELISA. Des concentrations croissantes (25, 50, 100 et $250 \mu\text{g} / \text{mL}$) des composés et du 5-FU ont été choisies pour cette étude (Fig.46).

Le stéroïde (C1) a développé une activité antiproliférative supérieure à celle de 5-FU pour toutes les concentrations étudiées, tandis que l'epicatéchine (C2) a montré une activité inférieure à celle de 5-FU pour les concentrations minimales 25 et $50 \mu\text{g/ml}$ et une activité équivalente pour les fortes concentrations.

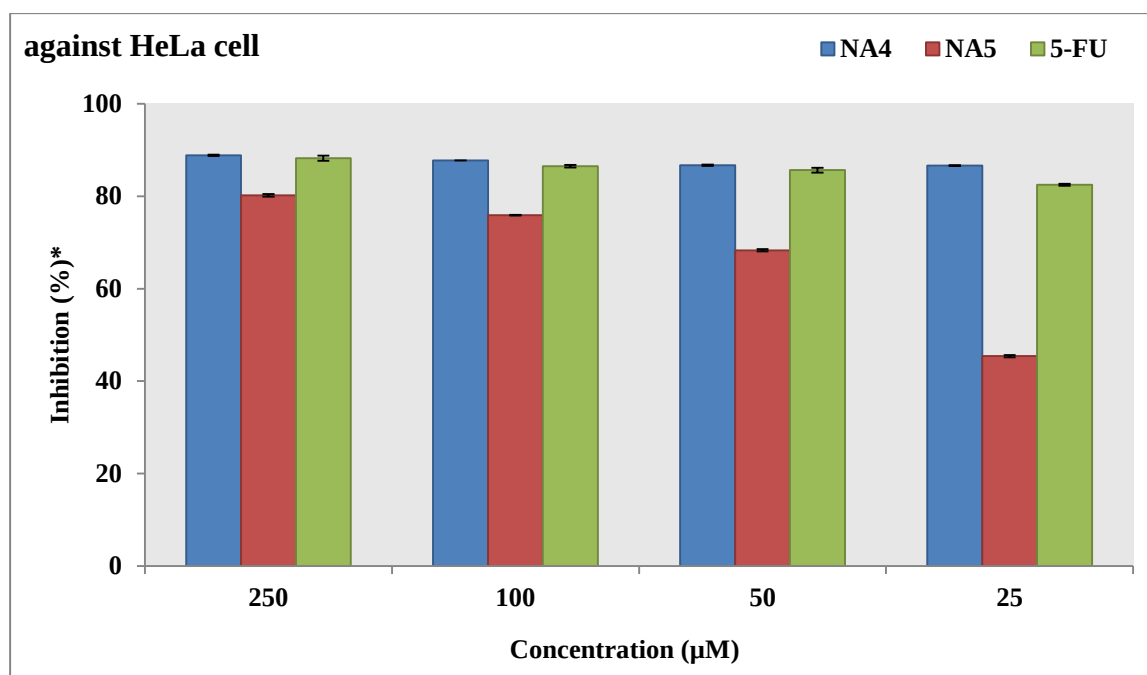


Figure 46 : L'activité antiproliférative des composés isolés à partir des feuilles de *C. oxyacantha* (NA4 (stéroïde) et NA5 (l'epicatéchine)) et du témoin positif (5-FU) contre les cellules HeLa. Les valeurs sont la moyenne de trois essais $\pm$ SD.

Les CI_{50} du stéroïde et d'epicatéchine sont inférieures à 25 $\mu\text{g/ml}$ et les CI_{75} < 25 et 43.06 $\mu\text{g/ml}$ pour le stéroïde et l'epicatéchine respectivement.

VI- L'activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits de *C. oxyacantha* par la méthode de diffusion des disques sur des milieux gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries, Sabouraud pour la levure et PDA pour les champignons.

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de six (6) bactéries pathogènes Gram + et Gram -, deux (2) moisissures et une levure.

Les résultats du screening antimicrobien des extraits sont reportés dans les tableaux VII ; VIII et IX.

VI.1- L'activité antibactérienne

Les extraits aqueux des différentes parties de *C. oxyacantha* n'ont manifesté aucun effet inhibiteur sur les souches bactériennes testés. De même les extraits d'acétone ont manifesté un effet inhibiteur quasiment insignifiant pour quelque souches seulement (Tab VII ; annexe IVa).

L'extrait de méthanol a manifesté des effets inhibiteurs sur la majorité des souches. Le plus fort effet a été observé pour l'extrait des feuilles sur *B. cereus* et celui des fruits sur *P. mirabilis* et *B. cereus*, suivi par l'extrait des fleurs sur *E. coli*. A l'exception des extraits de méthanol, *P. mirabilis* a montré une résistance pour tous les extraits.

Selon les résultats d'activité antimicrobienne des extraits de *C. oxyacantha* obtenus, nous remarquons que les bactéries G⁺ sont plus résistantes que les bactéries G⁻. Les souches *S. aureus* et *P. aeruginosa* possèdent une résistance supérieure par rapport aux autres souches G⁺.

Certes l'activité inhibitrice des extraits de *C. oxyacantha* sur les souches bactériennes testés est plus faible que celle manifestée par les antibiotiques de référence (gentamycine); cependant ces extraits sont doués d'activité antibactérienne dans la mesure où ils ne sont pas des produits purs mais des extraits bruts (Werner *et al.* 1998 ; Sanogo *et al.* 2006).

D'après les travaux de Bouzid *et al.* (2011), l'extrait aqueux des fruits de *C. monogyna* n'a manifesté aucun effet sur la souche *Staphylococcus aureus*. A une concentration de 500 mg/ml l'extrait méthanolique développé une zone d'inhibition de 8.02 ± 0.1 mm, valeur proche de celle développée par notre extrait méthanolique (7.3 ± 0.05 mm). A la lumière de ces observations on peut conclure que nos résultats sont similaires. Par contre

Résultats et discussion

Kostic *et al.* (2012) n'a observé aucun effet de l'extrait éthanolique des fruits de *C. monogyna* sur cette souche.

Tableau VII: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries par les extraits de *C. oxyacantha*, de gentamycine et les témoins négatifs.

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. auruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Ext aq feuilles	---	7.3±0.05	7±0.1	---	---	---
Ext aq fruits	---	---	---	---	---	---
Ext aq fleurs	---	6.6±0.11	---	---	---	---
Ext méth feuilles	12±0.1	11±0.0	12±0.1	8.6±0.15	7.3±0.05	14.5± 0.05
Ext méth fruits	11.6±0.05	9.6±0.05	14.6±0.05	8.3±0.15	7.3±0.05	14.3±0.05
Ext méth fleurs	13.6±0.15	9.6±0.05	11.6±0.05	7.3±0.05	8±0.1	11.8±0.02
Ext sox feuilles	7.3±0.05	---	---	---	---	8.8±0.02
Ext sox fruits	6.6±0.05	---	---	8.3±0.05	---	9±0.0
Ext sox fleurs	8.6±0.05	7.3±0.05	7±0.0	---	---	10±0.17
gentamycine	16±0.1	17±0.0	28.6±0.11	17±0.0	19.6±0.15	30.6±0.11
DMSO	---	---	---	---	---	---
H ₂ O	---	---	---	---	---	---

Les concentrations des extraits sont 500 mg/ml.

VI.2-Concentrations minimales d'inhibitrices:

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits de *C. oxyacantha* sont déterminées par la méthode de micro-dilution.

La détermination des CMI a été conduite sur les extraits qui ont manifesté une zone d'inhibition autour des souches d'un diamètre supérieure de 10 mm. Comme les extraits aqueux et d'acétone n'ont pas manifesté d'effet inhibiteur sur toutes les souches testées ainsi que l'extrait méthanolique sur les souches *P. auruginosa* et *S. aureus*, la détermination des CMI a été conduite sur quatre souches seulement *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. mirabilis* et *B. cereus* avec l'extrait méthanolique.

L'extrait de méthanol des fruits a manifesté des CMI de 75mg/ml, 100mg/ml et 175mg/ml pour les souches *P. mirabilis*, *B. cereus* et *E. coli* respectivement.

Alors que, l'extrait de méthanol des feuilles a manifesté des CMI de 100 mg/ml et 250 mg/ml pour les souches *P. mirabilis* et *S. typhimurium* respectivement.

Cependant, l'extrait de méthanol des fleurs a inhibé la croissance de deux souches bactériennes *B. cereus* et *P. mirabilis* dans la concentration minimale de 150 mg/ml et 200 mg/ml respectivement (Tab VIII ; annexe IV b).

Tableau VIII: Les CMI des extraits de méthanol des différentes parties de *C. oxyacantha*.

Extraits	CMI (mg/ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>B. cereus</i>
Ext Meth feuilles	/	250± 7.5	100± 3.8	/
Ext Meth fruits	175± 2.5	/	75± 1.2	100± 2.55
Ext Meth fleurs	/	/	200± 5.22	150± 2.63

VI.3-L'activité antifongique

Les résultats de l'activité antifongique ont révélé l'inefficacité de tous les extraits contre les souches de *A. flavus* et *C. albicans* et une faible efficacité sur *A. niger* avec une zone d'inhibition comprise entre 0.68 et 0.72 cm, quand ils sont testés à 500mg/ml. Il est à noter

que pour les concentrations inférieures à celle-ci aucun effet n'a été observé sur ces souches (Tab IX ; annexe IV c).

Par conséquent, les résultats de Kostic *et al.* (2012) ont démontré des zones d'inhibition de 13 ± 0.1 mm (volume d'injection 20 μ l) et 20 ± 0.25 mm (volume d'injection 50 μ l) d'extrait d'éthanol des fruits de *C. oxyacantha* dans la concentration 10 mg/ml et le diamètre de disque utilisé est 9 mm vis-à-vis de *C. albicans*, ce qui indique que l'activité antifongique dépend du solvant utilisé pour l'extraction.

Tableau IX : Diamètres des zones d'inhibition des extraits de *C. oxyacantha*, des témoins positifs et négatifs sur les champignons (mm).

extrait	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Candida albicans</i>
Ext Aq feuilles	7$\pm$0.01	---	---
Ext Aq fruits	7.1$\pm$0.01	---	---
Ext Aq fleurs	7.1$\pm$0.01	---	---
Ext Méth feuilles	7.3$\pm$0.01	---	---
Ext Méth fruits	6.8$\pm$0.007	---	---
Ext Méth fleurs	7.2$\pm$0.01	---	---
Ext Sox feuilles	7.2$\pm$0.02	---	---
Ext Sox fruits	6.8$\pm$0.012	---	---
Ext Sox fleurs	6.8$\pm$0.0	---	---
Nystatine	9.3$\pm$0.02	*	9.2$\pm$0.02
Clotrimazole	15.8$\pm$0.01	23.8$\pm$0.14	44.2$\pm$0.05
Amphotericine	17.5$\pm$0.01	*	15.5$\pm$0.01
DMSO	---	---	---
H₂O	---	---	---

Les différentes classes de polyphénols, essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes en fonction du site, la conformation spatiale et le nombre de groupement hydroxyles (Cowan ,1999).

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi sur les résultats. Natarajan *et al.* (2005) et Fazeli *et al.* (2007) ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits

Résultats et discussion

aqueux et organiques de *l'Euphorbia fusiformis* et hydro-éthanoliques de *Rhus coriaria* et *Zataria multiflora*, que la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Conclusion et Perspectives

Le présent travail a porté sur l'étude des extraits organiques et de l'extrait aqueux de différentes parties de *Crataegus oxyacantha* L. (aubépine), et nous avons tenté de contribuer à sa valorisation en Algérie en établissant une relation entre sa composition chimique et ses activités biologiques.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités importantes en polyphénols. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité considérable de flavonoïdes. Il ressort de ces analyses que *C. oxyacantha* est riche en flavonoïdes de types flavones et flavonols et en tannins.

L'analyse qualitative des extraits par HPLC TOF/MS a révélé la présence de plusieurs composés phénolique dans *C. oxyacantha* comme l'acide chlorogénique, l'acide gentisique et la rutine, ces molécules sont considérées comme les composés les plus actifs de la famille des flavonoïdes.

Par ailleurs, les extraits possèdent une activité antioxydante importante *in vitro*. Ils montrent une inhibition très importante vis-à-vis du radical DPPH, une forte activité chélatrice vis-à-vis du fer ferreux et un puissant pouvoir réducteur. L'évaluation de l'activité antimicrobienne de ces extraits vis-à-vis de 6 espèces bactériennes et 3 espèces fongiques s'est révélée modérée.

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physico-chimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie de masse, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces analyses ont conduit à l'identification de quatre constituants dans différentes fractions, il s'agit d'un stéroïde, catéchine, epicatéchine et eriodicyol.

Les extraits de *C. oxyacantha* possèdent une activité antiproliférative considérables contre les deux lignées cellulaires testées, toutefois le stéroïde et l'epicatéchine ont montré une activité remarquable contre la lignée cellulaire HeLa.

Perspectives et recommandations:

- Poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce *Crataegus oxyacantha*, sur l'ensemble des parties de la plante.

Conclusion et perspectives

- Purifier et identifier les principes actifs majoritaires,
- Etudier les activités biologiques de ces métabolites *in vivo* et *in vitro*,
- Appliquer la cytométrie de flux.

Référence

A

- Acar, J. et Courvalin, P. (1998). "La fin de l'âge d'or des antibiotiques." *La Recherche* **314**: 50-52.
- Aganga, A.A. and Mosase, K.W. (2001). Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*, **91**:107-113.
- Alekshun MN. and Levy SB. (2007) Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**:1037–50.
- Ali N.A.A., Julish W.D., Kusunick C. and Lindesquist U. (2001) Screening of yamani medicinal plant for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*. Pp173-179.
- Ammon HPT. and Handel, M. (1981) *Crataegus* toxicology and pharmacology. *Planta Med.* **43**: 105-120.
- Ammon H. and Kaul R. (1994) Heat circulation mechanism of action of *Crataegus* extract, flavanoid and procyanidin. Part I. History and workings. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **134** : 433-436.
- Andjelkovic M., Camp J.V., Meulenaer B.D., Depaemelaere G., Socaciu C. and Verloo M. (2006) Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry* **98**: 23–31.
- Andreumont A., Corpet D. and Courvalin P. (1997) La résistance des bactéries aux antibiotiques .*Pour la Science* **232** : 66-73.

B

- Baborun T., Troitin F. and Vasseurt J. (1994) Comparative polyphenolic productions in *Crataegus monogyna* callus cultures. *Phytochemistry* **37**: 1273–1276.

- Bahorun T., Aumjaud E., Ramphul H., Rycha M., Luximon-Ramma A., Trotin F. and Aruoma OI. (2003) Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. *Nahrung* **47**: 191-198.
- Barchan A., Bakkali M., A. Arakrak A. et Laglaoui A. (2015) Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha* : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. *Phytothérapie* 10.1007/s10298-015-0970-y.
- Barros L., Dueñas M., Carvalho A.M., Ferreira I.C. and Santos-Buelga C. (2012) Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food Chem. Toxicol.* **50** : 1576–1582.
- Behera J. N. and Rao J., 2006. A Ni^{2+} ($S = 1$) Kagome Compound Templated by 1,8-Diazacubane. *American of Chemistry Society* **128** (29): 9334 -9335.
- Belhattab R., Larous L., Kalantzakis G., Bouskou D. and Exarchou V.(2004). Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Food, Agricul. & Envir.* **2**: 63-69.
- Brchm, M. et al. (1995) Comparative antitumor activity of doxorubicin plus two radical scavenging plant extract preparations (*Ginkgo biloba*, *Crataegus oxyacantha*) and of doxorubicin alone. *Conbrib Oncol.* **48**: 48-52.
- Bruneton J., (1993) Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 2^{ème} edition Tec et Doc (Ed). Paris, p914.
- Bruneton J (1999) Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3^{ème} edition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris.
- Boizot N .et Charpentier J P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *methodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques*, N° spécial : 79-83.
- Bouaziz A., Khennouf S., Abdalla S., Djidel S., Abu Zarga M., Bentahar A., Dahamna S., Baghiani A. and 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.

- Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H. and Marzouk B. 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies*, **331**: 48–55.
- Bouzid W., Yahia M., Abdeddaim M., Aberkane M.C. et Ayachi A. (2011). Evaluation de l'activité antioxydant et antimicrobienne des extraits de l'*Aubépine monogyne*. *Lebanese Science Journal*, **12**(1):59-69.

C

- Caligiani A., Malavasi G., Palla G., Marsegia A., Tognolini M. and Bruni R. (2013) A simple GC-MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. *Food Chem.* **136**: 735–741.
- Chatterjee, S. et al. (1996) Antioxidant and human neutrophil elastase inhibitory activity of *Crataegus* extract (WS - 1442) Standardized or Oligomeric procyanidins (OPC). Proceedings of the 2nd International Congress on Phytomedicine. Sep. 11-14, Munich. Escop p SL- 43.
- Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek, T. and Baser K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, **100**: 553-559.
- Ceyhan G., Köse M., Tümer M., Demirtas I, Sahin Yaglioglu A. and Mckee, V. (2013) Structural characterization of some Schiff base compounds: Investigation of their electrochemical, photoluminescence, thermal and anticancer activity properties *Journal of Luminescence* **143**: 623–634.
- Chang Q., Zuo Z., Harrison F. and Chow M.S.S. (2002) Hawthorn. *J. Clin. Pharmacol.* **42**: 605–612.
- Chang W.T., Dao J. and Shao Z.H. (2005) Hawthorn: Potential roles in cardiovascular disease. *Am. J. Chin. Med.* **33** : 1–10.

- Chen C., Yu R., Owuor E.D. and Kong A.N.(2000) Activation of antioxidant response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch. Pharm. Res.* **23**: 605–612.
- Cheynier V., Fulcrand H., Sarni P. and Moutounet M. (1997) Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de leur vinification. In vino Analytica Scientia. *Analisis* **25**: 14-44.
- Chira K., Suh J.H., Saucier C. and Teissède P.L. (2008) Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* **6**: 75–82.
- Chu C.Y., Lee M.J., Liao C.L., Lin W.L. , Yin Y.F. and Tseng, T.H.(2003) Inhibitory effect of hot-water extract from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* on low-density lipoprotein (LDL) oxidation in cell and cell-free systems. *J. Agric. Food Chem.* **51** : 7583–7588.
- Crozier A (2003) Classification and biosynthesis of secondary plant products: An overview. In: Goldberg G (ed) Plants: Diet and Health. British Nutrition Foundation, Chapman Hall, Londres, pp. 27-48.
- Cowan M. M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 564-582.

D

- Dahmer S. and Scott E. (2010) Health effects of hawthorn. *Am. Fam. Physician* **81**: 465–468.
- Daniele C., Mazzanti G., Pitter MH. and Ernst E.(2006) Adverse-event profile of *Crataegus spp*, a systematic review. *Drug Saf.* **29**: 523-535.
- Davies J.R.(2000). Hawthorn. Element Books Limited, Bosten, MA.
- Della Loggia, R., Tubaro A. and Redaelli C. (1983) Depressive effect of *Crataegus oxyacantha* L. on central nervous system in mice. *Pharm.* **51**: 319-24.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Maamri S., Djireb F. and Stocker P.(2006). Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver

carboxylesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **21**(6): 719-726.

- Duke JA (1993) Medicinal plants and the pharmaceutical industry. In *New Crops*. Edited by J Janick, JE Simon John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp, 664–9.

E

- Ebrahimzadeh M.A. and Bahramain F. (2009). Antioxidant activity of *Crataegus pentaegyna* Subsp. *alburensis* fruits extracts used in traditional medicine in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **12** (5):413-419.
- Edwards J.E., Brown P.N., Talent N., Dickinson T.A. and Shipley P.R. (2012) A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* , **79**: 5–26.
- Erenler R., Yilmaz S., Aksit H., Sen O, Genc N, Elmastas M. and Demirtas I. (2014) Antioxidant Activities of Chemical Constituents Isolated from *Echinops orientalis* Trauv. *Rec. Nat. Prod.* **8** (1):32-36.
- Erenler R., Sen O., Aksit H., Demirtas I., Sahin Yaglioglu A., Elmastasa M. and Telcic I. (2015) Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. *J Sci Food Agric* 10.1002/jsfa.7155.
- Erlund I (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res* **24**: 851-74.
- Etienne J. (2000) *Biochimie génétique, Biologie moléculaire*. 6ème édition pp265-266.

F

- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdely C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, **331**: 372-379.
- Fakir H., Korkmaz M. and Güller B.(2009) Medicinal plant diversity of western Mediterranean region in Turkey. *J. Appl. Biol. Sci.* **3**: 30–40.

- Favier A. (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, **5** : 108-115.
- Fazeli F., Ghorbanli M. and Niknam V. (2007): Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum*, **51**: 98–103.
- Fiebig HH., Maier A. and Burger AM. (2004) Clonogenic assay with established human tumor xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. *Eur J Cancer*. **40**: 802 –820.
- Fogh J., Fogh JM. and Orfeo T. (1977) One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*. **59**: 221 – 226.
- Formica J.V. and Regelson W., (1995). Review of the biology of quercetine and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, **33**:1061-1080.
- Frankel E., Kanner J., Parks E. and Kinsella J. (1993) Inhibition of oxidation of human low- density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **341**:454-457.
- Frankel E.N. and Meyer A.S. (2000) The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. *J. of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 1925-1940.
- Fridkin S.K., Hageman J. C., Morrison M., Sanza L. T., Como-Sabetti K., Jernigan J. A., Harriman K., Harrison L. H., Lynfield R. and Farley, M. M., (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med*. **352**(14): 1436-1444.
- Froehlicher T., Hennebelle T., Martin-Nizard F., Cleenewerck P., Hilbert J.L., Trotin F. and Grec S.(2009) Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chem*. **115**: 897–903.

G

- Garcia M., Saenz M., Ahumada M. and Cert A. (1997) Isolation of three triterpenes and several aliphatic alcohols from *Crataegus monogyna* Jacq. *J. Chromatogr.* 767: 340–342.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. and Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? L'actualité chimique, 91-96.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp275.
- Geckil H., Ates B., Durmaz G., Erdogan S. and Yilmaz I. (2005). Antioxidant, Free radical scavenging and metal chelating characteristics of Propolis. *Am. J. Biochem and Biotech.* 1(1):27-30.
- Ginsberg RJ., Vokes EE. and Rosenzweig K. (2001) Cancer of the Lung: Non-Small Cell Lung Cancer. In: DeVita V.T., Hellman S, Rosenberg A. S, eds. Cancer, Principles and practice of oncology.925.
- Gire L. (2000) Les plantes médicinales. Ouest-France (Ed). Rennes, 30p.
- Goff BA., Mandel L., Muntz HG. and Melancon CH.(2000) Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer.* 89: 2068 – 2075.
- Giurescu Bedreag C.F., Trifan A., Bucur L.A., Arcus M., Tebrencu C., Miron A. and Costache I. I. (2014). Chemical and antioxidant studies on *Crataegus pentagyna* leaves and flowers. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(6): 9859-9867.
- Greenlee RT., Murray T., Bolden S. and Wingo PA. (2000). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 50: 7-33.
- Gülçin Oktay M., Kireççi E. and Küfrevio lu Ö. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem.* 83: 371-382.

H

- Hagerman A E. and Butler L G. (1978). Protein precipitation methods for quantitative determination of tannins. *J Agr Food Chem*, 809-812.
- Han X., Shen T. and Lou H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **8**: 950–988.
- Harborne JB. (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Nat Prod Rep.***18**: 361–79.
- Haverkos H., Rohrer M. and Pickworth W. (2000). The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomed Pharmacother.* **54**:54 – 59.
- Hemachakradhar K. and Pavan kumar Raju N. (2013). Preliminary phytochemical screening, quantitative estimation and evaluation of antimicrobial activity of *alstonia macrophylla* stem bark. *International journal of science inventions today.* **2**(1): 31-39.
- Hemingway R W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In chemistry. Ed.Hemingway and Karchesy, Plenum Press, New York. pp 503-515.
- Herrera C.M. (1984). Seed dispersal and fitness determinants in wild rose. Compined effects of hawthorn, birds, mice and browsing ungulates. *Spain*; **63**: 386-393.
- Hobbs C. and Foster S. (1990) Hawthorn: a literature review. *Herbal Gram* **22**:19-33.
- Hopkins M. P., Morley G.W. and Stage I.B. (1991) squamous cell cancer of the cervix: clinicopathologic features related to survival. *Am J Obstet Gynecol.* **164**: 1520–1527.
- Horne S. and Montgomery M. (2005) Hawthorn. *Natures Fields* **21**(12): 1-8.
- Hostettmann K., Potterat O. and Wolfender J.-L. (1998). The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimia* **52** : 10-17.
- Hseu Y., Chang W., Chen C., Liao L., Huang C., Lu F., Chia Y., Hsu H., Wu J. and Yang H. (2008). Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 105–114.

J

- Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C. and Thun M.J. (2006) Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* **56**(2):106-30.
- Joanny Menvielle-Bourg F. (2005) La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale .*Phytothérapie* **3**: 118-121.

K

- Kaddem S.E. (1990). Les plantes médicinales en Algérie, p31.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44** (6): 453-64.
- Karakus G., Polat Z.A., Sahin Yaglioglu A., Karahan M. and Yenidunya A.F. (2013) Synthesis, characterization, and assessment of cytotoxic, antiproliferative, and antiangiogenic effects of a novel procainamide hydrochloride-poly(maleic anhydride-co-styrene) conjugate *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* doi: 10.1080/09205063.2012.750209 2013.
- Kim S.H., Kang K.W. and Kim K.W. (2000) Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sci.* **67**(2): 121-31.
- Kirakosyan A., Seymour E., Kaufman P.B., Warber S., Bolling S. and Chang, S.C. (2003) Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 3973–3976.
- Koldes S., Demirtas I., Ozen T., Demirci M.A. and Brhçte L. (2015). Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *J Sci Food Agric*; **95**: 786–798.
- Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. and Vladimir-Knezevic S.(2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta. Pharm.* **54**: 65-72.
- Kostic D.A, Velickovic J. M, Snezana S Mitic S.S, Milan N Mitic M. N and Randelovic S.S(2012). Phenolic Content, and Antioxidant and Antimicrobial

Activities of *Crataegus Oxyacantha* L (Rosaceae) Fruit. *Trop J Pharm Res*, **11** (1): 117-124.

- Kotra L. P., Golemi D., Vakulenko S. and Mobashery S. (2000). Bacteria fight back. *Chemistry & Industry* **5**: 341-344.
- Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonamone A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E. and Etherton T.D. (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*. **113**: 71S-88S.
- Kulsic T., Radomic A. Katalinic V. and Milos M. (2004) .Use of different methods for testing antioxidant activity of Oregano essential oil. *Food chem*. **85**:633-640.
- Kurata Y., Histome I. and Shibamoto T. (2002) Dynamical description of sinoatrial node pacemaking: improved mathematical model for primary pacemaker cell. *Am. J. Physiol. Heart circ. Physiol*. **283**: H2074-H2101.

L

- Lacaille-Dubois, V., Franck, U. and Wagner, H. (2001) Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors from plants. *Phytomedicine*. **8**: 47-52.
- Lakache Z., Tigrine-Kordjani N., Tigrine C., Aliboudhar H. and Kameli A. (2016). Phytochemical screening and antioxidant properties of methanolic extract and different fractions of *Crataegus azarolus* leaves and flowers from Algeria. *IFRJ* **23**(4): 1576-1583.
- Laguerre M., Lecomte J. and Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, **46**, 244-282.
- Lass A. and Sohal R. S. (2000). Effect of coenzymes Q10 and alphotocopherol content of mitochondria on the production of superoxide anion radicals. *FASEB Journals*, **14**:87–94.
- Laurent-Pezet A. (2000) L'Usine Nouvelle - Biotech.Info, Hors-série, p 30-32.

Référence

- Lavie Y., Cao H., Bursten S.L., Giuliano A.E. and Cabot M.C. (1996) Accumulation of glucosyleeramides in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* .**271**:19530-6.
- Le K., Chiu F. and Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, **105**: 353-363.
- Lee Y.R., Woo K.S., Kim K.J., Son J.R. and Jeong H.S. (2007). Antioxidant activities of ethanol extracts from germinated specialty rough Rice. *Food Sci. Biotechnol.* **16**: 765-770.
- Leong L.P. and Shui G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* **76**: 69-75.
- Leuchtgens, H. (1993) *Crataegus* special extract WS 1442 in NYHA II heart failure. A placebo controlled randomized double blind study. *Fortschr Med.* **111**: 352-54.
- Leung A.Y. and Foster S. (1996) Encyclopedia of Common Natural Ingredients: Used in Food, Drugs, and Cosmetics. 2nd ed. New York: JohnWiley.
- Li C., Son H.J., Huang C., Lee S.K., Lohakare J. and Wang M.H. (2010) Comparison of *Crataegus pinnatifida* Bunge var. *typica* Schneider and *C. pinnatifida* Bunge fruits for antioxidant, anti-alpha-glucoside, and anti-inflammatory activities. *Food Sci. Biotechnol.* **19**: 769–775.
- Lim Y.Y, Lim T.T. and Tee J.J. (2007) Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study .*Food Chemistry* **103**: 1003–1008.
- Linnoila I. (1990) Pathology of non-small cell lung cancer. New diagnostic approaches. *Hematol Oncol ClinNorth Am.* **4**:1027-51
- Loeb K.R. and Loeb L.A. (2000) Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*; **21**:379-85.

M

- Martin S. and Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* **51** : 304-315.

- Melzer R., Fricke U. and Holzl J. (1991) Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries; *Arzneimittelforsch/Drug Res.*, **41**: 481-483.
- Meir S., Kanner J., Akiri B. and Hadas S.P. (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* **43**:1813-1815.
- Minna J.D., Roth J.A. and Gazdar A.F. (2002) Focus on lung cancer [Review] . *Cancer Cell*, **1**: 49-52.
- Mitsuuchi Y. and Testa J.R. (2002) Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet.* **115**: 183-188.
- Miraliakbari H. and Shahidi F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, **111**(2): 421-427.
- Mraihi F., Journi M., Chérif J.K., Sokmen M., Sokmen A. and Trabelsi-Ayadi M. (2013). Phenolic Contents and Antioxidant Potential of *Crataegus* Fruits Grown in Tunisia as determined by DPPH, FRAP, and β -Carotene/Linoleic Acid Assay. *Journal of Chemistry*.

N

- Nakashima H., Murakami T., Yamamoto N., Sakagami H., Tanuma S., Hatano T. and Okuda T.(1992) Inhibition of human immunodeficiency viral replication bu tannins and related compounds. *Antivir . Res.* **18**: 91-103.
- Nasa, Y., Hashizume A.N., Hoque, E. and Abiko, Y. (1993) Protective effect of *Crataegus* extract on the cardiac mechanical dysfunction in isolated perfused working rat heart. *Arzneim Forsch Drug Res.* **43**: 945-49.
- Natarajan K., Senthilarasu G., Kumaresn V. and Riviere T. (2005) Diversity in ectomycorrhizal fungi of a dipterocarp forest in Western Ghats. *Curr.Sci.* **88**: 1893-1895.
- Newman D. J., Cragg G. M. and Snader K.M. (2000).The influence of natural products upon drugdiscovery .*Nat. Prod. Rep.* **17**: 215-234.

Référence

- Nikolov N., DellaMonic G. and Chopin J. (1981). NDi-C-glycosylflavones from *Crataegus monogyna*. *Phytochemistry* **20**: 2780–2781.
- Nikolov N.T. and Vodenicharov R.I. (2003) Di-C-glycosides from *Crataegus monogyna*. *Chem Nat Compd* **11**: 436-437.
- Noman L., Zellagui1 A., Sahin Yaglioglu A., Demirtas I. and Rhouati S.(2015). Antimicrobial Activity of Essential Oil Components and Antiproliferative Activity of Trans-Tiliroside Compound from an Endemic Desert Species *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. **6**(2): 671-676.
- Novelli G. P. (1997). Role of free radicals in septic shock. *Journal of Physiology and Pharmacology*. **48**: 517-527.

O

- Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M. and Takahara Y. (1993). Antioxydant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochimie*. **33** : 557-561 .
- Orhan I., Ozcelik B., Kartal M., Ozdeveci B. and Duman H. (2007) HPLC Quantification of vitexine-2-O-rhamnoside and hyperoside in three *Crataegus* species and their antimicrobial and antiviral activities. *Chromatographia* **66**: S153-S157.

P

- Park Y., Fujioka M., Kobayashi M., Jaynes J.B. and Datta S. (2001). Even skipped is required to produce a trans-acting signal for larval neuroblast proliferation that can be mimicked by ecdysone. *Development* **128**(10): 1899--1909.
- Pittler M.H., Schmidt K. and Ernst E.(2003) Hawthorn Extract for Treating Chronic Heart Failure: Meta-analysis of Randomized Trials. *Am J Med*. **114**: 665-671.
- Potter D. (2007) Phylogeny and classification of *Rosaceae*. *Plant Systematics and Evolution*. **266**(1-2): 5-43.

Q

- Quezel P. and Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp. 294-295.

R

- Raghu G., Striker L., Harlan J., Gown A. and Striker G. (1986) Cytoskeletal changes as an early event in hydrogen peroxide induced cell injury: a study in A549 cells. *Br. J. Exp. Path.* **67**:105–112.
- Ramful D., Aumjaud B., Neergheen V. S., Soobrattee M. A., Googoolye K., Aruoma, O.I. and Bahorun T. (2011). Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro and in model emulsion systems. *Food Research International*, **44**:1190–1196.
- Rasmussen P. (2011) Hawthorn *Crataegus monogyna* (common hawthorn) or *Crataegus laevigata* (midland hawthorn; *Crataegus oxyacantha*); also known as haw, thornapple, maythorn, whitethorn. *J Prim Health Care*. **3**(1): 63-64.
- Reutxer, H.D. (1994) *Crataegus* as cardiac plant. *J. Phytother.* **15**: 73-81.
- Rewerski W. and Lewak S, (1967). Some pharmacological properties of flavan polymers isolated from hawthorn (*Crataegus oxyacantha*). *Arzneimittelforschung* **17**(4): 490-491.
- Rewerski, V., Piechocki, T., Rylski, M., Lewak, S. (1971) Some pharmacological properties of *Crataegus oxyacantha* compound and isolated oligomeric procyanidins. *ArzneimForsch Drug Res.* **21**: 886-88.
- Ribéreau-Gayon P (1968) Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* **20**: 933–956.
- Rigelsky, J.M.; Sweet, B.V. (2002) Hawthorn: Pharmacology and therapeutic uses. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **59**: 417–422.

- Roberts M.F. and Wink M., (1999). Alkaloids - Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Book Reviews / Phytochemistry*, **52**: 1177 – 1180.
- Rodrigues S., Calhelha R.C., Barreira J.C.M., Dueñas M., Carvalho A.M., Abreu R.M.V., Santos-Buelga C. and Ferreira I.C.F.R. (2012). *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC–DAD–ESI/MS. *Food Research International* **49** : 516–523
- Rohr G.E., Meier B. and Sticher O. (1999) Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of procyanidins in *Crataegus* leaves and flowers. *J. Chromatogr.* **835**: 59–65.

S

- Sango K., Suzuki T., Yanagisawa H., Takaku S., Hirooka H., Tamura M. and Watabe K. (2006) High glucose-induced activation of the polyol pathway and changes of gene expression profiles in immortalized adult mouse Schwann cells IMS32. *Journal of Neurochemistry*, **98**: 446–458.
- Sahreen S., Khan M. R. and Khan R. A. (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, **122**: 1205-1211.
- Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M. and Sharma P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **1** (1): 25-41.
- Schmidt U.(1994) Efficacy of the Hawthorn (*Crataegus*) preparation L1 132 in 78 patients with chronic congestive heart failure defined as NYHA. *Phytomedicine* **1**: 17-24.
- Schmidt U., Kuhn U., Ploch M. and Hübner W.D. (1994). Efficacy of the hawthorn (*Crataegus*) preparation LI 132 in 78 patients with chronic congestive heart failure defined as NYHA functional class II. *Phytomedicine* **1**: 17–24.
- Schüssler M., Hölzl J. and Fricke U. (1995) Myocardial effects of flavonoids from *Crataegus* species. *Arzneimittelforschung* **45**: 842–845.

- Schwartzman R.A. and Cidlowski J.A. (1993) Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev.* **14**:13 3-51.
- Shanta V., Krishnamurthi S., Gajalakshmi C.K., Swaminathan R. and Ravichandran K.(2000) Epidemiology of cancer of the cervix: global and national perspective. *J Indian Med Assoc.* **98**: 49 – 52.
- Shen S.Q., Zhang Y., Xiang J.J. and Xiong, C.L. (2007). Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J. Gastroenterol.* **13**: 1953–1961.
- Shen H., Zhu Y., Wu Y., Qiu H. and Shu Y. (2008). Genomic alterations in lung adenocarcinomas detected by multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, **181**: 100-107.
- Singleton V. L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R. M.(1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* 152-177.
- Sokol-Letowska A., Oszmianski J. and Wojdylo A.(2007). Antioxidant activity of phenolic compounds of Hawthorn, pine, skullcap. *Food Chem.* **103**(3): 853-859.
- Sroka Z. (2005) Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z Naturforsch.* **60C**:833–43.
- Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H. and Stöckigt D. (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Review Journal of Chromatography A*, **967** : 85–113
- Stocker R. and Keaney J. F. Jr., (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*, **84**:1381–1478.
- Swaminathan J.K., Khan M., Mohan I.K., Selvendiran K., Niranjali Devaraj S., Rivera B.K., and Kuppusamy P. (2010). Cardioprotective properties of *Crataegus oxyantha* extract against ischemia-reperfusion injury. *Phytomedicine* **17**:744-752.

T

- Tabach R., Mattei R. and Araujo Carlini E.L.D. (2009). Pharmacological evaluation of a phytotherapeutic product - CPV (dry extract of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L. and *Valeriana officinalis* L.) in laboratory animals. *Brazilian J Pharmacognosy* **19**: 255-260.
- Tadic V.M., Dobric S., Markovic G., Dordevic S.M., Arsic I.A., Menkovic N.R. and Stevic T. (2008). Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radicalscavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. *J Agr Food Chem.* **56**: 7700-7709.
- Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M. and El-Elimat T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry* **104**: 1372–1378.
- Testa J.R., Liu Z., Feder M., Bell D.W., Balsara B., Cheng J. and Taguchi T. (1997). Advance in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*, **95**: 20-32.
- Turkmen N., Velioglu Y. S, Sari F. and Polat G. (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, **12**: 484-496.

U

- Umino T., Wang H., Zhu Y., Liu X., Manouilova L.S., Spurzem J.R., Leuschen M.P. and Rennard S.I. (2000) Modification of type I collagenous gels by alveolar epithelial cells. *Am. J. Res. Cell Mol. Biol.* **22**: 702–707.
- Urbonaviciute A., Jakstas V., Kornygova O., Janulis V. and Maruska A., (2006). Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. *J. Chromatogr. A* **1112** : 339–344.

W

- Weikl A., Assmus K.D. and Neukum-Schmidt A. (1996). *Crataegus* special extract WS 1442: Assessment of objective effectiveness in patients with heart failure. *Fortschr Med.* **114**: 291-296.
- Werner A., Dehmelt L. and Nalbant P. (1998) Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaP_i protein families. *Journal of Experimental Biology.* **201**:3135–3142.

V

- Valko M., Rhodes C.J.b., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* Pp1-40.
- Velioglu Y.S., G. Mazza G., Gao L. and Oomah B.D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits,vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4113–4117
- Verdan A. M., Wang H. C., García C.R., Henry W.P. and Brumaghim J. L. (2011). Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**: 1314-1322.
- Verma S.K., Jain V., Verma D. and Khamesra R. (2007). *Crataegus oxyacantha*-A Cardioprotective Herb. *J Herbal Med Toxicology* **1**: 65-71.
- Vermerris W. and Nicholson R. (2008) Phenolic composition biochemistry. Pp. 63-149.
- Visentin V., Prevot D., Marti L. and Carpenne C. (2003). Inhibition of rat fat cell lipolysis .by mono amine oxidase andsemicarbazide – sensitive amine oxidase substrates .Eur . *J. Pharmacol*, **466** (3):235-243.
- Visioli F. (2001). Effects of vitamin E on the endothelium: Equivocal? Alpha-tocopherol and endothelial dysfunction. *Cardiovascular Research.* **51**: 198–201.

- Vouldoukis I., Conti M., Krauss P., Blazquez S., Tefit M., Mazier D., Calenda A. and Dugas B. (2004). Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress. *Phytother Res.* **18** (12): 957-62.

Y

- Yukiko K. Nakamura and Stanley T. Omaye (2009) Vitamin E-modulated gene expression associated with ROS generation (Review). *J. Functional foods* **1**: 241–252.

Z

- Zhang Z., Chang Q., Zhu M., Huang Y. and Chen Z. (2001). Characterization of antioxidants present in Hawthorn fruits. *J Nutr Biochem.* **12**(3): 183-186.
- Zenk M.H. and Juenger M. (2007) Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry Review* **68** :2757 – 2772
- Zielinski J.M., Carr Z., Krewski D. and Repacholi M. (2006). World Health Organization's International Radon Project. *J Toxicol Environ Health A*, **69**: 759-769.
- Zou Y. P., Lu Y.H. and Wei D.Z. (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 5032-5039.

Annexe

Annexe I

Composition du milieu Mueller-Hinton :

Extrait de viande de boeuf : 2.0g.

Peptone de caséine : 17.5g.

Amidon de maïs : 1.5g.

Agar : 17.0g.

pH : 7.4.

Composition du milieu Sabouraud :

Peptone : 10,0 g.

Glucose massé : 20,0 g.

Agar : 15,0 g.

pH = 6,0.

ANNEX II : Les rendements des extraits de *C. oxyacantha* L.

Extraits	Décoction	Macération	Soxhlet
Feuilles	6.7%	7.45%	3.6%
Fleurs	9.75%	10%	6.8%
Fruits	8.9%	0.33%	9.78%

ANNEX III: Composition chimique des extraits de différentes parties de *C. oxyacantha* L.

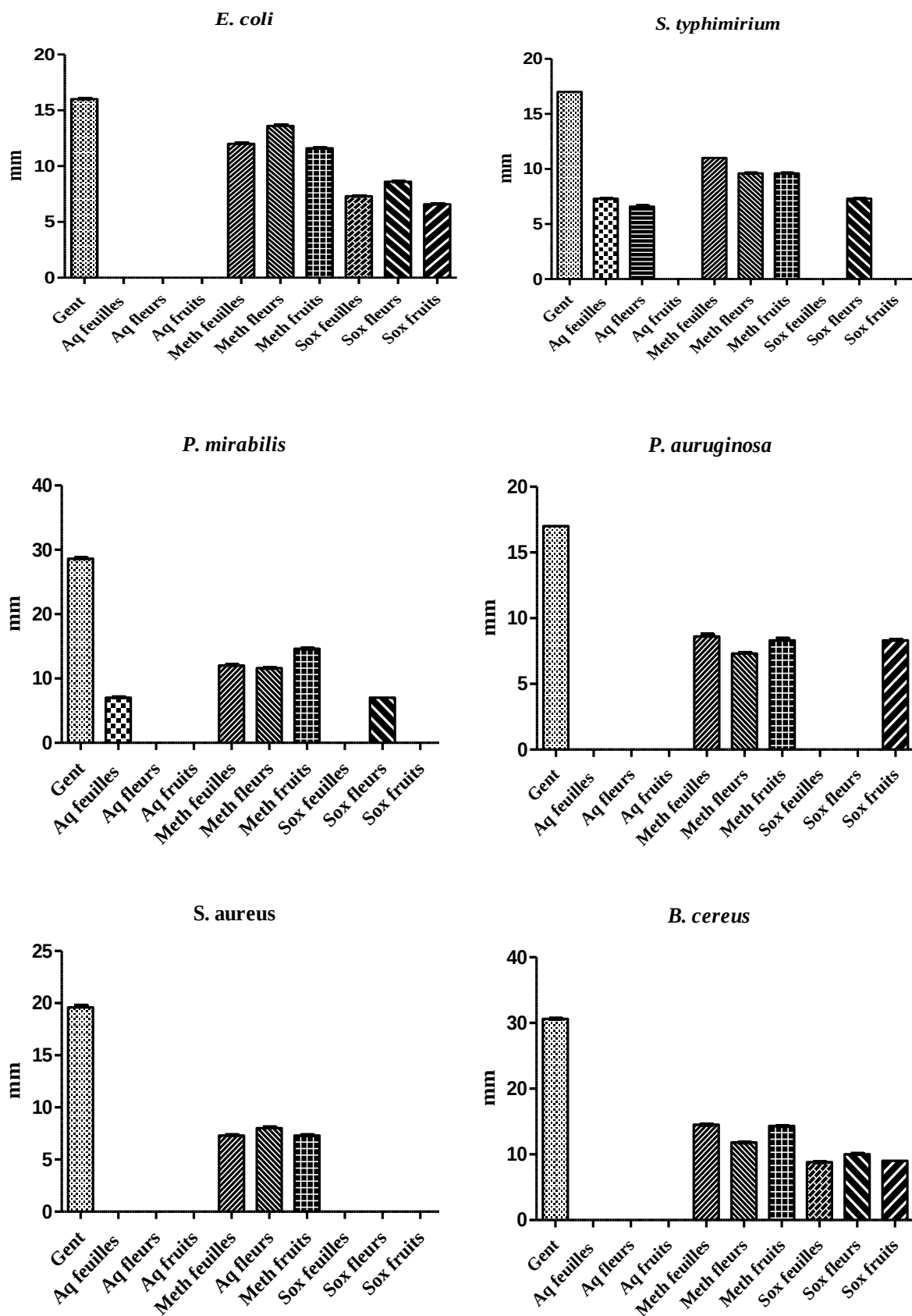
Extraits	PPT ¹	FT ²	Flav T ³	TT ⁴
Ext Aq feuilles	165.35±0.00	9.65±2.18	40.16±1.95	182.27±14.97
Ext Aq fruits	76.95±4.47	3.94±1.44	20.95±1.35	150.87±3.4
Ext Aq fleurs	76.56±8.78	17.84±1.37	60.1±1.46	229.94±8.62
Ext Méth feuilles	245.7±5.9	43.37±0.24	84.37±0.53	191.05±17.24
Ext Méth fruits	406.87±7.97	22.03±1.40	61.13±0.79	313.46±6.89
Ext Méth fleurs	207.10±4.17	67.26±0.11	157.22±4.18	249.38±5.44
Ext Ac feuilles	239.83±7.81	46.86±0.65	93.25±2.41	119.75±9.3
Ext Ac fruits	362.17±8.24	17.56±1.1	65.21±1.75	154.38±7.25
Ext Ac fleurs	39.69±2.14	15.04±1.19	46.12±2.24	128.64±11.84

¹ Dosage des polyphénols (mg équivalent de acide gallique/ 100 g d'extrait). ² Dosage des flavonoïdes (mg équivalent de quercétine/g d'extrait). ³ Dosage des flavones et flavonols (mg équivalent de quercétine/ g d'extrait). ⁴ Dosage des tannins (mg équivalent d'acide tannique/ g d'extrait).

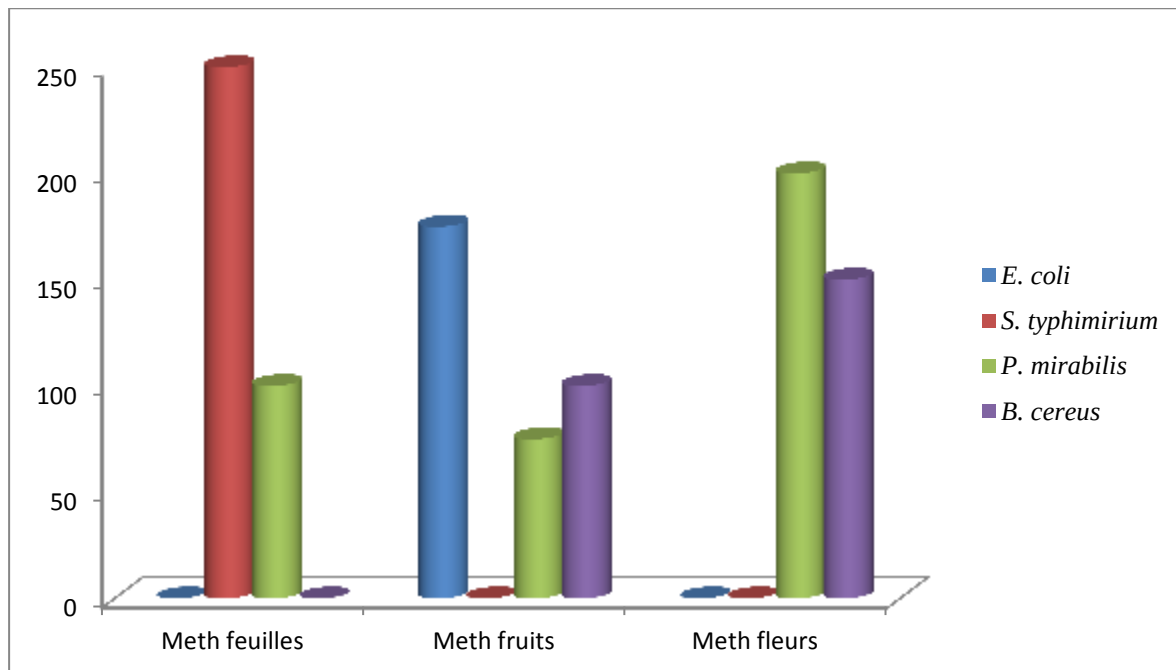
ANNEX IV : L'activité anti-oxydante des différentes parties de *C. oxycantha* L.

Extraits	DPPH (µg/ml)	B-carotène (%)	CFF (µg/ml)	PR (µg/ml)
Ext Aq feuilles	64.79±1.07	82.93±2.7	1400.71±4.09	506.04±1.95
Ext Aq fruits	106.49±1.13	51.68±4.9	1215±5.3	461.51±0.63
Ext Aq fleurs	43.37±2.05	83.88±1.77	1409±3.2	486.69±6.13
Ext Méth feuilles	24.47±0.51	91.79±0.00	646.18±2.7	98.94±0.95
Ext Méth fruits	17.47±1.56	96.73±2.62	530±1.5	90.87±0.54
Ext Méth fleurs	37.23±3.1	73.34±2.46	589.41±1.89	94.05±0.97
Ext Ac feuilles	39.58±1.37	85.71±0.00	660.29±2.0	143.93±1.29
Ext Ac fruits	21.55±0.68	66.33±0.89	1321±3.6	49.16±1.66
Ext Ac fleurs	188.18±3.79	69.92±5.43	980±2.1	500±2.87
BHT	41.65±0.0	---	---	---
BHA	14.12±0.0	92.4±1.7	---	41.41±0.51
MeOH	---	2.43±0.4	---	---
H2O	---	1.33±0.7	---	---
EDTA	---	---	43.53±1.35	---
AG	---	---	---	32.83±0.45

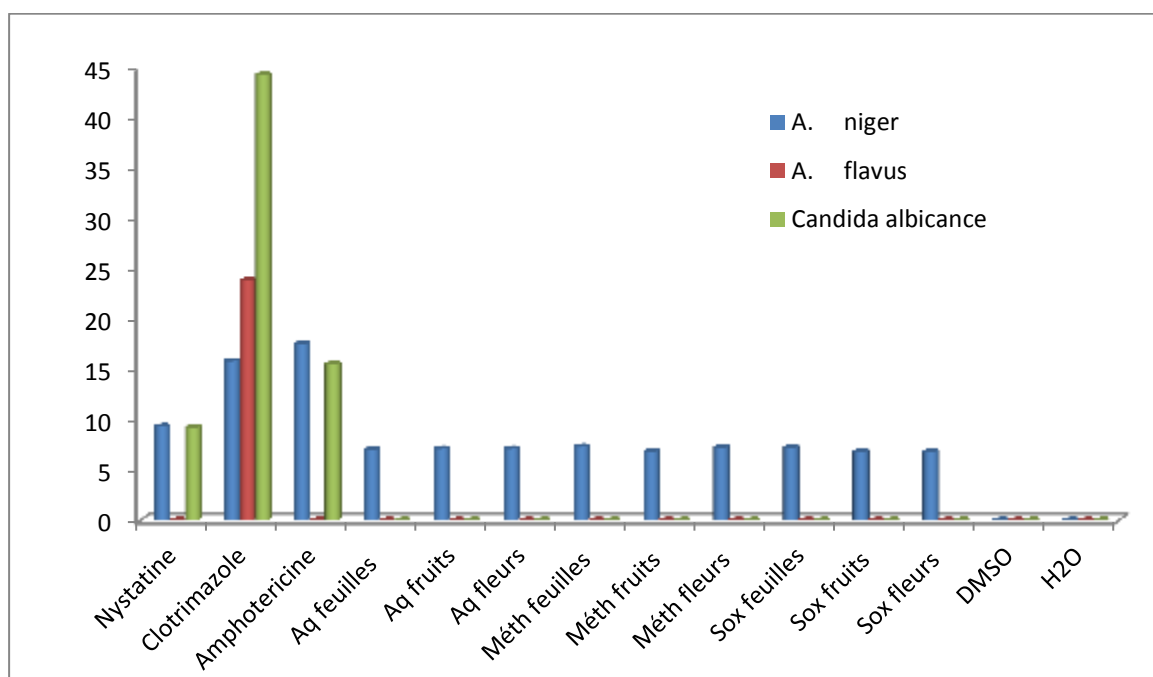
ANNEX (Va) : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries par les extraits de *C. oxyacantha*, de gentamycine et les témoins négatifs.



ANNEX (V_b) : Les concentrations minimales inhibitrices des extraits de méthanol des différentes parties de *C. oxyacantha*.



ANNEX (V_c) : Diamètres des zones d'inhibition des extraits de *C. oxyacantha*, des témoins positifs et négatifs sur les champignons (mm).



Antioxidant activity of aqueous extracts from *Crataegus oxyacantha* leaves

Amor Loubna^a and Belhattab Rachid^b

^aDepartment of Ecology and Vegetal Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas-Setif 1 University, 19000 Setif, Algeria.

^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas-Setif 1 University, 19000 Setif, Algeria.

ABSTRACT

Background: *Crataegus* (Rosaceae) genus comprises more than 200 species worldwide but few species have been used medicinally. In the Mediterranean region, the predominant species of this genus is *C. oxyacantha* syn. *Monogyna* (known as Hawthorn) which is protective against the treatment of mild heart diseases. **Methods:** The leaves were collected at three different stages (vegetative, flowering and fruiting). The aim of this work was to determine total phenol, flavonoid, flavon and flavonol contents, as well as antioxidant activity of hawthorn leaves aqueous extracts. Chemical determinations were carried out using spectrophotometric methods, whereas antioxidant activity was assessed according to 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), iron chelating ability and reducing power.

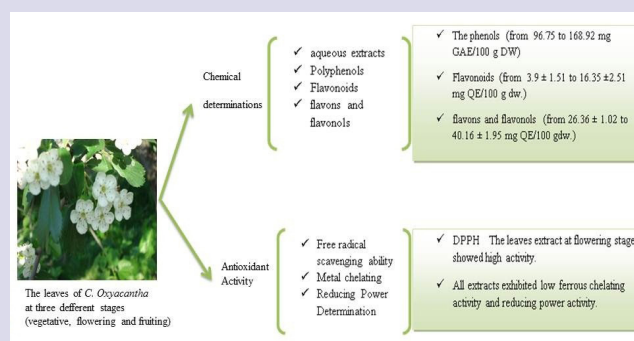
Results: Total phenol content varied from 96.75 to 168.92 mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g of dry weight; flavonoids ranged from 3.9 ± 1.51 to 16.35 ± 2.51 mg of quercetin equivalent (QE)/100 g of dry weight from the extract of leaves at flowering, vegetative and fruiting stages respectively; and the flavons and flavonols ranged from 26.36 ± 1.02 to 40.16 ± 1.95 mg of quercetin equivalent (QE)/100 g of dry weight. The leaves extract at flowering stage showed high scavenging activity against the free radical DPPH with an IC₅₀ value of 45.23 ± 0.07 µg/ml. The leaves extract from all the stages exhibited low ferrous chelating activity and reducing power activity (IC₅₀ between 262.26 ± 1.32 and 506.04 ± 1.95 µg/ml) compared to BHA (IC₅₀ 41.41 ± 0.51 µg/ml).

Key words: Antioxidant activity, *C. oxyacantha*, Hawthorn, Phenolic content, Rosaceae.

SUMMARY

- The leaves at the flowering stage showed the highest polyphenol and flavonoid content followed by those at the vegetative and fruiting stages.
- The extract of leaves in the vegetative stage shows the higher content of flavones and flavonols.

- The leaves extract at flowering stage showed high scavenging activity against the free radical DPPH.
- The leaves extract from all the stages exhibited low ferrous chelating activity and reducing power activity.



PICTORIAL ABSTRACT

Abbreviations used: DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), BHA (butylated hydroxyanisole), Na₂CO₃ (Sodium carbonate), AlCl₃ (Aluminium chloride), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), QE (quercetin equivalent), GAE (gallic acid equivalent).

Correspondence:

AMOR Loubna, Department of Ecology and Vegetal Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas-Setif 1 University, 19000 Setif, Algeria.

Email: loubnaam17@gmail.com

DOI : 10.5530/pc.2015.4.2

INTRODUCTION

Free radicals are fundamental to any biochemical process and represent an essential part of aerobic life and metabolism. The oxygen consumption inherent in cell growth leads to the generation of a series of reactive oxygen species (ROS).¹ ROS, which include free radicals such as superoxide anion radicals (O₂⁻), hydroxyl radicals (OH[•]) and non-free radical species such as hydrogen peroxide (H₂O₂) and singlet oxygen (¹O₂), are various forms of activated oxygen. The interaction of these species with molecules of a lipid produces new radicals (hydro peroxides and peroxides). In response to a variety of factors including tobacco smoke, pollutants, ionizing radiations, alcohol, synthetic pesticides and solvent, their production increases.² ROS can cause oxidative damage to proteins, lipids, enzymes and DNA and have also been linked to pathogenesis of oxidative diseases.³ Living organisms possess a number of protective mechanisms against the oxidative stress and toxic effects of ROS. Antioxidants regulate various oxidative reactions naturally occurring in tissues and are evaluated as potential anti-aging agents.⁴ Hence, antioxidants can terminate or retard the oxidation process by scavenging free radicals, chelating free catalytic metals and also by acting as electron donors.

Antioxidant compounds can scavenge free radicals and increase shelf life by retarding the process of lipid peroxidation, which is one of the major reasons for deterioration of food and pharmaceutical products during processing and storage. Antioxidants have been widely used as food additives to provide protection against oxidative degradation of foods.^{5,6}

Hawthorn (*Crataegus* spp.), belonging to the Rosaceae family, consists of small trees and shrubs. Common names for hawthorns may include mayblossom, quick thorn, whitethorn, haw hazels; gazelle, halves; hawthorn, and bread and cheese tree.⁷ They are native to the Mediterranean region, North Africa, Europe and Central Asia. There are more than 200 species worldwide, but very few have been tested and used for medicinal purposes. These include *C. oxyacantha*, *C. laevigata*, *C. monogyna*, *C. orientalis* and *C. pinnatifida*.⁸ The medicinal use of extracts or tinctures prepared from leaves, flowers and/or fruits dates back to ancient times. They are now officially listed as herbal drugs in pharmacopoeias in countries such as Germany, France, China and England.^{9,10}

In this study, three different aqueous extracts leaves at three developmen-

tal stages were prepared and their antioxidant activities *in vitro* were determined, including free radical scavenging effects, chelating ability and reducing power in order to evaluate its natural antioxidant properties.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and chemicals

Leaves of *C. oxyacantha* were collected from Beni Fouda, Algeria in three phases (vegetative, flowering and fruiting phases). The plant was taxonomically identified in department of Ecology and Vegetal Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University F.A. Setif-1. The plant samples were cut into small pieces and air dried at room temperature.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), quercetine, gallic acid, ferrozine, potassium ferricyanide, butylated hydroxyanisol (BHA) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). All other chemicals and solvents were obtained from Fluka.

Aqueous extracts

For the preparation of water extracts, leaves (10 g) were extracted with boiling water (250 ml) for 10 min. The plant materials remained in the warm water for 15 min and were then filtered. The filtrates were concentrated in a rotary evaporator (Büchi) to reduce the volume and kept in dark until use.¹¹

Total phenolic content determination

Total phenolic content of *C. oxyacantha* extracts was determined according to Folin-Ciocalteu spectrophotometric method.¹² A volume of 0.5 mL of 50% Folin-Ciocalteu reagent was mixed in a test tube containing 0.1 mL of extract. The resultant mixture was allowed to react for 1 min and 1.5 mL of 20% Na₂CO₃ was added. It was mixed thoroughly and placed in the dark for 2 h and then the absorbance was recorded at 760 nm using a visible light spectrophotometer (Spectronic 20 genesys TM). A gallic acid standard curve was obtained for the calculation of phenolic content.

Total flavonoid content determination

Total flavonoid content was determined using a spectrophotometric method based on the formation of flavonoid complex with aluminum. A volume of 1 mL of 2% AlCl₃ methanol solution was added to 1 mL of sample solution at room temperature. After 30 min incubation the absorbance was measured at 430 nm using a visible light spectrophotometer. Yellow color indicated that the extracts contained flavonoids. Quercetin was used as standard for calibration. Total flavonoid content was calculated as quercetin equivalent (QE).¹³

Determination of flavons and flavonols

Flavons and flavonols in extracts were expressed as quercetine equivalent. Quercetine was used to make the calibration curve. The standard solutions or extracts (0.5 mL) were mixed with 1.5 mL 95% ethanol (V/V), 0.1 mL 10% AlCl₃ (m/V), 0.1 mL (1M) potassium acetate and 2.8 mL water. The volume of 10% AlCl₃ was substituted by the same volume of distilled water in blank. After incubation at room temperature for 30 minutes, the absorbance of the reaction mixture was measured spectrophotometry at 415 nm.¹³

Free radical scavenging ability

Antiradical scavenging activity was evaluated using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) radical (0.004% in methanol), according to the method described by Kulsic.¹⁴ The extracts were dissolved in distilled water. BHA was used as the standard.

1 mL of the DPPH solution was mixed with 1 mL of the sample solution or the standard and then kept in the dark for 30 min. The optical density (DO) was measured using a Spectrophotometer at 515 nm against methanol. The blank consist of 1 mL of methanol and 1 mL of DPPH solution (0.004%).

All determinations were performed in triplicate. The optical density was recorded and percent of inhibition (PI) was calculated as follows: PI% = [(A₀ - At)/A₀] 100, where

A₀ is optical density of the blank and A_i is optical density in the presence of extracts.

Metal chelating

Ferrous ions chelating activity of aqueous extracts of *C. oxyacantha* and commercial antioxidants was determined according to Geckil *et al* (2005)¹⁵ method. Into tubes containing 1.7 ml distilled water and 50 µl of 0.2 mM FeCl₂, 50 µl of sample solution was added and the mixture was left at room temperature for 5 min. To this mixture, 0.1 ml ferrozine (5 mM) was added and final color was monitored spectrophotometrically at 562 after 10 min incubation. The metal chelating efficiency of sample was determined by comparing with the chelating activity of Ethyl Diamine Tetra-acetic Acid (EDTA). The inhibition percentage of ferrozine-Fe²⁺ complex formation against blanks containing FeCl₂ and ferrozine was calculated by the formula;

$$\% \text{ inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_c] \times 100$$

Where, A₀ indicates the absorbance of the control and A₁ the absorbance in the presence of *C. oxyacantha* extracts, commercial antioxidant or EDTA.

Reducing Power Determination

The reducing power of leaves extracts of *C. oxyacantha* was determined according to Lim *et al.* (2007),¹⁶ 0.1 ml of each extracts in water were mixed with phosphate buffer (2.5 ml, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide [K₂Fe(CN)₆] (2.5 ml, 1%). The mixture was incubated at 50°C for 20 min. A portion (2.5 ml) of tri-chloroacetic acid (10%) was added to the mixture to stop the reaction, which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of solution (2.5 ml) was mixed with distilled water (2.5 ml) and FeCl₃ (0.5 ml, 0.1%), and the absorbance was measured spectrophotometrically at 700 nm. Increased absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing power. BHA was used as positive control.

RESULTS AND DISCUSSION

Total polyphenols, flavonoids, flavons and flavonols content were evaluated in the *C. oxyacantha* leaves aqueous extract obtained during three different stages by Folin Ciocalteu and AlCl₃ methods (Table 1). Total phenolic content of the leaves at the flowering and vegetative stages were 168.92 mg GAE/100 g DW and 165.35 mg GAE/100 g DW respectively, whereas at the

Table 1: Content of total polyphenols, total flavonoids and flavons and flavonols determined in the *C. oxyacantha* leaves aqueous extracts obtained at different stages

Leaves Extracts	Total polyphenols ¹	flavonoids ²	flavons and flavonols ²
Vegetative	165.35 ± 0.0	9.65 ± 2.18	40.16 ± 1.95
Flowerings	168.92 ± 0.0	16.35 ± 2.51	26.36 ± 1.02
Fruiting	96.75 ± 0.0	3.9 ± 1.5	30.39 ± 0.6

1) Mg of GAE/ 100 g dw; 2) Mg of QE/100 g dw; 3) Each value in the table is represented as mean ± SD (n=3).

Table 2: Antioxidant activity of *C. oxyacantha* leaves extracts at vegetative, flowering and fruity stages and positive control (BHA, EDTA)

	IC ₅₀ (µg/ml) ³		
	DPPH	R.P. ¹	M.C ²
Vegetative	64.79 ± 1.07	506.04 ± 1.95	1400.71 ± 4.09
Flowering	45.23 ± 0.07	262.26 ± 1.32	1257.84 ± 0.0
Fruity	72.51 ± 2.	379.07 ± 2	1500 ± 0.0
BHA	14.12 ± 0.0	41.41 ± 0.51	-
EDTA	-	-	43.53 ± 1.35

1) Reducing Power; 2) Metal Chelating; 3) Each value in the table is represented as mean ± SD (n=3).

fruiting stage it was 96.75 mg GAE/100 g DW. These results show that the leaves can make a rich source of polyphenols when compared to the fruit content, the part of the plant most investigated. In comparison, Kosatic¹⁷ found that the polyphenol content ranged from 2.12 ± 0.12 to 30.63 ± 2.56 mg GAE /g of fresh fruit when extracted with organic solvents.

The leaves at the flowering stage showed the highest flavonoid content (16.35 ± 2.51 mg QE/100 g DW), followed by those at the vegetative and fruiting stages. The extract of leaves in the vegetative stage shows the higher content of flavons and flavonols (40.16 ± 1.95 mg QE/100 g DW). Total polyphenol and total flavonoid varies in different leaf extracts.

DPPH radical scavenging activity

The free radical scavenging activities were evaluated using the DPPH assay (Table 2). DPPH possesses a proton free radical having characteristic absorption, which decreases on exposure to radical scavengers.¹⁸ The method is widely used to predict the ability of flavonoids to transfer H atoms to radicals is based on the free radical, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl in the DPPH assay. The antioxidants were able to reduce the stable radical DPPH to the yellow colored diphenyl-picrylhydrazine. In this study, DPPH radical scavenging method was used to assess the determination of potential radical scavenging activities of aqueous extract of leaves at vegetative, flowering and fruiting stages. The reduction ability of DPPH radicals' formation was determined by the decrease in its absorbance at 515 nm induced by antioxidants. Free radical scavenging effects results were defined as the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH radical concentration by 50% in 30 minutes (IC₅₀). The leaves at flowering stage exerted the highest antiradical activity with an IC₅₀ value of 45.23 ± 0.07 µg /ml, followed by leaves at vegetative stage (64.79 ± 1.07 µg/ml) and leaves in fruiting stage (72.51 ± 2 µg/ml). However, these activities are very low comparatively to that of BHA with an IC₅₀ value of 14.12 µg/ml (Table 2). Generally, leaves extract at flowering stage have the highest free radical scavenging activity. Our results suggested that phenolic content increased the free radical scavenging activities.

Metal chelating

An important mechanism of antioxidant activity is the ability to chelate/deactivate transition metals, which possess the ability to catalyze hydroperoxide decomposition and Fenton-type reactions.¹⁹ Chelating agents may also serve as secondary antioxidants since they reduce redox potential, thereby stabilizing the oxidized forms of metal species.²⁰ Therefore, the ion (II) chelating capacities of the extracts were screened. The iron-ferrozine complex has maximum absorbance at 562 nm and a large decrease in absorbance indicates strong chelating power by forming a stable iron (II) chelate. In the presence of chelating agents, complex formation between ferrozine and Fe²⁺ is disrupted, resulting in reduction in the red colour of the complex. Measurement of the color decrease therefore allows estimation of the chelating activity of the co-existing chelator.^{21,22}

In this study, the aqueous extracts of three stages of leaves and reference compounds (EDTA) were found to have interfered with the formation of the ferrous and ferrozine complex, indicating that they contained chelating activity and were able to capture ferrous before ferrozine.

The metal chelating capacities of the leaves at vegetative, flowering and fruiting stages water extracts are shown in Table 2. The metal inhibition capacities increased with increasing extract concentrations, indicating that chelating compounds were present in these plant extracts. The metal chelating activity of the extracts was strongly dependent on the stage of collection due to the various antioxidant potentials of the compounds. Among these, the flowering stage extract possessed higher metal chelating activities compared to the other extracts.

Transition metals, especially iron (II), found in the biological systems may act as pro-oxidants. A pro-oxidant does not act as harmful agent for bio molecules directly, but facilitates production of such species which may cause damage to bio-molecules. Polyphenolic compounds, thus by binding with Fe (II), do not allow them to act as pro-oxidant and thus add to an indirect defense mechanism against potentially harmful radical species.

Reducing Power

Different studies have indicated that the electron donation capacity, reflecting the reducing power, of bioactive compounds is associated with antioxidant activity.²³ The presence of reductants such as antioxidant substances in the antioxidant samples causes the reduction of the Fe³⁺/ferricyanide complex to the ferrous form. Therefore, Fe²⁺ can be monitored by measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm.^{24,25} There are a number of assays designed to measure overall antioxidant activity or reducing potential, as an indication of host total capacity to withstand free radical stress.²⁶ In this assay, the yellow color of the test solution changes to various shades of green and blue depending on the reducing power of antioxidant samples. The reducing capacity of a compound may serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity. The reducing power of leaves was excellent compared to that of the BHA standard (Table 2); the reducing power of leaves at flowering stage (262.26 ± 1.32 µg/ml) was higher than extracts of leaves at fruiting and vegetative stages (379.07 ± 2 and 506.04 ± 1.95 µg/ml respectively). Reducing power of BHA 41.41 ± 0.5 µg/ml.

CONCLUSION

The replacement of synthetic with natural antioxidants (because of implications for human health) may be advantageous. In the present study analysis of total phenolic and flavonoid content and antioxidant activities showed that the leaves of *C. oxyacantha* collected in different stages can be a potent source of natural antioxidants.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are thankful to all staff in the Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas-Setif 1 University for their kind cooperation in conducting this study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

REFERENCES

- Barros L, Ferreira M, Queiros B, Ferreira ICFR and Baptista P, Total phenols, ascorbic acid, β-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food Chem. 2007; 103(2): 413-9.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? J. Neurochem. 2006; 97(6): 1634-58.
- Halliwell B. Antioxidants and human disease: A general introduction. Nutrition Reviews 1997; 55(1): S44-9.

4. Gulcin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol.* 2012; 86(3): 345-91.
5. Kumaran A, Karunakaran RJ. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem.* 2006; 97(1): 109-14.
6. Gülçin D, Sat DG, Beydemir S, Elmastas M, Küfrevioğlu OD. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chem.* 2004; 87(3): 393-400.
7. Ozcan M, Haciseferogullari H, Marakoglu T, Arslan D. Hawthorn (*Crataegus spp.*) fruit: some physical and chemical properties. *J Food Eng.* 2005; 69(4): 409-13.
8. Rigelsky JM, Sweet DV. Hawthorn, Pharmacology and Therapeutic Uses. *Am J Health Syst Pharm.* 2002; 59(5): 417-42.
9. Bahorun T, Aumjaud E, Ramphul H, Rycha M, Luximon-Ramma A, Trotin F, *et al.* Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. *Nahrung.* 2003; 47(3): 191-8.
10. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal medicines. Royal Pharmaceutical Society, London, United Kingdom: Pharmaceutical Press; 2002.
11. Belhattab R, Larous L, Kalantzakis G, Boskou D, Exarchou V. Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *J. food Agric. Environ.* 2004; 2(1): 69-73.
12. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Jones, L. (ed). *Methods in enzymology.* San Diego. CA 1999; 99: 152-78.
13. Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S, Vladimir-Knez EICS. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.* 2004; 54(1): 65-72.
14. Kulsic T, Radomic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidant activity of *Oregano* essential oil. *Food. chem.* 2004; 85(4): 633-40.
15. Geckil H, Ates B, Duramaz G, Erdogan S, Yalmaz I. Antioxidant, Free radical scavenging and Metal chelating characteristics of Propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2005; 1(1): 27-31.
16. Lim YY, Lim TT, Tee JJ. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chem.* 2007; 103(3): 1003-8.
17. Kostic AD, Velickovic Jasmina M, Mitic Snezana S, Mitic Milan N, Randelovic Sasa S. Phenolic Content, and Antioxidant and Antimicrobial activities of *Crataegus Oxyacantha* L. (*Rosaceae*) Fruit extract from Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2012; 11(1): 117-24.
18. Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998; 62(6): 1201-4.
19. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; 219(1): 1-4.
20. Hu YQ, Tan RX, Chu MY, Zhou J. Apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721 induced by water-soluble macromolecular components of *Artemisia capillaries* Thunberg. *Jpn. J. Cancer Res.* 2000; 91(1): 113-7.
21. Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa K. Antioxidative and antiglycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48(2): 180-5.
22. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 1-85.
23. Siddhuraju P, Mohan PS, Becker K. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chem.* 2002; 79(1): 61-7.
24. Chung YC, Chang CT, Chao WW, Lin CF, Chou ST. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50(8): 2454-8.
25. Gülçin D. Antioxidant activity of l-adrenaline: A structure–activity insight. *Chem. Biol. Interact.* 2009; 179(2): 71-80.
26. Wood LG, Gibson PG, Garg ML. A review of the methodology for assessing *in vivo* antioxidant capacity. *J. Sci. Food Agric.* 2006; 86(13): 2057.

ABOUT AUTHORS



AMOR Loubna: Is a Science Doctorate student at Ferhat Abbes University in Setif (Algeria), where she graduated in Natural Science Bachelor and Magister (=Master) of Valorization of Natural Resources. Her doctoral researches are based on the evaluation of the bioactivities of medicinal plants.

الملخص

تحصلنا على المستخلصات باستعمال طريقة الغلي، النقع و باستعمال جهاز سوكسلت . تم اجراء عمليات التحليل الكيميائي باستعمال طرق الطيف الضوئي، تنقية وتحديد المركبات الفينولية باستخدام كروماتوغرافيا الضغط العالي وتقنية الرنين المغناطيسي، في حين تم تقدير النشاط المضادة للأوكسدة باستعمال طريقة DPPH، بيتا كاروتين/ حمض اللينولييك، القوة الارجاعية، النشاطية المضادة للميكروبات باستخدام طريقة قياس قطر التثبيط و تحديد لتراكيز الدنيا المثبطة، و النشاطية المضادة للانقسام المفرط للخلايا باستعمال طريقة ELISA BrdU واستخدام سلالتين خلويتين HeLa و A549. يتراوح المحتوى الفينولي بين 2.14 ± 39.69 و 7.97 ± 406.87 مغ مكافئ من حمض الغاليك / غ من المستخلص، محتوى الفلافونويدات ما بين 1.51 ± 3.9 مغ مكافئ من الكركستين/ غرام من المستخلص، الفلافون والفلافونول ما بين 1.35 ± 20.95 و 4.18 ± 157.22 مغ مكافئ من الكركستين/ غ من المستخلص والديباغ تتراوح الكمية ما بين 9.3 ± 119.75 و 6.89 ± 313.46 مغ مكافئ من حمض التانيك/ غ من (1.56±17.47) ميكروغرام/مل، بيتا المستخلص. يظهر المستخلص الميثانولي للثمار نشاط مضاد للأوكسدة في اختبار اللينولييك (2.62 ± 96.73) و خلب الحديد (DPPH كاروتين/ حمض 1.5 ± 530 ميكروغرام/مل). لاحظنا وجود نشاطية مضادة للميكروبات ضعيفة مع جميع المستخلصات. وجدنا انه في التراكيز العليا (250 ميكروغ/مل) كل المستخلصات لديها نشاطية مضادة للانقسام المفرط للخلايا معتبرة باستثناء المستخلص الاسيتوني للثمار الذي يظهر نشاطية ضعيفة. مع ذلك فان الستيريود وبنسبة اقل الايبكاتشين المعزولة من الاوراق تملك نشاطية ماثلة للشاهد الموجب حتى في التراكيز الدنيا على الخلية هيللا.

الكلمات المفتاح: *Crataegus oxyacantha*, *Asteracea*، المركبات الكيميائية، النشاطية المضادة للأوكسدة، النشاطية المضادة للانقسام المفرط

للخلايا، النشاطية المضادة للميكروبات.

Résumé

Les extraits sont obtenus par décoction, macération et au soxhlet. Les déterminations chimiques ont été effectuées en utilisant des méthodes spectro-photométriques, la purification et l'identification des composés phénoliques en utilisant HPLC TOF / MS et la RMN ^1H et RMN ^{13}C , alors que l'activité antioxydante a été évaluée selon la méthode utilisant le DPPH, β -carotène/acide linoléique, chélation du fer et le pouvoir réducteur. L'activité antimicrobienne a été évaluée en mesurant la zone d'inhibition autour des disques et la détermination des concentrations minimale inhibitrices (CMI). L'activité antiproliférative des extraits a été évaluée selon le test BrdU ELISA en utilisant deux lignées cellulaires HeLa et A549. La teneur en polyphénol totaux variaient entre $39,69 \pm 2,14$ et $406,87 \pm 7,97$ mg EAG / g d'extrait; Les flavonoïdes totaux entre $3,9 \pm 1,51$ à $67,26 \pm 0,11$ mg EQ / g d'extrait; Les flavons et les flavonols entre $20,95 \pm 1,35$ à $157,22 \pm 4,18$ mg EQ / g d'extrait; et les tanins variaient entre $119,75 \pm 9,3$ et $313,46 \pm 6,89$ mg EAT / g d'extrait. L'extrait de méthanol des fruits a montré une forte activité antioxydante; DPPH ($\text{CI}_{50}=17.47 \pm 1.56$ $\mu\text{g/ml}$), β -carotène/ Acide linoléique ($\text{AA}\%=96.73 \pm 2.62$), la chélation du fer ($\text{CI}_{50}=530 \pm 1.5$ $\mu\text{g/ml}$). Une activité antimicrobienne faible a été observée avec l'ensemble des extraits. Pour la dose 250 $\mu\text{g/ml}$, tous les extraits ont manifesté une forte activité antiproliférative à l'exception de l'extrait d'acétone des fruits qui a montré une activité modérée. Toutefois, un stéroïde et à un degré moindre l'épicatéchine isolées partir des feuilles ont manifesté des activités similaires au témoin positif, même à de faibles doses sur les cellules HeLa.

Mots clés : *Crataegus oxyacantha*, *Asteracea*, composition chimique, activité antiproliférative, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

The extracts were obtained by decoction, maceration and by using soxhlet apparatus. The chemical determinations were carried out using spectrophotometric methods, purification and identification of phenolic compounds by using HPLC TOF/MS and RMN ^1H and RMN ^{13}C , whereas antioxidant activity was assessed according to DPPH, β -carotene/linoleic acid, iron chelating ability and reducing power methods. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition and determination of the minimal inhibitory concentration (MIC). The anti-proliferative activity was assessed by ELISA BrdU assay against two cell lines HeLa and A549. Total phenol content varied from 39.69 ± 2.14 to 406.87 ± 7.97 mg GAE/g extract; flavonoids ranged from 3.9 ± 1.51 to 67.26 ± 0.11 mg QE/g extract; the flavons and flavonols ranged from 20.95 ± 1.35 to 157.22 ± 4.18 mg QE/g extract; and the tannins ranged between 119.75 ± 9.3 and 313.46 ± 6.89 mg TAE/ g extract . The fruits methanol extract showed high antioxidant activity; against the free radical DPPH ($\text{IC}_{50}=17.47 \pm 1.56$ $\mu\text{g/ml}$), β -carotene/linoleic acid ($\text{AA}\%=96.73 \pm 2.62$), iron chelating ability ($\text{IC}_{50}=530 \pm 1.5$ $\mu\text{g/ml}$). A weak antimicrobial activity was observed with all extracts. When used at 250 $\mu\text{g/ml}$, all extracts showed a strong anti-proliferative activity, whereas the fruits acetone extract showed a moderate effect. However, a steroid and at a less extent epi-catechin compounds isolated from the leaves showed similar activities to the positive control even tested at low concentration against HeLa cells.

Key words: *Crataegus oxyacantha*, *Asteracea*, chemical composition, anti-proliferative activity, antioxidant activity, antimicrobial activity.