

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار- عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

Spécialité : Immunotoxicologie

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Thème

## Étude botanique, composition chimique et activités biologiques des Genévriers d'Algérie

Présentée par : Mlle AHMIDA Meryem

### Membres du Jury

Président	Mr KECHRID Zine	Professeur, Université Badji Mokhtar - Annaba
Directeur de thèse	Mr BOUMENDJEL Mahieddine	Professeur, Université Badji Mokhtar - Annaba
Examinatrice	Mme FEKNOUS Nesrine	Maître de Conférences A, Université Chadli bendjedid El-Tarf
Examinatrice	Mme HENNOUNI Nacera	Maître de Conférences A, Université Chadli bendjedid El-Tarf
Examinatrice	Mme ALEM Karima	Maître de Conférences A, Université Badji Mokhtar - Annaba

Année universitaire : 2023/2024

## Dédicaces

*À la miséricorde d'Allah le Tout-Puissant,*

*À mes précieux parents,*

*Aucun langage ne saurait exprimer pleinement la profondeur de mes émotions, de mon respect, de ma gratitude, et de mon amour éternel envers vous.*

*À mon frère **Yasser** et ma sœur **Marwa**,*

*Je vous suis infiniment reconnaissant pour votre soutien et votre présence constante. Sans votre aide précieuse, vos encouragements et votre soutien indéfectible, ce projet n'aurait jamais abouti.*

*En mémoire de mes chers **grands-parents** et de **mon oncle Mekki**,*

*Leur souvenir demeure gravé dans mon cœur pour toujours.*

*À la vaste famille **Ahmida** et **Laboudi**,*

*Vos prières ont été une source d'inspiration inépuisable.*

*À mes meilleures amies **Ilhem**, **Abir**, **Ghada**, **Maissa** et **Halla***

*Votre encouragement et votre intérêt pour ma réussite ont été d'une valeur inestimable.*

# Remerciements

Avant tout الحمد لله

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la contribution de nombreuses âmes bienveillantes. Je souhaite exprimer ma gratitude la plus sincère et profonde en remerciant du fond du cœur toutes celles et ceux qui m'ont prêté leur soutien pour l'accomplissement de cette œuvre.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers mon directeur de thèse, Monsieur **BOUMENDJEL Mahieddine**, professeur au Département de Biochimie de l'Université Badji Mokhtar Annaba, pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail. Je lui suis reconnaissante pour son soutien constant, sa patience et sa supervision efficace. Il a créé un environnement de travail amical et soutenant. Cela a été un privilège de travailler sous sa direction et de bénéficier de son expertise au cours de ces dernières années.

À Madame **BOUMENDJEL Amel**, professeure au Département de Biochimie de l'Université Badji Mokhtar Annaba, qui a été mon guide et mon soutien dès les premiers pas de mon mémoire de master et tout au long de mon parcours doctoral. Je tiens à lui exprimer ma gratitude la plus sincère pour son accompagnement précieux, sa disponibilité constante et ses conseils éclairés qui ont grandement contribué à mon épanouissement académique et professionnel.

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail :

A Monsieur **KECHRID Zine**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury et également pour les connaissances transmises durant mon cursus au Département de Biochimie.

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de donner de leur attention et de leur temps afin d'examiner ce travail : Dr **FEKNOUS Nesrine** Maître de Conférences à l'Université Chadli Bendjedid El-Tarf, Dr **HENNOUNI Nacera** Maître de Conférences également à l'Université Chadli Bendjedid El-Tarf, et enfin le Dr **ALEM Karima**, Maître de Conférences à l'Université Badji Mokhtar Annaba.

À Monsieur le Professeur **MESSARAH Mahfoud**, Directeur du Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie Environnementale (L.B.T.E.) à l'Université Badji Mokhtar à Annaba, le lieu où toutes nos expérimentations sont réalisées. Merci pour votre soutien et votre accueil chaleureux au sein de votre laboratoire.

Je tiens à adresser un immense merci à Monsieur Dr **BENSOUICI Chawki** et à toute son équipe du laboratoire de Biochimie du CRBT pour leur accueil chaleureux et l'assistance précieuse qu'ils m'ont apportée tout au long de mon stage.

Je souhaite exprimer ma gratitude à plusieurs personnes :

Je remercie mon père le Professeur **AHMIDA Zahir**

Je remercie également Mr le Professeur **FERDI Youcef**

Je remercie Mr le Professeur **BOUDJAADAR Djamel**

Et Mr le Professeur **DENDOUGUI Houcine**

- À l'ensemble du personnel du service d'anatomie pathologique de l'hôpital BouHara à Skikda, qui m'a réservé un accueil chaleureux et a effectué les coupes histologiques nécessaires.

Je tiens également à remercier dr Djaber Nesrine pour ses précieux conseils et encouragement constant. Un merci spécial à ILhem, Nadjiba, Dr Hichem Zaddam, Baya Nouha moubine, Dr Linda Ounaceur, Dr Taha Khaldi et Dr Housseem Chenna pour leur soutien.

Pour finir, un remerciement sincère à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

## Résumé

*Juniperus oxycedrus*, reconnue pour son importance dans la pharmacopée traditionnelle algérienne, a fait l'objet d'une étude approfondie visant à explorer ses capacités antioxydantes et anti-inflammatoires, ainsi que ses effets anti-acétylcholinestérase, anti-tyrosinase, anti- $\alpha$ -amylase, anti-uréase et photoprotecteurs. Les extraits étudiés incluent l'huile de cade, traditionnellement extraite du bois et des branches de *J. oxycedrus*, et des fractions d'acétate d'éthyle (AEJO) et de n-butanol (NBJO) issues des feuilles. Ces extraits ont été analysés pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Il a été découvert que l'huile de cade, ainsi que les fractions EAJO et NBJO, sont riches en composés phénoliques et flavonoïdes, affichant des capacités antioxydantes notables à travers divers tests. Le profil chimique des fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol, caractérisé par UPLC-ESI-MS/MS, a révélé la présence de douze composés, dont des flavonoïdes marquants tels que la rutine et la chrysin. Ces fractions, y compris l'huile de cade, ont montré une inhibition enzymatique plus ou moins importantes contre l'acétylcholinestérase, l'alpha-amylase, la tyrosinase et l'uréase, suggérant des applications potentielles pour le traitement de maladies telles que la maladie d'Alzheimer, le diabète, l'hyperpigmentation, les troubles dermatologiques et certaines infections bactériennes. Cette démarche vise non seulement à confirmer les applications traditionnelles de cette plante mais également à découvrir de potentielles nouvelles utilisations thérapeutiques basées sur ses propriétés bioactives. Dans le même contexte et compte tenu de leur potentiel antioxydant significatif obtenu lors des recherches *in vitro*, montrant de fortes capacités d'élimination des radicaux libres avec des valeurs IC<sub>50</sub> allant de 21,92 à 24,44  $\mu\text{g/mL}$ , et des pouvoirs réducteurs allant de 11,51 à 30,40  $\mu\text{g/mL}$ , l'huile de cade a été évaluée plus en détail dans d'un modèle expérimental d'asthme allergique. Pour ce fait, quatre groupes de rats Wistar sont utilisés : un groupe témoin, un groupe sensibilisé à l'ovalbumine (OVA), un groupe traité à l'huile de cade (HC), et un dernier groupe sensibilisé à l'ovalbumine et traité à l'huile de cade (OVA+HC). Les propriétés biologiques ont été évaluées en mesurant les marqueurs de stress oxydatif tels que le malondialdéhyde (MDA), le glutathion réduit (GSH), la glutathion peroxydase (GPx), la catalase (CAT), ainsi que les enzymes hépatiques ASAT, ALAT, PAL et les niveaux d'albumine dans divers compartiments incluant le foie, les poumons, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) et le sang. Les résultats ont démontré l'efficacité de l'huile de cade à réduire significativement les marqueurs de stress oxydatif et à diminuer l'infiltration des cellules inflammatoires dans les poumons, notamment en réduisant le recrutement des éosinophiles et des lymphocytes, acteurs clés de l'inflammation allergique associée à l'asthme. L'huile de cade a également contribué à abaisser les niveaux de peroxydation lipidique et à améliorer les niveaux d'enzymes hépatiques. Globalement, ces découvertes, validées par l'analyse microscopique de coupes histologiques des poumons, ont mis en lumière les puissantes propriétés anti-inflammatoires et anti asthmatiques de l'huile de cade. En conclusion, cette étude souligne le fort potentiel thérapeutique de *Juniperus oxycedrus*, et plus particulièrement de l'huile de cade, dans l'atténuation de l'inflammation et du stress oxydatif. Les propriétés antioxydantes, l'inhibition des enzymes et les effets anti-inflammatoires observés confirment son usage traditionnel et ouvrent la possibilité à des applications plus vastes. Ces résultats soutiennent l'utilisation de l'huile de cade et de ses fractions dans le traitement des affections inflammatoires, tout en mettant en lumière leur potentiel dans les industries pharmaceutique, cosmétique et alimentaire.

**Mots clés :** *Juniperus oxycedrus L.*, Huile de cade, Acétate d'éthyle, n-butanol, antioxydants, anti-enzymatiques, asthme expérimental, stress oxydatif.

## Abstract

This study explored the potential health benefits of *Juniperus oxycedrus*, a plant recognized for its significance in traditional Algerian pharmacopeia. The investigation focused on the Cade oil, which is traditionally extracted from the wood and branches of *J. oxycedrus*, as well as the ethyl acetate (EAJO) and n-butanol (NBJO) fractions from the leaves. These components were examined for their antioxidant and anti-inflammatory properties, *in vitro* and *in vivo*. The Cade oil, EAJO and NBJO fractions were found to be rich in phenolics and flavonoids, demonstrating significant antioxidant capacities across several assays. Chemical profiling of the ethyl acetate and butanol fractions via UPLC-ESI-MS/MS identified twelve compounds, including prominent flavonoids such as rutin and chrysin. These fractions, along with Cade oil, exhibited a varying potent enzymes inhibition property against acetylcholinesterase, alpha-amylase, tyrosinase, and urease, suggesting potential applications in managing Alzheimer's disease, diabetes, hyperpigmentation, dermatological disorders, and certain bacterial infections. This comprehensive study not only confirms the traditional uses of *J. oxycedrus* but also unveils potential new therapeutic applications based on its bioactive properties. In the same context and considering their significant antioxidant potential data obtained *in vitro* research showing strong radical scavenging abilities with IC<sub>50</sub> values ranging from 21.92 to 24.44 µg/mL, and reducing power activities ranging from 11.51 to 30.40 µg/mL, the cade oil was further evaluated in a rat model of allergic asthma. Cade oil was administered to four groups of Wistar rats: a negative control group, an ovalbumin-sensitized/challenged group, a Cade oil-treated group, and an ovalbumin-sensitized/challenged Cade oil-treated group. The biological properties were assessed by measuring oxidative stress markers such as malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), as well as hepatic enzyme activities (ASAT, ALAT, and PAL) and albumin levels across various compartments including the liver, lungs bronchoalveolar lavage fluid (LBA) and blood. The results demonstrated Cade oil's effectiveness in significantly reducing oxidative stress markers in the lungs and erythrocytes. It also markedly decreased inflammatory cell infiltration in the lungs, particularly reducing the recruitment of eosinophils and lymphocytes, key players in the allergic inflammation associated with asthma. Moreover, Cade oil was effective in lowering lipid peroxidation and enhancing hepatic enzyme levels. Overall, these findings, supported by microscopic analysis of histological lung sections, underscored the strong anti-inflammatory and anti-asthmatic properties of Cade oil. In conclusion, this study confirms the significant therapeutic potential of *Juniperus oxycedrus*, particularly Cade oil, in managing inflammation and oxidative stress. The demonstrated antioxidant, enzyme inhibition, and anti-inflammatory effects validate its traditional use and suggest potential broader applications. The findings support the use of Cade oil and its fractions in treating inflammatory conditions and highlight their promising use in the pharmaceutical, cosmetic, and food industries.

**Keywords:** *Juniperus oxycedrus* L., Cade oil, Acétate d'éthyle, n-butanol, antioxidants, anti-enzymatic, experimental asthma, oxidative stress.

## الملخص

تهدف الدراسة الحالية إلى أهمية المظهر الكيميائي واستكشاف بعض الأنشطة البيولوجية المحتملة لنبات *العرعر الشريبي*، والذي يُعرف باستعمالاته العديدة في العلاجات التقليدية في الجزائر. قامت الدراسة بالتركيز على زيت القطران المستخرج تقليدياً من خشب وأغصان *العرعر الشريبي*، بالإضافة إلى مستخلصات الأسيتات الإيثيلية (EAJO) وبيوتانول (NBJO) المستخلصة من الأوراق. في بداية الأمر، تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة من خلال العديد من الاختبارات الكيميائية، بالإضافة إلى تقييم قدرة العينات على معالجة الالتهابات عن طريق استعمال اختبار تثبيط تفكيك البروتين BSA. وقد أظهرت النتائج أن زيت القطران بالإضافة إلى مستخلصات (EAJO) و (NBJO) الغنية بالفينولات والفلافونويدات، يرافقها نشاط معتبر فيما يخص إزالة الجذور الحرة وكذا تثبيط تفكيك البروتين BSA. من جهة أخرى، كشف التحليل الكيميائي لفصائل الأسيتات الإيثيلية والبيوتانول (U PLC-ESI-MS/MS) عن وجود اثني عشر مركباً، بما في ذلك الفلافونويدات البارزة rutin و chrysin. إضافة لما سبق ذكره، فقد أظهرت هذه المستخلصات -إضافة إلى زيت القطران- خصائص قوية في تثبيط الإنزيمات مثل الأستيل كولين استراز، الأميلاز ألفا، التيروزيناز بالإضافة إلى إنزيم اليوريزاز، مما يشير إلى تطبيقات محتملة في علاج أمراض مثل مرض الزهايمر، السكري، فرط التصبغ، وبعض العدوى البكتيرية. نظراً للنتائج الجيدة التي أظهرها زيت القطران خلال المرحلة الأولى من الدراسة فيما يتعلق بالنشاط المضاد للأكسدة والذي أظهر معدلات معتبرة في إزالة الجذور الحرة بـ  $IC_{50}$  تتراوح بين 21.92 إلى 24.44 ميكروغرام/مل، الأمر الذي دفعنا إلى دراسة وتقييم زيت القطران بشكل خاص في نموذج فئران للربو التحسسي. وفي هذا الإطار تم استعمال أربع مجموعات من فئران ذكر ويستار: المجموعة الأولى (غير مصابة)، المجموعة الثانية (مصابة تم تحفيزها بمستضد مادة الزلال)، المجموعة الثالثة (معالجة بزيت القطران) والمجموعة الرابعة (محفزة عن طريق مستضد مادة الزلال وفي نفس الوقت معالجة بزيت القطران). تم تقييم الخصائص البيولوجية من خلال قياس تراكيز الخلايا البيضاء في الدم وسائل الغسيل القصي الهوائي (LBA) وكذا إنزيمات الكبد ALAT، ASAT، و PAL، ومستويات الألبومين، إضافة إلى مؤشرات الإجهاد التأكسدي مثل (MDA)، (GSH)، (GPx) و (CAT) في كل من الكبد، الرئتين وكريات الدم الحمراء. أظهرت النتائج فعالية زيت القطران في تخفيض الضرر التأكسدي في كل من الكبد، الرئتين وكريات الدم الحمراء. كما قلل بشكل ملحوظ من النخر الخلوي الالتهابي في الرئتين، خاصة فيما يتعلق بالخلايا اللمفاوية والمحبة والتي تعتبر من أهم مظاهر الالتهاب التحسسي المرتبط بالربو. علاوة على ذلك، فقد أظهر زيت القطران فعالية في خفض مستويات فوق أكسدة الدهون (MDA) وتحسين مستويات إنزيمات الكبد. بشكل عام، أكدت هذه النتائج، المعززة بتحليل مجهري لقطاعات الرئة النسيجية، الخصائص العلاجية لزيت القطران في تقليل الالتهاب والإجهاد التأكسدي ضمن نموذج الربو التحسسي. في الختام، تُبرز هذه الدراسة الإمكانات العلاجية الكبيرة لنبات *العرعر الشريبي* وبالأخص زيت القطران، في تخفيف الالتهابات والإجهاد التأكسدي. تؤكد الخصائص المضادة للأكسدة وتثبيط الإنزيمات والتأثير المضاد للالتهاب التي تمت ملاحظتها في هذه الدراسة صحة استخدامه التقليدي، مما يفتح المجال لتطبيقات أوسع وأكثر تنوعاً. إن هذه النتائج تعزز بشكل كبير فكرة الاستفادة من زيت القطران وفصائله ليس فقط في علاج الحالات الالتهابية، بل أيضاً في تطوير مستحضرات ذات فعالية علاجية متنوعة يمكن استخدامها في الصناعات الدوائية، التجميلية والغذائية.

**الكلمات المفتاحية:** العرعر الشريبي، زيت القطران، أسيتات إيثيل، بيوتانول، مضادات الأكسدة، مضادات إنزيمية، الربو، الإجهاد التأكسدي

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Diverses espèces de Cupressacées : <i>Juniperus oxycedrus</i> , <i>Juniperus thurifera</i> et <i>Juniperus phoenicea</i>	6
<b>Figure 2:</b> Détails de <i>Juniperus oxycedrus</i> : arbre, feuillage, baies matures et cônes femelles non mûre.	8
<b>Figure 3:</b> Répartition géographique de <i>Juniperus oxycedrus</i> dans le monde.	8
<b>Figure 4:</b> Ancien four à cade.	15
<b>Figure 5:</b> Structure du $\beta$ -cadinène	16
<b>Figure 6:</b> Stress oxydative et maladies chroniques	20
<b>Figure 7:</b> Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène	21
<b>Figure 8:</b> Mécanisme d'action du système antioxydant	25
<b>Figure 9:</b> Structure chimique de la rutine et de la quercétine.	27
<b>Figure 10:</b> Structure de l'acide salicylique	30
<b>Figure 11:</b> Structure de l'acide férulique	30
<b>Figure 12:</b> Structure de base des flavonoïde	32
<b>Figure 13:</b> Réponse immunitaire de type Th2 dans les voies aériennes	36
<b>Figure 14:</b> Mécanismes immunologiques de la phase de sensibilisation de l'allergie IgE-dépendante	37
<b>Figure 15 :</b> Mécanismes immunologiques de la phase de déclenchement	38
<b>Figure 16:</b> Physiopathologie de l'asthme	40
<b>Figure 17:</b> Comparaison macroscopique entre un cerveau normal et celui d'un patient MA	43
<b>Figure 18:</b> Fonction et inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase par les médicaments et les flavonoïdes	47
<b>Figure 19:</b> Schéma récapitulatif du protocole expérimental <i>in vitro</i> .	52
<b>Figure 20:</b> Schéma récapitulatif du protocole expérimental <i>in vivo</i>	53
<b>Figure 21:</b> Conversion du radical DPPH• en DPPH, H	56
<b>Figure 22:</b> Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H•	56
<b>Figure 23:</b> Mécanisme réactionnel du test pouvoir réducteur	57
<b>Figure 24:</b> Réduction du complexe chromogène de $\text{Cu}^{+2}$ -Nc <sub>2</sub>	57
<b>Figure 25 :</b> Réduction d'Ag <sup>+</sup> en nanoparticules (SNP)	58
<b>Figure 26:</b> Structure chimique de radical Galvinoxyl.	58
<b>Figure 27:</b> Formation du complexe $\text{Fe}^{+2}$ -phénanthroline.	59
<b>Figure 28:</b> Le principe de la réaction d'Ellman	59
<b>Figure 29:</b> Mécanisme d'hydrolyse de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase	60
<b>Figure 30:</b> Catalyse de la Tyrosine en Mélanine par la Tyrosinase.	61
<b>Figure 31:</b> Hydrolyse de l'uré.	62
<b>Figure 32:</b> Protocole expérimental global réalisée durant 24 jours (Sensibilisation, traitement et sacrifice).	63
<b>Figure 33:</b> Protocole de sensibilisation et aérosol	64
<b>Figure 34:</b> Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique	71
<b>Figure 35:</b> Principe de dosage du glutathion.	72
<b>Figure 36:</b> Structures chimiques des principaux flavonoïdes présents dans les fractions de <i>Juniperus oxycedrus</i> – Rutine et Chrysin	76
<b>Figure 37:</b> Pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA par les différents extraits du <i>Juniperus oxycedrus</i> en comparaison avec le diclofénac.	85
<b>Figure 38:</b> Effet de l'huile de cade sur les cellules inflammatoires dans le sérum.	103
<b>Figure 39:</b> L'effet de l'huile de Cade sur les cellules inflammatoires dans LBA.	104
<b>Figure 40:</b> Variations des taux de malondialdéhyde (MDA) dans le foie, poumons et les érythrocytes.	109
<b>Figure 41:</b> Variations des taux de la glutathion réduit (GSH) dans le foie, poumons et érythrocytes.	110
<b>Figure 42 :</b> Variations de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) dans le foie, poumons et érythrocytes.	111
<b>Figure 43:</b> Variations de l'activité de la catalase dans le foie, poumons et érythrocytes.	112
<b>Figure 44:</b> Analyse histopathologique des sections pulmonaires des rats.	113

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Différentes activités biologiques des différentes parties de <i>J. oxycedrus</i> .....	13
<b>Tableau 2:</b> Sources de stress oxydant endogènes et exogènes .....	22
<b>Tableau 3:</b> Teneur en polyphénols et flavonoïdes de différents extraits de <i>Juniperus oxycedrus</i> L. ....	75
<b>Tableau 4 :</b> Profil phénolique déterminé par LC-MS-MS des fractions EAJO et NBJO des feuilles de <i>Juniperus oxycedrus</i> .....	76
<b>Tableau 5 :</b> Différentes activités antioxydantes des extraits de <i>J. oxycedrus</i> .....	77
<b>Tableau 6:</b> Activité antiradicalaire par le test DPPH.....	78
<b>Tableau 7:</b> Activité antiradicalaire par le test ABTS .....	79
<b>Tableau 8:</b> Activité antiradicalaire par le test GOR.....	79
<b>Tableau 9 :</b> Activité antioxydante par le test Cuprak.....	80
<b>Tableau 10 :</b> Activité antioxydante par le test pouvoir réducteur .....	80
<b>Tableau 11:</b> Activité antioxydante par le test Phénanthroline .....	81
<b>Tableau 12 :</b> Activité antioxydante par le test nanoparticules d'argent (SNP) .....	81
<b>Tableau 13:</b> Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase.....	82
<b>Tableau 14 :</b> Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase.....	83
<b>Tableau 15 :</b> Activité inhibitrice de l'uréase .....	83
<b>Tableau 16 :</b> Activité inhibitrice de la tyrosinase.....	84
<b>Tableau 17:</b> Récapitulatif de l'activité enzymatique.....	84
<b>Tableau 18 :</b> Effet de l'huile de cade et des fractions de feuilles de <i>Juniperus oxycedrus</i> sur la dénaturation de l'albumine (BSA).....	84
<b>Tableau 19 :</b> Valeurs du facteur de protection solaire des extraits du <i>J. oxycedrus</i> .....	85
<b>Tableau 20 :</b> Valeurs du facteur de protection solaire des crèmes solaires commercialisées .....	86
<b>Tableau 21:</b> Poids corporels des rats et poids absolu et relatifs des poumons et foie .....	100
<b>Tableau 22 :</b> Variation dans les paramètres biochimiques du bilan rénal.....	102
<b>Tableau 23:</b> Variations des cellules leucocytaires au niveau du sang.....	103
<b>Tableau 24 :</b> Variations des cellules leucocytaires au niveau du LBA.....	103

## Liste des annexes

<b>Annexe 1:</b> Composition de l'aliment pour 1 kilogramme de nourriture (ONAB, Bejaïa).....	145
<b>Annexe 2:</b> Solutions utilisées pour le dosage des paramètres du stress oxydant. ....	145
<b>Annexe 3:</b> Réactifs utilisés pour le dosage de l'aspartate aminotransférase.....	146
<b>Annexe 4:</b> Réactifs utilisés pour le dosage de l'alanine aminotransférase.....	146
<b>Annexe 5:</b> Réactifs utilisés pour le dosage de la phosphatase alcaline. ....	146
<b>Annexe 6:</b> Réactifs utilisés pour le dosage de l'albumine.....	146
<b>Annexe 7 :</b> Réactifs utilisés pour le dosage de l'urée. ....	147
<b>Annexe 8:</b> Réactifs utilisés pour le dosage de la créatinine.....	147
<b>Annexe 9:</b> Courbe d'étalonnage de la BSA (1mg/mL). ....	147
<b>Annexe 10:</b> Courbe d'étalonnage à l'acide gallique pour mesurer les polyphénols totaux .....	148
<b>Annexe 11:</b> Courbe d'étalonnage à la quercétine pour mesurer les flavonoïdes .....	148
<b>Annexe 12:</b> Chromatogramme de l'extrait EAJO.....	148
<b>Annexe 13:</b> Pic de la chrysin (EAJO) .....	149
<b>Annexe 14:</b> Pic de la rutine (EAJO) .....	149
<b>Annexe 15:</b> Pic de la naringénine (EAJO) .....	149
<b>Annexe 16:</b> Pic de la beta carotène (EAJO).....	149
<b>Annexe 17:</b> Chromatogramme de l'extrait NBJO .....	150
<b>Annexe 18:</b> Pic de la rutine (NBJO) .....	150
<b>Annexe 19:</b> Pic de la chrysin (NBJO) .....	150
<b>Annexe 20:</b> Pic de l'acide coumarique (NBJO) .....	151
<b>Annexe 21:</b> Pic de la bêta carotène (NBJO).....	151
<b>Annexe 22:</b> Pic de la naringénine (NBJO).....	151
<b>Annexe 23:</b> Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF.....	151
<b>Annexe 24:</b> Catégories de protection affichées sur les produits solaires en fonction des facteurs de protection mesurés, selon la Recommandation de la Commission Européenne 2006 .....	152

## Liste des abréviations

**ACh** : Acétylcholine

**AChE** : Acétylcholinestérase.

**AGEs** : Produits de glycation avancée

**APP** : Protéine précurseur de l'amyloïde  $\beta$

**A $\beta$**  : Amyloïde bêta

**BChE** : Butyrylcholinestérase

**BSA** : Albumine sérique bovine

**COX** : Cyclooxygénase

**DOPA** : 3,4-Dihydroxyphénylalanine

**EAJO** : Fraction d'acétate éthyle dérivée de *Juniperus oxycedrus*

**Fc $\epsilon$ R** : Récepteurs pour la région Fc des immunoglobulines E

**FPS** : Facteur de protection solaire

**GR** : Glutathion réductase

**GSSG** : Glutathion disulfure

**HBR** : Hyper-réactivité

**HC** : Huile de cade

**HOCl** : Acide hypochloreux.

**IFN- $\gamma$**  : Interféron gamma

**IgE** : Immunoglobulines E

**IKI** : Iode/potassium iodure

**JO** : *Juniperus oxycedrus*

**LD50** : Dose létale, 50%

**LDL** : Lipoprotéine de basse densité

**L-DOPA** : 3,4-dihydroxyphénylalanine

**LPO** : Peroxydation lipidique

**MA** : Maladie d'Alzheimer

**mAChRs** : Récepteurs muscariniques

**MDA** : Malondialdéhyde

**MPO** : Myéloperoxydase

**nAChRs** : Récepteurs nicotiniques

**NBJO** : Fraction n-butanol dérivée de *Juniperus oxycedrus*

**NF- $\kappa$ B** : Facteur nucléaire kappa B

**NFTs** : Enchevêtrements neurofibrillaires

**NMDA** : Récepteurs N-méthyl-D-aspartate

**NSAIDs** : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

**PGE2** : Prostaglandine E2

**PNB** : Polynucléaires basophiles

**PNEo** : Polynucléaires éosinophiles

**RT** : Temps de rétention

**sAPP $\alpha$**  : Protéines précurseurs amyloïdes solubles alpha

**sAPP $\beta$**  : Protéines précurseurs amyloïdes solubles Beta

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SPF** : Sun protection factor

**TBARS** : Thiobarbituric Acid Reactive Substances (Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique)

**TiO2** : Dioxyde de titane

**TNF** : Facteur de nécrose tumorale

**XO** : Xanthine oxydase

# Table des matières

Résumé.....	I
Abstract.....	II
المخلص.....	III
Liste des figures .....	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des annexes.....	VI
Liste des abréviations.....	VII
Table des matières.....	IX
Introduction .....	1
Chapitre 1 : Description, Composition et Activité Biologique du <i>Juniperus oxycedrus</i> et de l'Huile de Cade .....	6
1. Présentation des Genévriers d'Algérie .....	6
1.1. Étymologie .....	6
1.2. Famille des Cupressaceae.....	6
2. Généralités sur le genévrier oxycède <i>Juniperus oxycedrus</i> .....	7
2.1. Position systématique.....	7
2.2 Description botanique .....	7
3. Répartition géographique .....	8
3.1. Dans le monde .....	8
3.2. En Algérie.....	9
4. Usage ethnobotanique : Utilisation en médecine traditionnelle .....	9
5. Études antérieures concernant la composition chimique et les activités biologiques.....	10
5.1. Composition chimique .....	10
5.2. Activités biologiques.....	13
6. Toxicité et effets secondaires.....	14
7. Huile de cade, remède naturel.....	14
7.1. Description et caractéristiques de l'huile de cade.....	14
7.2. Production du goudron de cade.....	14
7.2.1. Les fours.....	15
7.3. Composition chimique .....	16
7.4. Propriétés pharmacologiques de quelques molécules présente dans l'huile de cade.....	17
7.5. Applications thérapeutiques de l'huile de cade.....	18
7.5.1. Utilisations cosmétiques.....	18
7.5.2. Utilisations en médecine vétérinaire.....	19
7.5.3. Utilisations en médecine humaine .....	19
7.6. Toxicologie.....	19
Chapitre 2 : Stress Oxydatif et Antioxydants : Le Rôle Clé des Polyphénols .....	20
1. Le Concept de Stress Oxydatif.....	20
2. Radicaux libres.....	21
3. Sources des espèces réactives (ERO, ERN).....	22
4. Effets Pathologiques du Stress Oxydatif.....	22

<b>5. Les défenses antioxydantes .....</b>	<b>23</b>
5.1. Type d'antioxydants.....	23
5.2. Mécanisme de protection antioxydante .....	24
<b>6. Mécanismes d'action des polyphénols en tant qu'antioxydants .....</b>	<b>25</b>
6.1. Capture ou piégeage direct des ERO.....	26
6.2. Chélation des ions métalliques.....	26
6.3. Inhibition des enzymes.....	27
6.4. Inhibition de la peroxydation lipidique .....	27
<b>7. Composés polyphénoliques : Exploration des propriétés antioxydantes, activités biologiques diverses et intérêts thérapeutiques .....</b>	<b>29</b>
7.1. Les acides phénoliques.....	29
7.1.1. Acides hydroxybenzoïques .....	29
7.1.2. Acides hydroxycinnamiques.....	30
7.2. Effets thérapeutiques des acides phénoliques .....	30
7.3. Les flavonoïdes.....	31
7.3.1. Structure et classification .....	31
7.3.1.1. Squelette de Base.....	31
7.3.1.2. Sous-Classes de Flavonoïdes.....	32
7.4. Effets thérapeutiques des flavonoïdes .....	32
<b>Chapitre 3 : L'Asthme Allergique, la maladie d'Alzheimer, l'Hyperpigmentation et le Diabète mellitus : leur relation avec le stress oxydatif .....</b>	<b>34</b>
<b>1. L'asthme allergique .....</b>	<b>34</b>
1.1. Les concepts de base sur l'asthme allergique.....	34
1.2. Épidémiologie de l'asthme : une vue d'ensemble .....	34
1.3. Mécanismes pathophysiologiques de l'inflammation bronchique .....	35
1.3.1. Activation du système immunitaire dans l'asthme .....	35
1.3.2. Rôle des cellules immunitaires et inflammatoires.....	36
1.4. Mécanismes de la réaction asthmatique .....	36
1.4.1. Phase de sensibilisation (asymptomatique) .....	37
1.4.2. Phase de déclenchement (symptomatique) .....	38
1.5. Physiopathologie de l'asthme.....	39
1.5.1. Inflammation des voies aériennes .....	39
1.5.2. Obstruction et œdème des voies aériennes .....	39
1.5.3. L'Hyper-réactivité bronchique .....	39
1.5.4. Remodelage des voies aériennes.....	40
1.6. Asthme allergique et stress oxydatif.....	40
1.6.1. Traitement actuel de la maladie d'asthme.....	41
1.6.2. Polyphénols et sesquiterpènes en tant qu'antiasthmatiques et anti-inflammatoires.....	42
<b>2. La maladie d'Alzheimer.....</b>	<b>42</b>
2.1. Définition et pathologie.....	42
2.2. Mécanisme moléculaire dans le cerveau en état normal.....	43
2.3. Mécanisme moléculaire dans le cerveau en cas de maladie d'Alzheimer .....	44
2.4. Rôle du Stress Oxydatif dans la Pathogenèse et la Progression de la Maladie d'Alzheimer .....	44
2.5. Traitement actuel de la maladie d'Alzheimer .....	44
2.6. Médicaments et thérapeutiques dérivés naturellement .....	45
2.6.1. Polyphénols en tant d'antioxydants dans la maladie d'Alzheimer.....	45
2.6.2. Polyphénols en tant d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase .....	46
<b>3. Le Diabète sucré.....</b>	<b>47</b>
3.1. Définition .....	47
3.2. Le Diabète sucré et le Stress Oxydatif .....	48
3.3. Médicaments et thérapeutiques dérivés naturellement .....	48

3.3.1. Antioxydants naturels.....	48
3.3.2. L'Alpha-Amylase et son rôle dans la cible thérapeutique antidiabétique.....	49
3.3.3. Les polyphénols inhibiteurs de l'Alpha-Amylase.....	49
<b>4. L'hyperpigmentation .....</b>	<b>50</b>
4.1. Définition et pathologie.....	50
4.2. Stress oxydatif et la pigmentation cutanée .....	50
4.3. Approches thérapeutiques de l'hyperpigmentation.....	51
4.3.1. Polyphénols inhibiteurs de la Tyrosinase.....	51
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>52</b>
<b>1. Objectifs de l'étude .....</b>	<b>52</b>
<b>2. Matériel végétal.....</b>	<b>53</b>
<b>3. Extraction.....</b>	<b>53</b>
<b>4. Rendement .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Quantification des polyphénols et flavonoïdes.....</b>	<b>54</b>
5.1. Dosage des polyphénols totaux.....	54
5.2. Dosage des flavonoïdes (TFC).....	54
<b>6. Analyse par Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à ionisation électro spray (LC/ESI-MS).....</b>	<b>55</b>
<b>7. Évaluation des activités biologiques <i>in vitro</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>7.1. Activité antioxydante.....</b>	<b>55</b>
7.1.1. Test au DPPH.....	55
7.2.2. Test de l'ABTS .....	56
7.3.3. Test du pouvoir réducteur .....	57
7.1.4. Test de la capacité réductrice du cuivre (CUPRAC) .....	57
7.1.5. Test des nanoparticules d'argent (SNP) .....	58
7.1.6. Test du GOR.....	58
7.1.7. Test à la phénanthroline.....	58
<b>7.2. Activités anti-enzymatiques .....</b>	<b>59</b>
7.2.1. L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) .....	59
7.2.2. L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase .....	60
7.2.3. La capacité d'inhibition de la tyrosinase.....	61
7.2.4. L'activité inhibitrice de l'uréase .....	61
<b>7.3. L'activité anti-inflammatoire.....</b>	<b>62</b>
<b>7.4. Activité photoprotectrice (FPS).....</b>	<b>62</b>
<b>8. Evaluation de l'activité antioxydante et antiasthmatique <i>in vivo</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>8.1. Animaux .....</b>	<b>63</b>
<b>8.2. Les groupes expérimentaux .....</b>	<b>63</b>
<b>8.3. Sensibilisation des voies respiratoires.....</b>	<b>64</b>
<b>8.4. Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons .....</b>	<b>64</b>
8.4.1. Récupération des échantillons de sang.....	64
8.4.2. Récupération de liquide bronchoalvéolaire .....	65
8.4.3. Prélèvement des organes .....	65
8.4.4. Préparation des homogénats de tissus .....	65
8.4.5. Préparation des érythrocytes.....	65
<b>8.5. Détermination de la formule de numération sanguine (FNS) .....</b>	<b>65</b>
<b>8.6. Dosage des paramètres biochimiques .....</b>	<b>65</b>
8.6.1. Dosage des transaminases sériques.....	65
8.6.1.1. Détermination de l'activité d'aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1).....	65
a. Principe.....	65
8.6.1.2. Détermination de l'activité d'alanine aminotransférase (EC 2.6.1.2).....	66

a. Principe.....	66
8.6.1.3. Dosage de la phosphatase alcaline sérique :	67
a. Principe.....	67
8.6.2. Dosage d'albumine .....	68
a. Principe.....	68
8.6.3. Dosage de l'urée sérique .....	69
a. Principe.....	69
8.6.4. Dosage de la créatinine sérique.....	70
a. Principe.....	70
<b>9. Évaluation de l'activité antioxydante <i>in vivo</i> .....</b>	<b>71</b>
<b>9.1. Dosage des protéines totales.....</b>	<b>71</b>
<b>9.2. Détermination du taux de la peroxydation lipidique .....</b>	<b>71</b>
<b>9.3. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH) .....</b>	<b>71</b>
<b>9.4. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase.....</b>	<b>72</b>
<b>9.5. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase.....</b>	<b>72</b>
<b>9.6. Etude histologique.....</b>	<b>72</b>
<b>10. Traitement statistique des résultats .....</b>	<b>73</b>
<b>Résultats et Discussion .....</b>	<b>74</b>
<b>1. La 1ère partie expérimentale (<i>in vitro</i>) .....</b>	<b>74</b>
<b>1.1. Etude phytochimique .....</b>	<b>74</b>
1.1.1. Rendement.....	74
1.1.2. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux .....	74
1.1.3. Identification des composés phénoliques par UPLC LC-MS/MS.....	75
<b>1.2. Évaluation des activités biologiques <i>in vitro</i> .....</b>	<b>77</b>
1.2.1. L'activité antioxydante.....	77
1.2.1.1. Test de piégeage du radical DPPH .....	77
1.2.1.2. Test de piégeage par le radical ABTS.....	78
1.2.1.3. Test GOR.....	79
1.2.1.4. Test CUPRAC.....	79
1.2.1.5. Test du pouvoir réducteur .....	80
1.2.1.6. Analyse de la réduction du fer métallique évaluée par le dosage à la phénanthroline et le dosage des nanoparticules d'argent (SNP).....	80
<b>1.3. Activité enzymatique .....</b>	<b>81</b>
1.3.1. Activité anti Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase.....	81
1.3.2. Activité anti-diabétique via l'inhibition de l'alpha amylase .....	82
1.3.3. Activité anti uréase.....	83
1.3.4. Activité anti hyperpigmentation via l'inhibition de la tyrosinase.....	83
<b>1.4. Activité anti-inflammatoire .....</b>	<b>84</b>
<b>1.5. Activité photoprotection.....</b>	<b>85</b>
<b>2. Discussion de la partie expérimentale <i>in vitro</i>.....</b>	<b>86</b>
<b>3. La 2er partie expérimentale (<i>in vivo</i>).....</b>	<b>100</b>
<b>3.1. Variations des paramètres physiologiques, hématologiques et biochimiques lors de l'expérimentation <i>in vivo</i> .....</b>	<b>100</b>
3.1.1. Les effets de l'ovalbumine et l'huile de Cade sur la santé générale des rats, le poids corporel et le poids relatif des organes.....	100
<b>3.2. Etude des paramètres biochimiques .....</b>	<b>101</b>
3.2.1. Bilan hépatique .....	101
3.2.1.1. Transaminases.....	101
3.2.1.2. Phosphatase alcaline .....	101
3.2.1.3. L'albumine .....	101
3.2.2. Bilan rénal .....	101
3.2.2.1. L'urée et la créatinine.....	101
<b>3.3. Effet du traitement sur les paramètres hématologiques .....</b>	<b>102</b>

3.3.1. Variation des leucocytes dans le sang .....	102
3.3.2. Variation des leucocytes dans le liquide Bronchoalvéolaire (LBA) .....	103
<b>4. Discussion de l'expérimentation <i>in vivo</i> .....</b>	<b>104</b>
<b>4.1. Discussion de la partie expérimentale <i>in vivo</i> (poids, paramètres physiologiques, hématologiques et biochimiques) .....</b>	<b>104</b>
<b>5. Stress oxydatif induit par l'ovalbumine : Effets de l'huile de cade sur les paramètres de stress oxydants .....</b>	<b>109</b>
<b>5.1. Évaluation du statut de défense antioxydante dans les poumons, foie et érythrocytes .....</b>	<b>109</b>
5.1.1. Paramètres non-enzymatiques .....	109
5.1.1.1. Taux de malondialdéhyde .....	109
5.1.1.2. Taux du glutathion réduit .....	109
5.1.2. Paramètres enzymatiques .....	110
5.1.2.1. Activité de la glutathion peroxydase .....	110
5.1.2.2. Activité de la catalase .....	111
<b>5.2. Etude histologique au niveau des poumons .....</b>	<b>112</b>
<b>6. Discussion .....</b>	<b>114</b>
<b>6.1. Discussion de l'effet de l'huile de cade sur les paramètres de stress oxydants et des coupes histologiques .....</b>	<b>114</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>118</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>120</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>145</b>
<b>Publications &amp; Communications scientifiques .....</b>	<b>153</b>

# **Introduction**

## Introduction

Depuis l'Antiquité, les plantes constituent une source principale de médicaments, exploitant la richesse de leur métabolisme secondaire, une caractéristique unique du règne végétal. Parmi les milliers de molécules issues de ce processus, l'Homme a sélectionné celles qui sont utiles pour combattre divers pathogènes tels que les champignons, les bactéries et les virus (**Farnsworth, 1990**).

À l'aube du 21<sup>ème</sup> siècle, malgré les avancées significatives dans le domaine médical, de nombreuses pathologies mortelles sont encore dépourvues de traitements efficaces et appropriés. Cette situation souligne l'urgence de découvrir des molécules innovantes, qui sont à la fois plus efficaces, économiquement viables et avec moins d'effets secondaires.

La découverte et l'utilisation de substances actives d'origine végétale représente un pilier fondamental au développement de la pharmacopée moderne. L'aspirine, extraite de l'écorce du *Spiraea ulmaria* est un exemple marquant. D'autres découvertes, comme la quinine de *Cinchona officinalis* pour le paludisme et la morphine de *Papaver somniferum*, ont marqué l'histoire de la médecine (**Swain, 1968**).

Le paclitaxel, dérivé du *Taxus brevifolia*, souligne aussi l'importance des substances végétales en chimiothérapie (**Newman et Cragg 2007**). Ces extraits ont transformé la médecine, offrant des traitements pour de nombreuses maladies, y compris le diabète et la maladie d'Alzheimer (**Silveira et al., 2018**), les maladies auto-immunes (**Khan et al., 2019**) et les troubles respiratoires (**Prasher et al., 2020**).

Le monde des sciences biologiques et médicales a récemment été marqué par l'émergence du concept du 'stress oxydant', lié principalement aux espèces réactives oxygénées (ERO). Ce phénomène est caractérisé par un déséquilibre entre la production de radicaux libres, qui sont des sous-produits du métabolisme cellulaire et la capacité du corps à les neutraliser (**Pizzino et al., 2017**). En excès, ces radicaux libres peuvent endommager les cellules et les tissus, affectant les lipides, les protéines et l'ADN (**Halliwell et al., 1999**). De nombreuses preuves indiquent que le stress oxydatif joue un rôle significatif, à différents degrés, dans l'apparition et la progression de diverses maladies, notamment le cancer, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes, les maladies cardiovasculaires et les affections respiratoires (**Halliwell et al., 2012**).

Face à ces défis, l'intérêt pour les antioxydants naturels et leurs propriétés thérapeutiques a augmenté de manière significative ces dernières décennies. Ces antioxydants, peuvent réduire ou neutraliser les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme (**Yanishlieva et al., 2006; Lourenço et al., 2019**). Poussant des recherches intensives pour extraire, identifier et quantifier ces composés à partir de plantes médicinales.

Dans ce contexte, les composés phénoliques, issus des végétaux et appartenant à la classe des métabolites secondaires, se distinguent par un large éventail de propriétés pharmacologiques, incluant des effets anti-allergiques, anti-inflammatoires, anticancérigènes, antidiabétiques, neuroprotecteurs et cardioprotecteurs (**Pizzino et al., 2017; Liu et al., 2018**).

En Afrique, et plus particulièrement en Algérie, l'usage des plantes médicinales est profondément ancré dans les traditions et la culture. Cette pratique, caractéristique de la phytothérapie locale, est largement répandue parmi la population algérienne, témoignant de l'importance culturelle et du savoir empirique transmis de génération en génération (**Baba Aissa, 1991**). Cette pratique tire sa richesse d'une flore exceptionnellement diverse, bénéficiant de la géographie unique et des variations climatiques du pays, allant des zones subhumides méditerranéennes aux régions arides et semi-arides du Sud (**Quezel et Santa 1962 ; Hanifi, 1991**). Les plantes médicinales, notamment les espèces aromatiques, sont intégrées dans des recettes de tisanes ancestrales, reflétant leur importance culturelle, leur abondance locale et leur accessibilité (**Benarba et al., 2016**).

Toutefois, malgré une reconnaissance botanique établie, de nombreuses propriétés pharmacologiques et phytochimiques de cette flore demeurent inexplorées, constituant un défi scientifique et industriel majeur pour la valorisation de la biodiversité médicinale algérienne.

Au sein de cette riche diversité, notre recherche s'est principalement concentrée sur une plante médicinale particulière, *Juniperus oxycedrus* L., également connue sous le nom de genévrier de cade ou oxycèdre, dont le nom vernaculaire en Algérie est "Tagga" (**Chaouche et al., 2013**). Cette espèce, qui fait partie de la famille des Cupressaceae, est l'une des quelques 75 espèces du genre *Juniperus*, réparties à travers l'hémisphère Nord et plusieurs pays du Proche-Orient, y compris l'Algérie, le Maroc, la Tunisie et la Turquie. La flore algérienne se distingue par la présence de cinq espèces distinctes de *Juniperus* (**Quezel & Santa en 1962**). Spécifiquement, le *Juniperus oxycedrus*, se développe à l'état sauvage sur les terrains semi-arides, constituant ainsi un sujet d'étude privilégié en raison de son potentiel thérapeutique et de sa place importante dans la biodiversité locale (**Dob et al., 2006 ; Chaouche et al., 2013**).

*Juniperus oxycedrus* est valorisé pour ses nombreuses vertus biologiques, y compris ses propriétés antioxydantes (Chaouche et al., 2015; Meringolo et al., 2022), antivirales (Loizzo et al., 2008), anti-inflammatoires et antinociceptives (Küveli, 2009), antidiabétiques (Orhan et al., 2012), anticancéreuses (El-Abid et al., 2019), neuroprotectrices (Tavares et al., 2012), anti-prolifératives (Saab et al., 2014; Meringolo et al., 2022), antibactériennes (El Hajjouji et al., 2019) et antimicrobiennes (Karaman et al., 2003; Taviano et al., 2013).

Par ailleurs, l'huile de cade, obtenue par distillation destructive du bois et des branches de *Juniperus oxycedrus*, est riche en sesquiterpènes et reconnue pour ses multiples vertus, notamment ses propriétés insectifuges, antiparasitaires, antifongiques, antibactériennes et antiseptiques (Ninich et al., 2022). Depuis des siècles, cette huile est traditionnellement employée pour le traitement de divers troubles dermatologiques chez l'Homme et l'animal (Ninich et al., 2022). En Turquie, l'huile de cade est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour soigner une variété de maladies, incluant l'asthme, le rhumatisme, les infestations parasitaires, la lithiase biliaire, les symptômes du rhume et de la toux, ainsi que la fistule anale (Çakır et al., 2017).

Notre recherche vise à apporter une validation scientifique aux vertus traditionnellement attribuées à l'huile de cade, en s'alignant au plus près de ses utilisations ancestrales. Nous nous sommes concentrés sur l'analyse de ses effets préventifs et thérapeutiques sur l'inflammation des voies respiratoires, en utilisant un modèle d'asthme allergique chez des rats Wistar. Cette démarche a permis d'explorer en profondeur les propriétés thérapeutiques de l'huile de cade, notamment ses actions anti-inflammatoires et antioxydantes.

Parallèlement, notre recherche s'est étendue à une vérification des résultats obtenus par le biais de diverses analyses *in vitro*, visant à approfondir notre analyse des diverses activités biologiques de l'huile de cade. Ces études *in vitro* ont non-seulement validé les effets antioxydants et anti-inflammatoires de l'huile, mais nous ont également permis d'explorer d'autres propriétés biologiques. De plus, nous avons exploité les activités biologiques des deux différents extraits du *Juniperus oxycedrus* (Acétate d'éthyle et n-butanol).

Cette démarche globale a significativement enrichi notre compréhension de ses bénéfices thérapeutiques, offrant une validation supplémentaire de ses utilisations traditionnelles et élargissant notre compréhension de son potentiel thérapeutique.

➤ La première partie de notre étude, consacrée à l'aspect théorique, visait à approfondir les sujets suivants :

- La plante étudiée *Juniperus oxycedrus* et l'huile de cade, en couvrant des domaines tels que la botanique, la composition chimique et les propriétés biologiques associées dans la littérature.
- Le rôle du stress oxydatif dans le développement et la progression de conditions pathologiques spécifiques, telles que l'Asthme Allergique, la maladie d'Alzheimer, l'Hyperpigmentation et le Diabète mellitus, afin de comprendre comment l'huile de cade et les différents extraits du *Juniperus oxycedrus* pourraient intervenir thérapeutiquement dans ces contextes.

➤ Poursuivant notre exploration scientifique, la section expérimentale de notre recherche se scinde en deux sections complémentaires :

**Les expérimentations *in vitro***, où notre travail focalisera sur plusieurs objectifs clés :

- La caractérisation de la composition chimique des fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol via l'analyse par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-ESI-MS).
- La quantification des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes présents dans les fractions et l'huile de cade.
- L'évaluation de l'activité antioxydante grâce à plusieurs méthodes telles que les tests DPPH, ABTS, test du pouvoir réducteur, CUPRAK, Phenanthroline, GOR, SNP, appliquées tant aux fractions qu'à l'huile de cade.
- L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire par la méthode de l'inhibition de la dénaturation du BSA pour les fractions et l'huile de cade.
- L'évaluation des effets inhibiteurs sur plusieurs enzymes clés : la cholinestérase, l' $\alpha$ -amylase, l'uréase et la tyrosinase.
- L'évaluation de l'activité photoprotectrice, mesurée par le facteur de protection solaire (FPS).

**Les expérimentations *in vivo***, où nous évaluerons l'impact thérapeutique de l'huile de cade sur un modèle biologique de rat Wistar soumis à un protocole d'asthme allergique induit par l'ovalbumine. Cette étude inclura :

- Les variations des paramètres hématologiques à travers le FNS (Formule Numération Sanguine).

- Les variations de poids, tant absolues que relatives, des rats et de leurs organes spécifiques (foie, poumons).
- La mesure de certains paramètres biochimiques, tels que ASAT, ALAT et PAL.
- Les niveaux de MDA, GSH, GPx et CAT, indicateurs du stress oxydatif et de la réponse antioxydante.
- L'analyse histologique des tissus pulmonaires, pour évaluer l'impact de l'huile de cade sur l'inflammation et la structure des poumons.

# **Partie bibliographique**

## **Chapitre 1**

**Description, composition et activité biologique de  
*Juniperus oxycedrus* et de l'huile de cade**

# Chapitre 1 : Description, Composition et Activité Biologique du *Juniperus oxycedrus* et de l'Huile de Cade

## 1. Présentation des Genévriers d'Algérie

### 1.1. Étymologie

Le genévrier, connu scientifiquement sous le nom de "*Juniperus*", possède une étymologie singulière. Le terme "juniperus" trouve ses origines dans le latin, combinant "*junior*", qui signifie "jeune", avec "*parere*", qui veut dire " apparaître ". Cette étymologie pourrait refléter l'observation que le genévrier présente simultanément des fruits de deux générations différentes, avec de jeunes pousses et des baies mûres coexistant avant la chute de ces dernières (Teuscher et al., 2005).

### 1.2. Famille des Cupressaceae

Les Cupressacées, famille des cyprès (ordre des Pinales), également désignées sous le terme cupressinées, représentent une famille botanique de plantes gymnospermes ayant leurs origines à l'époque du Jurassique (Mazzari, 2008). Cette famille se caractérise par une morphologie foliaire spécifique, oscillant entre des feuilles squamiformes et des alènes. Leur classification historique a souvent reposé sur l'orientation de ces feuilles, établie soit en formations opposées pour les Cupressacées traditionnelles, soit alternativement pour les Taxodiacées (chaouche, 2014). Sur le plan taxonomique, la famille des Cupressacées présente une vaste diversité, englobant 135 espèces réparties sur 29 genres. *Juniperus* étant l'un des genres les plus prédominants avec près de 70 espèces distinctes (Fig. 01).



**Figure 1:** Diverses espèces de Cupressacées : *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus thurifera* et *Juniperus phoenicea* (par Pons & Gauthier, 2023) ainsi que (Le Driant, 2009, 2019)

## 2. Généralités sur le genévrier oxycède *Juniperus oxycedrus*

### 2.1. Position systématique

La taxonomie du *Juniperus oxycedrus* L. selon **Quezel et Santa (1962)** :

**Règne** : Plantae

**Classe** : Conifères

**Ordre** : Coniferales

**Famille** : Cupressacées

**Genre** : *Juniperus*

**Espèce** : *Juniperus oxycedrus* L.

### 2.2 Description botanique

Le genévrier oxycède, scientifiquement désigné sous *Juniperus oxycedrus* L., est un arbrisseau ou arbuste pouvant atteindre entre 1 et 14 mètres de hauteur. Typiquement, il se caractérise par son feuillage persistant constitué d'aiguilles pointues, dont la face supérieure est ornée de deux bandes blanchâtres séparées par une nervure médiane verte (**Chaouche et al., 2013**). Ces feuilles, généralement regroupées par trois, confèrent à l'arbre un aspect particulier (**Fig. 02**).

Les fruits de cette espèce sont distinctifs, prenant une couleur rouge luisante à maturité et mesurant entre 8 et 10 millimètres (**Fig. 02**). Il est à noter que ces cônes femelles, semblables à des baies, arrivent à maturité au bout d'environ deux ans (**Becker et al., 1982**).

L'importance du genévrier oxycède dépasse sa simple présence dans la nature. Son bois, homogène à grain fin, est prisé en ébénisterie, notamment pour la fabrication de crayons. De plus, son pouvoir calorifique le rend idéal pour le chauffage, et il donne un charbon d'excellente qualité. L'une des utilisations notables de cet arbuste est l'extraction, par distillation, de l'huile de Cade, largement reconnue pour ses propriétés pharmaceutiques (**Quezel, 1962 ; Becker et al., 1982**).

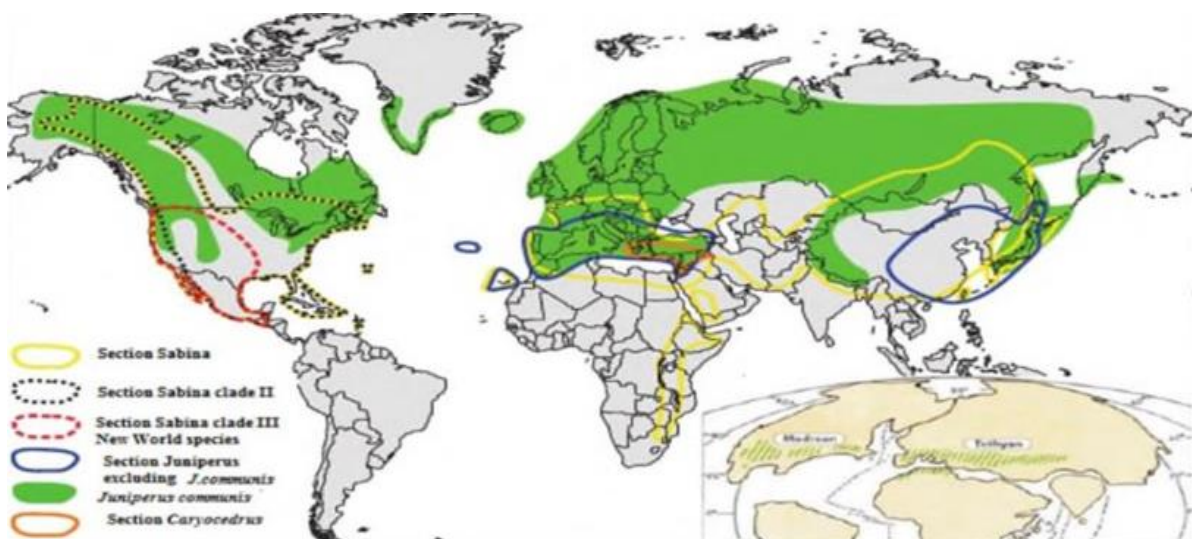


**Figure 2:** Détails de *Juniperus oxycedrus* : arbre, feuillage, baies matures et cônes femelles non mûres.

### 3. Répartition géographique

#### 3.1. Dans le monde

Le genévrier oxycède, une espèce autochtone de la région méditerranéenne, se localise principalement entre le Maroc et l'Iran, englobant des pays du Nord de l'Afrique comme le Maroc, l'Algérie, et la Tunisie, ainsi que de la Méditerranée comme l'Espagne, la France, l'Italie, le Portugal, la Turquie, la péninsule Balkanique, l'Est du Caucase et le Nord de l'Iran (**Marongiu et al., 2003**) (**Fig. 03**). Il s'épanouit jusqu'à une altitude de 1000 mètres dans les chaînes de montagnes méridionales. Les sols calcaires, semi-calcaires et marneux lui sont particulièrement favorables (**Garnier et al., 1961**). Le genévrier oxycède est communément trouvé dans les zones boisées, sur les coteaux arides et rocheuses, où il cohabite avec des espèces telles que les pistachiers, le genévrier de Phénicie et le buis, reflétant sa grande adaptabilité aux divers milieux naturels (**Bonnier, 1990 ; Brus et al., 2011**).



**Figure 3:** Répartition géographique de *Juniperus oxycedrus* dans le monde

### 3.2. En Algérie

Le genévrier, spécifiquement le *Juniperus oxycedrus*, est répandu dans les montagnes de l'Atlas, y compris l'Atlas Tellien et l'Atlas Saharien, ainsi que dans certaines régions côtières le long de la Méditerranée, notamment à Oran, Skikda, Annaba et Béjaïa. S'étendant sur des altitudes allant de 0 à 1000 mètres, son habitat couvre environ 290.000 hectares. Cependant, ce couvert forestier est en déclin, principalement en raison des impacts anthropiques et des conditions climatiques désertiques de l'Atlas Saharien et du versant Sud du Grand Atlas (**Kerbouche, 2010**)

## 4. Usage ethnobotanique : Utilisation en médecine traditionnelle

Les baies et les feuilles sont particulièrement privilégiées, mais toutes les parties de la plante trouvent leur utilité. Ainsi, dans plusieurs pays méditerranéens, les fruits du *Juniperus oxycedrus* sont couramment utilisés pour préparer une décoction aidant à éliminer les calculs rénaux ou de faire bouillir les fruits jusqu'à dissolution des graines pour traiter les hémorroïdes. En cas de douleurs abdominales et de perte d'appétit, les fruits sont écrasés, légèrement grillés, puis mélangés avec de l'oignon râpé et du goudron de pin, avant d'être appliqués sur l'abdomen (**Union Internationale pour la Conservation de la Nature et de ses Ressources, 2005**).

Pour soulager les rhumes et les toux, les baies et l'huile de cade sont ajoutées à de l'eau bouillante et la vapeur qui s'en dégage est ensuite inhalée. L'extrait, obtenu par broyage des fruits rouges suivi de leur ébullition, concentration et filtration à travers de la mousseline, est utilisé comme expectorant contre le catarrhe. La calcinose articulaire est traitée par la consommation trois fois par jour d'une boisson préparée à partir de fruits écrasés et décoctés. Pour les troubles gastriques, la racine de la plante est utilisée, alors que les poudres peuvent être appliquées localement sur les ulcères et les abcès (**Union Internationale pour la Conservation de la Nature et de ses Ressources, 2005**).

En Algérie, la résine de la plante, est prescrite pour traiter plusieurs maladies, dont l'eczéma, le psoriasis et la leishmaniose (**Chermat et Gharzouli 2015**). Par ailleurs, cette plante est reconnue pour ses bienfaits anti-hypertensifs, hypoglycémiques et anti-inflammatoires (**Boudjelal et al., 2013 ; Ouelbani et al., 2016**). Une infusion de feuilles est également couramment utilisée comme diurétique et dépuratif (**Miara et al., 2013 ; Miara et al., 2019**). En outre, elle sert de remède aux troubles urinaires, déséquilibres digestifs, affections respiratoires, migraines et douleurs articulaires (**Ouelbani et al., 2016**). En Turquie, le goudron de genévrier, ainsi que les feuilles et les fruits, sont couramment utilisés pour traiter une variété

de maux, notamment les plaies, les douleurs abdominales, les troubles gastriques, les maladies gynécologiques, les hémorroïdes, le rhume, la toux, la bronchite, la calcinose articulaire, les infections fongiques, l'inflammation rénale et pour éliminer les calculs rénaux (**Loizzo et al., 2007; Orhan et al., 2012**). Par ailleurs, une infusion de fruits et de feuilles de *Juniperus oxycedrus* et des fruits écrasés sont consommés pour traiter le diabète à Isparta et à Afyon (**Orhan et al., 2012**). Décoction de cônes, 1 tasse de thé avant les repas pour l'asthme (**Tuzlac & Aymaz, 2001**).

## **5. Études antérieures concernant la composition chimique et les activités biologiques**

### **5.1. Composition chimique**

Ces études, couvrant une gamme géographique étendue, mettent en évidence la complexité chimique et le potentiel biologique de *J. oxycedrus*, soulignant l'importance de la diversité des composés selon l'origine géographique et la partie de la plante examinée.

- **Loizzo et al., (2007)** ont trouvé que l'huile des baies du *Juniperus oxycedrus* libanais était caractérisée par une forte présence d' $\alpha$ -pinène, de  $\beta$ -myrcène, de  $\beta$ -myrcène, d' $\alpha$ -phellandrène et de limonène. Tandis que l'huile de bois se distinguait par des concentrations élevées de  $\delta$ -cadinène, de cis-thujopsène et d' $\alpha$ -muurulène.
- **Dob et al., (2006)** ont exploré l'huile essentielle des feuilles de *Juniperus oxycedrus* d'Algérie, détectant principalement des monoterpènes oxygénés, avec le trans-pinocarveol, le cis-verbenol et le manoyl oxide comme composés majeurs. Les hydrocarbures terpéniques étaient moins présents. Parmi les constituants, on note aussi l' $\alpha$ -cadinol, le  $\gamma$ -muurolène et le pinocarvone, ainsi que cinq diterpènes.
- D'autre part, **Derwich et Chabir (2011)** ont étudié la composition phytochimique de l'huile essentielle des feuilles de *Juniperus oxycedrus* du Maroc, identifiant une prédominance d' $\alpha$ -pinène et d'autres composants significatifs tels que le sabinène, de limonène, de  $\beta$ -pinène, d'oxyde de caryophyllène, de myrcène, de  $\rho$ -cymène, de  $\beta$ -phellandrène, de  $\gamma$ -terpinène, de terpinène-4-ol, de germacrène D, de (E)-caryophyllène et de  $\delta$ -ocimène.
- De plus, une recherche de **Saab et al., (2014)** sur les huiles essentielles extraites des graines et du bois de *Juniperus oxycedrus* du Liban ont été analysées pour déterminer leur composition chimique et activité antiproliférative. Les principaux composés de

l'huile des graines étaient l' $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -myrcène, tandis que l'huile de bois était riche en du  $\delta$ -cadinène, du cis-thujopsène, du  $\tau$ -muurolol, du widdrol, de l'epi-cubenol, du  $\beta$ -caryophyllène et de l' $\alpha$ -calacorene.

- En Turquie, l'étude de **Alan et al., (2016)** a révélé que les huiles essentielles des feuilles, baies et rameaux de *J. oxycedrus* présentaient une diversité de composés volatils, avec une prédominance de manoyl oxyde et d'oxyde de caryophyllène dans l'huile des rameaux, et de myrcène, d' $\alpha$ -pinène et de germacrène D dans l'huile de baies. Tandis que dans l'huile des feuilles, le manoyl oxyde et l'oxyde de caryophyllène prédominaient.
- **Llorens-Molina et al., (2016)** ont constaté une abondance d' $\alpha$ -pinène et de myrcène dans les baies de *Juniperus oxycedrus* originaires d'Espagne, tandis que les feuilles contenaient une variété plus large de composés monoterpéniques hydrocarbonés, tels que l' $\alpha$ -pinène, le  $\sigma$ -3-carène, le p-cymène, le limonène, le  $\beta$ -phellandrène et le terpinolène,
- **Ben Mrid et al., (2019)** ont identifié des composés phénoliques importants tels que l'acide salicylique et l'acide p-coumarique dans les aiguilles de *J. oxycedrus* du Maroc, présents principalement dans les extraits aqueux et méthanoïques, En revanche, les baies de *J. oxycedrus* se distinguaient par leur teneur en acide caféique dans l'extrait aqueux et en thymoquinone dans l'extrait méthanolique. Les flavonoïdes majeurs dans les aiguilles incluaient la rutine et l'héspéridine, tandis que les baies contenaient des niveaux remarquables de ces flavonoïdes dans les extraits méthanoliques.
- En Algérie, **Cheraif et al., (2020)** ont mis en évidence une gamme variée de composés dans l'huile essentielle de *J. oxycedrus*, avec une dominance notable de l' $\alpha$ -pinène. Les sesquiterpènes oxygénés, en particulier le bulnésol, ainsi que les diterpènes comme l'abietadiène et l'oxyde de manoyl, ont été également significativement présents.
- Aussi, **Djellouli et al., (2022)** ont étudié les extraits de *Juniperus oxycedrus* d'Algérie, identifiant huit composés phénoliques : l'acide gallique, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique, la vanilline, la rutine, la naringin et la quercétine. Leur recherche a révélé que l'extrait méthanolique contenait une concentration plus élevée de ces composés par rapport à l'extrait aqueux. L'acide chlorogénique était le composé le plus abondant dans les deux extraits, suivi par la

naringin et la rutine dans l'extrait méthanolique, tandis que l'acide gallique et l'acide p-coumarique dominaient dans l'extrait aqueux.

- **Meringolo et al., (2022)** ont étudié les huiles essentielles extraites des feuilles de *J. oxycedrus* localisée en Italie, identifiant l' $\alpha$ -pinène, le limonène, le (Z, E)-farnesol, le  $\beta$ -pinène et le  $\gamma$ -cadinène comme les composants volatils principaux. L'étude a aussi comparé les profils flavonoïdiques et phénoliques entre les extraits de méthanol et d'acétate d'éthyle, révélant des différences dans les concentrations bien que les types de composés soient similaires. Notamment, (-) -épicatéchine et la quercétine-3-O-glucoside étaient plus abondants dans l'extrait d'acétate d'éthyle, tandis que la rutine était prédominante dans l'extrait de méthanol.
- **Elidrissi et al., (2023)** ont étudié l'huile essentielle extraite des baies de *Juniperus oxycedrus* présent au Maroc. Les résultats ont révélé l'identification de 49 constituants, caractérisée par des teneurs élevées en  $\beta$ -pinène, suivi de limonène, sabinène,  $\alpha$ -pinène, (E)-caryophyllène,  $p$ -cymène, oxyde de caryophyllène et myrcène
- Une récente étude menée par **Mërtiri et al., (2024)** des extraits des baies et des aiguilles de *Juniperus oxycedrus*, collectés en Albanie. Les extraits des aiguilles étaient principalement caractérisés par des niveaux élevés d'acide ellagique. Ils contenaient également des quantités significatives de (-) - épigallocatechine et de kaempférol, ainsi que des quantités notables d'acide caféique, de caféine et de naringine. Dans les extraits de baies (JoxB) de la même étude, l'acide ellagique a été identifié comme le composé dominant, avec également une présence notable d'acide gallique. Des composés uniques aux extraits de baies étaient l'apigénine et la théaflavine.

## 5.2. Activités biologiques

Ci-dessous un tableau récapitulatif des principales activités biologiques de *J. oxycedrus*

**Tableau 1:** Différentes activités biologiques des différentes parties de *J. oxycedrus*

Activités biologiques	Partie utilisée de la plante	Extrait	Références
Antioxydante	▪ Feuilles	▪ Aqueux	(El Jemli et al., 2016)
		▪ Huile essentielle	(El Hajjouji et al., 2019)
		▪ Huile essentielle ▪ Méthanolique ▪ Acétate d'éthyle	Meringolo et al. (2022)
		▪ Aqueux	(Er Kemal et al., 2023)
	▪ Baies	▪ Huile essentielle	(Loizzo et al., 2007)
		▪ Méthanolique	(Taviano et al., 2013)
		▪ Éthanolique ▪ Acétate d'éthyle	(Živić et al., 2019)
	▪ Écorce de la racine	▪ Méthanolique	(Chaouche et al., 2013)
▪ Boie	▪ Huile essentielle	Loizzo et al. (2007)	
▪ Branches	▪ Huile essentielle	(Satrani et al., 2015)	
Anti-inflammatoire	▪ Feuille et Tige	▪ Méthanolique ▪ Dichlorométhane	(Moreno et al., 1988)
	▪ Feuille ▪ Baies	▪ Méthanolique	(Küpeli et al., 2009)
	• Feuille et Tige	▪ Méthanolique ▪ Aqueux	(Djellouli et al., 2022)
Antiproliférative	▪ Feuille ▪ Cône	▪ Méthanolique	(Yaglioglu & Eser, 2017)
	▪ Feuilles	▪ Huile essentielle ▪ Méthanolique ▪ Acétate d'éthyle	(Meringolo et al., 2022)
		▪ Aqueux	(Er Kemal et al., 2023)
	▪ Bois et Graines	▪ Huile essentielle	(Saab et al., 2013)
Anticancer	▪ Feuilles ▪ Baies	▪ Huile essentielle	(El-Abid et al., 2019)
	▪ Feuilles ▪ Baies	▪ Méthanolique	(Ben Mrid et al., 2019)
Antidiabétique	▪ Feuilles	▪ Hexane	(Orhan et al., 2012)
		▪ Éthanolique	(Orhan et al., 2011)
		▪ Huile essentielle	(Loizzo et al., 2007)
Neurodégénérative	▪ Feuilles	▪ Hydro-Méthanolique	(Tavares et al., 2012)
		▪ Huile essentielle	(Cheraif et al., 2020)
	▪ Baies	▪ Hexane	(Öztürk et al., 2011)
Antinociceptive	• Feuilles • Tige	▪ Méthanolique ▪ Dichlorométhane	(Moreno et al., 1988)
	▪ Feuille ▪ Baies	▪ Méthanolique	(Küpeli et al., 2009)
Antivirale	▪ Baies	▪ Huile essentielle	(Loizzo et al., 2008)
Antibactérienne	▪ Feuille	• Huile essentielle	(El Hajjouji et al., 2019)
	▪ Baies	▪ Méthanolique	(Taviano et al., 2011)
	▪ Cône	▪ Huile essentielle	(Angioni et al., 2003)

## 6. Toxicité et effets secondaires

La baie de genévrier est reconnue pour ses propriétés stimulantes sur les reins et la vessie grâce à ses composés actifs. Cependant, une utilisation excessive peut provoquer une irritation de ces organes. L'huile de genévrier, pouvant être irritante, est déconseillée pour les personnes ayant des problèmes rénaux, les femmes enceintes et celles avec des inflammations gastriques (**Union Internationale pour la Conservation de la Nature et de ses Ressources, 2005**).

Un cas d'intoxication sévère chez un individu a été signalé suite à l'ingestion d'un extrait du *Juniperus oxycedrus* fait maison, entraînant des complications sérieuses mais réversibles après un traitement approprié. Bien que les extraits de la plante aient une toxicité limitée à des doses modérées avec une DL<sub>50</sub> supérieure à 3 g/kg de poids corporel pour les deux extraits, la prudence reste recommandée dans leur usage (**Al-snafi, 2018**).

## 7. Huile de cade, remède naturel

### 7.1. Description et caractéristiques de l'huile de cade

L'huile de cade est un liquide épais, homogène, de couleur noire à brun foncé. Elle se distingue par une odeur particulière, intensément forte et empyreumatique, qui peut être considérée comme désagréable par certains. Elle se caractérise par une richesse en composés aromatiques et présente une solubilité partielle dans l'alcool à 90°. En revanche, elle est insoluble dans l'eau mais se dissout complètement dans des solvants comme l'éther, le benzène, l'acide acétique et le chloroforme (**Belliot, 2007**). L'huile de cade est un produit aux propriétés uniques, extrait de manière traditionnelle et utilisé pour ses caractéristiques distinctives et ses applications potentielles dans diverses pratiques, notamment médicinales.

### 7.2. Production du goudron de cade

L'huile de cade est extraite par un processus de distillation sèche ou carbonisation du bois du genévrier oxycède (*Juniperus oxycedrus*), spécifiquement à partir du tronc et des branches épaisses des arbres matures, car les spécimens plus jeunes ne produisent pas d'huile. Cette méthode décompose les substances végétales sous l'effet de la chaleur en séparant les composants en produits résiduels et distillés (**Belliot, 2007**). On distingue deux méthodes de distillation : per descensum et per ascensum.

- La méthode *per descensum* : utilisée dans les anciens fours, elle opère à des températures entre 200°C et 250°C, permettant de recueillir l'huile directement du bois sans évaporation.

- La méthode *per ascensum* : fonctionne à environ 400°C, provoquant l'évaporation de l'huile qui se condense ensuite sur les parois pour être récupérée. C'est cette dernière méthode qui est principalement utilisée pour produire l'huile de cade commercialisée (Belliot, 2007).

### 7.2.1. Les fours

Historiquement, la production d'huile de cade s'appuyait sur des fours traditionnels, des constructions robustes en pierres sèches couvertes de terre. Ces fours, actifs jusqu'au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, disposaient d'une fosse centrale en briques et en argile avec un fond en entonnoir pour la collecte de l'huile (Fig. 04). La chambre de chauffe, située à l'arrière, permettait d'atteindre des températures avoisinant les 250°C, optimales pour l'extraction de l'huile sans évaporation ou inflammation. En Algérie, le « *Gatran* » est toujours produit selon des méthodes traditionnelles dans les régions des Sud, de l'Est et du Centre, notamment à Ghardaïa, M'sila et Djelfa. Ces pratiques ancestrales, bien que moins documentées, illustrent la richesse du patrimoine culturel algérien dans l'utilisation des ressources naturelles locales pour la production d'huile de cade. La conservation de ces techniques souligne l'importance de l'héritage traditionnel, adapté aux besoins et technologies actuels.



**Figure 4:** Ancien four à cade (Belliot, 2007)

### 7.3. Composition chimique

Le goudron et l'huile issus du *Juniperus oxycedrus*, riches en composés chimiques complexes, constituent une source de sesquiterpènes, notamment le cadinène, reconnu comme leur majeur constituant. Plusieurs isomères sont présents, dont le principal est le  $\beta$ -cadinène (Andersen, 2001) (Fig. 5).

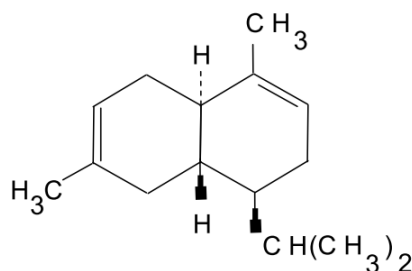


Figure 5: Structure du  $\beta$ -cadinène

Outre le cadinène, ces extraits de *Juniperus oxycedrus* se distinguent par la présence d'hydrocarbures aromatiques tels que le benzène et le toluène, contribuant à leur complexité chimique et à leurs applications potentielles (Chalchat et al., 1990; Belliot, 2007).

La présence de phénols, tels que le gaiacol, le crésol et la résorcine, ainsi que d'acides pyroligneux, avec une prédominance de l'acide acétique, jouent un rôle important dans les multiples usages de l'huile de cade, particulièrement pour ses propriétés antimicrobiennes et antiseptiques (Ninich et al., 2022).

Dans l'analyse menée par Chalchat et Garry, dix types d'huiles, tant essentielles qu'empyreumatiques, ainsi que des extraits provenant du bois de *Juniperus oxycedrus*, ont été examinés grâce à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Il a été observé que les composants principaux de l'huile essentielle, de l'extrait de l'hexane et de l'extrait alcoolique présentent des similitudes, comprenant notamment le  $\beta$ -Caryophyllène, l' $\alpha$ -Humulène, le Calaménène, le  $\gamma$ -Muuroène, l' $\alpha$ -Muuroène, ainsi que divers types de Cadinènes (incluant le  $\gamma$ - et  $\delta$ -cadinène), le Cubénol et l'Épicubénol (Chalchat et al., 1990).

Finalement, la composition chimique de ce goudron est déterminée par divers facteurs tels que la source des matières premières, la situation géographique, les conditions climatiques et les méthodes d'extraction employées (Belliot, 2007).

#### 7.4. Propriétés pharmacologiques de quelques molécules présente dans l'huile de cade

Certaines molécules de l'huile de cade offrent des propriétés pharmacologiques significatives, telles que des effets anti-inflammatoires, antiprolifératifs et cicatrisants, ce qui ouvre la voie à leur utilisation potentielle dans divers traitements thérapeutiques notamment :

$\beta$ -Caryophyllène, est un sesquiterpène naturel, parmi ses diverses activités biologiques, exerce une action anti-inflammatoire en inhibant les principaux médiateurs inflammatoires tels que l'Interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ), l'Interleukine-6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ ), le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B), la cyclooxygénase 1 (COX-1) et la cyclooxygénase 2 (COX-2) (Francomano et al., 2019).

Plusieurs recherches, réalisées *in vitro* et *in vivo*, indiquent que l'utilisation du  $\beta$ -Caryophyllène peut améliorer l'état de modèles animaux représentant des pathologies inflammatoires variées, y compris des troubles neurologiques comme la maladie de Parkinson et d'Alzheimer, des maladies inflammatoires telles que la sclérose en plaques et l'athérosclérose, ainsi que différents types de cancers comme ceux du sein et du pancréas (Francomano et al., 2019).

Il présente un potentiel thérapeutique contre les infections à Streptococcus, l'ostéoporose et la stéatohépatite.

Il a démontré des effets anti-pseudo-allergiques en réduisant la dégranulation des mastocytes et les réactions anaphylactiques (Pathak et al., 2021).

Il est connu pour ses effets anticonvulsivants, analgésiques, myorelaxants, sédatifs et antidépresseurs (Francomano et al., 2019).

Le  $\beta$ -caryophyllène issu de la résine de *Copaifera langsdorffii* favorise la cicatrisation cutanée. Une étude a révélé qu'il induit une rétraction macroscopique des plaies, diminue les niveaux de molécules pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) et augmente ceux d'IL-10 et de la GPx, démontrant ses mécanismes antioxydants et anti-inflammatoires. Il améliore également la re-épithélialisation et le remodelage du collagène, soulignant son potentiel en formulation topique pour la guérison des plaies cutanées chez les rats (Gushiken et al., 2022).

Selon Ding et al. (2020), l'huile essentielle de *Phoebe bournei* (Hemsl.) Yang, obtenue par hydrodistillation, contient principalement :  $\alpha$ -muurolène (7.32%),  $\delta$ -cadinène (11.44%) et 1s-calamenène (5.18%) : L'huile essentielle de *P. bournei* montre des propriétés antifongiques significatives et est particulièrement efficace contre certains cancers comme la leucémie, le cancer du sein et du côlon, mais moins contre les cancers du poumon et du foie. Elle a également

un potentiel hypoglycémique en augmentant l'absorption de glucose par les adipocytes (**Ding et al., 2020**).

Selon **Mulyaningsiha et al. (2010)**, l'huile essentielle de *Kadsura longipedunculata* contient principalement du  $\delta$ -cadinène (21.79%), cubenol (5.12%) and d-cadinol (5.11%) et d'autres composants. Elle a montré une activité anti-inflammatoire en inhibant les enzymes cyclooxygénase et lipoxygénase et en réduisant les niveaux de PGE<sub>2</sub>, ce qui suggère une forte activité anti-inflammatoire (**Mulyaningsih et al., 2010**).

Selon **Kundu et al. (2013)**, l'huile essentielle d'*Eupatorium adenophorum*, distillée à partir de ses feuilles, contient principalement du  $\gamma$ -cadinène, germacrène-D, et  $\gamma$ -elemène. Les cadinènes isolés ont été soumis aux tests DPPH et FRAP, révélant des propriétés antioxydantes comparables à celles des standards établis (**Kundu et al., 2013**).

D'après **Hui et al. (2015)**, la recherche a évalué les effets antiprolifératifs et apoptotiques du  $\delta$ -cadinène sur les cellules de cancer ovarien OVCAR-3. Ce sesquiterpène a montré une inhibition de la croissance des cellules de manière dépendante de la dose et du temps, a induit la condensation chromatiniennne et a activé les caspases.

Le  $\delta$ -cadinène a également provoqué un arrêt du cycle cellulaire en phase sub-G1 et un clivage de PARP, soulignant son potentiel comme agent anticancéreux pour le traitement du cancer de l'ovaire (**Hui et al., 2015**).

## **7.5. Applications thérapeutiques de l'huile de cade**

L'huile de cade est tirée du bois de petits arbustes de la famille des genévriers. Sa composition est complexe et caractérisée par une proportion élevée d'hydrocarbures tels que le cadinène. En raison de sa composition complexe, elle possède des propriétés antiprurigineuses, kératolytiques, cicatrisantes, antiseptiques et antifongiques (**Ninich et al., 2022**). Grâce à ces propriétés, elle est souvent utilisée en médecine vétérinaire et en médecine humaine, notamment en dermatologie et en cosmétologie (**Burri et al., 2017**).

### **7.5.1. Utilisations cosmétiques**

L'huile de cade, autrefois populaire pour rendre les cheveux luisants, est aujourd'hui utilisée dans certains shampoings traitant le psoriasis du cuir chevelu et autres problèmes dermatologiques (**Belliot, 2007; Ninich et al., 2022**).

### **7.5.2. Utilisations en médecine vétérinaire**

Historiquement employée pour traiter la gale, les teignes, et l'eczéma chez les animaux, l'huile de cade reste parfois utilisée par les vétérinaires pour certaines affections cutanées (**Ninich et al., 2022**).

### **7.5.3. Utilisations en médecine humaine**

L'huile de cade avait une utilisation variée en médecine humaine, traitant des troubles pulmonaires, des douleurs dentaires, des affections oculaires, des lithiases biliaires et des néphrites chroniques. Elle servait aussi d'antihelminthique, surtout chez les enfants. Ces utilisations ont diminué avec l'avènement de nouveaux médicaments (**Orhan et al., 2012 ; Ninich et al., 2022**). En Turquie, le goudron de genévrier, ainsi que les feuilles et les fruits, sont couramment utilisés pour traiter une variété de maux, notamment les plaies, les douleurs abdominales, les troubles gastriques, les maladies gynécologiques, les hémorroïdes, le rhume, la toux, la bronchite, la calcinose articulaire, les infections fongiques, l'inflammation rénale et pour éliminer les calculs rénaux (**Çakır, 2017**).

### **7.6. Toxicologie**

La toxicité orale aiguë du goudron de genévrier a été évaluée chez un groupe de 10 rats Osborne-Mendel jeunes adultes. La dose létale médiane (LD<sub>50</sub>), c'est-à-dire la dose à laquelle 50 % des animaux testés sont décédés, a été déterminée à 8014 mg/kg, avec des limites de confiance à 95 % s'étendant de 6550 à 9770 mg/kg. Avant le test, les animaux ont été maintenus à jeun pendant environ 18 heures. Les principaux effets toxiques notés étaient une baisse de l'activité (dépression) et des signes d'irritation au niveau du système gastro-intestinal. Ces résultats proviennent de l'étude réalisée par **Jenner et al. (1964)** citée par **Andersen (2001)**.

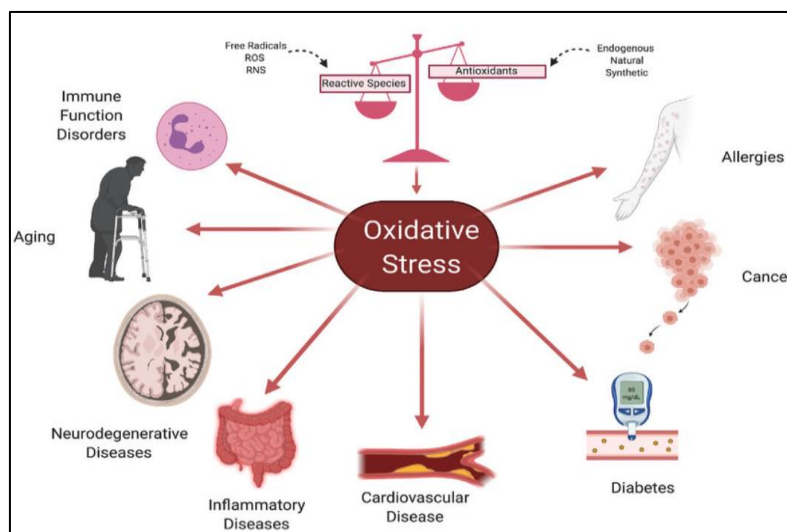
## **Chapitre 2**

# **Stress Oxydatif et Antioxydants : Le Rôle Clé des Polyphénols**

# Chapitre 2 : Stress Oxydatif et Antioxydants : Le Rôle Clé des Polyphénols

## 1. Le Concept de Stress Oxydatif

La fondation théorique du concept du stress trouve ses racines dans les travaux de **Selye en 1936**. Au cours des années 1970, le terme a commencé à être employé spécifiquement pour décrire les effets du peroxyde d'hydrogène sur les érythrocytes, signalant son adoption significative dans le champ de la biologie (**Sies, 2018**). C'est en 1985, avec la publication de l'ouvrage "Stress Oxydatif" que le concept a été rigoureusement défini comme étant un déséquilibre favorisant les agents pro-oxydants par rapport aux antioxydants. Depuis cette époque, le terme a subi d'importantes évolutions, enrichissant à la fois notre compréhension et notre application de ce phénomène scientifique. Ces progrès ont mis en exergue le rôle majeur du stress oxydatif dans l'étiologie de diverses maladies, ainsi que sa contribution essentielle au maintien de l'homéostasie redox (**Sies, 2018**). Aujourd'hui, le stress oxydatif est défini comme une prédominance des oxydants par rapport aux antioxydants dans les systèmes biologiques, dépassant les capacités réductrices du système de défense antioxydant humain (**Fig. 6**). Cet excès de radicaux libres, altère les macromolécules biologiques telles que l'ADN, les lipides et les protéines, perturbant ainsi la machinerie cellulaire et participant activement au déclenchement et/ou au développement de nombreuses pathologies incluant l'inflammation, les troubles gastriques, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires, le diabète, les troubles respiratoires, le vieillissement, l'ischémie, la progression tumorale et carcinogénèse (**Fleming Luo et Leo 2021**).



**Figure 6:** Stress oxydative et maladies chroniques (**Fleming et Luo 2021**)

## 2. Radicaux libres

Par définition, un radical libre est un atome, un groupe d'atomes ou une molécule possédant un électron (ou plusieurs) non-apparié(s) sur la couche périphérique de leur squelette moléculaire (Favier, 2003). Les radicaux libres sont principalement des substances très réactives et instables qui tendent à appairer leur électron non apparié avec un électron libre d'autres composés, provoquant ainsi leur oxydation et devenant ainsi réduits, d'où leur nom d'oxydants. Le radical peut se débarrasser de l'électron libre en le transmettant à une autre molécule, le radical devient oxydé et l'accepteur d'électron devient réduit (Halliwell, 1993).

Bien que l'oxygène, sous forme moléculaire, puisse se comporter comme un radical libre, c'est surtout lors de la réduction partielle de l'oxygène par les électrons durant la respiration cellulaire mitochondriale que les EROs se forment (Halliwell 1993 ; Favier 2003).

Comme illustrés dans la Fig. 7, ces EROs comprennent notamment le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le peroxynitrite.

On distingue les EROs primaires, directement issus de l'oxygène, qui jouent des rôles spécifiques dans les processus physiologiques ; des EROs secondaires, qui se forment suite à l'interaction des EROs primaires avec des composants cellulaires tels que les lipides, les protéines et les glucides (Favier, 2003).

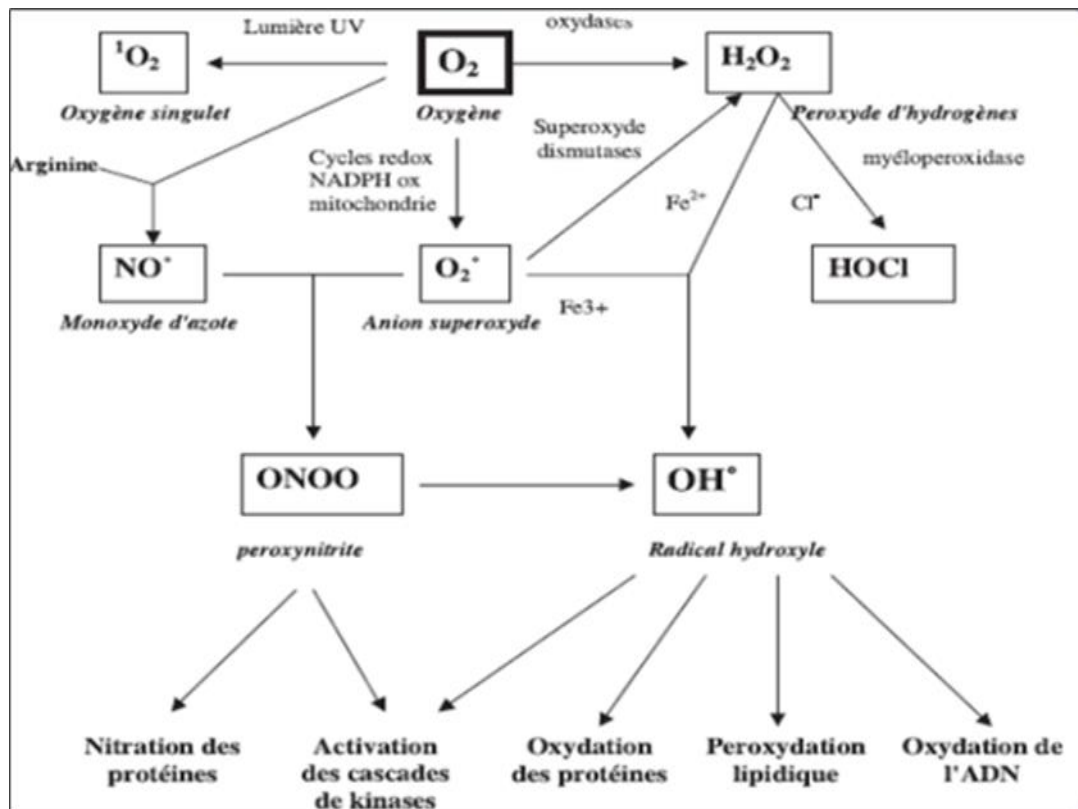


Figure 7: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène

### 3. Sources des espèces réactives (ERO, ERN)

La production de ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN), dans l'organisme des animaux et des humains est un processus continu et une partie normale de la physiologie humaine et animale. Ces espèces sont également produites dans des conditions pathologiques ( **Niki, 2016; Sies, 2018**). D'autre part, les radicaux libres peuvent être générés à partir de sources endogènes ou exogènes (**Haleng et al., 2007**), comme le montre le **Tableau 02** :

**Tableau 2:** Sources de stress oxydant endogènes et exogènes (**Haleng et al., 2007**).

Sources exogènes	Sources endogènes
Tabagisme	Enzymes de la chaîne respiratoire
Faible consommation des fruits et légumes	Mitochondriale
Alcool	NADPH-oxydase
Toxines et médicaments	Xanthine-oxydase
Pollution	Synthase de l'oxyde nitrique et
Radiations	Tétrahydrobioptérine
	Myéloperoxydase

### 4. Effets Pathologiques du Stress Oxydatif

Le stress oxydatif, résultant d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la capacité antioxydante de l'organisme, est impliqué comme facteur déclenchant ou exacerbant dans une vaste gamme de pathologies (**Favier, 2003**). Ce phénomène impacte gravement les composants cellulaires tels que les lipides, les protéines, et l'ADN, empêchant ainsi les fonctions cellulaires et compromettant la santé des organes (**Niki, 2016**).

Sur le plan lipidique, l'interaction des radicaux libres avec les membranes enrichies en acides gras polyinsaturés entraîne la formation de substances toxiques, notamment l'hydroxynonéal et le malondialdéhyde, compromettant l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes. Cette situation réduit leur fluidité et leur perméabilité, perturbant les mécanismes de signalisation cellulaire ainsi que l'activité des récepteurs et des transmetteurs (**Haleng et al., 2007**). Selon **Catala (2011)** les altérations de la fluidité et de la perméabilité des membranes dues à la peroxydation lipidique nuisent aux fonctions cellulaires, menant potentiellement à la mort cellulaire.

Concernant les protéines, le stress oxydatif engendre des altérations notables, incluant la fragmentation et des modifications structurales. Des acides aminés comme la cystéine et la méthionine sont particulièrement sensibles à ces modifications, ce qui mène à la formation de protéines carbonylées, indiquant un dysfonctionnement protéique et augmentant le risque de maladies inflammatoires et dégénérative (**Sahiner et al., 2011 ; Bai et al., 2019**). En outre,

l'histidine, la proline, le tryptophane et la tyrosine, exposés aux espèces oxygénées activées, subissent une oxydation produisant des groupes carbonylés et des liaisons disruptives, telles que les ponts bi-tyrosine, affectant la fonction protéique. Ces atteintes, généralement irréversibles, peuvent diminuer l'activité enzymatique ou altérer la reconnaissance moléculaire **(Haleng et al., 2007)**.

Quant à l'ADN, sa vulnérabilité aux dommages causés par les espèces oxygénées activées peut conduire à des mutations et à une instabilité génétique **(Mironczuk-Chodakowska et al., 2018)**. Les radicaux libres, notamment le radical hydroxyle, capable de déclencher l'apoptose. Un exemple de ces dommages est la transformation de la guanine en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG), qui perturbe l'association normale de la cytosine avec l'adénine, favorisant ainsi des mutations qui peuvent accélérer le vieillissement et initier des processus carcinogénèse **(Haleng et al., 2007)**.

## **5. Les défenses antioxydantes**

Les antioxydants contribuent à empêcher la surproduction des espèces réactives d'oxygène et d'azote ou à les neutraliser avant qu'elles engendrent des dommages aux cellules. Leur action s'étend sur plusieurs fronts : ils peuvent capturer ces espèces réactives, se lier aux métaux de transition pour éviter leur participation à la production d'EROs, inhiber les enzymes responsables de la génération d'EROs, ou servir de cofacteurs aux enzymes antioxydantes **(Perron et Brumaghim, 2009)**.

### **5.1. Type d'antioxydants**

Les systèmes de défense, synthétisés par notre organisme (endogènes), incluant à la fois les antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques, collaborent en synergie pour préserver l'homéostasie oxydative. Les antioxydants enzymatiques neutralisent les espèces réactives de l'oxygène (ROS), offrant une première ligne de défense contre le stress oxydatif. Parmi eux des enzymes telles que la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx) **(Shahiner et al., 2011)**.

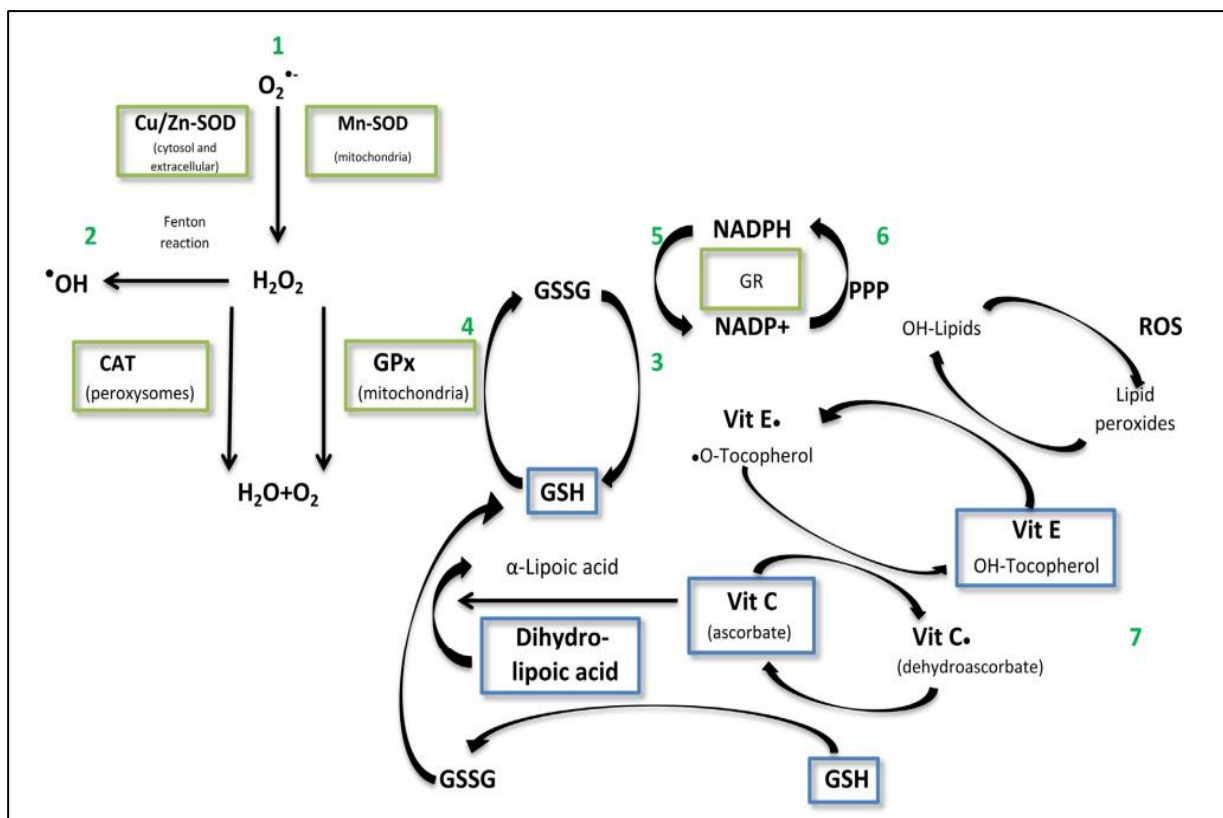
D'autre part, les antioxydants non-enzymatiques, comprenant des petites molécules comme le glutathion réduit (GSH), un cofacteur enzymatique qui intervient dans la régulation des fonctions cellulaires et la protection des lipides membranaires **(Sahiner et al., 2011 ; Bai et al., 2019)**. En complément, une variété d'antioxydants non-enzymatiques est obtenue principalement à travers l'alimentation (exogènes). Ces derniers se répartissent en plusieurs catégories, notamment les polyphénols (tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes)

constituant le groupe le plus significatif, suivis par les vitamines (comme les vitamines E et C), les caroténoïdes et certains minéraux (Zinc et Sélénium) (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018).

## 5.2. Mécanisme de protection antioxydante

Face à l'agression des radicaux libres, les cellules, les tissus et la matrice extracellulaire déclenchent des mécanismes de défense internes visant à neutraliser ces menaces et leurs dérivés, comme le montre la **Figure 8**. Ces mécanismes incluent la prévention, constituant la première ligne de défense, bloquant les interactions des radicaux libres et de leurs dérivés avec les substances biologiques de l'organisme ; la réparation, interrompant les réactions d'oxydation radicalaire ; et l'inactivation traitant les produits réactifs soit par réparation des dommages, soit par élimination (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018) et ce dans le détail les étapes suivantes :

- Le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) se forme par la réduction d'un seul électron de l'oxygène et sous l'action de la superoxyde dismutase (Cu/Zn-SOD ou Mn-SOD) se transforme en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).
- Le  $H_2O_2$  est ensuite réduit en eau et en oxygène par l'action combinée de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxydase (GPx).
- Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène peut se convertir en radical hydroxyle (HO) dans la réaction de Fenton, catalysée par des métaux de transition, impliquant ce radical dans des réactions en chaîne.
- Le glutathion réduit (GSH), grâce à son groupe thiol, intervient dans la restauration des protéines ou d'autres macromolécules à leur état réduit. De plus, le GSH réduit le  $H_2O_2$  dans une réaction menée par le glutathion peroxydase et le glutathion oxydé résultant agit sur les thiols protéiques.
- Le glutathion disulfure est ensuite réduit en GSH par le glutathion réductase (GR), utilisant l'hydrogène de NADPH, qui est oxydé en  $NADP^+$ .
- Le NADPH est produit lors de la phase oxydative de la voie des pentoses phosphates, où le glucose-6-phosphate se transforme en ribulose 5-phosphate, réduisant le  $NADP^+$  en NADPH.
- Enfin, la vitamine C et l'acide alpha-lipoïque aident à régénérer le GSSG en GSH. La vitamine E, en tant que donneur d'hydrogène, neutralise les peroxydes lipidiques et arrête les réactions en chaîne oxydatives. La forme non-oxydée de la vitamine E peut être recyclée par la vitamine C et le glutathion.



**Figure 8:** Mécanisme d'action du système antioxydant (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018)

## 6. Mécanismes d'action des polyphénols en tant qu'antioxydants

Dans le contexte des stratégies de défense contre le stress oxydatif, les composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, sont hautement valorisés dans les pratiques médicales, traditionnelles et modernes, pour leur efficacité antioxydante. Grâce à leurs propriétés redox remarquables, agissant efficacement comme des agents réducteurs et donateurs d'hydrogène, capturant les radicaux libres et neutralisant les ions (Perron et Brumaghim, 2009).

Les antioxydants se divisent en deux types principaux : les antioxydants primaires, qui interrompent la réaction en chaîne et captent les radicaux libres ; les antioxydants secondaires ou préventifs, qui préviennent le stress oxydatif par divers moyens tels que la chélation des métaux et l'inhibition des peroxydations lipidiques. Ces mécanismes contribuent également à la régénération des antioxydants primaires et à l'élimination de l'oxygène singulet (Dai et Mumper, 2010).

## 6.1. Capture ou piégeage direct des ERO

Les polyphénols sont reconnus pour leurs puissantes propriétés antioxydantes, qui sont attribuables à leur structure chimique unique, leur conférant ainsi la capacité de neutraliser directement les espèces réactives de l'oxygène (Tiwari, 2001).

Cette capacité est fondée sur un mécanisme décrit dès 1976 par Sherwin, où ces antioxydants, par le biais de leurs groupes hydroxyles (-OH) situés sur les anneaux aromatiques, cèdent un atome d'hydrogène aux radicaux libres, les transformant ainsi en formes moins réactives et moins dommageables. Cette donation d'électrons stabilise les EROs et empêche la propagation des réactions en chaîne oxydatives. Les composés phénoliques peuvent aussi réagir avec d'autres radicaux libres pour former des produits stables (Dai et Mumper, 2010).

À titre d'exemple, La rutine contient une partie catéchol (groupes o-dihydroxyles) sur l'anneau aromatique, un élément structurel clé qui forme des liaisons hydrogènes intra-moléculaires avec les radicaux libres, contribuant ainsi à sa forte activité antioxydante (Panhwar et Memon, 2014).

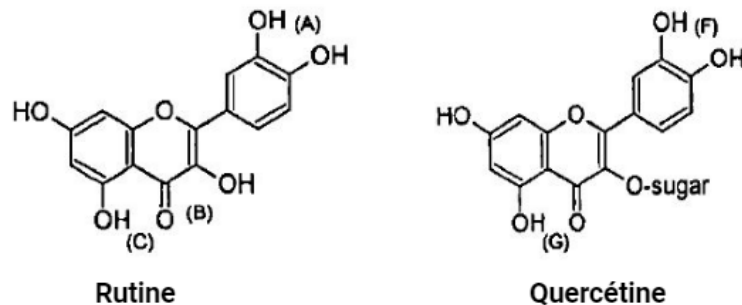
## 6.2. Chélation des ions métalliques

Les ions métalliques sont essentiels à la biologie cellulaire, mais leur suractivité peut causer des dommages cellulaires, comme la peroxydation des lipides, illustrée par l'effet du  $\text{Cu}^{2+}$  sur les Lipoprotéines à faible densité (LDL) (Laguerre, 2007). Les composés phénoliques contenant des groupes catécholate et gallate peuvent contrer la formation de radicaux d'oxygène métal-dépendants, soit par stabilisation de  $\text{Fe}^{2+}$  empêchant son auto-oxydation, soit en formant des complexes inactifs avec des ions tels que  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$  (Tiwari, 2001).

Les flavonoïdes sont reconnus pour leur efficacité à chélater ces ions métalliques ; la quercétine est un flavonoïde efficace dans la chélation des ions métalliques grâce à trois sites de liaison (A, B, C), avec une affinité particulière du site A à pH physiologique (Fig. 09). Ce processus implique la coordination des ions via les groupes hydroxyles de la quercétine (Hider et al., 2001).

Quant à la rutine, une forme glycosylée de la quercétine, elle possède deux sites de liaison aux métaux, nommés F et G. Cependant, en raison de sa conjugaison avec un groupe glucidique, la rutine ne peut pas lier les métaux aussi efficacement que la quercétine, car elle perd le proton nécessaire à la liaison. Cela indique que les propriétés de chélation de la rutine sont limitées à cause de sa structure, où la partie glucidique modifie sa capacité d'interaction avec les ions métalliques par rapport à la quercétine non glycosylée. Ainsi, bien que la quercétine et la rutine

interagissent avec les ions métalliques par leurs groupes phénoxide (la forme déprotonée du groupe phénol), la présence de groupes hydroxyles spécifiques et la structure glucidique de la rutine influencent leur efficacité de chélation, particulièrement efficace contre les ions à haute densité de charge comme le fer (III) et le cuivre (II) (Hider et al., 2001).



**Figure 9:** Structure chimique de la rutine et de la quercétine (Hider et al., 2001)

### 6.3. Inhibition des enzymes

Les polyphénols, reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, sont capables d'inhiber certaines enzymes clés, dont la xanthine oxydase. Cette enzyme impliquée dans le métabolisme des purines, où elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et ultérieurement en acide urique. L'excès d'activité de cette enzyme peut provoquer une augmentation des niveaux d'acide urique, conduisant à l'hyperuricémie et augmentant le risque de la maladie de la goutte (Zheng et al., 2023). Parallèlement, cette réaction enzymatique est accompagnée de la génération de l'anion superoxide et du peroxyde d'hydrogène à partir du dioxygène, faisant de la xanthine oxydase une source biologique significative d'espèces réactives de l'oxygène (Shahiner et al., 2011).

Les polyphénols interfèrent avec l'activité de la xanthine oxydase, soit en se liant de manière compétitive à son site actif, bloquant ainsi l'accès aux substrats, soit en modifiant sa structure conformationnelle de façon non-compétitive. Cette inhibition empêche la conversion de l'oxygène en formes réactives, réduisant ainsi la quantité d'EROs produite et contribuant à la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Zheng et al., 2023).

### 6.4. Inhibition de la peroxydation lipidique

Les polyphénols peuvent intervenir dans la perturbation de la peroxydation lipidique, un processus où les radicaux libres ciblent agressivement les lipides dans les membranes cellulaires. Ils interviennent par deux mécanismes distincts : protection des lipides cibles et arrêt de la propagation de l'oxydation (Delattre et al., 2005).

Premièrement, en tant qu'antioxydants préventifs, ils bloquent la formation des espèces réactives de l'oxygène ou neutralisent des espèces réactives spécifiques comme  $O^{2\bullet-}$ ,  $^1O_2$  et  $OH$ , qui sont les initiateurs de l'oxydation. Dans la seconde approche, ils offrent un atome d'hydrogène aux radicaux favorisant la propagation de l'oxydation ( $LOO\bullet$ ), ce qui met un terme à la peroxydation lipidique en cours. Cette double intervention des polyphénols est fondamentale pour prévenir l'oxydation des lipides cellulaires, un facteur clé dans la protection des membranes cellulaires contre les dommages oxydatifs (Delattre et al., 2005 ; Laguerre, 2007).

## **7. Composés polyphénoliques : Exploration des propriétés antioxydantes, activités biologiques diverses et intérêts thérapeutiques**

Avec plus de 8000 variétés identifiées, ces métabolites se caractérisent par au moins un anneau aromatique à six carbones accompagnés d'un ou plusieurs groupes hydroxyles, sous forme libre ou liés comme éthers, esters ou hétérosides (**Bruneton, 2009 ; Khan et al., 2019**). Leur classification repose sur leur structure, incluant le nombre d'anneaux aromatiques et les groupements fonctionnels, et englobe diverses catégories telles que les flavonoïdes, stilbénoloïdes, tanins, et lignines, ainsi que d'autres composés phénoliques, terpénoïdes et alcaloïdes (**Tomas-Barberan et Clifford, 2000**).

Ces substances se retrouvent abondamment dans notre régime alimentaire, notamment dans les fruits, légumes, boissons comme le café et le thé, ainsi que dans les céréales, graines oléagineuses et légumineuses (**Perron et Brumaghim 2009**). Les polyphénols apportent divers avantages pour la santé, en servant d'antioxydants, en réduisant l'inflammation et en exerçant une action antimicrobienne. Ils contribuent également à la protection cutanée, à la diminution de la pression artérielle, et possèdent des effets cardioprotecteurs et anticancéreux (**Perron et Brumaghim 2009 ; Khan et al., 2019**).

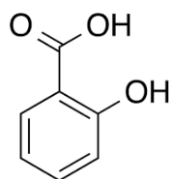
### **7.1. Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques, caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique lié à un groupe hydroxyle, forment une catégorie essentielle de composés en phytochimie et constituent l'unité de base pour d'autres composés phénoliques. On distingue principalement deux classes d'acides phénoliques : les dérivés de l'acide benzoïque, ou acides hydroxybenzoïques, et ceux de l'acide cinnamique, ou acides hydroxycinnamiques., les acides phénoliques exercent des activités antioxydantes en neutralisant divers radicaux, ce qui les rend indispensables à divers processus biologiques (**Kumar et Goel 2019**).

#### **7.1.1. Acides hydroxybenzoïques**

Les acides hydroxybenzoïques, dérivés spécifiques de l'acide benzoïque, sont présents dans une variété limitée de plantes et demeurent relativement peu explorés dans notre régime alimentaire habituel. Ces composés se caractérisent par une structure complexe. Cette diversification

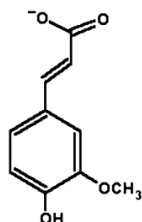
structurale donne naissance à plusieurs types d'acides, tels que vanillique, gallique, syringique, salicylique, dont la structure est présentée dans la **Figure 10** (Kumar et Goel 2019).



**Figure 10:** Structure de l'acide salicylique

### 7.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Dans le monde végétal, les acides hydroxycinnamiques sont particulièrement abondants et divers, avec l'acide caféique comme le plus courant. Les autres acides notables de cette catégorie incluent l'acide férulique, sinapique et 4-coumarique, fréquemment présents dans de nombreux aliments. Ces composés se retrouvent rarement sous forme libre, étant plutôt conjugués sous formes de dérivés glycosylés ou d'esters avec des acides comme le quinique, le tartrique ou le shikimique. L'acide férulique, quant à lui, est reconnu comme l'un des acides phénoliques les plus fréquents dans les graines (Kumar et Goel 2019). La structure de l'acide férulique est illustrée dans la **Figure 11**.



**Figure 11:** Structure de l'acide férulique

## 7.2. Effets thérapeutiques des acides phénoliques

L'une des caractéristiques les plus étudiées de l'acide salicylique (SA) est sa propriété antioxydante. L'acide salicylique est un inhibiteur confirmé du stress oxydatif. Les recherches de Sagone et al. ont montré que l'acide salicylique réagissait avec les radicaux hydroxyles dans les granulocytes, formant des métabolites. De plus, l'acide salicylique a réduit les radicaux anion superoxyde en agissant sur l'activité du NADPH, ce qui a à son tour diminué les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules endothéliales humaines lors d'études *in vitro* (Randjelović et al., 2015). De plus, selon l'étude de Balasubashini et al. (2003), l'acide férulique possède des effets antidiabétiques et peut réduire le glucose sanguin chez les animaux diabétiques induits par la streptozotocine. Il agit en neutralisant les radicaux libres dans le pancréas, ce qui favorise une augmentation de la sécrétion d'insuline. Par ailleurs, l'effet

neuroprotecteur de l'acide férulique (FA) s'explique par sa capacité à inhiber la production de leucotriènes et à réduire le stress oxydatif dans le cerveau. Une administration à long terme de FA à une dose de 300  $\mu\text{M}$  s'avère efficace pour protéger contre la toxicité du peptide amyloïde bêta en inhibant l'activation des microglies *in vivo* (Srinivasan et al., 2007). L'effet anti-âge de l'acide férulique (FA) protège les cellules contre les dommages liés au vieillissement et à l'exposition environnementale. En formant un radical phénoxy stabilisé par résonance, et grâce à l'absorption des UV, le FA catalyse la formation de ce radical stable, améliorant sa capacité à interrompre les réactions en chaîne de radicaux libres (Graf, 2000).

### 7.3. Les flavonoïdes

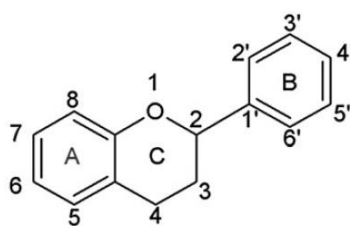
Une classe de composés naturels présentant une structure polyphénolique distincte. Ils sont largement présents dans une variété de fruits, de légumes et de certaines boissons. Au sein du règne végétal, les flavonoïdes sont essentiels pour la pigmentation, la protection contre les UV, et la réaction au stress environnemental. Ils sont divisés en plusieurs sous-groupes, tels que les flavones et les flavonols, chacun possédant des sources principales spécifiques (Harborne, 2013). Les recherches approfondies sur les flavonoïdes ont mis en lumière leur potentiel en tant qu'agents thérapeutiques, notamment dans le traitement de maladies telles que la maladie d'Alzheimer. Les avancées dans la recherche sur les flavonoïdes, leurs applications, leur catégorisation, ainsi que les perspectives futures continuent d'être des sujets d'exploration scientifique active (Harborne, 2013; Panche et al., 2016).

#### 7.3.1. Structure et classification

La structure des flavonoïdes est à la fois complexe et diversifiée, mais elle repose sur un squelette de base commun à tous les membres de cette famille de composés. Voici une description détaillée de leur structure :

##### 7.3.1.1. Squelette de Base

Les flavonoïdes sont constitués d'un cadre de 15 atomes organisé en trois anneaux, connus sous les noms A, B, et C. Le plus souvent, l'anneau A est un cycle benzénique, tandis que l'anneau B est également un cycle benzénique, mais varié selon les sous-classes de flavonoïdes. L'anneau C, un hétérocycle oxygéné, relie les anneaux A et B (Fig. 12). Cette structure est illustrée par le squelette de base des flavonoïdes (Panche et al., 2016).



**Figure 12:** Structure de base des flavonoïdes (**Panche et al., 2016**)

### 7.3.1.2. Sous-Classes de Flavonoïdes

En résumé, la structure des flavonoïdes est caractérisée par trois anneaux de base, avec des variations dans la liaison des anneaux, le degré de saturation et d'oxydation, ainsi que dans les groupes fonctionnels attachés. Ces variations structurelles sous-tendent la diversité et la complexité des fonctions biologiques des flavonoïdes.

Les flavonoïdes, selon **Panche et al., (2016)**, constituent une vaste classe de composés polyphénoliques présents dans les plantes, qui jouent un rôle majeur dans la défense contre les stress environnementaux et dans l'interaction avec les pollinisateurs. Voici une brève description des différents groupes de flavonoïdes mentionnés :

- **Flavones** : Ce groupe inclut l'apigénine, la lutéoline et la chrysin.
- **Flavonols** : Parmi les plus connus se trouvent la rutine, le kaempférol, la quercétine, la myricétine et la fisétine.
- **Flavanones** : Telles que l'hespéritine, la naringénine et l'ériodictyol
- **Flavanols** : Ce groupe inclut des composés comme l'épigallocatechine gallate (EGCG), principalement présent dans le thé vert, ainsi que d'autres catéchines.
- **Anthocyanines** : Les anthocyanines, incluant la cyanidine, la delphinidine, la malvidine, la pélagonidine et la péonidine,
- **Chalcones** : Ce groupe, incluant la phloridzine, l'arbutine, la phlorétine et la chalconaringénine,
- **Isoflavonoïdes** : les roténoïdes.

### 7.4. Effets thérapeutiques des flavonoïdes

La chrysin et la rutine sont deux flavonoïdes qui présentent des propriétés thérapeutiques notables. Selon **Ciftci et al. (2012)**, la chrysin, administrée à une dose de 50 mg/kg, a réduit la croissance des cellules de mélanome B16F10 chez des souris BALB/c, démontrant ainsi un effet anticancéreux. De plus, dans une étude sur des rats diabétiques, des doses de chrysin de 20, 40 et 80 mg/kg par jour ont amélioré les profils lipidiques et antioxydants (**Naz et al., 2019**). En outre, une recherche concernant l'exposition à la fumée de cigarette a montré une

augmentation significative des cytokines inflammatoires et de l'expression de MPO dans les tissus pulmonaires des volontaires. Cependant, l'administration de chryisine à des doses de 10 et 20 mg/kg par jour a efficacement neutralisé ces effets, réduisant à la fois l'inflammation et la libération de cytokines (**Naz et al., 2019**). Quant à la rutine, parmi ses effets pharmacologiques, elle a réduit l'activité des cytokines pro-inflammatoires en diminuant la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  dans les microglies -qui présente les cellules macrophages au niveau du cerveau-. Un tel effet considéré utile dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, (**Wang et al., 2012**). L'activité antiasthmatique de la rutine a été étudiée chez des cobayes dans un modèle d'asthme expérimental via l'exposition l'ovalbumine en aérosol. La rutine a réduit les symptômes de l'asthme (**Jung et al., 2007**). Dans une étude menée par **Choquenot et al. (2008)**, la rutine, intégrée à des émulsions (eau+ huile), a démontré des valeurs de facteur de protection solaire (FPS) comparables à celles de l'homosalate. En association avec du dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), le FPS atteignait presque 30.

## **Chapitre 3**

**L'Asthme Allergique, la maladie d'Alzheimer,  
l'Hyperpigmentation et le Diabète mellitus :  
leur relation avec le stress oxydatif**

# **Chapitre 3 : L'Asthme Allergique, la maladie d'Alzheimer, l'Hyperpigmentation et le Diabète mellitus : leur relation avec le stress oxydatif**

## **1. L'asthme allergique**

### **1.1. Les concepts de base sur l'asthme allergique**

L'asthme est défini par trois caractéristiques principales : une obstruction réversible des voies aériennes se manifestant par un rétrécissement des bronches, une inflammation chronique des voies aériennes impliquant diverses cellules telles que les mastocytes, éosinophiles, lymphocytes T, macrophages, neutrophiles et cellules épithéliales, et une hyper-réactivité bronchique à différents stimuli (**Lambrecht et Hammad 2015**).

L'asthme peut être affecté par divers facteurs prédisposants liée à l'hôte et déclenchants liée à l'environnement. Cliniquement, l'asthme se manifeste par des symptômes tels que des sifflements respiratoires, une dyspnée, une constriction thoracique et une toux fréquente, surtout la nuit ou tôt le matin. Bien que ces symptômes soient généralement liés à une obstruction des flux d'air réversible, dans certains cas, la réversibilité peut être incomplète (**James et Mims 2015**).

L'hyper-réactivité bronchique dans l'asthme est en grande partie liée à l'inflammation des voies aériennes, résultant de l'action coordonnée de cellules inflammatoires (**James et Mims 2015**). La libération de cytokines et de chimiokines par ces cellules entraîne un rétrécissement des voies aériennes, une augmentation de la production de mucus, un œdème vasculaire et des lésions des voies aériennes, autant de caractéristiques typiques de la réponse asthmatique (**Fan Chung et Adcock 2000**). Ces processus inflammatoires peuvent même entraîner des changements structurels permanents ou un « remodelage » des voies aériennes.

### **1.2. Épidémiologie de l'asthme : une vue d'ensemble**

L'asthme est désormais reconnu comme l'une des conditions chroniques les plus importantes dans le monde, entraînant une morbidité considérable et dans certains cas la mortalité, imposant un fardeau élevé sur les services de santé et les économies à l'échelle mondiale (**Simpson et Sheikh 2014**). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cette pathologie représente un défi significatif, affectant environ 262 millions de personnes à travers le monde en 2019. Plus alarmant encore, cette maladie a été à l'origine de 461 000 décès à l'échelle mondiale au cours de la même année (**Global Burden of Disease Study 2019, 2020**). Il est prévu que le nombre de personnes atteigne les 400 millions d'ici 2025 (**Nunes et al., 2017**).

Les pays en développement sont particulièrement touchés, pour des raisons à la fois économiques. En effet, plus de 80 % des décès liés à l'asthme surviennent dans ces régions, avec une prévalence d'environ 8 % dans la région de la Méditerranée orientale, selon le rapport mondial sur l'asthme de 2014 (**Global Asthma Network, 2014**).

D'après **Bouayad et al. (1998)** en Algérie, la prévalence de l'asthme est estimée entre 4 et 6 % chez les adultes, et s'élève à 8 à 10 % parmi les enfants, reflétant une part significative de la population. Une étude ultérieure réalisée par **Nafti et al., (2009)**, a révélé un taux de prévalence global de l'asthme de 3,45 % dans la population algérienne, soulignant l'impact majeur de cette condition chronique qui entraîne le décès d'environ 1000 personnes chaque année.

### **1.3. Mécanismes pathophysiologiques de l'inflammation bronchique**

#### **1.3.1. Activation du système immunitaire dans l'asthme**

L'asthme se distingue essentiellement par une réaction inflammatoire persistante au niveau des voies respiratoires, impliquant de manière significative le système immunitaire (**Lambrecht et Hammad 2015**). L'activation du système immunitaire dans l'asthme commence généralement par la reconnaissance d'allergènes spécifiques par les cellules immunitaires. Ces allergènes sont souvent des substances environnementales comme le pollen, les acariens, les moisissures ou les squames d'animaux (**Létuvé et Taillé 2013**). Lorsqu'un individu sensibilisé inhale un allergène, les cellules dendritiques des voies aériennes capturent cet allergène et migrent vers les ganglions lymphatiques régionaux, où elles présentent des fragments de l'allergène aux lymphocytes T naïfs (**Lambrecht et Hammad 2010**). Cela conduit à la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T helper de type 2 (Th2). Les lymphocytes Th2 sécrètent un ensemble de cytokines, notamment l'interleukine-4 (IL-4), l'interleukine-5 (IL-5), et l'interleukine-13 (IL-13), qui orchestrent la réponse immunitaire allergique (**Larche et al., 2003**). L'IL-4 et l'IL-13 sont particulièrement importants pour la commutation de classe des immunoglobulines, encourageant les lymphocytes B à produire des immunoglobulines E (IgE). Les IgE circulantes se fixent ensuite aux récepteurs FcεRI, situés sur la surface des mastocytes et des basophiles, préparant le système immunitaire à une réponse rapide lors de futures expositions à l'allergène (**Larche et al., 2003 ; Evrard, 2020**). Ainsi, l'asthme est une maladie multifactorielle où l'activation immunitaire initiale et les réponses inflammatoires persistantes jouent un rôle clé dans le développement et l'aggravation des symptômes. Les thérapies actuelles ciblent principalement ces voies immunitaires et inflammatoires pour réduire l'inflammation des voies respiratoires et améliorer le contrôle des symptômes.

### 1.3.2. Rôle des cellules immunitaires et inflammatoires

Les cellules immunitaires et inflammatoires, notamment les mastocytes, les éosinophiles, les lymphocytes T et les cellules dendritiques, jouent des rôles majeurs dans l'entretien et l'amplification de l'inflammation asthmatique (Evrard, 2020). Les mastocytes, activés par la liaison de l'allergène aux IgE, libèrent une variété de médiateurs chimiques, tels que l'histamine, les leucotriènes et les prostaglandines, qui contribuent à la bronchoconstriction, à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à l'attraction d'autres cellules inflammatoires (Létuvé et Taillé, 2013).

Les éosinophiles, recrutés dans les voies aériennes par l'action de l'IL-5 et d'autres chimiokines, libèrent des protéines cytotoxiques, des cytokines et des médiateurs lipidiques, aggravant l'inflammation et causant des dommages tissulaires (Fig. 13). Les lymphocytes T, en particulier les sous-types Th2 et Th17, contribuent à l'inflammation en sécrétant des cytokines qui favorisent l'infiltration et l'activation des cellules inflammatoires, ainsi que le remodelage des voies aériennes (Létuvé et Taillé 2013).

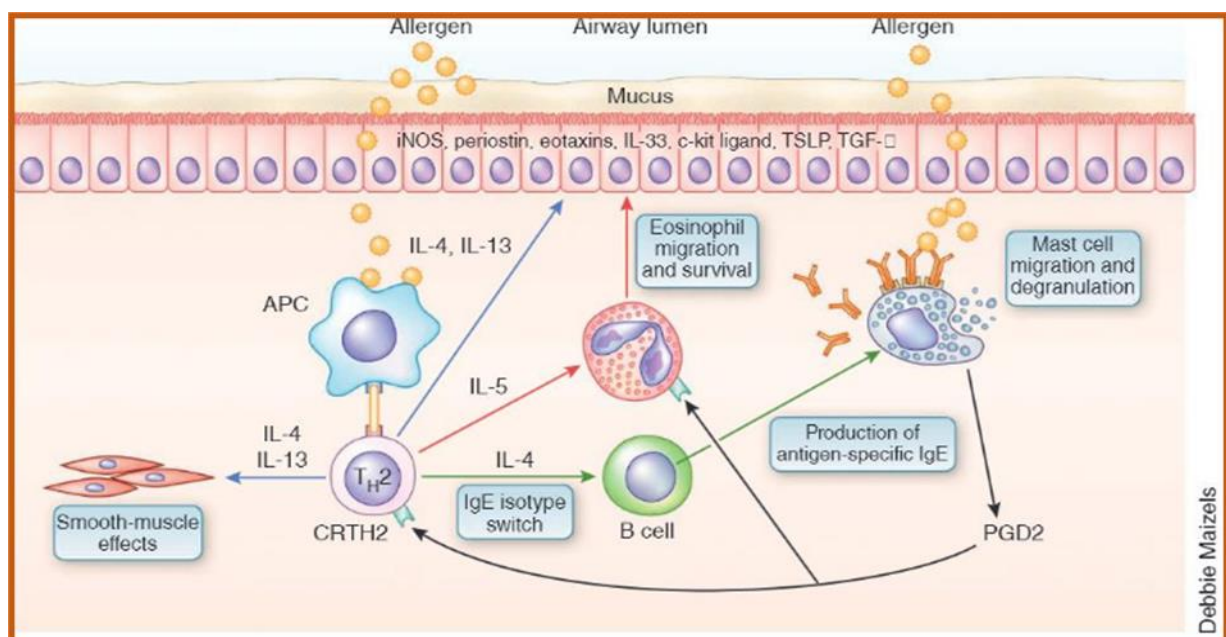


Figure 13: Réponse immunitaire de type Th2 dans les voies aériennes

### 1.4. Mécanismes de la réaction asthmatique

Le processus allergique lié à l'asthme, qui concerne 75 à 80% des cas selon Madore et al. (2010), implique principalement une hypersensibilité de type I, médiée par les IgE. Ce mécanisme immunologique se déroule en deux phases distinctes, identifiées par Evrard, (2020).

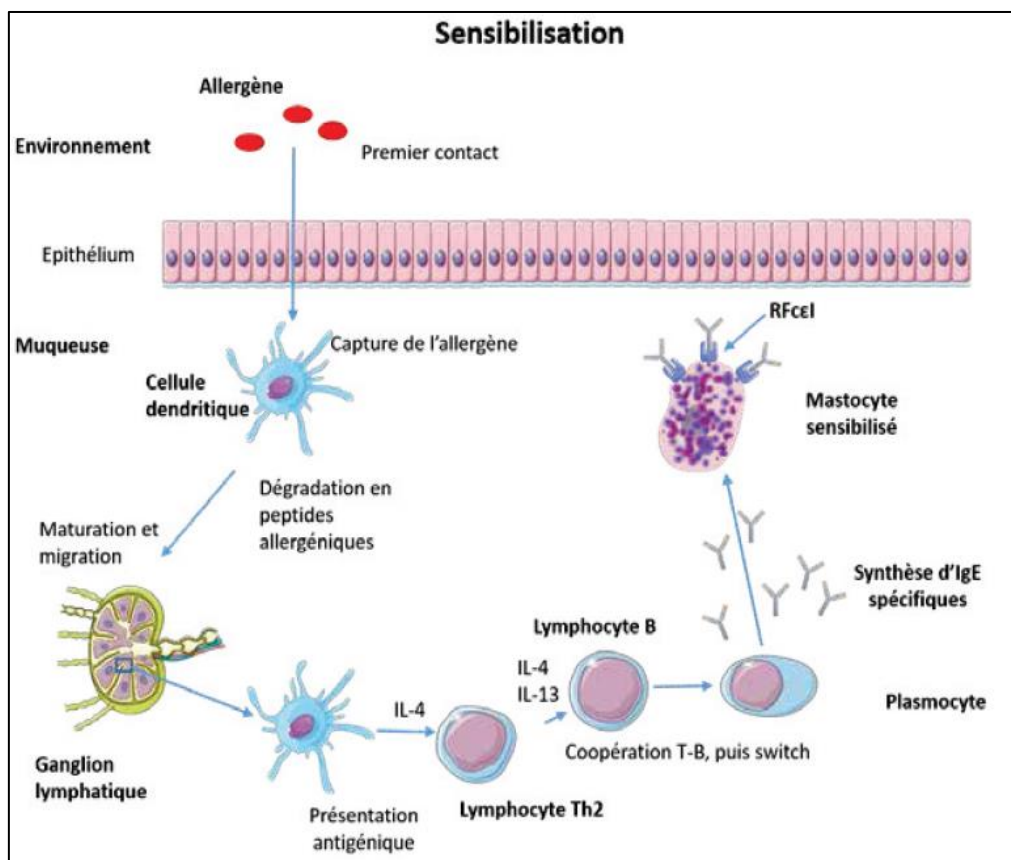
### 1.4.1. Phase de sensibilisation (asymptomatique)

#### Pénétration de l'allergène

Lors du premier contact, l'allergène, une fois entré dans l'organisme, peut directement interagir avec les cellules immunitaires situées dans les tissus des voies respiratoires (**Fig. 14**). La surface des voies aériennes est bordée d'une couche de mucus qui piège les particules étrangères et de cils qui aident à les déplacer vers l'extérieur du corps. Cependant, malgré ces défenses, les allergènes peuvent pénétrer cette première barrière et s'installer dans les tissus périphériques où ils seront ensuite capturés par les cellules immunitaires (**Madore et al., 2010**).

#### Capture et présentation par les cellules dendritiques

Les allergènes, une fois infiltrés, sont capturés par les cellules dendritiques dans les tissus périphériques, puis migrent vers les ganglions lymphatiques où elles présentent des fragments de l'allergène aux lymphocytes T CD4 naïfs (**Sicherer et Sampson 2018**). Cette interaction déclenche la différenciation des lymphocytes T en cellules Th2, qui sécrètent des cytokines telles que l'IL-4 (**Lambrecht et Hammad 2015**). L'IL-4 favorise la transformation des lymphocytes B en plasmocytes, qui produisent des IgE spécifiques à l'allergène, initiant ainsi la réponse allergique (**Madore et al., 2010**).



**Figure 14:** Mécanismes immunologiques de la phase de sensibilisation de l'allergie IgE-dépendante (**Evrard, 2020**)

### 1.4.2. Phase de déclenchement (symptomatique)

Lorsqu'un individu sensibilisé est à nouveau exposé à un allergène, deux phases se déclenchent : la phase immédiate et la phase tardive (Madore et al., 2010).

#### Phase immédiate

La réaction allergique se déclenche quelques minutes après la réexposition à l'allergène (Fig. 15), mettant en jeu les mastocytes et les polynucléaires basophiles (PNB) pré-sensibilisés. Ces cellules, grâce aux IgE spécifiques à l'allergène sur leur surface, reconnaissent rapidement l'allergène (Gould, 2008). Leur activation résulte du pontage de deux IgE par un allergène multivalent, déclenchant ainsi leur dégranulation et la libération d'histamine (Church et al. 2017). Cela entraîne rapidement des symptômes comme la bronchoconstriction, la vasodilatation et l'œdème. Environ une heure après, la production de médiateurs néosynthétisés tels que les leucotriènes et les prostaglandines intensifie et prolonge ces effets allergiques (Sirois, 2019).

#### Phase tardive

Commence entre 6 et 12 heures après l'exposition à l'allergène (Fig.15). Cette étape est caractérisée par une infiltration des cellules inflammatoires, en particulier des polynucléaires éosinophiles (PNEo), dans les tissus affectés. Les PNEo sont principalement attirés par l'interleukine 5 (IL-5) et sont activés par les complexes immuns formés entre les IgE et l'allergène, via le récepteur RFcεII (Stone et al., 2010). Une fois activés, les PNEo dégranulent, libérant des médiateurs pro-inflammatoires qui causent des lésions tissulaires et exacerbant l'inflammation (Patelis et al., 2016).

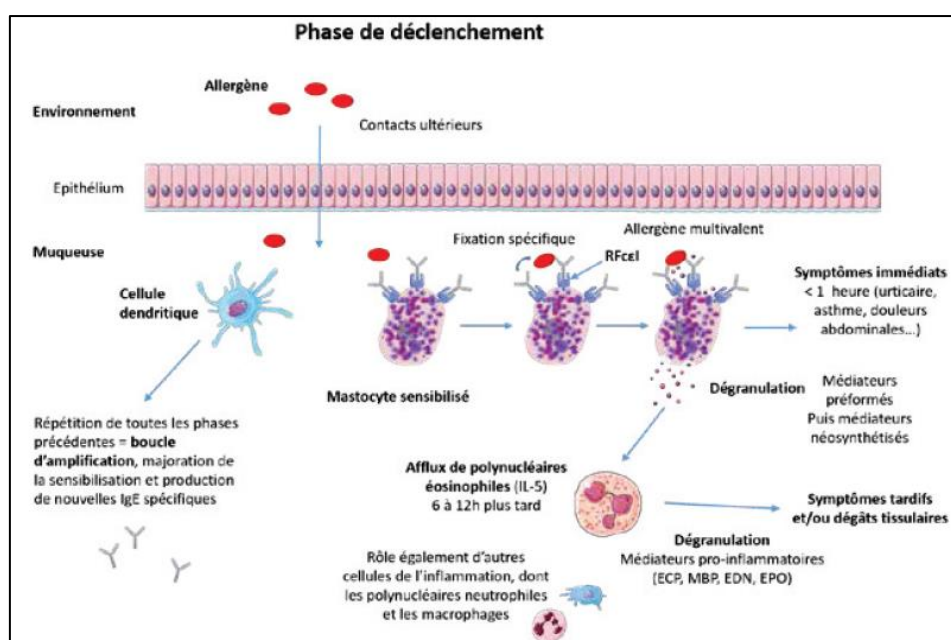


Figure 15 : Mécanismes immunologiques de la phase de déclenchement (Evrard, 2020)

## **1.5. Physiopathologie de l'asthme**

### **1.5.1. Inflammation des voies aériennes**

C'est le processus central dans l'asthme, entraînant une hyperactivité des voies aériennes et une limitation du flux d'air. Elle est causée par une réponse immunitaire exacerbée menant à l'infiltration des voies aériennes par des cellules inflammatoires telles que les lymphocytes T, les éosinophiles et les mastocytes. Ces cellules libèrent des médiateurs inflammatoires, tels que les cytokines et les leucotriènes, qui contribuent à l'œdème de la muqueuse, à la production de mucus et à la bronchoconstriction (**Holgate, 2002**).

### **1.5.2. Obstruction et œdème des voies aériennes**

Dans l'asthme, l'obstruction des voies aériennes, quant à elle, est provoquée par une combinaison de bronchoconstriction, d'œdème de la paroi des voies aériennes et de production excessive de mucus. Le rétrécissement des voies aériennes, principal événement physiologique, perturbe fortement le flux d'air en réponse à divers *stimuli*, notamment les allergènes qui activent un mécanisme dépendant des IgE. Cette activation entraîne la libération de médiateurs tels que l'histamine et les leucotriènes par les cellules mastocytaires, causant une contraction des muscles lisses (**Busse et Lemanske 2001**). De plus, les Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) peuvent induire une bronchoconstriction non-médiée par les IgE (**Stevenson et Szczeklik 2006**). Le degré de réponse des voies aériennes est également influencé par l'inflammation des voies respiratoires et possiblement par le stress, bien que les mécanismes exacts de ce dernier restent à définir. De plus, l'œdème des voies aériennes, exacerbé par une inflammation chronique, réduit significativement le diamètre des voies respiratoires, aggravant l'obstruction et la sécrétion de mucus et la formation de bouchons de mucus obstruant les conduits aériens.

### **1.5.3. L'Hyper-réactivité bronchique**

L'hyper-réactivité (HBR), résultant d'une réaction bronchoconstrictive amplifiée, représente un trait distinctif majeur de l'asthme, bien qu'elle ne lui soit pas exclusivement réservée. En effet, elle est également présente dans plus de 50% des cas de rhinite chronique et dans certaines formes de bronchite chronique. Les origines de l'hyper-réactivité sont multiples, incluant l'inflammation, la dysrégulation neurologique, et les changements structurels au sein des voies aériennes (**Sicherer et Sampson 2018**). Principalement, l'inflammation est reconnue comme

un déterminant significatif du niveau de l'hyper-réactivité soulignant l'importance de la prise en charge globale des troubles respiratoires en ciblant spécifiquement l'inflammation pour améliorer la fonction respiratoire et le contrôle des symptômes (Bernstein et Levy, 2014).

#### 1.5.4. Remodelage des voies aériennes

L'inflammation chronique liée à l'asthme, peut causer des altérations structurelles permanentes dans les voies aériennes, menant à l'épaississement des parois, l'augmentation de la masse musculaire lisse, et la fibrose, réduisant ainsi la fonction pulmonaire et aggravant l'asthme (Tillie-Leblond et al., 2004) (Fig. 16). Dans l'asthme sévère, ce processus, nommé "remodelage bronchique", inclut des lésions épithéliales, une infiltration cellulaire, et une hyperplasie des glandes à mucus, contribuant à l'obstruction des voies aériennes et potentiellement irréversible sans traitement appropriée de la maladie (Létuvé et Taillé, 2013).

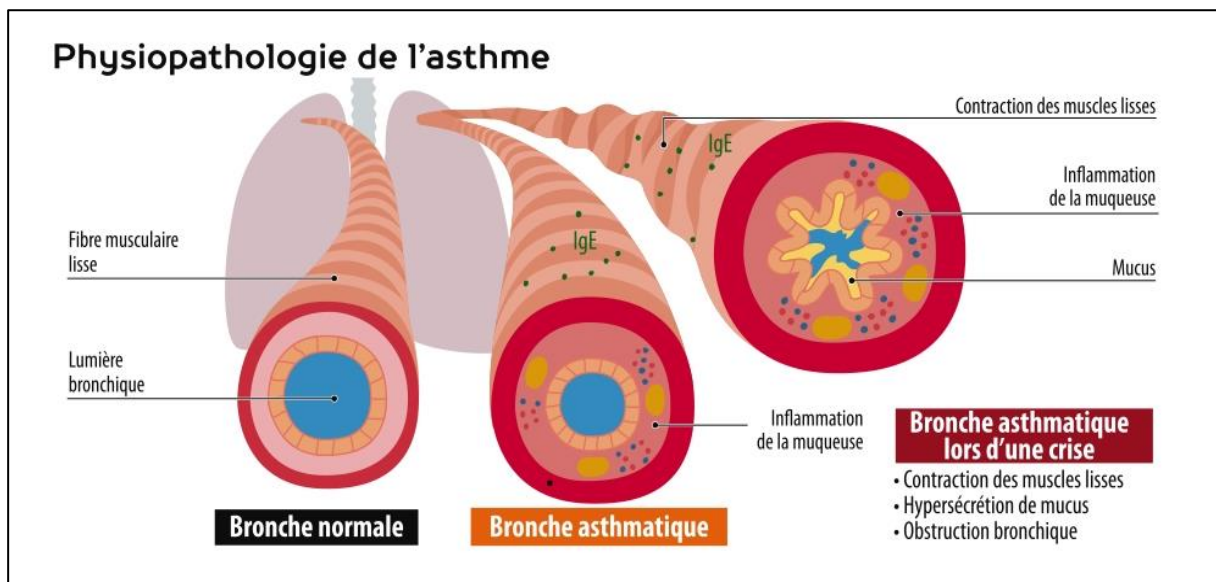


Figure 16: Physiopathologie de l'asthme (Anne-Charlotte Navarro, 2017)

#### 1.6. Asthme allergique et stress oxydatif

L'asthme, caractérisé par une inflammation chronique et une hyperréactivité des voies aériennes, est significativement influencé par une augmentation des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, principalement produites par les cellules immunitaires telles que les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles (Comhair et al., 2009). L'activation de ces cellules entraîne une libération accrue d'EROs, contribuant directement à la détérioration de la fonction pulmonaire (Sahiner et al., 2011). Cela se manifeste par une augmentation de l'hyperréactivité bronchique, une production exacerbée de mucus, et la libération de divers médiateurs chimiques pro-inflammatoires (Barnes, 1990). Le mécanisme sous-jacent à l'implication des cellules immunitaires dans l'asthme révèle la production de l'anion superoxyde

(O<sup>2-</sup>) et de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par des complexes enzymatiques comme la NADP oxydase, la xanthine oxydase et au travers des processus de respiration des mitochondries. L'anion superoxyde, un type d'EROs, se transforme naturellement ou enzymatiquement en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Sahiner et al., 2011**). Ces composés participent à la création de radicaux libres hautement cytotoxiques, tels que le radical hydroxyle (•OH). Par l'action de leurs peroxydases, les cellules immunitaires catalysent l'interaction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le chlorure (Cl<sup>-</sup>), formant ainsi de l'acide hypochloreux (HOCl). De même, l'O<sup>2-</sup> peut réagir avec le NO pour former le peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>), un ERO particulièrement puissant, ce qui contribue à exacerber l'inflammation et la sensibilité des voies respiratoires (**Dworski et al., 2000 ; Sahiner et al., 2011**). Parallèlement, le stress oxydatif affecte négativement la fonction bêta-adrénergique pulmonaire, augmentant la sensibilité des muscles lisses des voies aériennes et favorisant ainsi des épisodes d'hyperréactivité et de bronchospasme (**Dworski et al., 2000**). L'impact du stress oxydatif dans l'asthme est également mis en évidence par la diminution des capacités antioxydantes dans les voies aériennes des patients asthmatiques. Des études montrent que les niveaux d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase (GPx), la superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT) ainsi que des composants non enzymatiques tels que le glutathion réduit (GSH), sont significativement réduits. Cette réduction de la défense antioxydante rend les voies aériennes plus vulnérables aux dommages oxydatifs, aggravant ainsi les symptômes de l'asthme (**Zemmouri et al., 2017; Khaldi et al., 2018; Rouibah et al., 2019**). Dans ce contexte, une approche thérapeutique ciblée sur la réduction du stress oxydatif et le renforcement des défenses antioxydantes des voies aériennes, en parallèle avec le contrôle de l'inflammation et de l'hyperréactivité bronchique, pourrait offrir une stratégie prometteuse dans la gestion de l'asthme. La compréhension approfondie des interactions entre les cellules immunitaires et le stress oxydatif dans l'asthme.

### **1.6.1. Traitement actuel de la maladie d'asthme**

De nombreuses entreprises pharmaceutiques recherchent de nouveaux traitements pour l'asthme. Les thérapies actuelles, incluant les bronchodilatateurs, ne traitent pas les processus inflammatoires sous-jacents de l'asthme et requièrent souvent l'usage de corticostéroïdes (**Ramshaw et al., 2001**). Bien que les corticostéroïdes soient efficaces pour réduire l'inflammation en agissant sur les gènes pro-inflammatoires, leur utilisation à long terme est limitée en raison des effets secondaires, particulièrement chez les enfants. Ainsi, la recherche continue pour trouver des traitements plus sûrs et efficaces (**Ramshaw et al., 2001**).

### 1.6.2. Polyphénols et sesquiterpènes en tant qu'antiasthmatiques et anti-inflammatoires

Les polyphénols, incluant les flavonoïdes, modulent efficacement le système immunitaire en réduisant l'activation du complément et en diminuant la réponse inflammatoire. À faibles doses, ils peuvent stimuler l'immunité, particulièrement chez les personnes immunodéprimées (**Karnouf, 2009**). Leur rôle dans le contrôle de l'asthme inclut la captation des radicaux libres et l'inhibition de la libération d'histamine, ce qui aide à prévenir les symptômes asthmatiques (**Ghedira, 2005**). L'alpha-humulène, un sesquiterpène, se distingue par ses effets anti-inflammatoires, réduisant le recrutement des éosinophiles et la production de cytokines inflammatoires dans les modèles d'inflammation allergique des voies respiratoires (**Rogério et al., 2009**). Le cadinène, un autre sesquiterpène, est étudié pour ses propriétés anti-inflammatoires potentielles (**Egas et al., 2015**), suggérant un rôle possible dans la réduction de l'inflammation associée à diverses conditions, y compris l'asthme. Ensemble, ces composés naturels offrent un potentiel thérapeutique significatif pour lutter contre l'asthme et les réponses inflammatoires, soutenant l'utilisation de traitements plus naturels et ciblés pour ces affections.

## 2. La maladie d'Alzheimer

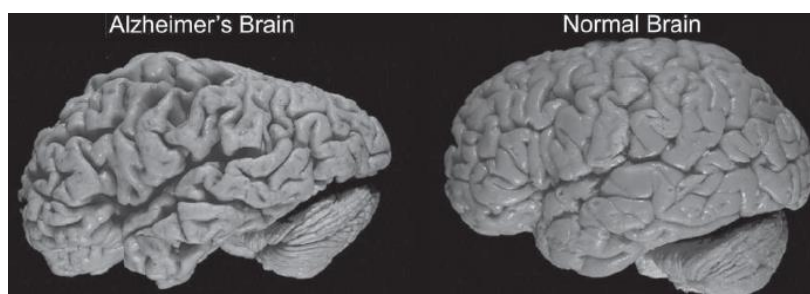
### 2.1. Définition et pathologie

La maladie d'Alzheimer (MA) est un trouble neurodégénératif progressif, représentant la forme la plus répandue de démence, principalement observée chez les personnes âgées. Elle se caractérise par la dégradation progressive des fonctions cognitives, entraînant une perte de mémoire, des troubles du langage, une désorientation, ainsi que des changements de personnalité et de comportement (**Yiannopoulou et Papageorgiou 2013**). Actuellement, plus de 50 millions de personnes souffrent de démence dans le monde, un chiffre qui devrait doubler tous les vingt ans, atteignant 150 millions d'ici 2050 (**Martins et al., 2019**). Identifiée pour la première fois en 1906, la MA n'a été reconnue que sept décennies plus tard comme une cause courante de démence et un important facteur de mortalité, devenant dès lors un sujet majeur de recherche (**Waldemar et al., 2017**). Pathologiquement, la MA se caractérise par une perte neuronale et synaptique dans le cortex cérébral, particulièrement dans les lobes temporaux et pariétaux, ainsi que dans certaines régions du cortex frontal et de l'hippocampe. Cette dégénérescence est accompagnée d'une atrophie cérébrale, de la formation de dégénérescences neurofibrillaires (NFT) intracellulaires et de dépôts amyloïdes extracellulaires, connus sous le nom de plaques. Ces dernières sont principalement constituées d'agrégats du peptide amyloïde-bêta ( $A\beta$ ), les oligomères solubles de  $A\beta$  étant considérés comme toxiques. Les NFT, constitués

de protéine tau hyperphosphorylée, ne sont pas exclusifs à la MA, puisqu'ils se retrouvent dans d'autres pathologies neurodégénératives (Waldemar et al., 2017). Avec le temps, la MA mène à des dommages et à la perte de neurones dans différentes parties du cerveau, affectant non-seulement les fonctions cognitives mais aussi les capacités motrices de base, comme la marche et la déglutition, conduisant finalement à une dépendance totale et à une issue fatale. La compréhension et l'intervention dans la progression de la MA sont impératives, étant donné l'impact profond de la maladie sur les patients, les familles et les systèmes de santé à travers le monde (Cassidy et al., 2020). Les signes pathologiques de la maladie d'Alzheimer comprennent l'accumulation de plaques d'amyloïde-bêta ( $A\beta$ ) et de dégénérescences neurofibrillaires de tau dans le cerveau, entraînant une perte neuronale et une atrophie cérébrale (Martins et al., 2019).

## 2.2. Mécanisme moléculaire dans le cerveau en état normal

Dans le cadre normal du fonctionnement cérébral (Fig. 17), la séquence de traitement de la Protéine Précurseur d'Amyloïde (APP) par l' $\alpha$ -secrétase et la  $\gamma$ -secrétase, appelée voie non-amyloïdogène, est fondamentale. Initialement, l'APP est clivée par l' $\alpha$ -secrétase, engendrant la Protéines Précurseurs Amyloïdes Solubles Alpha (sAPP $\alpha$ ), une protéine soluble qui favorise la plasticité et le développement neuronal (Turner et al., 2003). Ce processus se poursuit avec le clivage de sAPP $\alpha$  par la  $\gamma$ -secrétase, générant l'AICD (Domaine Intracellulaire C-terminal de la Protéine Précurseur de l'Amyloïde), indispensable pour la régulation de la transcription neuronale et la translocation (Sastre et al., 2001). La capacité des récepteurs neuronaux à s'ouvrir aux ligands permet une transmission efficace des impulsions nerveuses, un aspect essentiel de l'état normal du cerveau. La maintenance de l'homéostasie de la transmission synaptique est assurée par le transport du glucose et des ions tels que  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$  à travers les transporteurs et récepteurs spécifiques, notamment les récepteurs NMDA et AMPA. Enfin, la neurotransmission entre les neurones est facilitée par l'interaction de l'acétylcholine avec les récepteurs nicotiques et muscariniques (nAChRs et mAChRs), mettant en lumière le rôle vital de ces molécules complexes dans le maintien des fonctions cérébrales normales (Siddappaji et Gopal, 2021).



**Figure 17:** Comparaison macroscopique entre un cerveau normal et celui d'un patient MA. Un cerveau normal (à droite) comparé à un cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer (à gauche). Notez les changements de taille et la rétraction dus à la perte de cellules cérébrales dans le cerveau atteint d'Alzheimer (Verma et Chen 2016).

### **2.3. Mécanisme moléculaire dans le cerveau en cas de maladie d'Alzheimer**

La pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer est caractérisée par deux processus principaux. Le premier concerne l'accumulation de plaques amyloïdes, débutant par un dysfonctionnement dans le traitement de la protéine précurseur amyloïde (APP) où la  $\beta$ -secrétase (BACE-1) produit des fragments de sAPP $\beta$ . Ces fragments sont ensuite convertis en peptides A $\beta$ , notamment A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42, qui s'agglomèrent pour former des oligomères, protofibrilles et finalement des plaques séniles perturbant les fonctions neuronales (**Bloom et al., 2014 ; Siddappaji et Gopal, 2021**). Le second processus est l'hyperphosphorylation de la protéine tau, qui normalement stabilise les microtubules (**Dimitrov et al., 2013 ; Bloom et al., 2014**). Dans l'Alzheimer, Tau devient hyperphosphorylée et se détache des microtubules, déstabilisant ainsi les neurones et contribuant à leur mort. Ces tau hyperphosphorylées s'agrègent en dégénérescences neurofibrillaires (NFTs), aggravant l'atrophie cérébrale et le déclin cognitif. Ces deux processus sont accompagnés d'un dommage oxydatif significatif, marquant les étapes clés de la progression de l'Alzheimer (**Waldemar et al. 2017**).

### **2.4. Rôle du Stress Oxydatif dans la Pathogenèse et la Progression de la Maladie d'Alzheimer**

Le cerveau, avec son activité métabolique élevée et sa capacité limitée à la régénération cellulaire, est extrêmement vulnérable aux dommages oxydatifs, particulièrement dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (**Verma et Chen 2016**). Dans la MA, les mécanismes de défense antioxydants sont souvent insuffisants face à l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui conduit à une réduction de l'activité des enzymes antioxydantes et des niveaux d'antioxydants, exacerbant la production de ROS (**Cassidy et al., 2020**). Cette surproduction de ROS est amplifiée par des dysfonctionnements mitochondriaux et la perturbation de l'homéostasie des ions métalliques, qui favorisent l'agrégation de l'amyloïde-bêta et de la protéine tau phosphorylée, accélérant ainsi la neurodégénérescence et la progression de la maladie. Les dommages oxydatifs affectent également les macromolécules comme les lipides, l'ADN et les protéines, contribuant à l'inflammation, à l'altération de la fonction cellulaire, et à l'agrégation pathologique des protéines, qui ensemble jouent un rôle clé dans les processus pathologiques observés dans la MA (**Luca et al., 2015**).

### **2.5. Traitement actuel de la maladie d'Alzheimer**

Actuellement, les options thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer (MA) incluent des médicaments qui ciblent principalement les symptômes de légère à modérée intensité, tels que les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (donépézil, rivastigmine, galantamine) et les

antagonistes des récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) comme la mémantine (**Yiannopoulou et Papageorgiou 2013; Martins, et al. 2019**). Ces médicaments visent à restaurer les voies cholinergiques et à réduire la neurotoxicité du glutamate, respectivement. Cependant, ils n'offrent qu'une efficacité limitée et sont souvent accompagnés d'effets secondaires comme les nausées et la bradycardie. En outre, certains patients peuvent ne montrer aucune amélioration suite au traitement (**Lleo et al., 2006**). Parallèlement, des anticorps monoclonaux tels que le bapineuzumab, le solanezumab, le gantenerumab et le crenezumab sont en cours d'exploration pour leur capacité à prévenir les dépôts amyloïdes, une caractéristique pathologique de la MA (**Peng et al., 2023**). Malgré le potentiel des thérapies combinées et l'intérêt pour les nouvelles cibles thérapeutiques, les régimes actuels ne permettent pas encore un traitement complet de la MA, soulignant la nécessité d'une recherche continue pour développer des options thérapeutiques plus efficaces et mieux tolérées.

## **2.6. Médicaments et thérapeutiques dérivés naturellement**

Actuellement, les herbes sont parmi les médicaments les plus efficaces utilisés pour traiter et atténuer la progression de nombreuses maladies telles que le diabète, le cancer et les maladies neurologiques comme la MA. Récemment, les produits naturels sont devenus très populaires comme complément ou médecine alternative en raison de leur efficacité et de leurs moindres effets secondaires (**Noori et al., 2021**). De nombreuses études scientifiques ont rapporté des effets bénéfiques des produits naturels dans le traitement de la MA en utilisant des modèles animaux appropriés (Manoharan et al., 2016). Plusieurs agents naturels tels que les vitamines C, E, la lutéoline, la mélatonine, le curcumin, la quercétine, le resvératrol, l'huperzine A et l'acide rosmarinique ont été utilisés chez les patients atteints de MA et ont montré des résultats utiles (**Noori et al., 2021**).

### **2.6.1. Polyphénols en tant d'antioxydants dans la maladie d'Alzheimer**

Les composés phénoliques servent d'antioxydants, protégeant les tissus en neutralisant les oxydants endogènes ou en inhibant la production de ROS (**Uriarte-Pueyo et Calvo 2011**). Capables de traverser la barrière hémato-encéphalique, les polyphénols peuvent exercer des effets neuroprotecteurs *in vitro* (**Johnson et al., 2019**). Des polyphénols comme le resvératrol, la myricétine, la rutine et la quercétine ont montré des effets bénéfiques contre la MA en raison de leurs propriétés antioxydantes et anti-amyloïdogènes. Ces substances naturelles continuent d'être étudiées pour leur potentiel thérapeutique contre la MA (**Cassidy et al., 2020**). De plus, certains polyphénols semblent moduler les voies de signalisation liées à l'inflammation, un autre facteur clé dans la progression de la maladie d'Alzheimer.

### 2.6.2. Polyphénols en tant d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est l'enzyme clé qui termine l'impulsion nerveuse aux synapses cholinergiques par l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur présent dans l'espace synaptique, maintenant ainsi la transmission normale des impulsions nerveuses. (Mukherjee et al., 2007 ; Colovic et al., 2013). D'après l'hypothèse cholinergique de la maladie d'Alzheimer (MA), au début de la maladie, les systèmes cholinergiques du cerveau frontal sont touchés, entraînant une perte des neurones cholinergiques et par là de la synthèse de l'ACh. En conséquence, la mémoire du patient se dégrade et les fonctions cognitives et non-cognitives sont altérées (Yiannopoulou et Papageorgiou 2013).

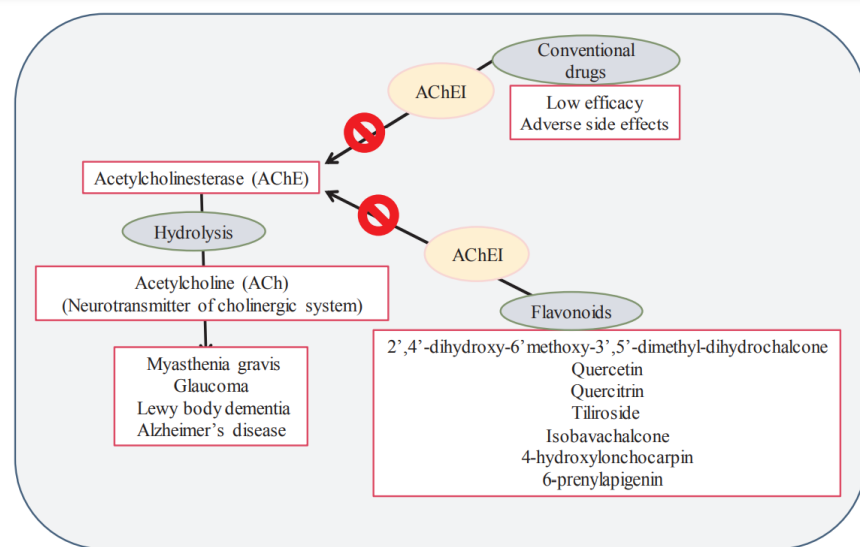
Par conséquent, restaurer les niveaux d'acétylcholine en inhibant l'AChE est devenu le traitement principal pour les déficits cognitifs de la MA (Fig.18). En bloquant l'enzyme AChE, la décomposition de l'acétylcholine est empêchée, prolongeant ainsi sa fonction dans les synapses (Trinh et al., 2003). L'inhibition de l'AChE est bénéfique non-seulement pour l'amélioration de la transmission cholinergique dans le cerveau, mais aussi pour réduire l'agrégation du  $\beta$ -amyloïde et la formation des fibrilles neurotoxiques dans la MA (Bartolini et al., 2003).

Jusqu'à présent, quelques inhibiteurs de l'AChE, tels que le donépézil, la rivastigmine et la galantamine, ont été approuvés pour traiter la MA. Ces inhibiteurs représentent actuellement les médicaments les plus couramment utilisés contre la MA, mais ils ne parviennent pas à empêcher l'évolution complète de la maladie et présentent d'importants effets secondaires (Xie et al., 2017).

Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont mis au point de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE), notamment des inhibiteurs multifonctionnels efficaces aussi contre la démence vasculaire. Parallèlement aux méthodes de synthèse chimique, l'intérêt pour les plantes comme sources de nouveaux agents thérapeutiques a augmenté (Kavirajan et Schneider 2007). Cette recherche a permis de découvrir plusieurs phytochimiques, tels que les alcaloïdes, les curcumines, les stilbènes et les flavonoïdes, qui inhibent efficacement l'AChE. Les flavonoïdes, en particulier, sont devenus un centre d'intérêt majeur en raison de leur puissante activité inhibitrice et de leur faible toxicité (Khan et al., 2018).

Un autre groupe de chercheurs a montré que deux flavonoïdes, la rutine et la quercétine, isolés de *Dimorphandra gardneriana*, révélaient un nouveau mécanisme d'action de l'activité leishmanicide aux stades promastigote et amastigote. Ces flavonoïdes inhibaient l'hydrolyse de l'acétylcholine (Lenta et al., 2007). Selon Sz wajgier et al. (2020), ainsi que dans de nombreux

travaux d'autres auteurs, les composés isolés tels que la rutine, la quercétine et le kaempférol se sont révélés être des inhibiteurs efficaces de l'AChE et de la BChE. De plus, d'autres études ont démontré l'activité anti-AChE de la quercétine *in vivo* dans le tissu cérébral de poissons zèbres dans des modèles de maladie d'Alzheimer (Mani et al., 2018 ; Rishitha et Muthuraman, 2018). En outre, Zhang et al. (2018) ont indiqué que la quercétine, la rutine et le kaempférol se lient au site actif de l'AChE humaine avec des interactions autour de certains résidus dans la poche active.



**Figure 18:** Fonction et inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase par les médicaments et les flavonoïdes (Khan et al., 2018)

### 3. Le Diabète sucré

#### 3.1. Définition

Le diabète sucré est un trouble métabolique résultant de l'incapacité à produire suffisamment d'insuline ou à y répondre de manière efficace. Cette déficience provoque des niveaux anormalement élevés de glucose dans le sang, entraînant de graves conséquences telles que des dommages aux nerfs et aux vaisseaux sanguins, des maladies cardiaques, des troubles rénaux (Adeghate et al., 2006). Le diabète de type 1, représentant 5-10 % des cas, implique une réponse auto-immune qui détruit les cellules bêta-productrices d'insuline dans le pancréas, menant à une carence en insuline. Cette forme se manifeste généralement chez les jeunes individus. À l'inverse, le diabète de type 2, qui constitue plus de 85 % de tous les cas de diabète, est principalement caractérisé par une résistance à l'insuline, où les cellules du corps ne répondent pas efficacement à l'insuline (Lee et al., 2014 ; Sekiou et al., 2018).

### **3.2. Le Diabète sucré et le Stress Oxydatif**

Le stress oxydatif dans le diabète sucré résulte principalement de l'oxydation du glucose qui provoque un déséquilibre entre les antioxydants et les pro-oxydants, augmentant la production d'espèces réactives de l'oxygène (**Dandu et Inamdar, 2007**). Les mécanismes non-enzymatiques ont un impact notable, où l'hyperglycémie provoque la réaction du glucose avec les protéines, ce qui conduit à la formation de produits de glycation avancée (AGE), qui augmentent la production de ROSs par le biais d'une signalisation cellulaire modifiée. Des sources enzymatiques comme la xanthine oxydase et la NAD(P)H oxydase jouent un rôle important dans la génération des ROS à travers des voies telles que la voie du polyol, qui convertit l'excès de glucose en sorbitol, augmentant les ROSs (**Davies, 1987 ; Valko et al., 2009**). Le stress oxydatif est aussi associé à la peroxydation lipidique, se manifestant par une élévation de pro-oxydants tels que la ferritine et résultant en une production accrue de composés comme les F2-isoprostanes (**Davies, 1987 ; Valko et al., 2009**). La chaîne respiratoire mitochondriale agit également comme une source de ROSs, particulièrement dans des conditions hyperglycémiques, où elle produit principalement du superoxyde, exacerbant le stress oxydatif et contribuant aux complications du diabète (**Kowluru et Chan, 2009**).

### **3.3. Médicaments et thérapeutiques dérivés naturellement**

#### **3.3.1. Antioxydants naturels**

Les carences en antioxydants les plus couramment observées chez les personnes diabétiques incluent des niveaux réduits d'ascorbate, de glutathion et de superoxyde dismutase (**Jialal et al., 2002**). Par conséquent, les plantes riches en composés antioxydants puissants jouent un rôle majeur dans la gestion des conditions affectées par le stress oxydatif, telles que le diabète sucré (DM). De nombreuses études ont examiné l'impact de ces végétaux et de leurs constituants antioxydants sur le diabète et ses complications associées, obtenant des résultats positifs. (**Sekiou et al., 2018**) ont démontré que l'extrait aqueux d'*Artemisia herba-alba* présente des effets bénéfiques sur le diabète grâce à ses propriétés hypoglycémiques et antioxydantes, augmentant les niveaux de GSH, SOD, CAT, GPx, et GST dans le foie et réduisant la peroxydation lipidique.

### 3.3.2. L'Alpha-Amylase et son rôle dans la cible thérapeutique antidiabétique

Les enzymes digestives, telles que l' $\alpha$ -amylase pancréatique et l' $\alpha$ -glucosidase, jouent un rôle clé dans la digestion des glucides, transformant les amidons complexes en glucose absorbable. Cependant, une activité excessive de ces enzymes peut provoquer une augmentation des niveaux de glucose dans le sang, menant à l'hyperglycémie (Whitcomb et Lowe, 2007). Dans ce contexte, l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase s'est révélée être une stratégie thérapeutique importante, en limitant la conversion des amidons en sucres et en contrôlant les niveaux de glucose postprandiaux. En tant que métalloenzyme dépendante du Calcium, l' $\alpha$ -amylase catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4 dans les amidons, les transformant en molécules de sucre plus petites, ce qui peut augmenter les niveaux de glucose sanguin après les repas. Cette conversion excessive, notamment en l'absence d'une action insulinique adéquate, conduit à l'hyperglycémie (Whitcomb et Lowe, 2007). Les médicaments tels que l'Acarbose<sup>®</sup>, le Miglitol<sup>®</sup> et la Voglibose<sup>®</sup> inhibent cette conversion en bloquant l'activité de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase, limitant ainsi l'absorption des glucides et aidant à réguler les niveaux de sucre dans le sang. En plus, la recherche s'intéresse aux extraits de plantes riches en polyphénols et les tannins, qui inhibent naturellement l' $\alpha$ -amylase, proposant ainsi une alternative moins vulnérable aux effets secondaires que les médicaments synthétiques (Alqahtani et al., 2019).

### 3.3.3. Les polyphénols inhibiteurs de l'Alpha-Amylase

Dans le traitement du diabète de type 2, les polyphénols sont étudiés pour leur capacité à ralentir l'absorption du glucose. Ces composés naturels, trouvés en abondance dans notre régime alimentaire, ciblent spécifiquement les enzymes digestives clés : la  $\alpha$ -amylase et la  $\alpha$ -glucosidase. Leur action consiste à ralentir la dégradation des glucides, réduisant ainsi les pics de glycémie après les repas, un problème courant chez les personnes diabétiques (Papoutsis et al., 2022 ; Naz et al., 2023). Les études suggèrent que certains polyphénols spécifiques, tels que l'acide férulique, l'héspéridine, la naringine, l'épicatéchine et la quercétine, ne se contentent pas simplement de s'associer avec les enzymes, mais modifient leur fonctionnement, empêchant ainsi efficacement la transformation des glucides en sucres simples. Cette interaction directe avec les sites actifs des enzymes peut potentiellement bloquer leur activité, contribuant à une meilleure régulation du sucre dans le sang (Rasouli et al., 2017).

## 4. L'hyperpigmentation

### 4.1. Définition et pathologie

L'hyperpigmentation représente une condition cutanée répandue résultant d'une production excessive de mélanine, conduisant à l'assombrissement de certaines zones de la peau. Ce phénomène est souvent perçu comme une source d'inquiétude esthétique majeure, particulièrement chez les femmes (Mirmortazavi et al., 2019).

La mélanine, pigment principal de la peau et des cheveux, est produite par les mélanocytes situés dans la couche basale de l'épiderme et vise principalement à protéger contre les effets nocifs des rayons UV (Kurpejović et al., 2021). Cependant, une surproduction de mélanine, due à des facteurs tels que les rayons UV, les inflammations cutanées, les frottements ou des déséquilibres hormonaux, peut entraîner diverses formes d'hyperpigmentation telles que le mélasma, les taches de vieillesse, les lentigines ou les éphélides (Souilah, 2021).

La production accrue de mélanine en réponse à l'exposition UV, en particulier, met en évidence les mécanismes déclencheurs de l'hyperpigmentation, notamment une multiplication des mélanocytes et une augmentation de l'activité des enzymes mélanogènes, telles que la tyrosinase.

### 4.2. Stress oxydatif et la pigmentation cutanée

Les facteurs environnementaux tels que les polluants, l'exposition quotidienne au soleil, la fumée et les xénobiotiques augmentent la production d'espèces réactives de l'oxygène dans le corps. Ces ROSs externes perturbent les défenses antioxydantes de la peau, entraînant un stress oxydatif dans l'épiderme. Ce stress oxydatif contribue au vieillissement de la peau induit par le soleil, à la carcinogenèse, à l'inflammation et à la prolifération cellulaire (Liyanarachchi et al., 2018). L'exposition aux UV provoque une interaction entre les UV et les chromophores cellulaires comme l'ADN et la mélanine. Cela entraîne un transfert d'énergie qui rend les électrons des chromophores instables. Les molécules peuvent se stabiliser en libérant de l'énergie, entraînant des modifications de l'ADN et d'autres structures cellulaires, ce qui cause des dommages oxydatifs et des altérations génétiques (Randhawa et al., 2015). Lorsque les photosensibilisateurs activés par les UV transfèrent leur énergie à l'oxygène moléculaire, cela produit de l'oxygène singulet, une forme réactive qui interagit principalement avec des molécules ayant des doubles liaisons électroniques, comme la tyrosine. Cette interaction déclenche des changements biologiques notables dans la cellule, affectant des processus comme la réponse au stress oxydatif et modulant diverses voies de signalisation cellulaire (Bertrand, 2017). En outre, les UVB et les UVA affectent différemment la peau : les UVB affectent

principalement l'épiderme et les kératinocytes, tandis que les UVA pénètrent plus profondément et sont associés à une augmentation de la production de mélanine et de l'activité de la tyrosinase, conduisant à une hyperpigmentation due à une augmentation du nombre de mélanocytes et à une intensification de l'oxydation de la L-tyrosine en L-dopa (**Randhawa et al., 2015**).

### **4.3. Approches thérapeutiques de l'hyperpigmentation**

#### **4.3.1. Polyphénols inhibiteurs de la Tyrosinase**

Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes tels que la quercétine, la lutéoline, la baicaléine et la chrysin, jouent un rôle clé dans la régulation de la santé cutanée en inhibant la tyrosinase, une enzyme essentielle du processus de mélanogenèse. Ces composés naturels protègent également contre le stress oxydatif, lié à plusieurs maladies de la peau comme le vitiligo et le psoriasis (**Souilah et al., 2021**).

Les extraits phénoliques de *Citrus sinensis* contiennent de l'hespéridine ( $242,3 \pm 1,54 \mu\text{g/g}$ ), du rutin ( $62,51 \pm 0,86 \mu\text{g/g}$ ) et de la quercétine ( $20,85 \pm 0,48 \mu\text{g/g}$ ). L'activité inhibitrice de la tyrosinase est de  $41,59 \pm 0,95 \%$ , comparée à  $75,27 \pm 0,56 \%$  pour l'acide kojique (**Tamfu et al., 2022**). Selon **Farasat et al. (2020)**, l'évaluation *in silico* de l'effet inhibiteur de la tyrosinase, à savoir la chrysin, le kaempférol, la naringine et la quercétine montre que la naringine est le plus efficace des quatre flavonoïdes testés, ce qui en fait un candidat idéal comme agent de blanchiment pour le traitement des troubles cutanés.

# **Matériel et Méthodes**

# Matériel et Méthodes

## 1. Objectifs de l'étude

Les objectifs principaux de cette recherche sont :

1. caractériser les principaux composants phytochimiques présents dans les extraits acétate d'éthyle et n-butanol, obtenus à partir des feuilles de la plante *Juniperus oxycedrus*.
2. mettre en évidence, à travers une exploration *in vitro*, les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, phytoprotectrices, anti-enzymatiques : anti-Alzheimer, anti-diabétique, anti-tyrosinase et anti-uréase et attribuées à la plante, à l'huile de cade ainsi qu'aux extraits concernés, comme il est illustré dans la (Fig. 19).
3. vérifier l'efficacité de l'huile de cade par le gavage d'une dose de 1 ml/Kg/jours, utilisant des rats Wistar préalablement sensibilisés à l'ovalbumine dans le cadre d'un modèle d'asthme expérimental. Le protocole utilisé est illustré dans la (Fig. 20).

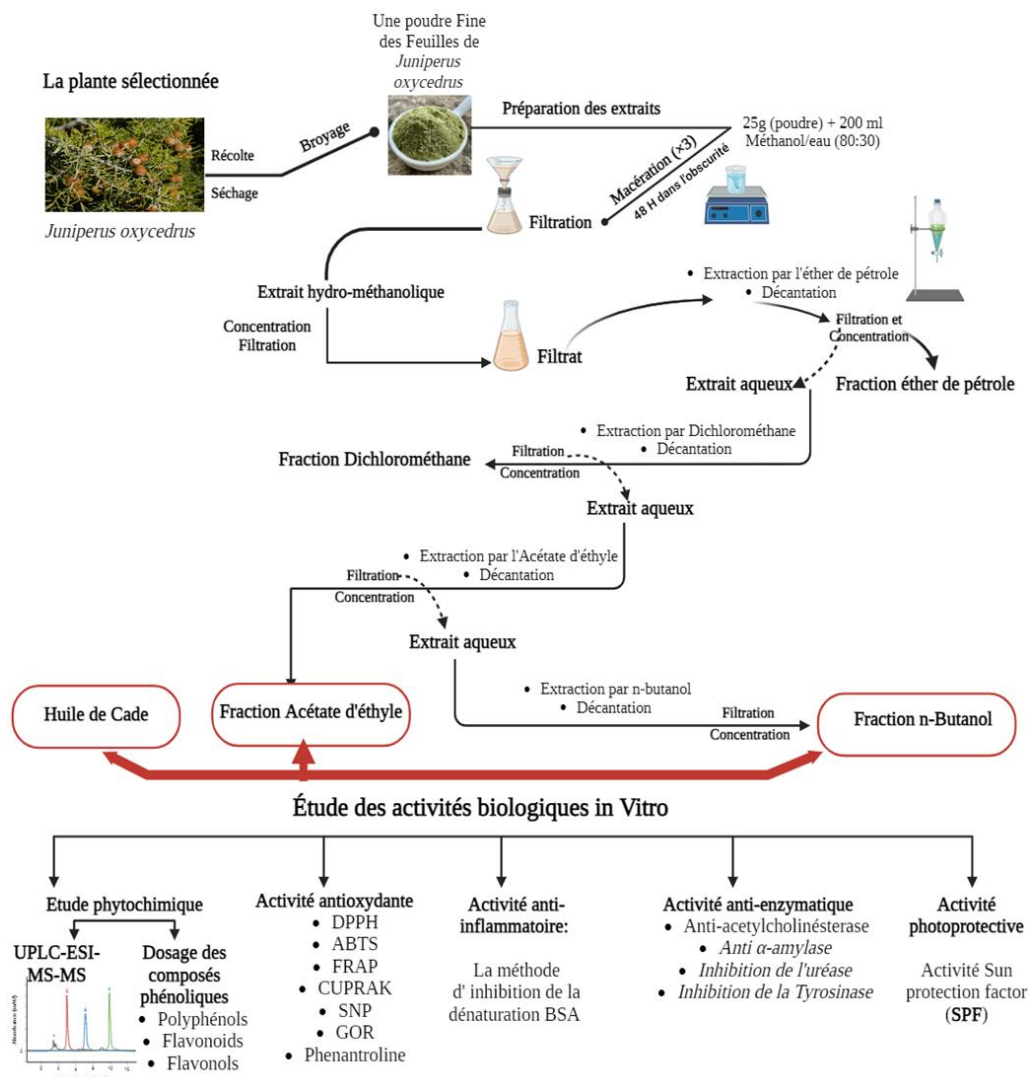


Figure 19: Schéma récapitulatif du protocole expérimental *in vitro*

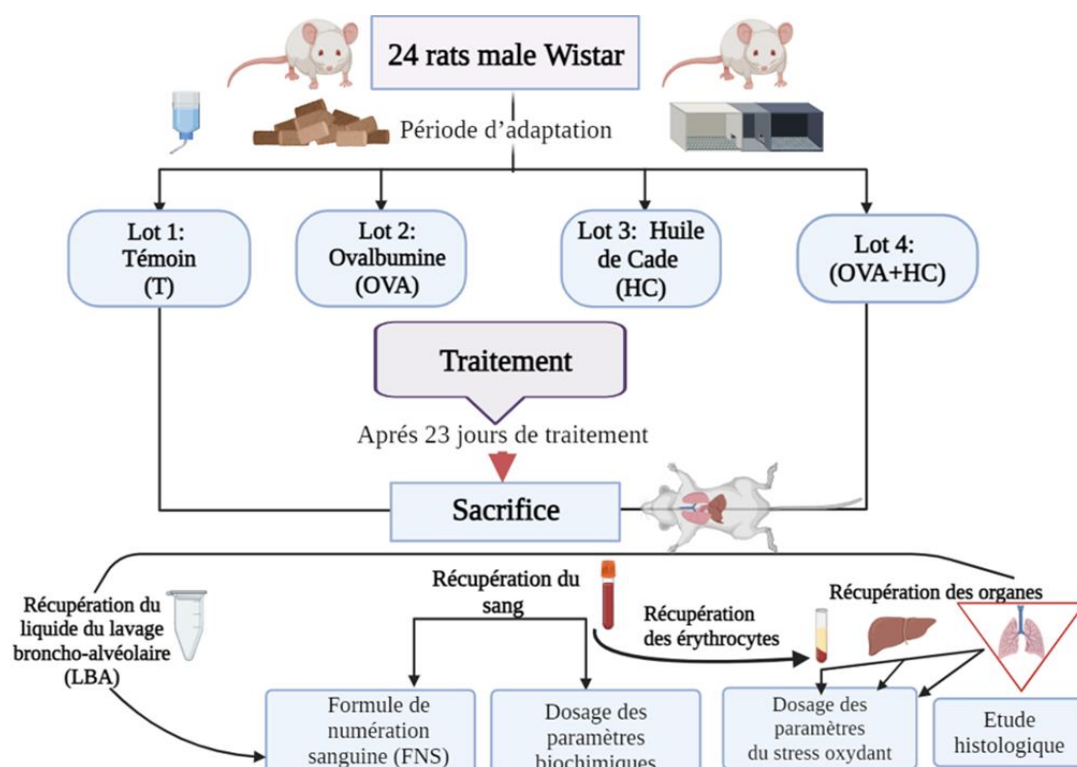


Figure 20: Schéma récapitulatif du protocole expérimental *in vivo*

## 2. Matériel végétal

Les parties aériennes de *Juniperus oxycedrus* L. ont été récoltées en mars 2019 à partir de la région d'Abdelaziz, située dans la province de Jijel (36°50'45.7"N 6°01'45.4"E, Algérie). Le professeur Zaafour Moncef, du Département de Biologie à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, Algérie, a procédé à l'identification botanique de la plante. Après récolte, les échantillons ont été séchés à l'air libre dans un lieu sombre. Les feuilles ont ensuite été détachées des tiges et broyées en poudre fine, puis stockées soigneusement dans un endroit sec pour l'extraction. Concernant l'huile de cade, sa production traditionnelle s'appuie sur une distillation directe à la vapeur des bois et des branches de *Juniperus oxycedrus*. Ces derniers sont collectés le long de la côte méditerranéenne orientale de l'Algérie et sont commercialisés par les herboristes locaux.

## 3. Extraction

Les parties aériennes séchées de *J. oxycedrus* (25g) ont été soumises à une macération répétée trois fois avec 200 mL d'une solution hydro-alcoolique (80% de méthanol, 20% d'eau distillée) à température ambiante. Cette opération a été réalisée dans l'obscurité, avec une agitation constante pendant les 48 heures. Les solutions obtenues ont ensuite été filtrées à travers un papier filtre Whatman n° 1, puis le solvant a été éliminé sous pression à l'aide d'un évaporateur

rotatif. Après filtration, la phase aqueuse restante a été extraite deux fois successivement pour chaque solvant de polarité croissante : 100 ml d'éther de pétrole ; 100 mL de dichlorométhane ; 100 mL d'acétate d'éthyle ; 100 mL de n-butanol. Ces solvants ont ensuite été éliminés à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 °C. Les fractions concentrées résultantes ont été conservées au sec à -20 °C dans des flacons en verre fumé jusqu'à leur analyse. Notre travail se concentre sur deux de ces fractions : l'acétate d'éthyle et le n-butanol. L'huile de cade a été diluée dans de l'éthanol absolu à un ratio de (1:10) selon la méthode décrite par **Abdellah et al. (2018)**.

## 4. Rendement

Le rendement de l'extraction est calculé en comparant la masse de l'extrait sec obtenu à la masse initiale de la matière sèche utilisée. Le rendement (R) peut être exprimé en pourcentage et est calculé selon la formule suivante :

$$R = \left( \frac{M_{\text{extrait}}}{M_{\text{init}}} \right) \times 100$$

où : R : rendement en pourcentage (%)  
M : masse de l'extrait sec (g)  
M<sub>init</sub> : masse initiale de la matière première sèche (g)

## 5. Quantification des polyphénols et flavonoïdes

Pour approfondir l'analyse, des quantifications des polyphénols et flavonoïdes contenus dans les extraits ont été réalisés. Le choix de se concentrer sur ces composés s'explique principalement par leur contribution majeure aux propriétés antioxydantes attribuées aux plantes.

### 5.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux des échantillons de *J. oxycedrus* a été évaluée selon la méthode de Folin-Ciocalteu, légèrement modifiée pour s'adapter à la méthode des microplaques, suivant la méthode initialement définie par **Singleton et Rossi (1965)**. L'absorbance a été enregistrée à 765 nm. Les résultats ont été exprimés en microgrammes d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (µg GAE/mg).

### 5.2. Dosage des flavonoïdes (TFC)

La teneur totale en flavonoïdes a été évaluée d'après la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium décrite par **Topçu et al. (2007)**. L'absorbance mesurée à 415 nm a permis d'exprimer les résultats en microgrammes d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait sec (µg QE/mg).

## 6. Analyse par Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à ionisation électro spray (LC/ESI-MS)

L'analyse des composants phytochimiques des fractions n-butanol et acétate d'éthyle de *Juniperus oxycedrus* a été réalisée au CRAPC - Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques, situé à Ouargla, en utilisant un système Shimadzu 8040 UPLC-ESI-MS/MS exploitant la technologie UFMS pour une sensibilité optimale. La séparation a été réalisée sur une colonne Ultra-force C18, avec une phase mobile A (eau + 0.1% acide formique) et une phase mobile B (méthanol), suivant un gradient d'élution précis. Les paramètres opérationnels comprenaient un débit de 0.3 mL/min, une température de colonne de 40 °C, et un volume d'injection de 10 µL. Les conditions ESI ajustées pour le LC-MS-MS ont permis des analyses précises en modes ion positif et négatif, en employant le monitoring de réactions multiples (MRM).

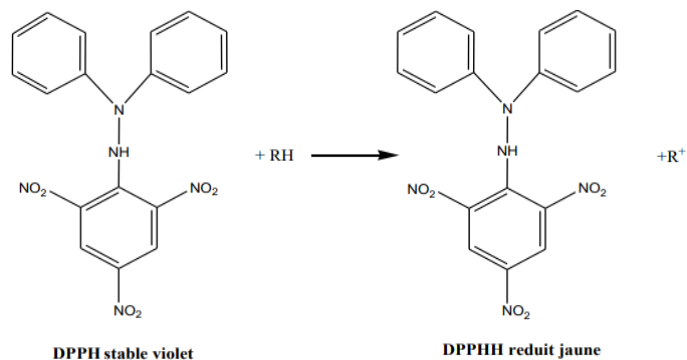
## 7. Évaluation des activités biologiques *in vitro*

### 7.1. Activité antioxydante

Il est reconnu que l'emploi de divers tests antioxydants complémentaires est indispensable et enrichit l'évaluation du potentiel antioxydant de ces extraits. Dans cette optique, l'activité antioxydante de notre plante *J. oxycedrus* a fait l'objet d'une analyse *in vitro*, exploitant les 8 méthodes suivantes : le test DPPH, test ABTS, test du pouvoir réducteur, Cuprak, test SNP, GOR et phénanthroline.

#### 7.1.1. Test au DPPH

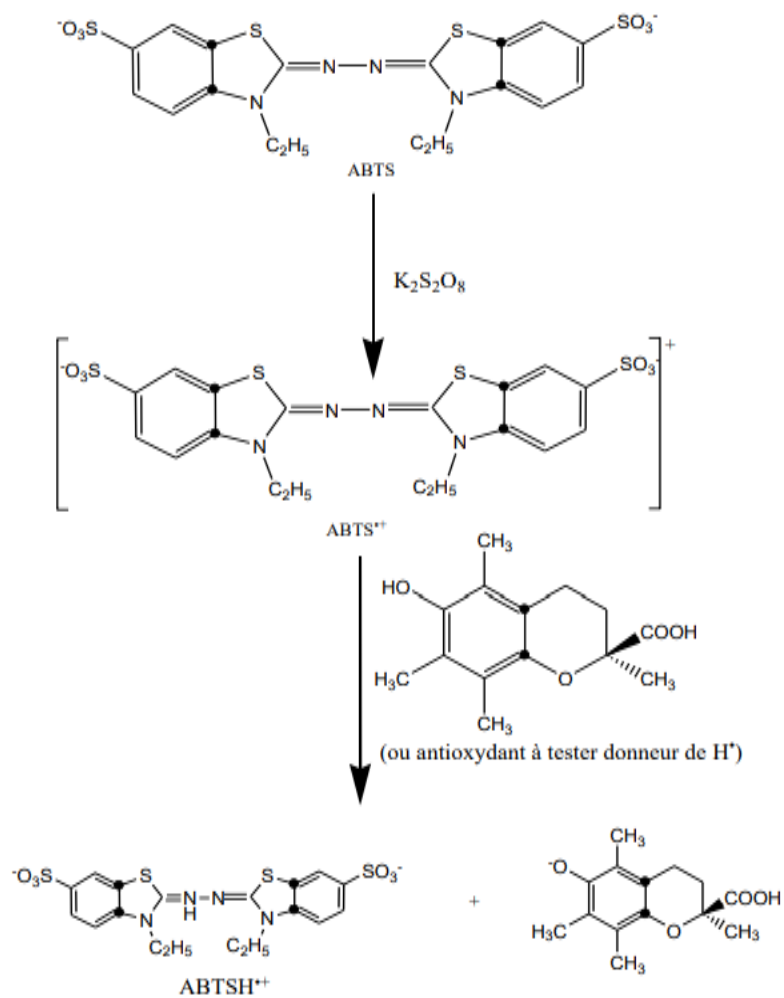
Selon le protocole établi par **Blois (1958)**, la méthode DPPH permet de déterminer l'efficacité antioxydante par le changement de couleur d'une solution de violet à jaune, observable à 517 nm, suite à la réduction du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle par des antioxydants selon la **Figure 21**. Pour cette analyse, le BHT (Butylhydroxytoluène) et le BHA (Butylhydroxyanisole) ont servi de standards de référence. Les résultats concernant la concentration nécessaire pour obtenir une inhibition de 50% (IC<sub>50</sub>), exprimée en µg/mL, ont été quantifiés.



**Figure 21:** Conversion du radical DPPH• en DPPH, H (Gülçin, 2012)

### 7.2.2. Test de l'ABTS

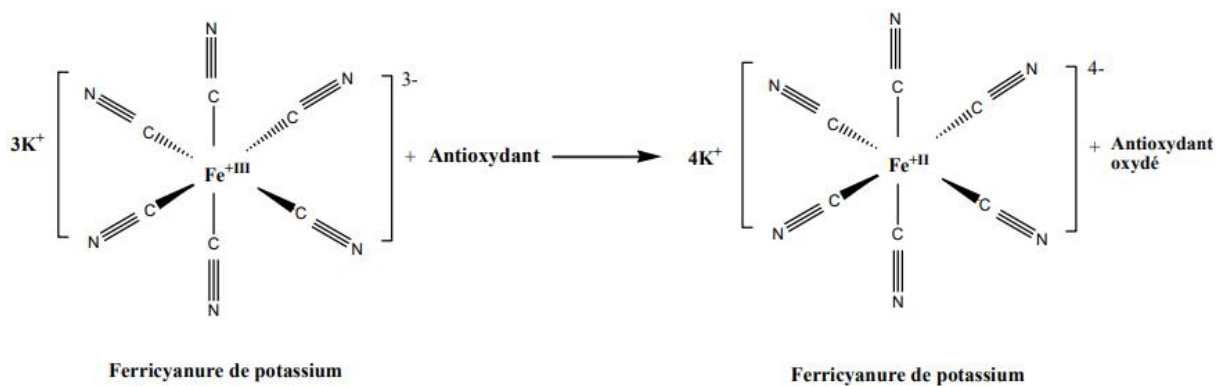
L'évaluation de l'efficacité antioxydante contre le radical ABTS•+ s'est basée sur la méthode proposée par **Re et al. (1999)**. Selon le principe illustré dans la (**Fig. 22**).



**Figure 22:** Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H• (Gülçin, 2012)

### 7.3.3. Test du pouvoir réducteur

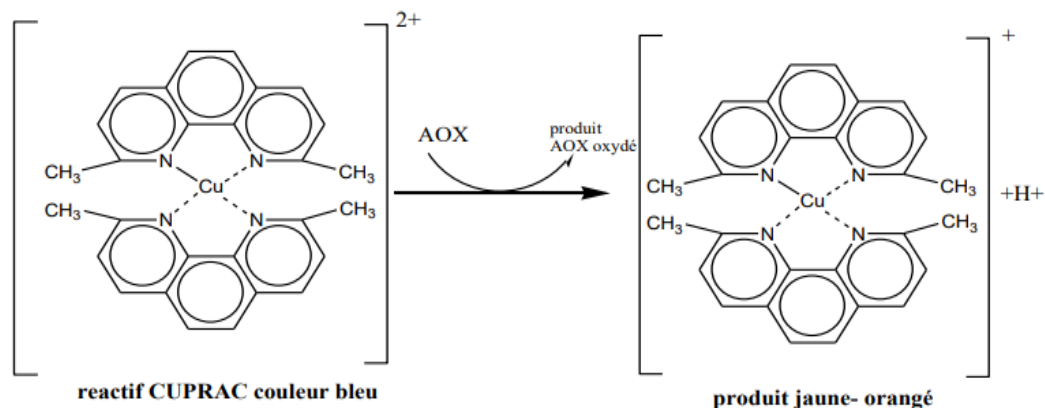
Le pouvoir antioxydant réducteur a été évalué en utilisant la méthode d'Oyaizu (1986) avec des modifications mineures, qui repose la réduction du ferricyanure de potassium ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ferrocyanure de potassium ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par un antioxydant, voir la **Figure 23**. L'absorbance a été lue au spectrophotomètre à l'aide d'un lecteur de microplaque à 700 nm. Une absorbance plus élevée indique un plus grand pouvoir réducteur. Les résultats ont été présentés sous la forme  $A_{0.5}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), correspondant à la concentration indiquant une intensité d'absorbance de 50%. Le potentiel réducteur des différents extraits a été comparé à celui de l'acide ascorbique.



**Figure 23:** Mécanisme réactionnel du test du pouvoir réducteur (Gülçin, 2012)

### 7.1.4. Test de la capacité réductrice du cuivre (CUPRAC)

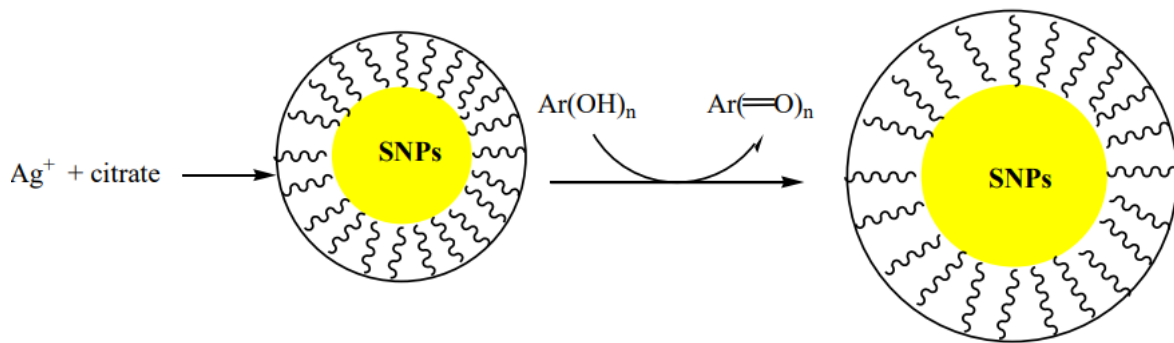
Dans la méthode CUPRAC, qui évalue la capacité antioxydante par réduction des ions cuivriques (Fig. 24), la mesure de cette réduction est effectuée au spectrophotomètre à 450 nm, comme décrit par Apak et al. (2004). Les résultats  $A_{0.5}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) correspondent à la concentration indiquant une absorbance de 0.50. Ces résultats ont été comparés avec les étalons antioxydants BHA et BHT.



**Figure 24:** Réduction du complexe chromogène de  $\text{Cu}^{2+}$ -Nc<sub>2</sub> (Özyürek et al., 2011)

### 7.1.5. Test des nanoparticules d'argent (SNP)

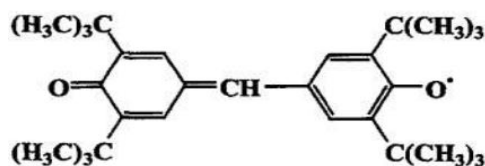
La méthode développée par **Özyürek et al. (2012)** pour réduire les ions  $\text{Ag}^+$  en nanoparticules d'argent sphériques (SNPs) repose sur l'utilisation des antioxydants en présence de graines d'argent stabilisées au citrate (**Fig. 25**). Cette approche conduit à la formation d'une bande d'absorption spécifique à 423 nm due à la résonance plasmonique de surface (SPR), caractéristique des SNPs. Les résultats sont exprimés en  $A_{0.5}$ . L'acide ascorbique a servi de standard de référence.



**Figure 25** : Réduction d' $\text{Ag}^+$  en nanoparticules (SNP) (**Özyürek et al., 2012**)

### 7.1.6. Test du GOR

Selon la méthode définie par **Shi et al. (2001)** l'activité antioxydante de nos échantillons a été évaluée par leur capacité à neutraliser les radicaux libres Galvinoxyl (GOR). L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 428 nm, avec l'acide ascorbique utilisé comme standard. Les résultats ont été exprimés en  $\text{EC}_{50}$  (en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ce qui représente la concentration nécessaire pour atteindre une réduction de 50% de l'intensité d'absorbance.

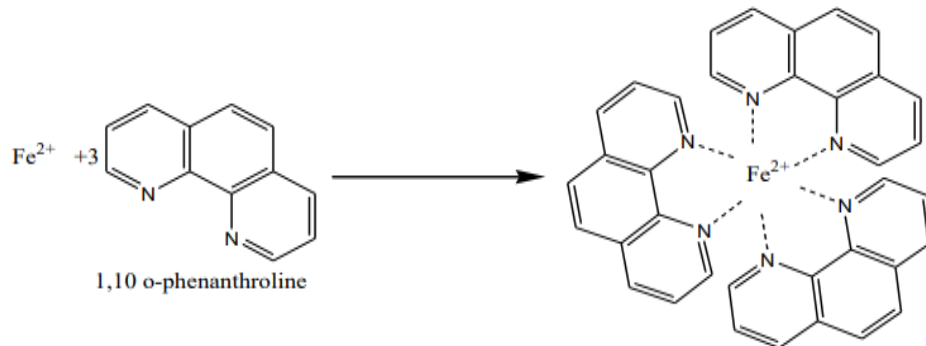


**Figure 26**: Structure chimique de radical Galvinoxyl (**Shi et al., 2001**)

### 7.1.7. Test à la phénanthroline

Basée sur la méthode de la phénanthroline, décrite par **Szydłowska-Czerniak et al. (2008)**, cette approche permet d'évaluer l'activité antioxydante des échantillons en mesurant leur capacité à prévenir l'oxydation des ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La phénanthroline se lie aux ions ferreux, formant un complexe rouge-orange dont l'intensité de

couleur est directement proportionnelle à la concentration des ions ferreux présents (**Fig. 27**). La présence d'antioxydants ralentit cette conversion, réduisant ainsi l'intensité de la couleur du complexe. L'absorbance du complexe est mesurée à 510 nm.

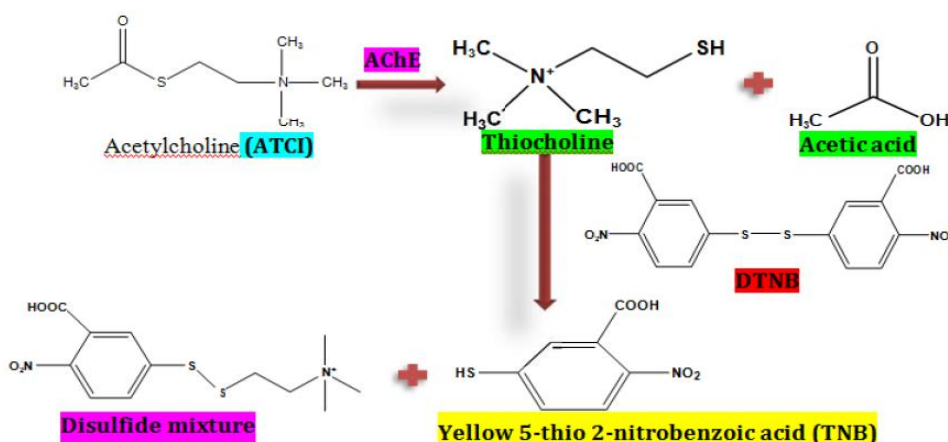


**Figure 27:** Formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -phénanthroline (Agustina et al., 2015)

## 7.2. Activités anti-enzymatiques

### 7.2.1. L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'évaluation de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) des extraits a été menée selon une version modifiée de la méthode spectrophotométrique développée par **Ellman et al. (1961)**, adaptée à l'utilisation d'un lecteur de microplaques à 96 puits. L'AChE, extraite de l'anguille électrique, a été analysée en utilisant l'iodure d'acétylthiocholine comme substrat, en présence de DTNB (5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)). Ce réactif réagit avec les produits de la réaction enzymatique pour former un composé jaune (**Fig. 28**), dont l'intensité est mesurée spectrophotométriquement. L'absorbance a été déterminée à 0 min, 15 min, à 412 nm. La galantamine a servi comme référence standard. Les résultats ont été donnés en valeur  $\text{IC}_{50}$ .



**Figure 28:** Le principe de la réaction d'Ellman (Ellman et al., 1961)

### 7.2.2. L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase

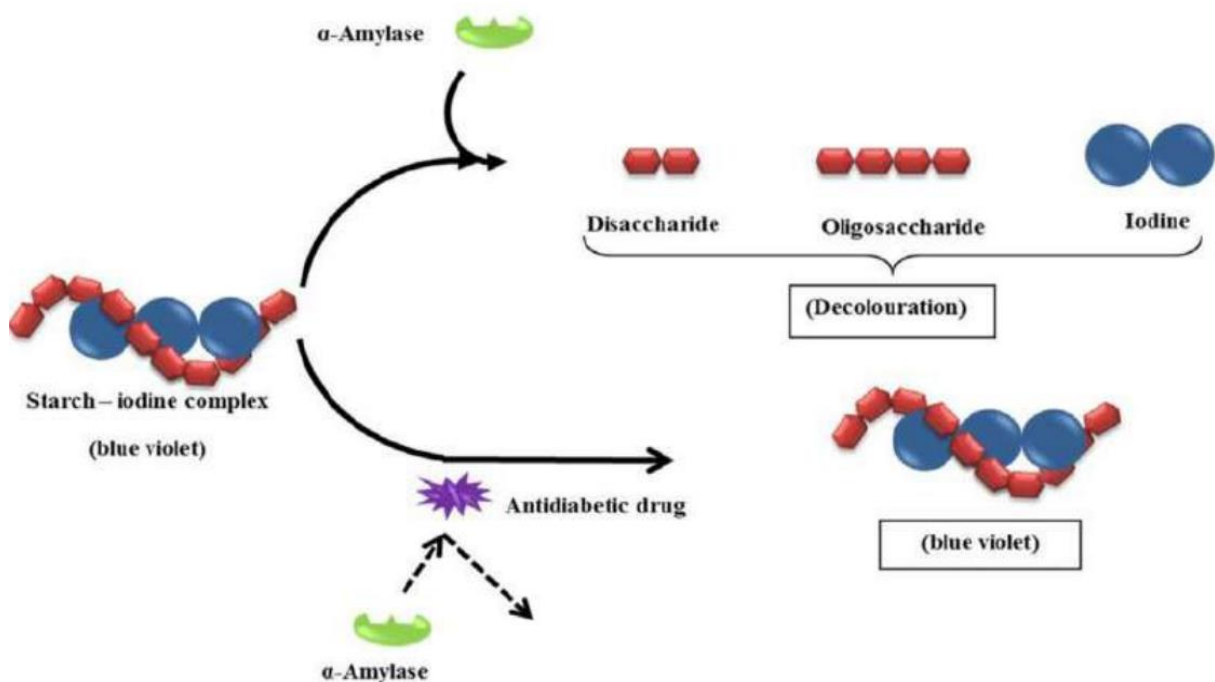
L'évaluation de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase a été effectuée suivant la méthode à l'iode/potassium iodure (IKI) proposée par **Zengin et al. (2014)**. L'acarbose a été utilisé comme un standard.

Cette méthode repose sur l'interaction entre l'amidon non dégradé et l'iode pour former un complexe coloré, dont l'intensité de la couleur est indicative de l'activité enzymatique.

Normalement, l' $\alpha$ -amylase catalyse la décomposition de l'amidon en molécules plus simples qui ne peuvent pas former de complexe coloré avec l'iode. En présence d'inhibiteurs contenus dans les extraits testés, l'amidon s'accumule et réagit avec l'iode, formant un complexe bleu-noir, visible spectrophotométriquement à 630 nm (**Fig. 29**).

- Une couleur bleu foncé indique ainsi une forte présence d'amidon, signifiant une inhibition efficace de l' $\alpha$ -amylase.
- Une couleur jaune révèle l'absence d'amidon, signifiant l'absence d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase.
- Une couleur brunâtre signale que l'amidon est dégradé partiellement.

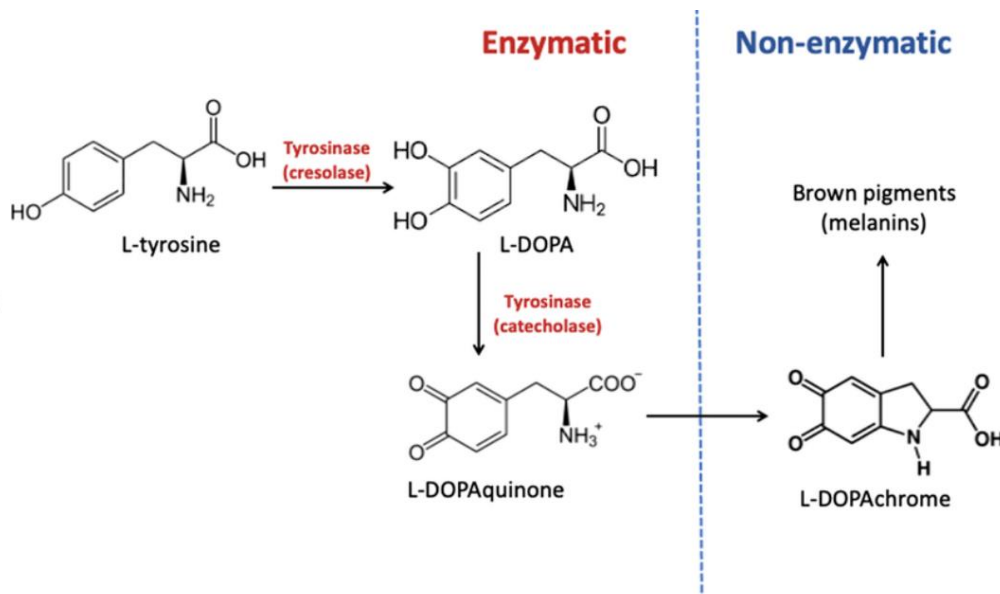
Ce protocole permet de déduire l'efficacité des inhibiteurs présents dans les extraits en observant la réduction de l'hydrolyse de l'amidon par l'enzyme.



**Figure 29:** Mécanisme d'hydrolyse de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase (**Jijith et Jayakumari, 2017**)

### 7.2.3. La capacité d'inhibition de la tyrosinase

L'évaluation de l'activité inhibitrice de la tyrosinase a été effectuée suivant la méthode à décrite par **Deveci et al. (2018)**. Dans ce processus, la L-DOPA a été utilisée comme substrat, et l'acide kojique a servi comme standard de comparaison. L'absorbance a été mesurée à 475 nm, et les résultats ont été donnés en valeur  $IC_{50}$ . Cette approche permet de déterminer le potentiel des extraits comme agents thérapeutiques ou conservateurs, selon leur capacité à influencer l'activité de la tyrosinase. La tyrosinase est une enzyme essentielle contenant du cuivre, abondante dans la nature, qui catalyse l'oxydation de la tyrosine en mélanine, un pigment vital responsable de la pigmentation de la peau, des cheveux et des yeux chez les mammifères. Outre son rôle dans la détermination de la couleur, la mélanine offre une protection contre les dommages causés par les rayons UV, jouant ainsi un rôle préventif dans le développement des cancers de la peau (**Kurpejović et al., 2021**). Ce protocole évalue l'efficacité des inhibiteurs dans les extraits par la diminution de l'activité de la tyrosinase, essentielle à la synthèse de la mélanine, offrant ainsi des perspectives dans le contrôle des processus de pigmentation (**Fig. 30**).

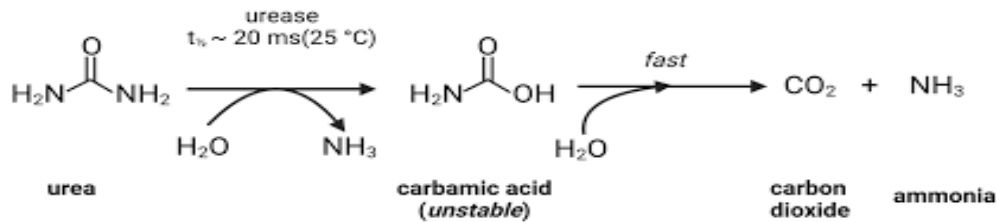


**Figure 30:** Catalyse de la Tyrosine en Mélanine par la Tyrosinase (**Kurpejović et al., 2021**)

### 7.2.4. L'activité inhibitrice de l'uréase

La capacité d'inhibition de l'uréase a été évaluée en mesurant la production d'ammoniac en utilisant la méthode à l'indophénol décrite par **Taha et al. (2018)**. L'absorbance pour ce test a été enregistrée à 630 nm. La thiourée a servi comme standard.

L'uréase, une enzyme présente chez de nombreux organismes, transforme l'urée en ammoniacque et dioxyde de carbone, affectant le pH et jouant un rôle dans certaines infections gastriques, notamment celles provoquées par *Helicobacter pylori*.



**Figure 31:** Hydrolyse de l'urée (Gupta et al., 2023)

### 7. 3. L'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* a été évaluée à l'aide de la méthode de dénaturation protéique, en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme modèle, conformément à la procédure décrite par **Karthik et al. (2013)**. La mesure de la turbidité des échantillons s'est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 660 nm, utilisant le diclofénac de sodium comme référence standard. Cette approche permet d'explorer comment divers composés peuvent offrir une protection aux protéines biologiques face aux différents stress, suggérant leur potentiel à moduler les processus inflammatoires dans l'organisme. Cette propriété est particulièrement pertinente dans le contexte des maladies inflammatoires, où la stabilisation des protéines contre la dénaturation pourrait contribuer à atténuer les réactions inflammatoires (**Bisset et al., 2020**).

### 7.4. Activité photoprotectrice (FPS)

Les fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol ont été solubilisées dans l'éthanol pour atteindre une concentration de 250 µg/mL puis analysées spectralement sur une plage de longueurs d'onde de 290 à 320 nm avec des intervalles de 5 nm. L'efficacité de la protection solaire a été évaluée par la détermination *in vitro* du Facteur de Protection Solaire (FPS), en utilisant la formule proposée par **Mansur et al. (1986)**. Pour les calculs de SPF, l'absorbance de chaque échantillon a été mesurée trois fois, comme indiqué dans l'équation suivante :

$$\text{SPF}_{\text{spectrophotométrique}} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

Où : **EE (λ)** : est le spectre d'effet érythémal (erythemal effect spectrum) ;  
**I (λ)** : est le spectre d'intensité solaire (solar intensity spectrum) ;  
**Abs (λ)** : est l'absorbance des échantillons (absorbance of sunscreen product) ;  
**CF** : est le facteur de correction (correction factor : 10).

Les valeurs de  $\text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda)$  sont des constantes, et elles ont été déterminées par (**Mansur et al., 1986**) ( Voir annexe 23).

## 8. Evaluation de l'activité antioxydante et antiasthmatique *in vivo*

### 8.1. Animaux

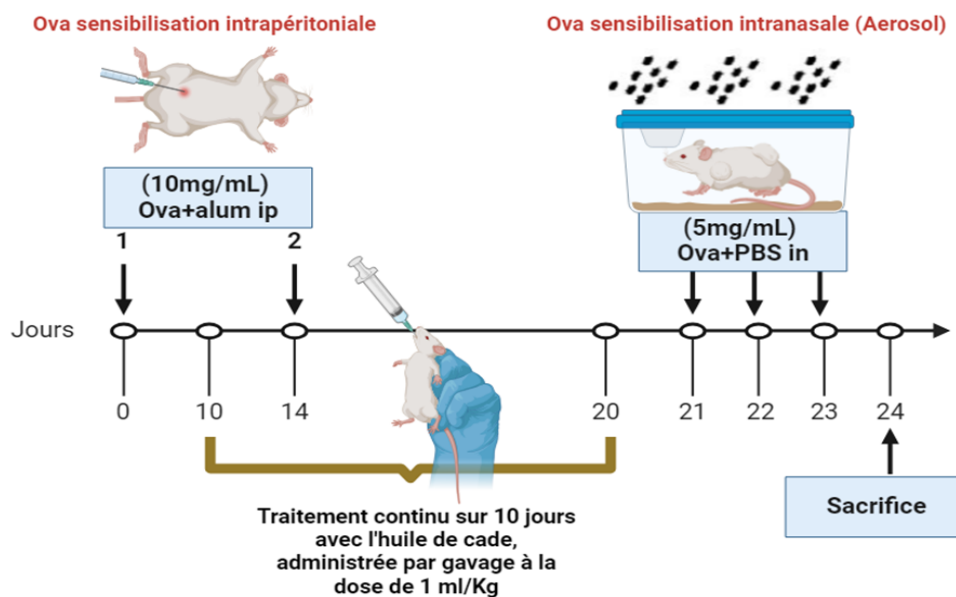
Vingt-quatre rats Wistar mâles pesant entre (240 et 250g) ont été utilisés. Les rats ont été obtenus de l'Institut Pasteur d'Alger (Alger, Algérie) et ont eu accès illimité à l'eau et à l'alimentation standard fournie par l'ONAB de Béjaïa (Algérie) ( Voir annexe 1). Les animaux ont été hébergés dans des conditions de photopériode naturelle, avec une température moyenne maintenue à 21-25°C.

### 8. 2. Les groupes expérimentaux

Vingt-quatre rats ont été répartis en quatre groupes distincts, comptant chacun six individus. Ces derniers ont été sensibilisés à l'ovalbumine et/ou ont reçu un traitement à base d'huile de cade à la dose de 1 ml/Kg/jour, suivant un protocole bien adapté (Fig. 32). En bref, les 4 lots sont constitués de :

- **Le lot 1** : regroupe rats témoins (**Témoin**), traités seulement avec de l'eau physiologique sous les mêmes conditions que les autres groupes.
- **Le lot 2** : regroupe les rats sensibilisés à l'ovalbumine (**OVA**), modèle pour l'étude de l'asthme expérimental.
- **Le lot 3** : regroupe de rats recevant un traitement oral avec de l'huile de cade (1 ml/Kg) (**HC**).
- **Le lot 4** : inclut les rats à la fois sensibilisés à l'ovalbumine et traités avec l'huile de cade à la dose de 1 ml/Kg/jour (**OVA+HC**), selon (El jemli et al., 2017).

Cette structuration permet d'évaluer l'efficacité de l'huile de cade dans le traitement des symptômes induits par la sensibilisation à l'ovalbumine.

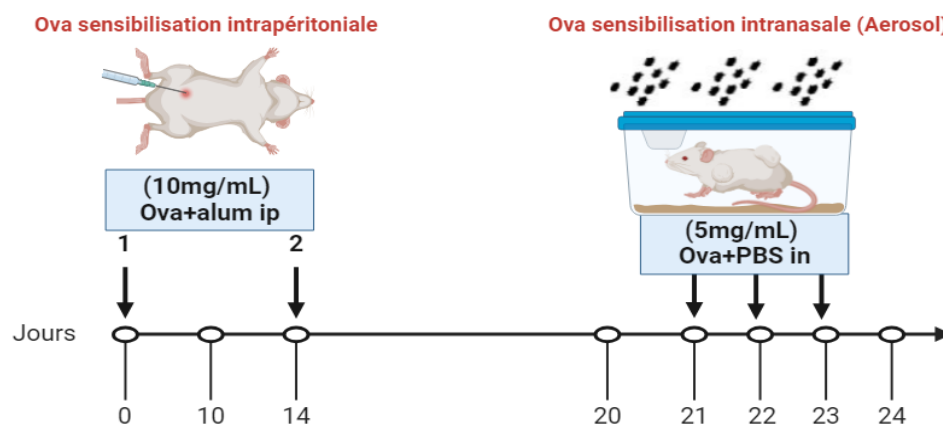


**Figure 32:** Protocole expérimental global réalisée durant 24 jours (Sensibilisation, traitement et sacrifice)

### 8.3. Sensibilisation des voies respiratoires

Pour induire une inflammation aiguë simulant un asthme allergique, les groupes (**OVA**) et (**OVA+HC**), ont été sensibilisés avec de l'ovalbumine (référence A5253-250G, grade II, Sigma Aldrich), suivant une méthode validée par **Moura et al., (2005)** ainsi que **Zemmouri et al., (2017)** :

- L'administration intra-péritonéale d'ovalbumine (concentration de 10 mg/ml) mélangée à un adjuvant d'hydroxyde d'aluminium (dissous dans une solution saline à 0,9% à une concentration de 1mg/ml) a été effectuée le premier jour (J0) et répétée le treizième jour (J14), comme détaillé dans la (**Fig. 33**).
- Les jours 21 à 23, les rats des groupes (**OVA**) et (**OVA+ HC**) ont subi une réaction anaphylactique déclenchée par l'inhalation d'ovalbumine (5 mg/ml dans du sérum physiologique à 0,9%) via un nébuliseur (OMRON, NE-C29-E), conformément à **Moura et al. (2005)**. Cette procédure a été effectuée dans une chambre en plexiglas pendant 30 minutes.



**Figure 33:** Protocole de sensibilisation et aérosol

### 8.4. Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons

Après 24 jours de traitement, la décapitation cervicale a été effectuée sur les rats, 24 heures après leur dernière exposition à l'aérosol.

#### 8.4.1. Récupération des échantillons de sang

Le sang prélevé est placé dans des tubes secs pour séparer le sérum (utilisé pour des analyses biochimiques ultérieures) et des tubes à EDTA pour les analyses hématologiques (FNS). Le culot des tubes secs sert dans la préparation des lysats érythrocytaires destinés aux analyses du stress oxydant.

#### **8.4.2. Récupération de liquide bronchoalvéolaire**

Après canulation de la trachée, un lavage broncho-alvéolaire a été effectué avec 1 mL de PBS (Voir annexe 2), en trois passages successifs (Khaldi et al., 2018). Le liquide obtenu a été centrifugé et le culot a servi à la numération cellulaire.

#### **8.4.3. Prélèvement des organes**

Le poumon et le foie sont récupérés et rincés avec une solution saline à 0,9%. Ils sont alors séparés en deux sections : une destinée à être congelée pour l'analyse du stress oxydant ; l'autre fixée dans du formol 10% pour l'examen histologique.

#### **8.4.4. Préparation des homogénats de tissus**

Des échantillons de foie et de poumon (1 g) des rats ont été broyés à l'aide d'un broyeur à ultrasons, puis homogénéisés et centrifugés. Les surnageants ont été recueillis dans des tubes Eppendorf et conservés à -20 °C pour les analyses ultérieures du stress oxydatif.

#### **8.4.5. Préparation des érythrocytes**

Le culot érythrocytaire a subi un double lavage avec une solution de lyse, suivi de centrifugations (première à 3000 g pour 15 min, puis à 4000 g pour 30 min, toutes deux à 4°C). Le surnageant recueilli a ensuite été transféré dans des tubes Eppendorf et stocké à -20°C en vue d'analyses futures sur le stress oxydatif (Khaldi et al., 2018).

#### **8.5. Détermination de la formule de numération sanguine (FNS)**

La Formule de Numération Sanguine (FNS) a été établie grâce à un analyseur automatique de cellules sanguines ERMA INC, modèle PCE-210N.

#### **8.6. Dosage des paramètres biochimiques**

Les paramètres biochimiques (ASAT, ALAT, PAL, Albumine, Créatinine et urée) ont été mesurés à l'aide d'un automate COBAS INTEGRA 400.

##### **8.6.1. Dosage des transaminases sériques**

###### **8.6.1.1. Détermination de l'activité d'aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1)**

###### **a. Principe**

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transférase (TGO) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'aspartate au  $\alpha$ -

cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate produit est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH (Murray, 1984).



**-Réactif de travail :** Dissoudre un comprimé de R2 (voir annexe 3) dans un flacon de R1.

Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

**- Mode opératoire :** Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

<b>Réactif de travail (mL)</b>	<b>1.0</b>
<b>Echantillon (µL)</b>	<b>100</b>

Puis, les mélanges réactionnels sont mixés et incubés pendant une minute. L'absorbance initiale est lue à 340 nm. Le chronomètre est redémarré simultanément pour lire à nouveau les absorbances après 1, 2 et 3 minutes.

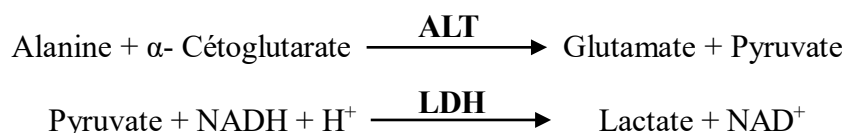
**- Calcul de l'activité :** L'aspartate aminotransférase est évaluée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{ASAT (U/L)} = \Delta\text{DO}/\text{min} \times 1750$$

### 8.6.1.2. Détermination de l'activité d'alanine aminotransférase (EC 2.6.1.2)

#### a. Principe

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi glutamate pyruvate transaminase (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'alanine au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate par le lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH (Murray, 1984), selon le schéma réactionnel suivant :



La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon (**Murray, 1984**).

- **Réactif de travail** : Dissoudre le contenant du R2 dans le flacon de R1 (**voir annexe 4**). Ce réactif est stable 2 semaines à 2-8°C.

- **Mode opératoire** : Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

<b>Réactif de travail (mL)</b>	<b>1.0</b>
<b>Echantillon (µL)</b>	<b>100</b>

Puis, les mélanges réactionnels sont mixés et incubés pendant une minute à température ambiante. L'absorbance initiale est lue à 340 nm, puis à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. La moyenne des absorbances par minutes ( $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ ) est alors déterminée pour l'utiliser dans les calculs.

- **Calcul de l'activité** : L'alanine aminotransférase est évaluée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{ALAT (U/L)} = \Delta \text{DO}/\text{min} \times 1750$$

### 8.6.1.3. Dosage de la phosphatase alcaline sérique :

#### a. Principe

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10.4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate (**Wenger et al., 1984 ; Sabokbar et al., 1994**), selon la réaction suivante :



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon.

- **Réactif de travail** : dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans une bouteille du réactif 1 (tampon). (**Voir annexe 5**)

- **Mode opératoire** : Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

<b>Réactif de travail (mL)</b>	<b>1.2</b>
<b>Echantillon (µL)</b>	<b>20</b>

Puis, les mélanges réactionnels sont mixés et incubés pendant une minute. L'absorbance initiale est lue à 405 nm, puis à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. La moyenne des absorbances par minute ( $\Delta$  abs/min) est alors déterminée pour l'utiliser dans les calculs.

**- Calcul de l'activité :**

Pour estimer l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, on utilise la formule suivante :

$$\text{Phosphatase alcaline (U/L)} = \Delta \text{ DO/min} \times 3300$$

**8.6.2. Dosage d'albumine**

**a. Principe**

L'albumine réagit avec le vert de bromocrésol (BCG), pour former un complexe coloré. Le pH du milieu est maintenu à 4.2 par le tampon. Après l'incubation, l'absorbance du mélange est mesurée à 628 nm (**Doumas et al., 1971**).

**- Mode opératoire :** Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes : (**Voir annexe 6**).

<b>Réactifs</b>	<b>Blanc</b>	<b>Étalon</b>	<b>Échantillon</b>
<b>Réactifs (mL)</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>
<b>Étalons (µl)</b>	--	<b>5</b>	--
<b>Échantillons (µl)</b>	--	--	<b>5</b>
<b>H<sub>2</sub>O distillé (µl)</b>	<b>5</b>	--	--

Après une incubation à température ambiante pendant 10 minutes, l'absorbance optique est lue à 630 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant une heure à température ambiante.

**- Calcul de la concentration**

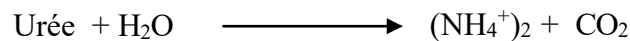
$$\text{Albumine (g/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (5 g/dL)}$$

### 8.6.3. Dosage de l'urée sérique

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode cinétique enzymatique à l'uréase.

#### a. Principe

L'urée est hydrolysée enzymatiquement en ions d'ammoniac ( $\text{NH}_4^+$ ) et dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Les ions d'ammoniac formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite ( $\text{NaClO}$ ) en présence du catalyseur nitroprusside pour former l'indophénol vert (Kaplan, 1984), selon les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon.

- **Réactif du travail** : Dissoudre une tablette de réactif 3 (enzymes) dans une bouteille de réactif 1 (tampon) et mélanger légèrement. Le réactif 2 ( $\text{NaClO}$ ) est préparé pour l'utiliser. (Voir annexe 7)

- **Mode opératoire** : Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

	Blanc	Étalons	Échantillon
Réactif de travail (mL)	1.0	1.0	1.0
Étalon ( $\mu\text{L}$ )	--	10	--
Echantillon ( $\mu\text{L}$ )	--	10	--

Puis, les mélanges réactionnels sont mixés et incubés 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante (15-25°C). Les absorbances des échantillons et de l'étalon sont lues contre le blanc réactif à 340 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

- **Calcul de la concentration** : La concentration de l'urée est calculée par la formule suivantes :

$$\text{Urée (mg/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (50 mg/dL)}$$

#### 8.6.4. Dosage de la créatinine sérique

##### a. Principe

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium : c'est la réaction de JAFFE. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré Nitroprusside dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon (Murray, 1984).

- **Réactif de travail** : mélanger un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2.

- **Mode opératoire** :

Le réactif de travail est mélangé aux échantillons selon les proportions suivantes :

	<b>Blanc</b>	<b>Étalons</b>	<b>Échantillon</b>
<b>Réactif de travail (mL)</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>
<b>Étalon (µL)</b>	--	<b>100</b>	--
<b>Echantillon (µL)</b>	--	--	<b>100</b>

La lecture des densités optiques se fait à 492 nm : La densité optique (DO1) après 30 secondes et la densité optique (DO2) après 90 secondes.

- **Calcul de la concentration** :

La concentration de la créatinine est calculée par la formule suivante :

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon} - \Delta \text{DO blanc}}{\text{DO étalon} - \Delta \text{DO}} \times \text{concentration de l'étalon (2 mg/dL)}$$
$$\Delta \text{DO} = (\text{DO 2} - \text{DO 1})$$

## 9. Évaluation de l'activité antioxydante *in vivo*

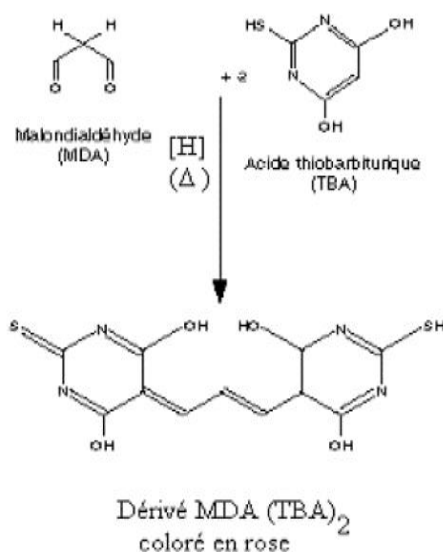
Pour les expérimentations *in vitro*, les réactifs ont été acquis auprès de Sigma Chemicals Co et Biochem Chemopharma. Pour les études *in vivo*, incluant l'ovalbumine et l'albumine de sérum bovin (BSA), les réactifs ont été fournis exclusivement par Sigma Chemical Co. (USA).

### 9.1. Dosage des protéines totales

Selon la méthode colorimétrique décrite par **Bradford (1976)**, la quantification des protéines a été effectuée en utilisant une courbe d'étalonnage basée sur l'Albumine de Sérum Bovin (BSA), permettant ainsi de déterminer leur concentration (**Annexe 9**).

### 9.2. Détermination du taux de la peroxydation lipidique

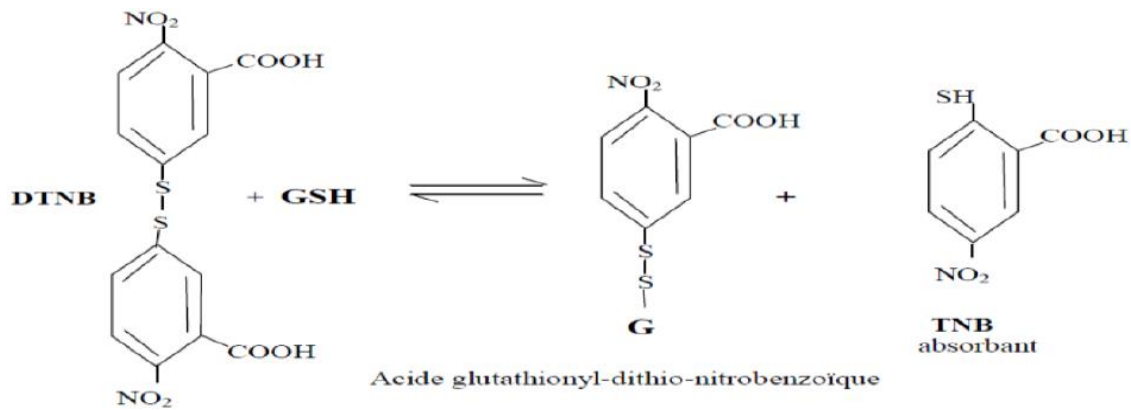
En utilisant la méthode **d'Esterbauer et al. (1992)**, la peroxydation lipidique a été évaluée par la mesure du malondialdéhyde (MDA) avec le test TBARS, qui détecte la formation d'un complexe avec l'acide thiobarbiturique à une absorbance de 530 nm.



**Figure 34:** Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique

### 9.3. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)

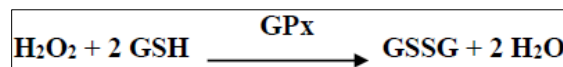
D'après la méthode colorimétrique décrite par **Weckbecker et Cory (1988)**, la mesure des niveaux de glutathion réduit (GSH) dans les échantillons s'effectue par la réaction du GSH avec le DTNB. Comme le démontre la **Figure 35**, Cette interaction entraîne la coupure du DTNB et la libération de l'acide thionitrobenzoïque (TNB), responsable de la coloration jaune observable à 412 nm. Ainsi, la concentration de GSH est exprimée en nmol de GSH par mg de protéine.



**Figure 35:** Principe de dosage du glutathion

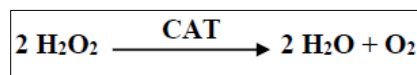
#### 9.4. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase

La procédure décrite par **Flohé et Günzler (1984)** a été utilisée pour évaluer l'activité de la glutathion peroxydase (GPx). Selon cette méthode, la présence de glutathion réduit (GSH) favorise la réduction du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en glutathione disulfide (GSSG), avec l'activité spécifique de la GPx mesurée à 420 nm. L'activité enzymatique est exprimée en  $\mu\text{mol GSH}/\text{min}/\text{mg}$  protéine, reflétant la conversion du GSH en GSSG en présence de GPx selon le schéma réactionnel suivant :



#### 9.5. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité de la Catalase (CAT) a été mesurée selon la méthode **d'Aebi (1984)**. Le principe de ce test repose sur la dégradation du peroxyde d'hydrogène en présence de catalase, conformément à la réaction suivante :



L'activité catalytique de la CAT se fait par le suivi des variations d'absorbance à 240 nm avec un spectrophotomètre UV/visible, en raison de la dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Cette activité est quantifiée  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  décomposé/min/mg protéine.

#### 9.6. Etude histologique

Les tissus pulmonaires ont été prélevés puis fixés dans du formaldéhyde à 10%. Après fixation, les échantillons ont été déshydratés par des solutions d'éthanol et inclus dans de la paraffine. Des coupes d'une épaisseur de 5  $\mu\text{m}$  ont été réalisées à partir des blocs de paraffine et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). L'observation des sections colorées s'est faite à l'aide d'un microscope LEICA DM 1000LED, en suivant la méthode décrite par (**Zemmouri et al., 2017**).

## 10. Traitement statistique des résultats

Pour chaque groupe de six rats, les résultats des expériences sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM). Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel Microsoft Excel. Les analyses comparatives entre les groupes ont été conduites en utilisant le test "t" de student, et une valeur de  $p < 0,05$  a été interprétée comme indiquant une différence statistiquement significative.

# **Résultats et discussion**

## Résultats et Discussion

### 1. La 1<sup>ère</sup> partie expérimentale (*in vitro*)

#### 1.1. Etude phytochimique

##### 1.1.1. Rendement

L'extraction des composés phénoliques de la plante *Juniperus oxycedrus* a été réalisée avec deux solvants, l'acétate d'éthyle et le n-butanol, donnant des rendements respectifs de 5,3 % et 12 %. Les extractions ont produit une pâte jaunâtre et une pâte bleu foncé, respectivement (**Tab. 3**).

##### 1.1.2. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux

Dans le cadre de cette étude, l'analyse phytochimique des fractions de *Juniperus oxycedrus* ainsi que de l'huile de cade obtenue à partir du bois de *J. oxycedrus*, révèle des concentrations considérables en composés phénoliques et en flavonoïdes est présenté dans le **tableau 3**. La quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux a été effectuée selon des courbes d'étalonnage préparées à partir de l'acide gallique (pour les polyphénols,  $y = 0.0034x + 0.1044$ ,  $R^2 = 0.997$ ) et de la quercétine (pour les flavonoïdes,  $y = 0.0048x$ ,  $R^2 = 0.997$ ). (**Voir les annexes 10 et 11**)

Les résultats indiquent que l'huile de cade (**HC**) présente la concentration la plus élevée en polyphénols, avec une teneur de  $275,21 \pm 3,14$  µg EAG/mg, suivie par la fraction d'acétate d'éthyle (**AEJO**) qui affiche une concentration de  $252,56 \pm 3,91$  µg EAG/mg. En revanche, la fraction-butanol (**NBJO**) montre la plus faible concentration en polyphénols, avec  $119,14 \pm 3,39$  µg EAG/mg.

À l'opposé de ce qui est observé pour les polyphénols, la répartition des flavonoïdes totaux montre que la fraction (**AEJO**) possède la concentration la plus élevée, avec  $47,70 \pm 2,21$  µg QE/mg, suivie par la fraction (**NBJO**) avec  $31,11 \pm 2,30$  µg QE/mg, alors que l'huile de cade présente la concentration la plus basse en flavonoïdes ( $28,23 \pm 1,91$  µg QE/mg).

**Tableau 3:** Teneur en polyphénols et flavonoïdes de différents extraits de *Juniperus oxycedrus L.*

Fractions	Total bioactive content		
	Rendement (%)	Phenolic content ( $\mu\text{g GAE/mg}$ )	Flavonoid content ( $\mu\text{g QE/mg}$ )
HC	/	275,21 $\pm$ 3,14	28,23 $\pm$ 1,91
EAJO	5,3	252,56 $\pm$ 3,91	47,70 $\pm$ 2,21
NBJO	12	119,14 $\pm$ 3,39	31,11 $\pm$ 2,30

### 1.1.3. Identification des composés phénoliques par UPLC LC-MS/MS

Le **Tableau 06** présente une vue détaillée et comparative des profils phénoliques obtenus par LC-MS-MS pour les fractions EAJO et NBJO de *Juniperus oxycedrus*. Les fractions EAJO et NBJO étaient quasiment similaires. Néanmoins, des différences notables ont été observées dans la présence et les quantités de certains composants. Globalement, l'analyse a révélé la présence de onze composés distincts dans la fraction EAJO et de dix dans la NBJO ; la plupart de ces composés appartiennent aux classes des flavonoïdes et des acides phénoliques. L'analyse a également mis en évidence la présence de deux acides phénoliques (l'acide salicylique et l'acide férulique), cinq flavonoïdes (la rutine, la chrysin, la quercétine, la naringénine et l'hésperidine), un caroténoïde (le bêta-carotène), une vitamine (l'acide folique), une coumarine (l'hydroxycoumarine) et un stilbénol (le viniférine).

Une première observation révèle l'absence de certains pics dans les chromatogrammes (**Voir les annexes 12 et 17**), notamment pour l'acide salicylique et l'acide chlorogénique qui ne sont pas détectés dans la fraction EAJO, tandis que pour la fraction NBJO, aucun pic n'est observé pour l'acide férulique et l'hydroxy coumarin. Ces différences pourraient indiquer une spécificité de la composition phytochimique entre les deux fractions, qui peut être attribuée aux variations dans la polarité des composés et la sélectivité de l'extraction par les solvants.

Suivant le **tableau 4**, la rutine domine le profil des flavonoïdes dans les deux fractions, avec des pourcentages remarquablement élevés : 86,78932 % pour l'EAJO et 88,1493 % pour le NBJO. Cette prédominance suggère un rôle potentiellement significatif dans l'activité biologique de l'extrait, considérant les propriétés antioxydantes et pharmacologiques reconnues de la rutine.

En se penchant sur la chrysin, on constate qu'elle est le deuxième flavonoïde en abondance dans les deux fractions, occupant 11,6941 % de l'EAJO et 11,31354 % du NBJO. Ce composé, connu pour ses effets anti-inflammatoires, pourrait contribuer de manière importante aux propriétés thérapeutiques de l'extrait.

Les autres flavonoïdes, comme la quercétine et le naringénine, bien qu'en proportions moindres, sont tout de même présents dans les deux fractions, ce qui rajoute à la diversité chimique de l'extrait et pourrait suggérer une synergie entre les composés lorsqu'ils sont considérés dans leur ensemble pour leurs effets biologiques.

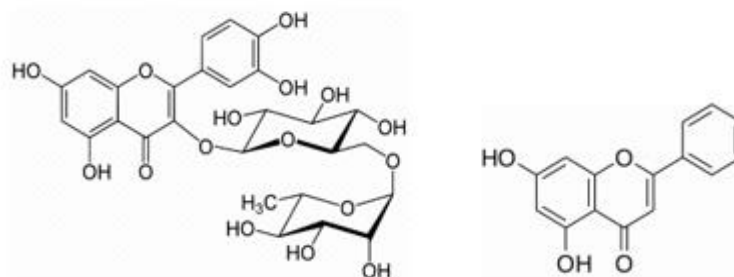
Le bêta-carotène, ainsi que le viniférine et l'hésperidine, identifiés dans les deux fractions, se distinguent malgré leurs faibles pourcentages. Leur présence, même en petites quantités, pourrait conférer à l'extrait des propriétés pharmacologiques.

Ces données montrent non seulement la diversité des composés phénoliques et flavonoïdes dans les fractions de *J. oxycedrus*, mais aussi la nécessité d'une analyse approfondie pour comprendre pleinement les implications de ces profils pour les recherches futures.

**Tableau 4 :** Profil phénolique déterminé par LC-MS-MS des fractions EAJO et NBJO des feuilles de *Juniperus oxycedrus*

Composé	Formule moléculaire	Rt de temps EAJO	Area % EAJO	Rt de Temps NBJO	Area % NBJO
Acide salicylique	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Aucun pic détecté	0	10,759	0,011826
Acide Férulique	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	10,797	1,148471	Aucun pic	0
Chryisine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	21,687	<b>11,6941</b>	21,668	<b>11,31354</b>
Quercétine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	21,661	0,01145	22,676	0,018721
Viniférine	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	23,042	0,006167	24,489	0,001485
Acide Chlorogénique	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Aucun pic détecté	0	Aucun pic	0
Bêta-carotène	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	32,165	0,183112	32,162	0,233544
Hésperidine	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	37,903	0,0075	39,044	0,004819
Acide Folique	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	39,187	0,00305	37,583	0,002416
Rutine	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	40,376	<b>86,78932</b>	40,379	<b>88,1493</b>
Hydroxycoumarine	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Aucun pic détecté	0,00	46,045	0,000176
Naringénine	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	47,397	0,156913	45,948	0,264179

\*RT : retention de temps



**Figure 36:** Structures chimiques des principaux flavonoïdes présents dans les fractions de *Juniperus oxycedrus* – Rutine et Chryisine

## 1.2. Évaluation des activités biologiques *in vitro*

### 1.2.1. L'activité antioxydante

Pour déterminer avec précision la capacité antioxydante, l'application de diverses méthodes est indispensable, en raison de la complexité inhérente aux réactions d'oxydation. Cette nécessité est d'autant plus marquée pour les extraits naturels, qui se caractérisent par une diversité moléculaire, rendant indispensable une combinaison de tests pour une analyse complète de leur potentiel antioxydant (Gülçin, 2009 ; Lourenço et al., 2019). Dans cette recherche, l'huile de cade ainsi que les fractions AEJO et NBJO, extraites des feuilles de *J. oxycedrus*, ont été examinées au moyen de divers tests dédiés à l'évaluation de leur capacité antioxydante. Six méthodes employées comprennent les tests de piégeage des radicaux libres DPPH, ABTS et GOR, ainsi que les capacités réductrices avec le test pouvoir réducteur, CUPRAC et phénanthroline, en plus des nanoparticules d'argent (SNP). L'objectif de ces méthodes multiples est de tenir en compte les mécanismes d'action et l'efficacité de capture des radicaux par les composés bioactifs présents. Les résultats des activités antioxydantes sont présentés dans le **tableau 5**, exprimés en termes de IC<sub>50</sub> et A<sub>0,5</sub>, comparés aux standards antioxydants (BHT, BHA et acide ascorbique), visant ainsi à enrichir notre compréhension du potentiel antioxydant des extraits étudiés.

**Tableau 5** : Différentes activités antioxydantes des extraits de *J. oxycedrus*.

	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)	ABTS IC <sub>50</sub> (µg/mL)	CUPRAC A <sub>0,50</sub> (µg/mL)	Pouvoir réducteur A <sub>0,50</sub> (µg/mL)	SNP IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Phénanthroline IC <sub>50</sub> (µg/mL)	GOR IC <sub>50</sub> (µg/mL)
HC	24,29 ± 0,39	24,44 ± 1,27	30,40 ± 1,52	19,4 ± 0,45	Na	11,52 ± 0,48	21,92 ± 1,27
EAJO	30,36 ± 0,20	1,83 ± 0,01	9,58 ± 0,72	12,67 ± 0,51	16,11 ± 1,18	2,77 ± 0,28	7,10 ± 0,64
NBJO	73,55 ± 0,67	1,57 ± 0,09	20,80 ± 1,21	23,44 ± 0,57	220,00 ± 3,4	2,09 ± 0,57	9,84 ± 1,31
BHT	6,07 ± 0,2	1,75 ± 0,2	5,35 ± 0,71	NT	NT	0,88 ± 0,04	NT
BHA	12,9 ± 0,24	1,14 ± 0,11	8,97 ± 3,94	NT	NT	2,12 ± 0,05	NT
AA	NT	NT	NT	6,73 ± 1,15	7,14 ± 0,05	NT	6,73 ± 0,29

Les valeurs IC<sub>50</sub> et A<sub>0,50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). HC : Huile de cade, EAJO : fraction d'acétate d'éthyle ; NBJO : fraction de n-butanol ; BHA : hydroxyanisole butylé ; BHT : hydroxytoluène butylé ; AA : acide ascorbique ; NT : non testé. Na : pas d'absorbance.

#### 1.2.1.1. Test de piégeage du radical DPPH

Le **tableau 6** illustre les concentrations inhibitrices 50% (IC<sub>50</sub>), qui mesurent la capacité des différents extraits et standards à piéger 50% des radicaux libres via le test DPPH. Une faible concentration IC<sub>50</sub> est indicatrice d'une activité antioxydante élevée (Aissani, 2022). Ces données révèlent une augmentation du pourcentage d'inhibition des radicaux libres proportionnellement à l'élévation de la concentration. Il est apparu que l'huile de cade et la fraction EAJO ont démontré une capacité antiradicalaire significative, avec respectivement des IC<sub>50</sub> de 24,29 ± 0,37 µg/mL et de

30,36 ± 0,20 µg/mL. Bien que ces résultats soient remarquables, ils demeurent inférieurs à ceux des antioxydants de référence tels que le BHT (IC<sub>50</sub> : 12,99 ± 0,41 µg/mL) et le BHA (IC<sub>50</sub> : 6,14 ± 0,41 µg/mL). En revanche, la fraction NBJO a montré une activité antioxydante relativement plus faible, avec une IC<sub>50</sub> de 73,55 ± 0,67 µg/mL, ce qui en fait l'extrait le moins efficace parmi ceux testés dans le test DPPH. La comparaison des résultats met en évidence que l'huile de cade possède une activité antiradicalaire supérieure à celle des fractions, et l'activité de la fraction EAJO est plus élevée que celle de NBJO. Cette variabilité dans l'efficacité antioxydante au sein d'extraits issus de la même plante pourrait être attribuée aux méthodes et aux types de solvants utilisés pour l'extraction. Cette distinction met en lumière l'impact significatif de la composition phénolique sur leur capacité à neutraliser les radicaux libres.

**Tableau 6:** Activité antiradicalaire par le test DPPH

Extraits/ Standards	% Inhibition							IC <sub>50</sub> µg/mL
	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
<b>HC</b>	31,49± 0,38	57,39± 0,90	78,65± 0,19	86,21±1,15	86,50±0,34	87,22±0,07	88,24±0,77	24,29±0,37
<b>EAJO</b>	Na	3,06± 0,22	7,11± 0,11	10,40±0,22	25,54±0,43	46,25±0,11	73,70±0,22	30,36±0,20
<b>NBJO</b>	4,36± 0,32	6,19± 0,11	12,92± 0,54	19,88±0,86	45,80±0,32	60,93±0,54	79,66±0,22	73,55±0,67
<b>BHT</b>	76,55± 0,48	79,89± 0,26	81,73±0,10	84,18±0,10	87,13±0,17	89,36±0,19	90,14±0,00	6,4±0,41
<b>BHA</b>	49,09± 0,76	72,63± 2,06	88,73±0,89	94,00±0,31	94,97±0,08	95,38±0,41	95,02±0,23	12,99±0,41
<b>α-Tocophérol</b>	37,21±1,82	81,53±1,51	89,23±0,12	89,38±0,19	89,45±0,22	89,99±0,23	89,52±0,33	13,02±5,17

Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). BHA : hydroxyanisole butylé ; BHT : hydroxytoluène butylé.

### 1.2.1.2. Test de piégeage par le radical ABTS

L'activité de piégeage des radicaux a également été évaluée en utilisant les tests ABTS. Les résultats de l'essai ABTS ont révélé que la fraction NBJO a exhibé une activité antiradicalaire supérieure, avec un pourcentage d'inhibition de 90,64 % à une concentration de 25 µg/m et une valeur IC<sub>50</sub> de 0,57 ± 0,09 µg/mL, suivie de près par la fraction AEJO, présentant une valeur IC<sub>50</sub> de 1,83 ± 0,01 µg/mL. Cette dernière se rapproche de celle de l'antioxydant standard BHT, qui était de 1,59 ± 0,03 µg/mL, démontrant ainsi la capacité remarquable de ces fractions à neutraliser les radicaux libres ABTS+. Contrairement aux résultats obtenus dans le test DPPH, l'huile de cade a enregistré pour le test ABTS une valeur IC<sub>50</sub> de 24,44 ± 1,28 µg/mL, ce qui est considéré faible comparé aux fractions NBJO et AEJO.

**Tableau 7:** Activité antiradicalaire par le test ABTS

Extraits/ Standards	% Inhibition							IC <sub>50</sub> µg/mL
	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
CO	42,79± 1,45	50,91± 0,78	64,43± 1,51	72,32±0,82	84,92±0,53	88,60±1,96	90,45±0,53	24,44±1,27
BHT	69,21±0,40	78,23±1,34	88,12±1,28	88,76±3,07	90,85±1,74	90,95±0,51	96,68±0,39	1,29±0,30
BHA	92,83±1,42	94,68±0,42	94,95±0,90	95,32±0,25	95,59±0,47	95,83±0,15	95,86±0,10	1,81±0,10
	1,5625 µg	3,125 µg	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
EAJO	46,76± 0,98	60,20± 1,59	75,64± 0,86	85,17±1,10	87,51±0,25	Na	Na	1,83±0,01
NBJO	43,03± 0,61	73,12± 0,25	85,26± 1,23	90,03±1,10	90,64±0,25	Na	Na	1,57±0,09
BHT	49,22±0,75	59,22±0,59	78,55±3,43	90,36±0,00	92,18±1,27	93,37±0,86	94,87±0,87	1,59±0,03
BHA	83,42±4,09	93,52±0,09	93,58±0,09	93,63±0,16	93,63±0,95	94,20±0,90	95,39±2,62	1,03±0,00

Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3).

BHA : hydroxyanisole butylé ; BHT : hydroxytoluène butylé. Na : pas d'absorbance.

### 1.2.1.3. Test GOR

Concernant le test GOR, il a été constaté que la fraction EAJO démontre une activité supérieure à celle de la fraction NBJO et de l'huile de cade, avec des valeurs IC<sub>50</sub> respectives de 7,10 ± 0,64 µg/mL, 9,84 ± 1,31 µg/mL et 21,93 ± 0,47 µg/mL. L'efficacité de la fraction EAJO se rapproche significativement de celle du BHA, dont la valeur IC<sub>50</sub> est de 5,38 ± 0,06 µg/mL, révélant ainsi une aptitude puissante dans le piégeage des radicaux libres.

**Tableau 8:** Activité antiradicalaire par le test GOR

Extraits/ Standards	% Inhibition							IC <sub>50</sub> µg/mL
	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
HC	36,30±0,84	56,87±0,26	83,74± 2,72	89,09±0,98	90,27±0,08	90,61±0,06	Na	21,92±1,27
EAJO	47,07±0,46	80,63± 1,03	89,12± 0,74	91,75±0,63	92,87±0,15	Na	Na	7,10 ± 0,64
NBJO	45,22±0,61	69,00±0,59	71,74±0,90	Na	Na	Na	Na	9,84 ± 1,31
	1,5625	3,125 µg	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
BHT	34,66±2,62	49,23±0,77	61,29±0,69	68,89±0,26	70,02±0,50	70,49±0,55	71,13±0,74	3,32±0,18
BHA	25,99±2,56	39,15±0,88	54,16±0,27	65,02±1,26	70,19±0,51	70,32±0,65	70,60±0,10	5,38 ±0,06

Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). BHA

: hydroxyanisole butylé ; BHT : hydroxytoluène butylé. Na : pas d'absorbance.

### 2.1.1.4. Test CUPRAC

Lors de l'évaluation réalisée via le test CUPRAC, la fraction EAJO a affiché l'activité antioxydante la plus marquée, avec une valeur A<sub>0.5</sub> de 9,58 ± 0,72 µg/mL. Cette performance se rapproche des valeurs A<sub>0.5</sub> observées pour les standards antioxydants reconnus, BHT et BHA, qui sont respectivement de 5,35 ± 0,71 µg/mL et 8,97 ± 3,94 µg/mL. En contraste, la capacité antioxydante de la fraction NBJO ainsi que de l'huile de cade a été moins prononcée, présentant une valeur A<sub>0.5</sub> de 20,80 ± 1,21 µg/mL et 30,40 ± 1,52 µg/mL, respectivement. Cela indique une efficacité

antioxydante significativement plus faible de l'huile de cade comparée à celle de la fraction EAJO ainsi que celle de la fraction NBJO.

**Tableau 9** : Activité antioxydante par le test Cuprak

Extraits/ Standards	Absorbance							A <sub>0,50</sub> (µg/mL)
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
HC	0,20±0,01	0,48±0,01	0,77±0,05	1,42±0,17	2,55±0,8	3,56±0,27	4,05±0,06	30,40±1,52
EAJO	0,54±0,01	0,89±0,02	1,42±0,03	2,57±0,13	3,50±0,04	3,65±0,20	3,90±0,05	9,58±0,72
NBJO	0,38±0,05	0,54±0,01	0,96±0,11	1,46±0,07	2,60±0,04	3,69±0,35	3,99±0,09	20,80±1,21
BHA	1,12±0,05	1,95±0,31	3,14±0,46	3,58±0,42	3,35±0,20	3,77±0,19	3,92±0,13	5,35±0,71
BHT	1,41±0,03	2,22±0,05	2,42±0,02	2,50±0,01	2,56±0,05	2,86±0,07	3,38±0,13	8,97±3,94

Les valeurs A<sub>0,50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). BHA : hydroxyanisole butylé ; BHT : hydroxytoluène butylé.

### 1.2.1.5. Test du pouvoir réducteur

Dans l'évaluation du pouvoir réducteur, l'action des antioxydants, servant de réducteurs, est illustrée par la réduction du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> via la méthode au ferrocyanure de potassium. Cette approche met en lumière les capacités de l'huile de cade et des fractions EAJO et NBJO comme donneurs d'électrons, révélant une activité antioxydante notable. En comparaison avec le standard d'acide ascorbique, qui présente une valeur A<sub>0,5</sub> de 6,73 ± 1,15 µg/mL, l'extrait EAJO a exhibé un potentiel réducteur remarquable, avec une valeur A<sub>0,5</sub> de 12,67 ± 0,5 µg/mL. L'huile de cade, quant à elle, a démontré une activité modérée avec un IC<sub>50</sub> de 19,40 ± 0,45 µg/mL.

**Tableau 10** : Activité antioxydante par le test du pouvoir réducteur

Extraits/ Standards	Absorbance							IC <sub>50</sub> µg/mL
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
HC	0,12±0,01	0,20±0,01	0,33±0,02	0,63±0,03	0,77±0,01	1,25±0,07	2,39±0,35	19,40±0,45
EAJO	0,24±0,03	0,37±0,01	0,49±0,00	0,78±0,04	1,54±0,33	1,93±0,11	2,97±0,18	12,67±0,51
NBJO	0,17±0,02	0,26±0,02	0,32±0,03	0,60±0,06	0,78±0,00	1,43±0,13	1,94±0,19	23,44±0,57
A. ascorbique	0,35±0,05	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,37±0,20	1,44±0,21	6,77±1,15
α-Tocophérol	0,11±0,00	0,16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	1,81±0,09	34,93±2,38

Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). \* Composés de référence.

### 1.2.1.6. Analyse de la réduction du fer métallique évaluée par le dosage à la phénanthroline et le dosage des nanoparticules d'argent (SNP)

L'évaluation de la réduction du fer métallique a été effectuée via le test de la phénanthroline. Comme indiqué dans le **tableau 11**, l'activité antioxydante la plus élevée a été enregistrée pour la fraction NBJO, avec un IC<sub>50</sub> de 2,09 ± 0,57 µg/mL, suivie de près par la fraction EAJO, avec un IC<sub>50</sub> de 2,77 ± 0,28 µg/mL. En revanche, l'huile de cade a montré l'activité antioxydante la plus faible, avec un

IC<sub>50</sub> de 11,52 ± 0,48 µg/mL. De plus, NBJO a démontré une capacité antioxydante supérieure à celle du standard BHT, avec un IC<sub>50</sub> de 2,12 ± 0,04 µg/mL. Dans le test utilisant des nanoparticules d'argent, la fraction EAJO s'est révélée plus efficace que la fraction NBJO, présentant une valeur A<sub>0.5</sub> de 16,11 ± 1,18 µg/mL, proche à celle du standard d'acide ascorbique, qui avait une A<sub>0.5</sub> de 7,14 ± 0,05 µg/mL. Le NBJO a affiché une valeur A<sub>0.5</sub> de 220,00 ± 3,54 µg/mL, tandis que l'huile de cade n'a exprimé aucune activité (**Tab. 12**). Il est à noter que les résultats des tests GOR, CUPRAC, à la phénanthroline et les nanoparticules d'argent sont rapportés pour la première fois pour l'espèce *J. oxycedrus* originaire d'Algérie, car jusqu'à présent, aucune étude similaire n'avait été réalisée.

**Tableau 11:** Activité antioxydante par le test Phénanthroline

Extraits/ Standards	Absorbance							A <sub>0.5</sub> µg/mL
	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
HC	0,42± 0,01	0,45± 0,01	0,51± 0,02	0,54± 0,01	0,64±0,01	0,73±0,02	0,95±0,15	11,52±0,48
EAJO	0,53±0,08	0,99± 0,07	1,74± 0,33	2,46±0,50	3,77±0,32	4,09±0,07	4,11±0,13	2,77±0,28
NBJO	0,50±0,02	0,69± 0,02	0,87± 0,17	1,39±0,32	2,59±0,75	3,79±0,34	4,03±0,02	2,09±0,57
	<b>0,78125 µg</b>	<b>1,5625 µg</b>	<b>3,125 µg</b>	<b>6,25 µg</b>	<b>12,5 µg</b>	<b>25 µg</b>	<b>50 µg</b>	<b>A<sub>0.5</sub> µg/mL</b>
BHA	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	0,93±0,07
BHT	0,47±0,01	0,47±0,01	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	2,24±0,17

Les valeurs A<sub>0.5</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). BHA : hydroxyanisole butylé ; BHT : hydroxytoluène butylé. Na : pas d'absorbance.

**Tableau 12 :** Activité antioxydante par le test nanoparticules d'argent (SNP)

Extraits/ Standards	Absorbance							A <sub>0.5</sub> (µg/mL)
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
HC	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	/
EAJO	0,48±0,01	0,61± 0,04	0,64± 0,04	0,85±0,02	0,99±0,07	1,11±0,01	1,23±0,01	16,11±1,18
NBJO	Na	Na	0,33± 0,01	0,40±0,04	0,42±0,10	0,80±0,04	0,99±0,05	220,00±3,54
	<b>1,5625µg</b>	<b>3,125µg</b>	<b>6,25µg</b>	<b>12,5µg</b>	<b>25µg</b>	<b>50µg</b>	<b>100µg</b>	<b>A<sub>0.5</sub> (µg/ml)</b>
A. ascorbique	0,24±0,00	0,32±0,01	0,45±0,01	0,75±0,01	1,22±0,02	1,90±0,03	2,35±0,01	7,14±0,00
Trolox	0,17±0,00	0,22±0,01	0,23±0,00	0,30±0,01	0,43±0,01	0,64±0,03	1,04±0,01	34,17±1,23

Les valeurs A<sub>0.5</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). BHA : hydroxyanisole butylé ; BHT : hydroxytoluène butylé. Na : pas d'absorbance.

### 1.3. Activité enzymatique

L'évaluation de l'activité enzymatique de l'huile de cade et des fractions obtenues de *Juniperus oxycedrus* a été réalisée par l'inhibition de quatre enzymes.

#### 1.3.1. Activité anti Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase

L'activité anticholinestérase a été évaluée en utilisant la méthode d'**Ellman**, avec l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), dans le but de déterminer leur capacité à inhiber l'AChE. Les résultats, illustrés dans le tableau ci-dessous, exposent l'activité inhibitrice de l'AChE des extraits, en

comparaison avec celle de la galantamine, un médicament couramment utilisé dans la prise en charge des stades précoces de la maladie d'Alzheimer légère.

Selon ces résultats présentés dans le **tableau 13**, il est constaté que tous les extraits inhibent l'AChE à diverses concentrations. Cette inhibition croissante avec l'augmentation des doses indique une réponse dose-dépendante pour chacun des extraits testés.

Parmi ces extraits, la Fraction EAJO a démontré la plus forte activité inhibitrice de l'AChE, avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 14,60±0.98µg/mL, ce qui la rend seulement deux fois moins active que la galantamine, dont l'IC<sub>50</sub> est de 6.27±1.15 µg/mL. L'huile de cade, de son côté, a affiché une activité inhibitrice modérée, avec un IC<sub>50</sub> de 61,08±1,19, observable uniquement à des concentrations élevées (200µg-800µg). Cela pourrait suggérer une concentration plus faible en composés inhibiteurs de l'AChE ou une affinité réduite de ces composés pour l'enzyme cible, comparativement à l'extrait EAJO et à la galantamine. En revanche, la fraction NBJO a révélé une activité anticholinestérasique faible, avec un pourcentage d'inhibition significativement inférieur à celui de la galantamine.

**Tableau 13:** Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

Extraits/ Standards	% inhibition de l'acétylcholinestérase							IC <sub>50</sub> µg/mL
	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
HC	Na	Na	Na	Na	35,88±1,13	79,37±0,66	95,40±0,47	61,08±1,19
EAJO	14,92±0,84	27,09±0,20	44,44±0,55	63,75±0,40	74,94±2,63	87,49±1,93	94,74±1,39	14,60±0.98
NBJO	0,17±0,02	0,26± 0,02	0,32± 0,03	0,60±0,06	17,66±1,93	37,22±1,83	47,73±0,35	201,22±0.88
Galantamine	35,93±2,28	43,77±0.00	68,50±0,31	80,69±0,41	85,78±1,63	91,80± ,20	94,77± 0,34	6,27±1,15

Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). Na : pas d'absorbance.

### 1.3.2. Activité anti-diabétique via l'inhibition de l'alpha amylase

Les résultats, présentés dans le **tableau 14**, montrent l'activité inhibitrice de l'α-amylase par l'huile de cade, EAJO et NBJO, comparée à celle de l'Acarbose, un médicament antidiabétique utilisé dans le traitement du diabète de type 2. D'après les données recueillies, il est observé que les extraits ont manifesté une faible activité inhibitrice de l'α-amylase.

Les fractions EAJO et NBJO ont révélé une faible activité, avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 639,48±7.43µg/ml et 975,83±15.95µg/ml respectivement, ce qui est nettement moins efficace comparé à l'Acarbose qui présente un IC<sub>50</sub> de 365,93±1,70. En revanche, l'huile de cade a révélé l'activité la plus élevée parmi les extraits testés, avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 95,19±2,37 µg/ml, surpassant même celle de l'Acarbose. Ceci indique une excellente activité antidiabétique.

**Tableau 14** : Activité inhibitrice de l'α-amylase

Extraits/ Standards	% Inhibition							
	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
HC	Na	24,88±1,61	25,57±3,52	35,19±0,63	53,36±1,00	80,89±2,33	98,38±4,05	95,19±2,37
EAJO	Na	Na	Na	15,01±0,38	22,85±0,19	34,67±0,24	37,79±0,09	639,48±7,43
NBJO	Na	Na	Na	Na	19,23±0,09	22,41±0,52	29,75±0,09	975,83±15,95
	62,5 µg	125 µg	250 µg	500 µg	1000 µg	2000 µg	4000 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Acarbose	7,76±0,17	8,08±0,30	9,46±0,11	10,70±0,96	31,81±2,89	37,21±3,54	53,05±1,59	365,93±1,70

Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). Na : pas d'absorbance.

### 1.3.3. Activité anti uréase

Les résultats, présentés dans le tableau ci-dessous, montrant l'activité inhibitrice de l'uréase par l'huile de cade, EAJO et NBJO, en comparaison avec celle de la Thiourée, un inhibiteur bien connu de l'uréase, été utilisé comme composé de référence. D'après ces résultats affichés dans le **tableau 15**, il est observé que les extraits ont manifesté une faible activité inhibitrice de l'uréase. La fraction AEJO et l'huile de cade ont révélé une faible activité, avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 245,77±3.75/ml et 340,91±9,82µg/ml respectivement, ce qui est considérablement moins efficace comparé à la Thiourée, dont l'IC<sub>50</sub> est de 11.57±0.68 µg/mL. Par ailleurs, NBJO a démontré l'activité la plus faible parmi les extraits étudiés.

**Tableau 15** : Activité inhibitrice de l'uréase

Extraits/ Standards	% Inhibition							
	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
HC	Na	Na	25,36±2,55	28,89±1,47	43,05±1,47	53,28±0,58	NA	340,91±9,82
EAJO	Na	8,20±0,87	27,27±1,32	35,68±0,32	42,50±1,23	67,76±1,72	84,86±2,10	245,77±3,75
NBJO	Na	Na	Na	Na	6,47±3,60	22,50±5,16	48,42±2,25	819,60±18,68
	3,125 µg	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
Thiourée	4,49±0,78	19,85±2,74	55,64±4,24	94,17±0,15	98,42±0,19	98,49±0,41	98,90±0,05	11.57±0.68

Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). Na : pas d'absorbance.

### 1.3.4. Activité anti hyperpigmentation via l'inhibition de la tyrosinase

Les effets inhibiteurs de l'huile de cade et des fractions de *Juniperus oxycedrus* sur l'activité de la tyrosinase sont présentés dans le **tableau 16**. Parmi ceux-ci, uniquement la fraction EAJO a réussi à inhiber l'activité de la tyrosinase, bien que modestement, avec un IC<sub>50</sub> de 206,44±18.48, comparativement à l'acide kojique (IC<sub>50</sub>=25,23±0,78µg/ml), reconnu principalement pour son efficacité contre la tyrosinase et utilisé comme agent éclaircissant. En revanche, l'huile de cade et la fraction NBJO n'ont montré aucune activité inhibitrice.

**Tableau 16 : Activité inhibitrice de la tyrosinase**

Extraits/ Standards	% Inhibition							IC <sub>50</sub> µg/mL
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
HC	Na	Na	Na	Na	na	na	na	/
EAJO	Na	Na	Na	Na	12,02±6,37	25,77±5,03	48,54±2,35	206,44±18,48
NBJO	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	/
	3.125 µg	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
Acide Kojique	6,91±0,75	19,22±0,75	36,29±2,92	49,46±2,24	58,32±0,37	64,36±0,65	66,95±2,24	25.23 ± 0.78

Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). Na : pas d'absorbance.

**Tableau 17: Récapitulatif de l'activité enzymatique**

Extraits/ Standards	Anti -AChE IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Anti-α Amylase IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Anti-Tyrosinase IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Anti-Urease IC <sub>50</sub> (µg/mL)
HC	61,08±1,19	95,19±2,37	NA	340,91±9,82
AEJO	14.60 ± 0.98	639.48 ± 7.43	206.44 ± 18.48	245.77 ± 3.75
NBJO	201.22±1.88	975.83 ±15.95	NA	>200
Galantamine	6.21±0.12	NT	NT	NT
Acarbose	NT	365,93±10,70	NT	NT
Acide Kojique	NT	NT	25.23 ± 0.78	NT
Thiourée	NT	NT	NT	11.35±0.3

Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3). Na : pas d'absorbance. NT : non testé.

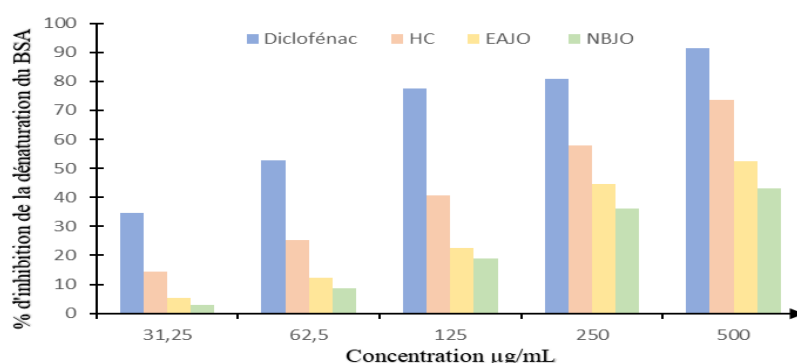
#### 1.4. Activité anti-inflammatoire

Comme illustré sur le **tableau 18** et la **figure 37**, l'effet anti-inflammatoire *in vitro* des extraits, y compris l'huile de cade, NBJO, et EAJO, a été évalué en utilisant le modèle de dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA). À différentes concentrations, l'activité inhibitrice de ces extraits contre la dénaturation protéique induite par la chaleur a été comparée à celle de molécules de référence diclofénac. À 500 µg/mL, l'huile de cade a exhibé une action anti-inflammatoire significative avec un pourcentage d'inhibition de 73,62%, proche à celui du diclofénac, qui est de 91,29%. Dans ce contexte, les résultats pour AEJO et NBJO révèlent des performances d'inhibition respectives de 52,59% et 43,01%, illustrant une capacité modérée à inhiber la dénaturation protéique, comparativement à l'huile de cade

**Tableau 18 : Effet de l'huile de cade et des fractions de feuilles de *Juniperus oxycedrus* sur la dénaturation de l'albumine (BSA)**

Fractions/standard	Inhibition de la dénaturation du BSA
	IC <sub>50</sub> µg/mL
HC	197,55±3,479
AEJO	430.27±8.22
NBJO	586.12±11.38
Diclofénac	61.87±0.49

Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en Moyenne ± Écart Type (n=3).



**Figure 37:** Pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA par les différents extraits du *juniperus oxycedrus* en comparaison avec le diclofénac

### 1.5. Activité photoprotection

Dans cette étude, l'efficacité photoprotectrice de l'huile de cade et des fractions issues de *J. oxycedrus* a été évaluée en mesurant leur facteur de protection solaire (FPS). Les niveaux de FPS ont été classés de minimal à maximal pour évaluer la capacité de protection contre les rayons UV-B nocifs. Les catégories de protection, selon la **Recommandation de la Commission Européenne 2006**, varient d'une protection minimale (FPS de 6 à 10) à une protection modérée (FPS de 15 à 25), une protection élevée (FPS de 30 à 50) et une protection maximale (FPS supérieur à 50) (**Voir annexe 24**). La mesure du FPS a été réalisée par spectrophotométrie, en utilisant l'équation développée par **Mansur et al. (1986)**. Les résultats, illustrés dans le **tableau 19**, montrent l'activité photoprotectrice de l'huile de cade, de EAJO et de NBJO, comparée à celle des crèmes solaires commercialisées par Vichy et Nivea (**Tab. 20**). Il ressort de ces résultats que les extraits ont montré une activité allant de modérée à élevée en termes de protection. La fraction NBJO et l'huile de cade ont montré des niveaux de protection élevés, avec des valeurs de FPS de  $31,71 \pm 0,31$  et  $30,74 \pm 0,28$  respectivement. Cependant, ces valeurs sont inférieures à celles des produits de référence Nivea et Vichy, qui présentent des FPS de  $50,11 \pm 0,53$  et  $44,23 \pm 0,35$ . D'autre part, EAJO a révélé une activité modérée, avec un FPS de  $22,62 \pm 1,52$ .

**Tableau 19 :** Valeurs du facteur de protection solaire des extraits du *J. oxycedrus*

$\lambda$ (nm)	EE x I (nm)	AEJO		NBJO		HC	
		Abs	SPF	Abs	SPF	Abs	SPF
290	0.015	$3,095 \pm 0,12$	$0,464 \pm 0,01$	$3,088 \pm 0,02$	$0,463 \pm 0,03$	$3,113 \pm 0,05$	$0,466 \pm 0,00$
295	0.0817	$2,837 \pm 0,11$	$2,318 \pm 0,09$	$3,156 \pm 0,02$	$2,580 \pm 0,02$	$3,065 \pm 0,02$	$2,504 \pm 0,02$
300	0.2874	$2,485 \pm 0,16$	$7,142 \pm 0,46$	$3,161 \pm 0,04$	$9,084 \pm 0,11$	$3,109 \pm 0,04$	$8,936 \pm 0,13$
305	0.3278	$2,193 \pm 0,16$	$7,190 \pm 0,53$	$3,187 \pm 0,01$	$10,45 \pm 0,04$	$3,075 \pm 0,06$	$10,079 \pm 0,22$
310	0.1864	$1,990 \pm 0,14$	$3,709 \pm 0,27$	$3,189 \pm 0,05$	$5,945 \pm 0,09$	$3,071 \pm 0,06$	$5,724 \pm 0,12$
315	0.0837	$1,804 \pm 0,13$	$1,510 \pm 0,11$	$3,144 \pm 0,01$	$2,631 \pm 0,01$	$2,987 \pm 0,01$	$2,500 \pm 0,01$
320	0.018	$1,589 \pm 0,11$	$0,286 \pm 0,02$	$3,084 \pm 0,06$	$0,555 \pm 0,01$	$2,95 \pm 0,02$	$0,531 \pm 0,00$
<b>Total</b>	1	<b><math>22,62 \pm 1,52</math></b>		<b><math>31,71 \pm 0,31</math></b>		<b><math>30,74 \pm 0,28</math></b>	

$\lambda$  : La longueur d'onde, **EE** : spectre d'effet érythémal, **I** : spectre d'intensité solaire, **Abs** : absorbance du produit de protection solaire.

**Tableau 20** : Valeurs du facteur de protection solaire des crèmes solaires commercialisées

$\lambda$ (nm)	EE x I (nm)	Nivea		Vichy	
		Abs	SPF	Abs	SPF
290	0.015	5,141± 0,00	0,771 ± 0.00	4.457 ± 0.02	0.668 ± 0.00
295	0.0817	5,492± 0,00	4,486± 0,00	4.464 ± 0.02	3.647 ± 0.01
300	0.2874	5,01± 0,00	14,398± 0,00	4.409 ± 0.03	12.671±0.10
305	0.3278	4,933± 0,07	16,172± 0,23	4.416 ± 0.03	14.47± 0.11
310	0.1864	5,021± 0,15	9,35± 0,28	4.428 ± 0.04	8.25 ± 0.08
315	0.0837	4,827±0,00	4,040± 0,00	4.415 ± 0.02	3.704 ± 0.01
320	0.018	4,880± 0,11	0,878± 0,02	4.49 ± 0.05	0.808 ± 0.00
<b>Total</b>	1		50,11±0,53		44.23 ± 0.35

$\lambda$  : La longueur d'onde, EE : spectre d'effet érythémal, I : spectre d'intensité solaire, Abs : absorbance du produit de protection solaire.

## 2. Discussion de la partie expérimentale *in vitro*

L'extraction de principes actifs à partir de matières végétales suscite un vif intérêt de nos jours, en grande partie grâce à leur potentiel biologique. L'isolation de polyphénols et de flavonoïdes s'effectue à l'aide de divers solvants. Il est largement reconnu dans la littérature scientifique que le méthanol offre les meilleurs rendements d'extraction. Cependant, en raison de sa toxicité, son utilisation est restreinte dans les applications industrielles. Pour surmonter cet obstacle, le méthanol est souvent remplacé par des solvants organiques moins toxiques qui offrent également des rendements d'extraction satisfaisants. L'éthanol, le n-butanol, l'acétate d'éthyle et l'éther de pétrole figurent parmi ces alternatives, sélectionnés pour leur sécurité et leur efficacité (**Bartnick et al., 2006**). L'objectif de l'emploi de différents solvants, possédant des polarités variées, est de maximiser l'extraction de composés bioactifs spécifiques depuis la source végétale et d'en localiser les principes actifs. L'utilisation de l'acétate d'éthyle vise à recueillir un extrait enrichi en composés polaires, tandis que l'extraction avec le n-butanol permet d'obtenir un extrait concentré en composés très polaires.

Concernant les rendements des fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol obtenus à partir des feuilles de *Juniperus oxycedrus*, les valeurs étaient respectivement de 5,3 % et 12 %, respectivement (**Tab. 05**). Ces quantités diffèrent de celles obtenues dans l'étude de **Mazari (2008)**, qui a rapporté pour les feuilles de *Juniperus oxycedrus* un rendement plus bas, à 2,66 %, pour la fraction d'acétate d'éthyle (AcOEt), et un rendement significativement plus élevé de 14 % pour la fraction de n-butanol (n-buOH). En revanche, dans l'étude de **Djellouli et al. (2022)**, un rendement de 9 % et de 14 % a été observé respectivement pour l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique des feuilles de *J. oxycedrus*. Il est important de noter que le rendement de l'extraction est influencé par plusieurs facteurs. En effet, outre la variation inter-spécifique, il existe également une variation intra-spécifique. La première peut être expliquée par des facteurs génétiques et environnementaux

(**Siddhuraju et Becker, 2003**), tandis que la seconde peut être due à la méthode d'extraction et aux conditions dans lesquelles la procédure est réalisée, telles que la température, le pH et le temps d'extraction (**Do et al., 2013**).

Les polyphénols, largement répandus en tant que métabolites secondaires dans les plantes, constituent la principale source d'antioxydants naturels. Grâce à leurs groupes hydroxyles, ils peuvent neutraliser efficacement les radicaux libres (**Khan et al., 2019**). Ces antioxydants primaires, incluant les acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilbènes et coumarines, entre autres, ont démontré plusieurs propriétés thérapeutiques réduisant le risque de cancer et de diabète, présentant des propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques, antibactériennes et antivirales (**Pandey et Rizvi 2009**).

Dans ce contexte, de nombreuses recherches phytochimiques et pharmacologiques ont mis en évidence l'abondance de polyphénols et de flavonoïdes dans l'espèce de *Juniperus oxycedrus* ainsi que sa capacité antioxydante (**Loizzo et al., 2007 ; Taviano et al., 2013 ; Fadel et al., 2016 ; Miceli et al., 2020 ; Meringolo et al., 2022**).

Les études concernant l'ensemble des composés bioactifs de l'huile de cade sont rares, voire absente dans la littérature scientifique. L'attention de la recherche s'est principalement portée sur l'analyse des extraits de *Juniperus oxycedrus* et de leur huile essentielle. Face à cet flux de données se concentrant uniquement sur les extraits de *Juniperus oxycedrus* et leur huile essentielle, notre intérêt s'est porté sur l'évaluation des contenus bioactifs totaux des extraits d'huile de cade provenant du bois et des branches de *Juniperus oxycedrus*, ainsi que sur l'examen de leurs caractéristiques pharmacologiques. En outre, nous avons également exploré les fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol de la même espèce, afin d'enquêter sur leurs potentiels.

Dans la littérature, une variété de résultats a été documentée concernant le contenu bioactif des parties aériennes de divers extraits de *J. oxycedrus*. Cependant, les études portant spécifiquement sur les fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol sont peu rapportées.

Selon les recherches précédentes, la concentration en polyphénols rapportée par **Chaouche et al. (2013)** est de  $133,08 \pm 4,1$  mg EAG/g dans l'extrait hydro-méthanolique des aiguilles de *J. oxycedrus* collectées à Tlemcen. Ce chiffre apparaît faible en comparaison avec celui que nous avons mesuré dans notre fraction EAJO ( $252,56 \pm 3,91$  µg EAG/mg). De la même manière, l'extrait éthanolique des parties aériennes de *J. oxycedrus* de Batna, étudié par **Fadel et al. (2016)**, a révélé un contenu en flavonoïdes de  $23,11 \pm 3,22$  µg EQ/mg... une valeur également inférieure à celle que nous avons observée dans nos extraits. À l'opposé, **Ben Mrid et al. (2019)** ont identifié des concentrations nettement supérieures, avec  $292,52 \pm 11$  mg EAG/g pour les polyphénols et  $54,58 \pm 2,98$  mg EQ/g pour les flavonoïdes, dans l'extrait méthanolique de l'espèce marocaine de *J. oxycedrus*. Dans une

veine similaire, **Djellouli et al. (2022)**, ont trouvé un taux élevé de flavonoïdes ( $90,56 \pm 2,23$  mg EQ/g) dans l'extrait méthanolique des feuilles de *J. oxycedrus* collectées à Mascara, ce qui dépasse largement nos propres résultats. Les variations entre ces résultats peuvent s'expliquer par la méthode d'extraction utilisée, les conditions environnementales spécifiques ou le stade de développement de la plante (**Djellouli et al., 2022**).

À notre connaissance, aucune étude identifiant la teneur en polyphénols et flavonoïdes jusqu'à présent de l'huile de cade n'a été publiée jusqu'à ce jour.

D'après notre étude réalisée par UPLC LC-MS/MS, il est apparu des variations dans le pourcentage des composés identifiés à travers les différentes fractions dérivées de *J. oxycedrus*. La rutine a été identifiée comme le principal flavonoïde dans les fractions EAJO et NBJO, avec des pourcentages de surface de 86,78 % et de 88,14 %, respectivement, suivis de la présence de chryisine avec des pourcentages de 11.69% et de 11.31%, respectivement.

Une étude récente menée par **Meringolo et al. (2022)** a démontré que l'(-)-épicatechine, la rutine et le quercétine-3-O-glucoside étaient les principaux constituants identifiés dans les fractions polaires de la partie aérienne de *J. oxycedrus* collecté en Italie. Dans une étude antérieure de **Yaglioglu et al. (2017)**, la rutine et la catéchine ont été identifiées comme les composés phénoliques les plus abondants dans l'extrait méthanolique de *J. oxycedrus* collecté en Turquie. De plus, une étude a révélé que l'acide chlorogénique, la naringénine et la rutine étaient les composés les plus détectés dans l'extrait méthanolique des feuilles de *J. oxycedrus* d'Algérie (**Djellouli et al., 2022**). D'autre part, l'acide salicylique, l'héspéridine, la rutine et la naringénine ont été signalés comme les composés les plus abondants dans l'extrait méthanolique obtenu de l'espèce marocaine de *J. oxycedrus* (**Ben Mrid et al., 2019**).

La comparaison du profil des composés phénoliques des fractions de feuilles EAJO et NBJO de *J. oxycedrus* dans notre étude avec ceux identifiés dans les parties aériennes de la même espèce dans des recherches antérieures a mis en évidence des variations dans les composés détectés. En effet, la rutine, la naringénine et l'héspéridine ont été précédemment détectés dans les extraits de *J. oxycedrus* (**Ben Mrid et al., 2019 ; Djellouli et al., 2022 ; Er Kemal et al., 2023**). Cependant, la catéchine, l'acide caféique, l'acide chlorogénique et l'acide gallique, détectés dans les recherches mentionnées ci-dessus (**Meringolo et al., 2022 ; Yaglioglu et Eser, 2017**), n'ont pas été trouvés dans notre étude. En contraste, la chryisine et l'acide férulique détectés dans cette étude, ont été rapportés pour la première fois dans l'extrait aqueux de *J. oxycedrus* d'Algérie par **Er Kemal et al. (2023)**. Concernant la quercétine, le bêta-carotène, la viniférine et l'acide folique, ces composés ont été détectés pour la première fois dans notre étude, bien qu'avec de faibles concentrations.

Nos résultats de composition chimique de *J. oxycedrus* ne concordaient pas entièrement avec les données existantes dans la littérature sur la même espèce, cette différence peut dériver des variations dans les espèces végétales examinées, la sélection et les types de composés standards utilisés dans les analyses. Une exploration plus approfondie utilisant une gamme plus large de composés standards dans les recherches futures pourrait potentiellement fournir une compréhension plus complète du profil chimique de *J. oxycedrus*.

En ce qui concerne l'activité antioxydante des divers extraits de *Juniperus oxycedrus*, y compris l'huile de cade, l'analyse a révélé que leur efficacité varie en comparaison avec les standards, en fonction des méthodes d'évaluation employées. Cette étude a permis de constater une variabilité significative dans la composition chimique des extraits, impactant directement leur potentialité.

Il est intéressant de noter que la capacité des extraits de *Juniperus oxycedrus* à neutraliser les radicaux libres varie proportionnellement à leur concentration, mettant en évidence l'importance de cette dernière dans l'évaluation de l'activité antioxydante. Parmi ces extraits, la fraction acétate d'éthyle s'est distinguée en affichant la meilleure activité antioxydante, surpassant les autres extraits testés. De plus, l'extrait acétate d'éthyle de *Juniperus oxycedrus* a démontré une supériorité en termes d'activité antiradicalaire, notamment dans les tests ABTS, phénanthroline, et galvinoxyl, ainsi qu'une capacité antioxydante remarquable dans la réduction du cuivre (CUPRAC), du fer (pouvoir réducteur) et les essais sur la réduction de nanoparticule d'argent (SNP). Bien que cette fraction contienne une concentration élevée en polyphénols, ce n'est pas la plus importante comparée à d'autres. Elle se distingue toutefois par la concentration la plus élevée en flavonoïdes parmi les extraits étudiés de *Juniperus oxycedrus*, soulignant ainsi son potentiel antioxydant exceptionnel. Ces fortes activités pourraient être expliquées par la nature de ses composés, en particulier la présence de flavonoïdes comme la rutine et leur interaction synergique avec d'autres composés polyphénoliques.

Les radicaux libres synthétiques DPPH et ABTS, servent couramment à mesurer les propriétés antioxydantes d'extraits végétaux. Exposées à des antioxydants, des molécules instables comme DPPH• ou ABTS•+ se transforment en structures plus stables, en captant un électron ou un atome d'hydrogène de la molécule antioxydante (**Gülçin, 2012**).

Grâce à leurs structures comportant des groupes hydroxyles, les flavonoïdes et les composés phénoliques peuvent céder des atomes d'hydrogène, neutralisant les espèces radicales et les formes réactives de l'oxygène (**Saravanan et Parimelazhagan, 2014**). Un antioxydant puissant capable de piéger les radicaux agit également comme un puissant réducteur (**Bisset et al., 2020**).

Concernant l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH, l'huile de cade a démontré une activité supérieure à celle des autres extraits et proche de celle du standard  $\alpha$ -tocophérol. Cette efficacité

pourrait être attribuée à la présence possible d'une quantité significative de molécules donneuses d'hydrogène, susceptibles de réduire la génération de radicaux et la décoloration dans les tests DPPH• (Prasad et al., 2013).

Abdellah et al. (2018) ont indiqué que l'huile de cade exprimait une IC<sub>50</sub> de 1,45 ± 0,05 µg/mL contre le radical DPPH, révélant une activité antioxydante plus élevée que nos résultats. Pour les fractions EAJO et NBJO, avec des valeurs IC<sub>50</sub> de 30,36 ± 0,20 et 73,55 ± 0,67 respectivement, leur activité antioxydante mesurée par le test DPPH pour la fraction acétate s'approche de celle rapportée en 2022 par Meringolo et al. (20,6 ± 2,3 µg/mL). Cependant, cela ne correspond pas aux résultats de recherches antérieures menées par Belhaddad et al. (2023), où les extraits d'acétate d'éthyle et de n-butanol ont démontré une forte activité de piégeage avec des valeurs IC<sub>50</sub> allant de 12,24 ± 0,44 µg/mL à 27,57 ± 0,60 µg/mL, respectivement, ce qui est également supérieur à nos résultats. La diversité dans les structures des composés phénoliques eux-mêmes peut entraîner une efficacité antioxydante variable, certains composés ayant des capacités de piégeage de radicaux plus élevées que d'autres en fonction de leur structure Belhaddad et al. (2023). Ces éléments ensemble peuvent contribuer aux variations observées dans les résultats d'activité antioxydante des différents extraits de *Juniperus oxycedrus*.

Dans le même contexte, l'évaluation de l'activité de neutralisation des radicaux par le biais de test ABTS a été réalisée. Les données obtenues, illustrées dans le **tableau 09**, indiquent que la fraction EAJO affiche une forte activité radicalaire de 1,57±0,09 µg/ml, inférieure à celle du standard antioxydant BHT, qui est de 1,14 ±0,11 µg/ml. De manière cohérente, la fraction NBJO a présenté une activité avec une valeur IC<sub>50</sub> de 1,83±0,01 µg/ml, ce qui se situe à proximité des valeurs IC<sub>50</sub> du BHT et du BHA, à savoir 1,75±0,20 et 1,14±0,11 µg/ml, respectivement. Ce qui est en harmonie avec les recherches précédentes de Ben Mrid et al. (2019), qui ont établi que l'extrait méthanolique de *J. oxycedrus* était capable d'inhiber ABTS<sup>+</sup> avec une excellente un IC<sub>50</sub> de 0,12±0,00 mg/ml. En revanche, les activités ABTS mentionnées par Meringolo et al. (2022) ; Jemli et al. (2016) et Chaouche et al. (2015), respectivement à 9,3±1,3 µg/ml, 19,80 ± 0,55 µg/ml, et 90,16 ± 4,2 µg/ml, sont moins efficaces par rapport à nos résultats. À notre connaissance, l'huile de cade n'avait pas été précédemment évaluée par le test ABTS. Cependant, nos propres résultats montrent que cet extrait possède une activité antioxydante notable, plus aux moins comparable à celle des standards utilisés dans notre étude. Cette efficacité de l'huile de cade est probablement due à sa riche teneur en composés phénoliques.

En résumé, les radicaux DPPH• et ABTS•+ sont des espèces de radicaux libres qui deviennent stables en acceptant des électrons ou des molécules d'hydrogène (Gülçin, 2012). Les différents extraits de *Juniperus oxycedrus*, y compris l'huile de cade, riches en composés phénoliques et

flavonoïdes, jouent un rôle majeur dans l'interception des radicaux libres, donnant leur hydrogène à partir des groupes hydroxyles phénoliques et formant ainsi des radicaux stables qui ne participent pas à l'oxydation des lipides (**Saravanan et Parimelazhagan, 2014**). Concernant l'activité de piégeage du DPPH, qui s'est avérée faible pour les extraits AEJO et NBJO, ces derniers ont cependant montré une excellente activité avec le test ABTS. Selon **Wang et al. (1998)** il est à noter que certains composés capables de piéger le radical ABTS•+ peuvent ne pas agir de la même manière avec le radical DPPH•. Cette différence d'activité peut aussi être expliquée par la présence de tannins, des molécules de haut poids moléculaire qui pourraient diminuer la production d'ABTS•+ en inhibant l'activité du persulfate de potassium. L'efficacité de ces composés dépendrait de leur poids moléculaire, du nombre de leurs cycles aromatiques et de la disposition de leurs groupes hydroxyles. (**Hagerman et al., 1998**).

Lors de l'analyse de la capacité réductrice (test du pouvoir réducteur), la présence d'antioxydants dans les extraits à analyser entraînerait la réduction des ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ) en ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ), diminuant ainsi la concentration en ions ferriques disponibles (**Zengin et al., 2011**). Cette transformation chimique sert d'indicateur de l'activité antioxydante des extraits, puisque la capacité à réduire les ions  $Fe^{3+}$  reflète directement la présence et l'efficacité des composés antioxydants à neutraliser les espèces réactives d'oxygène et à prévenir l'oxydation (**Zengin et al., 2011**).

En comparant nos résultats concernant l'huile de cade, avec un  $EC_{50}$  de  $19.4 \pm 0.45 \mu\text{g/mL}$ , à ceux rapportés par **Abdellah et al. (2018)**, nous constatons que leur étude a mis en évidence une capacité de réduction du fer par l'huile de cade présentant une activité nettement supérieure à la nôtre, avec des valeurs d' $EC_{50}$  de  $0.15 \pm 0.020 \mu\text{l/ml}$ .

En ce qui concerne les fractions, et en se référant à nos données, **Jemli et al. (2016)** ont démontré que l'extrait aqueux des feuilles de *J. oxycedrus* marocain avait également une capacité de réduction notable, avec une valeur d' $IC_{50}$  assez proche de la nôtre, soit  $24,23 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ . En revanche, **Meringolo et al. (2022)**, **Ben Mrid et al. (2019)** et **Chaouche et al. (2013)** ont rapporté des valeurs d' $IC_{50}$  de  $99,5 \pm 3,7 \mu\text{g/ml}$ ,  $139,14 \pm 2,77 \text{ mg/ml}$  et  $290 \pm 18,3 \mu\text{g/ml}$ , respectivement, suggérant des activités antioxydantes moins prononcées par rapport à celles observées dans notre étude.

À notre connaissance, cette étude est la première dans la littérature à évaluer l'activité antioxydante des différents extraits de *Juniperus oxycedrus* en utilisant les tests du galvinoxyle, de la phénanthroline, de la réduction cuprique (CUPRAC), ainsi que la méthode des nanoparticules d'argent (SNP). Un antioxydant efficace dans le piégeage des radicaux libres agit souvent aussi comme un réducteur puissant (**Bisset et al., 2020**). Les méthodes de pouvoir réducteur et de la O-phénanthroline évaluent la capacité de l'antioxydant à convertir l'ion ferrique Fe (III), tandis que le test CUPRAC mesure la réduction de l'ion cuprique Cu (II) et la méthode SNP examine la réduction

des ions Ag<sup>+</sup> en nanoparticules d'argent sphériques par les polyphénols (**Özyürek et al., 2011 ; Özyürek et al., 2012 Agustina et al., 2015**).

Les analyses de la capacité réductrice de nos extraits ont révélé que la fraction acétate d'éthyle est la plus performante, suivie par NBJO et l'huile de cade. Ces résultats confirment que *Juniperus oxycedrus* est un agent réducteur puissant, capable non seulement de réduire les ions ferriques, mais également d'agir comme un réducteur efficace des ions cuivre et d'argent.

Pour conclure cette étude, il convient de souligner que *Juniperus oxycedrus* et ses produits dérivés représentent une source précieuse d'antioxydants naturels.

Les fractions d'acétate d'éthyle, de n-butanol et l'huile de cade examinées ont montré un spectre varié d'activités antioxydantes, à la fois puissantes et diversifiées, ce qui peut s'expliquer par leurs compositions distinctes en composés phénoliques et flavonoïdes. La diversité et l'interaction synergique entre ces composés bioactifs, connus pour leurs vertus antioxydantes et biologiques, jouent un rôle clé dans l'efficacité antioxydante de chaque fraction.

La présence de composés tels que la rutine, ainsi que la chryisine, la naringénine, l'acide férulique et la quercétine, soulignée dans diverses recherches, contribue notablement à cette activité antioxydante (**Srinivasan et al., 2007; Enogieru et al., 2018; Oršolić et al., 2022**). En outre, concernant l'huile de cade, des composés tels que les cadinènes, identifiés comme les constituants majeurs selon **Chalchat et al. (1990)**, également reconnus pour leurs propriétés antioxydantes (**Kundu et al., 2013**), enrichissent le potentiel antioxydant de cette essence.

Finalement, la richesse et la complexité des composés bioactifs dans *Juniperus oxycedrus* soutiennent son utilisation traditionnelle, encouragent son intégration dans des applications thérapeutiques, en particulier pour lutter contre le stress oxydatif.

Concernant l'inhibition de la dénaturation de la BSA, son principe repose sur le fait que l'une des caractéristiques fondamentales de l'inflammation est la dénaturation des protéines, dans laquelle Les protéines subissent une perte de leurs structures tertiaire et secondaire, en appliquant un stress externe ou des composés, tels que les ROS (**Bisset et al., 2020**). La dénaturation des protéines entraîne souvent la perte de leurs fonctions biologiques et l'induction de la réaction inflammatoire par la production d'autoantigènes, contribuant tous deux au développement de dysfonctions auto-immunes pouvant se manifester sous forme de troubles rhumatismaux et inflammatoires (**Bisset et al., 2020 ; Mouffouk et al., 2020**).

Traditionnellement, les plantes ont été utilisées pour traiter les conditions inflammatoires, suggérant qu'elles pourraient être des réservoirs pour de nouveaux composés bénéfiques dans la synthèse de médicaments pour soulager ou guérir les symptômes inflammatoires (**Mouffouk et al., 2020**).

Dans notre présente étude, nous avons examiné l'efficacité anti-inflammatoire des extraits de *J. oxycedrus* en observant leur capacité à inhiber la dénaturation des protéines BSA *in vitro*. L'observation clé de notre expérimentation repose sur la capacité des extraits étudiés, ainsi que du diclofénac sodique - un anti-inflammatoire de référence - à maintenir l'intégrité structurale des protéines, notamment de l'albumine sérique bovine (BSA). Cette capacité est déduite de l'augmentation mesurée de l'absorbance des échantillons, signalant une inhibition de la dénaturation protéique induite par la chaleur (Karthik et al., 2013).

D'après les pourcentages d'inhibition, il est évident que l'huile de cade et la fraction d'acétate d'éthyle (AEJO) étaient plus efficaces par rapport à la fraction (NBJO), mais le diclofénac sodique, étant plus puissant à des concentrations plus faibles (Fig. 37).

Selon des études antérieures de Williams et al. (2008), ils ont mis en évidence deux zones sur l'albumine sérique bovine (BSA) : une première riche en résidus de tyrosine aromatique et une seconde riche en résidus aliphatiques tels que la thréonine et la lysine. À partir de ces découvertes, ils ont suggéré que certaines molécules thérapeutiques pourraient cibler simultanément les sites riches en tyrosine et en thréonine pour moduler les voies de transduction de signal impliquées dans leur action biologique globale.

D'après la littérature, l'huile de cade est riche en sesquiterpènes actifs tels que la  $\delta$ -cadinène, et le  $\beta$ -caryophyllène, identifiés comme principaux contributeurs à son potentiel anti-inflammatoire (Chalchat et al., 1990 ; Lorençoni et al., 2020). En parallèle, les extraits d'acétate d'éthyle (EAJO) se distinguent par leur teneur en flavonoïdes et acides phénoliques (Tab. 3). L'efficacité anti-inflammatoire observée pourrait être attribuée soit à l'action individuelle de ces composés, soit à un effet synergique entre eux (Aissani, 2022). Des recherches antérieures soulignent l'importance de la  $\delta$ -cadinène, non-seulement pour ses propriétés anti-tumorales, anti-inflammatoires, et antiparasitaires (Hui et al., 2015), mais aussi parce que les huiles essentielles qui la contiennent en quantité significative manifestent une activité anti-inflammatoire notable, ont démontré une capacité à réduire les niveaux de TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , confirmant ainsi son action anti-inflammatoire dans un modèle d'induction de pleurésie par carraghénane (Barreto et al., 2016 ; Oliveira et al., 2021). En plus, le  $\beta$ -Caryophyllène se distingue par ses multiples effets biologiques, en particulier son action anti-inflammatoire qui s'exerce à travers l'inhibition de médiateurs clés tels que l'IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, COX-1, et COX-2, offrant une perspective prometteuse pour le développement de thérapies anti-inflammatoires basées sur des composés naturels (Francomano et al., 2019).

Les composants anti-inflammatoires de l'extrait de *Juniperus oxycedrus* incluent la rutine, la chrysin, l'acide férulique, la quercétine. Ces extraits seront exploités comme de nouveaux agents pharmacologiques contre les maladies inflammatoires (Enogieru et al., 2018; Oršolić et al., 2022).

Confirmant nos résultats, une étude de **Djellouli et al. (2022)** a rapporté que les extraits méthanoliques et aqueux de *J. oxycedrus* ont montré des activités anti-inflammatoires *in vitro*. Spécifiquement, à une concentration de 500 µg/mL. Leurs activités variaient entre 62,85 % et 23,35 % respectivement.

Les études précédentes ont suggéré que les propriétés anti-inflammatoires des extraits de plantes pourraient être liées à leurs capacités antioxydantes (**Djellouli et al., 2022**). En outre, des flavonoïdes tels que la rutine, la quercétine et la chrysine sont connus pour leur effet anti-inflammatoire grâce à ses capacités appréciables de piégeage des radicaux libres (**Enogieru et al., 2018; Oršolić et al., 2022**).

D'après les résultats obtenus lors de cette recherche exploratoire, il apparaît que la plante étudiée renferme des éléments actifs démontrant des capacités thérapeutiques, en particulier dans le domaine de l'anti-inflammation. Ces découvertes ouvrent la voie à la synthèse de nouvelles substances médicinales potentielles.

Concernant les activités enzymatiques, commençant par l'effet inhibiteur du *Juniperus oxycedrus* contre l'AChE. La maladie d'Alzheimer (MA), communément connue sous le nom de démence, représente un problème de santé publique mondiale, affectant environ 10 % de la population âgée dans le monde. La maladie d'Alzheimer est associée à des altérations de la neurotransmission cholinergique centrale, principalement en raison d'une déplétion du neurotransmetteur acétylcholine (**Greenberg, 2008**).

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine dans les neurones. L'acétylcholine est vitale pour le système nerveux, notamment dans l'amélioration de la mémoire (**Colović et al., 2013**). En inhibant l'AChE, les niveaux d'acétylcholine dans le système nerveux augmentent, atténuant ainsi le risque de pathologies liées au cerveau comme la maladie d'Alzheimer (**Bonesi et al., 2010**). Les études précédentes suggèrent que le stress oxydatif peut également contribuer au développement de la maladie d'Alzheimer (MA) (**Shahidi et Ambigaipalan 2015**). De plus, inhiber l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) ont été identifiés comme des stratégies puissantes pour traiter les symptômes de la maladie d' Alzheimer (**Palmer, 2011**).

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase de l'huile de cade et celle des fractions de feuilles de *J. oxycedrus* a été évaluée, et la galantamine a servi de comparaison, comme vu dans le **tableau 13**. L'EAJO et l'huile de cade ont exprimé un effet inhibiteur plus puissant contre l'AChE ( $IC_{50}$  :  $14,60 \pm 0,98$  µg/mL et  $61,08 \pm 1,19$  µg/ml). Ces résultats ont été comparés à la galantamine, qui avait un  $IC_{50}$  de  $6,27 \pm 1,15$  µg/mL, avec un  $IC_{50}$  mesuré dans EAJO plus proche du standard. D'autre part, la littérature disponible concernant l'effet inhibiteur de l'AChE des fractions de feuilles de *J.*

*oxycedrus* était rare et insuffisante. Selon les données existantes, l'huile essentielle dérivée des parties aériennes de *J. oxycedrus* collectée à Laghouat, a exprimé une activité inhibitrice de l'AChE de 65,88 % à 200 µg/ml (**Cheraif et al., 2020**). Dans la même ligne, **Öztürk et al. (2011)**, ont rapporté que l'extrait d'hexane des baies de *J. oxycedrus* poussant en Turquie était l'extrait le plus efficace contre l'AChE parmi les six autres extraits étudiés, avec une inhibition de 81,40 % à 200 µg/mL. Cependant, l'extrait éthanolique des parties aériennes du *Juniperus oxycedrus* subsp. *Badia* collecté au Portugal a montré une faible inhibition de 24,02 % à 200 µg/mL (**Tavares et al., 2012**). De même, **Orhan et al. (2011)** ont rapporté que l'extrait éthanolique dérivé des feuilles de *Juniperus oxycedrus* turque a montré une inhibition modérée de 14,65 % à 100 µg/mL, tandis que l'extrait aqueux avait une inhibition de 39,17 % à 200 µg/mL.

D'après les résultats mentionnés ci-dessus, nous pouvons conclure que notre fraction d'acétate d'éthyle a montré l'activité inhibitrice la plus efficace contre l'AChE, suggérant que cette capacité inhibitrice peut être liée aux composés phénoliques abondants, en particulier les flavonoïdes comme la chrysin, la rutine, la quercétine et l'acide férulique sont reconnus pour leurs propriétés neuroprotectrices et leurs avantages potentiels dans le traitement des maladies neurodégénératives (**Shahidi et Ambigaipalan, 2015; Enogieru et al., 2018; Mishra et al., 2021; Phadke et al., 2021**). Ces composés étaient présents en quantités variables dans les deux fractions, avec l'acide férulique exclusivement trouvé dans la fraction EAJO, qui est connu pour combattre le stress oxydatif et atténuer les maladies neurodégénératives (**Phadke et al., 2021**). Cela pourrait expliquer la plus grande efficacité de l'EAJO par rapport à la fraction NBJO. L'EAJO a également montré une capacité puissante de piégeage des radicaux, soulignant son potentiel en tant que source de composés pouvant diminuer le stress oxydatif, ce qui est significatif, car le stress oxydatif est connu pour contribuer à l'apparition et à l'avancement des maladies neurodégénératives (**Shahidi et Ambigaipalan, 2015 ; Phadke et al., 2021 ; Akbari et al., 2022**).

Le diabète sucré se caractérise essentiellement par une hyperglycémie chronique et découle souvent d'un dysfonctionnement de la production et de l'action de l'insuline (**Habtemariam et Lentini, 2015 ; Sekiou et al., 2018**). Une approche thérapeutique vitale pour la gestion de l'hyperglycémie implique l'inhibition d'enzymes clés du métabolisme des glucides, notamment l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase. Ces enzymes, actives dans la bouche et l'intestin grêle, sont vitales pour la décomposition de l'amidon en sucres plus simples (**Habtemariam et Lentini, 2015**). Inhiber l' $\alpha$ -amylase, qui catalyse l'hydrolyse de l'amidon, peut empêcher la décomposition de l'amidon et l'absorption subséquente du glucose, conduisant à des niveaux de glucose sanguin plus bas. Ce mécanisme est non-seulement bénéfique pour contrôler le diabète mais aussi précieux pour traiter l'obésité (**Mahmood, 2016**). Par conséquent, des efforts de recherche significatifs ont été dirigés

vers le développement d'inhibiteurs efficaces de l' $\alpha$ -amylase (**Habtemariam et Lentini 2015; Oboh et al., 2015; Mahmood, 2016**).

Dans l'étude actuelle, l'huile de cade a montré une activité antidiabétique notable comparée à l'acarbose, comme illustré dans le **tableau 14**. Ce résultat est renforcé par les travaux de **Loizzo et al. (2007)**, où l'huile extraite par hydrodistillation du bois de *Juniperus oxycedrus* susp. oxycedrus a également démontré une activité hypoglycémique significative, avec une  $IC_{50}$  de 3,49  $\mu$ l/ml. Loizzo et al. (2007) rapportent que les sesquiterpènes, notamment le  $\delta$ -cadinène (14,5 %) et le cis-thujopsène (9,2 %), constituent les principaux composants de cette huile essentielle, avec le  $\delta$ -cadinène comme composant majeur. Ces composés sont également présents dans l'huile de cade selon **chalchat et al. (1990)**. Par conséquent, l'effet inhibiteur de l'huile de cade sur l' $\alpha$ -amylase pourrait être liée à la présence de ces sesquiterpènes, suggérant leur potentiel rôle dans le traitement du diabète de type 2.

D'autre part, les fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol de *J. oxycedrus* ont montré une activité antidiabétique modeste comparée à celle de l'acarbose, comme le détaille le **tableau 14**. Cette efficacité relative peut s'expliquer par la présence variable de composés spécifiques. En effet, selon **Oboh et al. (2015)**, la quercétine et la rutine inhibent l'activité de l' $\alpha$ -amylase de manière dose-dépendante, la rutine étant plus efficace que la quercétine. Cette inhibition se produit par la formation de liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles dans les flavonoïdes et les groupes polaires au site allostérique de l'enzyme près du site catalytique. Cette interaction est censée modifier la structure moléculaire de l'enzyme et ses caractéristiques hydrophiles et hydrophobes, diminuant finalement son activité. Des combinaisons de rutine et de quercétine, en particulier un mélange de 75 % de rutine et 25 % de quercétine, montrent un effet synergique, augmentant davantage l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase. La faible teneur en quercétine dans ces deux fractions pourrait donc être à l'origine de leur moindre efficacité. La faible quantité en quercétin dans les deux fractions pourrait expliquer leur efficacité plus au moins faible.

En ce qui concerne l'activité inhibitrice de la tyrosinase, cette enzyme est vitale dans les étapes initiales de la mélanogénèse, processus biochimique responsable de la production de mélanine. La mélanine est le pigment qui détermine la coloration de la peau et des cheveux. Néanmoins, des déséquilibres dans la production de mélanine peuvent conduire à des conditions telles que l'hyperpigmentation ou le vitiligo, se manifestant par une pigmentation inégale de la peau (**Souilah et al., 2021**).

La recherche actuelle explorant les effets de différents extraits de *Juniperus oxycedrus*, comme illustré dans le **tableau 16**, révèle qu'uniquement la fraction d'acétate d'éthyle de *Juniperus oxycedrus* présente une activité inhibitrice sur la tyrosinase, bien que de manière limitée, avec une

concentration inhibitrice (IC<sub>50</sub>) de 206,44±18,48 µg/mL. Cette activité, quoique notable, est moins efficace comparée à celle de l'acide kojique de référence, lequel affiche une IC<sub>50</sub> de 25,23±0,78 µg/mL. Ces résultats sont confirmés par l'étude menée par **Cheraif et al. (2020)** qui est en accord avec les nôtres. Leur recherche a démontré que l'huile essentielle extraite des feuilles *J. oxycedrus*, originaire d'Algérie, manifeste également une activité inhibitrice modeste sur la tyrosinase, évaluée à 39%.

L'inhibition de l'enzyme tyrosinase, majeure pour gérer l'hyperpigmentation, est efficacement réalisée par des aldéhydes aromatiques, des acides, des flavonoïdes et des chélateurs de cuivre. La rutine particulièrement notée pour ses fortes propriétés anti-pigmentaires (**Souilah et al., 2021**). Cependant, malgré son abondance dans les fractions d'acétate d'éthyle (NBJO) et de n-butanol (NBJO), l'activité globale inhibitrice de la tyrosinase est modérée dans l'EAJO et absente dans le NBJO. Cela pourrait suggérer que dans ce contexte spécifique, l'efficacité de la rutine est influencée par des facteurs tels que la nature de son interaction au sein de la fraction, qu'elle soit synergique ou antagoniste, plutôt que l'implication d'autres molécules bioactives (**Cheraif et al., 2020**).

Finalement l'uréase, qui est une métalloenzyme trouvée dans divers organismes comme les bactéries, les champignons et les plantes, joue un rôle clé dans la conversion de l'urée en ammoniac et en carbamate, qui se décomposent ensuite en dioxyde de carbone et une deuxième molécule d'ammoniac (**Zaidi et al., 2012; Taha et al., 2018**). Cette réaction peut augmenter significativement les niveaux de pH, affectant la santé humaine. L'uréase est notamment impliquée dans des infections graves du tractus gastrique causées par des pathogènes tels que *Helicobacter pylori*. Son inhibition est donc primordiale dans le développement de traitements pour des conditions comme les ulcères et le cancer gastrique. Les inhibiteurs de l'uréase, ciblant le site actif de l'enzyme, montrent une promesse dans le traitement des infections et la mitigation des effets nocifs de l'uréase sur les organismes vivants (**Zaidi et al., 2012; Qanash et al., 2023**).

Dans le but de la recherche des inhibiteurs d'uréase, les extraits de *J. oxycedrus* ont été préparés pour l'effet d'inhibiteur de l'uréase par rapport à la thiourée. Comme illustré dans le **tableau 15**, la fraction testée EAJO a montré une faible activité inhibitrice de l'uréase avec un IC<sub>50</sub> de 245,77±3,75µg/ml, suivi par l'huile de cade avec 340,91±9,82. Ces résultats sont obtenus pour la première fois avec l'espèce *J. oxycedrus*. Aucune étude portant sur ces aspects n'a été réalisée auparavant. Une grande variété d'inhibiteurs d'uréase ont été identifiés dans les plantes, y compris les terpénoïdes, les polyphénols et les alcaloïdes. Ces composés agissent soit en concurrençant l'urée, le substrat, soit en chélatant le Nickel, un cofacteur essentiel pour l'enzyme. Parmi ces inhibiteurs, la rutine était le composé principal dans les fractions testées et a démontré la capacité d'inhiber l'uréase, affichant une valeur de IC<sub>50</sub> de 97,8 µg/mL (**Qanash et al., 2023**).

Quant à l'activité photoprotectrice, l'utilisation des écrans solaires comme agents de protection contre les UV est devenue très populaire, principalement pour leur capacité à absorber, ou disperser les rayons du soleil. Le Facteur de Protection Solaire (FPS) est un indicateur essentiel de leur efficacité contre les coups de soleil, les valeurs FPS plus élevées signifiant une meilleure protection (**Mishra et al., 2011**). Simultanément, une exposition prolongée aux radiations UV, surtout aux UV-B (280–320 nm), accroît le risque de maladies cutanées comme le cancer et les réactions photo-allergiques. Les recherches récentes s'orientent vers les substances naturelles comme alternatives potentielles de crèmes solaires, grâce à leurs propriétés d'absorption des UV et antioxydantes. De manière notable, une corrélation significative a été établie entre les valeurs de FPS et la teneur en composés phénoliques dans les extraits de plantes, comme rapporté par **Ebrahimzadeh et al. (2014)**, renforçant ainsi la crédibilité de ces composés naturels dans les applications de protection solaire. Les valeurs du facteur de protection solaire (FPS) de diverses fractions sont présentées dans le **tableau 19**. La fraction NBJO a montré la plus haute valeur FPS à  $31,71 \pm 0,31$ , suivie par l'huile de cade, qui a un FPS de  $30,74 \pm 0,28$ . L'activité inhibitrice observée peut être attribuée aux effets photoprotecteurs de composés tels que la rutine, la quercétine, la chryisine, l'acide férulique et le bêta-carotène (**Saewan et Jimtaisong 2013; Stevanato et al., 2014; Freitas et Gaspar 2016**). Les classifications FPS sont catégorisées en quatre niveaux : bas (FPS 6-15), moyen ou modéré (FPS 15-30), élevé (FPS 30-50) et très élevé (FPS > 50). Selon cette classification, l'huile de cade et la fraction NBJO tombent dans la catégorie d'activité de protection solaire élevée, tandis que la fraction EAJO est classée comme ayant une activité de protection solaire modérée. Comparativement, les extraits méthanolique des feuilles de *J. phoenicia* ont montré une activité de protection solaire modérée avec un SPF de  $26,13 \pm 1,73$ , s'alignant étroitement sur les résultats de cette étude (**Telaidji, 2018**). En conclusion, l'étude souligne que *Juniperus oxycedrus*, collecté à Jijel, est une source naturelle prometteuse pour traiter le diabète et les troubles cutanés en raison de ses activités inhibitrices de l' $\alpha$ -amylase, photoprotectrice et inhibitrices de la tyrosinase. L'huile de cade ainsi que les fractions de feuilles d'acétate d'éthyle et de n-butanol sont riches en composés phénoliques, offrant de fortes propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Ces résultats soutiennent son utilisation en médecine traditionnelle. De plus, l'étude souligne l'importance de *J. oxycedrus* dans le développement de produits pharmaceutiques pour combattre les troubles neurodégénératifs, grâce à sa grande activité anticholinestérase. Il est conclu que les composés bioactifs isolés de la fraction d'acétate d'éthyle pourraient offrir des avantages thérapeutiques significatifs, en particulier dans les maladies neurodégénératives et antidiabétiques, ainsi que l'huile de cade pourrait offrir des avantages anti-inflammatoires significatifs, méritent des investigations *in*

*vivo* supplémentaires pour confirmer leur toxicité et leur efficacité et pour explorer leur potentiel thérapeutique complet.

### 3. La 2<sup>er</sup> partie expérimentale (*in vivo*)

#### 3.1. Variations des paramètres physiologiques, hématologiques et biochimiques lors de l'expérimentation *in vivo*

##### 3.1.1. Les effets de l'ovalbumine et l'huile de Cade sur la santé générale des rats, le poids corporel et le poids relatif des organes

Le **tableau 21** illustre les variations des poids corporel, absolus et relatifs des organes chez les rats. Ceux exposés à l'ovalbumine ont montré une baisse statistiquement significative de leur poids corporel ( $p < 0,05$ ), avec un accroissement de 18 % en comparaison au groupe témoin qui a enregistré une hausse de 26 %. Par ailleurs, les groupes traités à l'OVA+HC et au HC n'ont pas présenté d'augmentation statistiquement significative du poids corporel face aux groupes OVA et témoin, avec des gains de poids respectifs de 22 % et 24 %.

Quant au poids relatif des poumons, aucune différence significative n'a été notée entre tous les groupes. Cependant, une augmentation remarquable du poids relatif des poumons a été observée chez le groupe OVA par rapport au groupe témoin. Fait intéressant, le traitement à l'huile de Cade a modifié tant le poids corporel que le poids relatif des poumons dans le groupe OVA+HC.

Aucune baisse significative du poids corporel n'a été observée chez les groupes recevant une dose de 1 ml d'huile de Cade en comparaison avec le groupe témoin. De plus, aucune mortalité ni modification comportementale observable n'a été détectée dans aucun des groupes traités. L'administration d'huile de Cade n'a révélé aucun effet secondaire.

**Tableau 21:** Poids corporels des rats et poids absolus et relatifs des poumons et foie

	Témoin	OVA	HC	OVA+HC
Poids corporel initial (g)	247,33 ±2,17	246,5±2,35	248±1,32	245,5±1,48
Poids corporel final (g)	310,83±6,38	290,83±5,38*	308,5±4,21	298,66±4,50
Gain de poids (g)	+63,5 (26%)	+44,33 (18%)	+60,5 (24%)	+53,16 (22%)
Poids absolu des poumons (g)	2,459±0,46	2,706±0,41	2,444±0,2	2,517±0,19
Poids relatif des poumons (g)	0,78± 0,19	0,91±0,17	0,79±0,05	0,84±0,03
Poids absolu du foie (g)	8,264±0,63	8,439±0,519	7,464±0,65	7,567±0,32
Poids relatif du foie (g)	2,65	2,90	2,41	2,51

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM pour des groupes de 6 animaux chacun. Différence significative : groupes HC, OVA comparés au témoin (\* $p < 0,05$ ), groupe OVA+HC comparé au groupe OVA (## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ ).

## **3.2. Etude des paramètres biochimiques**

### **3.2.1. Bilan hépatique**

#### **3.2.1.1. Transaminases**

Les données présentées dans le **tableau 22** révèlent des modifications significatives dans l'activité enzymatique des transaminases. Chez les rats asthmatiques (OVA), on observe une augmentation hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) de l'aspartate aminotransférase (ASAT), ainsi qu'une augmentation significative ( $p \leq 0,05$ ) de l'alanine aminotransférase (ALAT), en comparaison avec les rats du groupe témoin. D'autre part, une réduction hautement significative de l'ASAT ( $p \leq 0,01$ ) et une diminution significative de l'ALAT ( $p \leq 0,05$ ) ont été constatées chez le groupe (OVA+HC) en comparaison avec ceux du groupe OVA, comme le montre le **tableau 22**.

#### **3.2.1.2. Phosphatase alcaline**

Suivant le **tableau 22**, l'analyse des données montre une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) de l'activité PAL chez le groupe OVA, marquant une différence hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) en comparaison avec les animaux du groupe témoin. D'autre part, l'introduction orale d'huile de cade dans le protocole de traitement a mené à une diminution notable de l'activité de la PAL chez les animaux traités, avec une significativité ( $p \leq 0,01$ ) par rapport aux animaux asthmatiques non traités (groupe OVA). Cependant, il est important de noter que, malgré cette diminution significative par rapport au groupe OVA, l'activité de la PAL dans le groupe traité avec l'huile de cade ne montre pas de différence significative en comparaison avec le groupe témoin.

#### **3.2.1.3. L'albumine**

L'analyse des données du **tableau 22** révèle des variations importantes des niveaux d'albumine entre les différents groupes. Chez le groupe OVA, qui modélise une condition asthmatique, une réduction significative des taux d'albumine a été observée par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, chez le groupe OVA+HC, qui ont reçu un traitement, une amélioration hautement significative des niveaux d'albumine a été enregistrée en comparaison avec le groupe OVA.

### **3.2.2. Bilan rénal**

#### **3.2.2.1. L'urée et la créatinine**

Selon les données du **tableau 22**, il est à noter que l'exposition à l'OVA n'a pas entraîné de changements significatifs dans la concentration sérique de créatinine. De même, les niveaux d'urée n'ont montré aucune variation significative.

**Tableau 22** : Variation dans les paramètres biochimiques du bilan rénal

Paramètres	Lots expérimentaux			
	Témoin	OVA	HC	OVA+HC
ASAT (UI/L)	179,91±9,42	240,01±19,50 (**)	180,79±18,58 (#)	189,87±7,67 (##)
ALAT (UI/L)	58,31±1,27	60,19± 1,42 (*)	54,11±2,83 (#)	57,67±1,91(#)
PAL (UI/L)	131,66±3,66	204,93±19,30(***)	144 ±7,17(##)	155,34±3,71(***)(##)
Albumine (g/L)	37,20±1,33	35,01±2,51(*)	37,93±0,94(*) (##)	38,26±1,32(##)
Créatinine (mg/MI)	6,31±0,45	6,12±0,49	6,7±0,61	6,26±0,20
Urée (g/MI)	0,56±0,04	0,54±0,03	0,57±0,06	0,59±0,07

\*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$  ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  comparativement aux rats témoins ;

#  $p \leq 0,05$  ; ##  $p \leq 0,01$  ; ###  $p \leq 0,001$  comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine

### 3.3. Effet du traitement sur les paramètres hématologiques

#### 3.3.1. Variation des leucocytes dans le sang

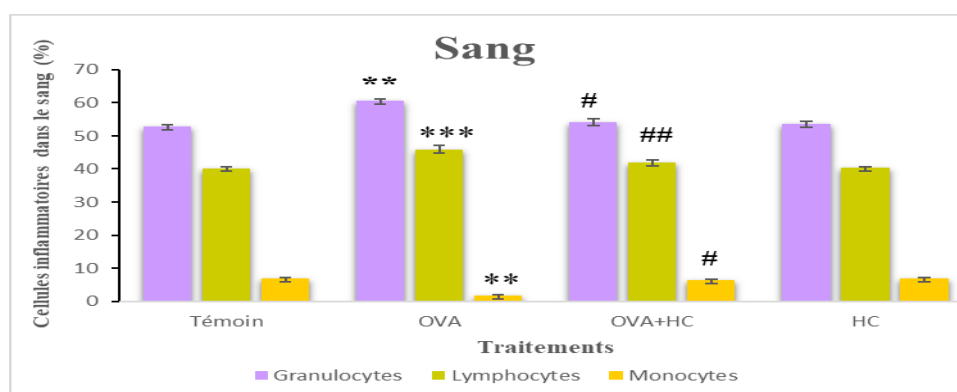
Les données présentées dans le **tableau 23** mettent en lumière les variations significatives des niveaux de leucocytes chez les rats suite à divers traitements. Chez les rats exposés à l'OVA, nous observons une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) du nombre de leucocytes par rapport aux rats témoins. Cette élévation marque une réaction inflammatoire probablement liée à la sensibilisation. Par ailleurs, une diminution significative des leucocytes a été enregistrée chez les rats traités (OVA+HC), comparativement aux rats du groupe OVA. Les résultats analysés illustrent également des changements notables dans le taux des lymphocytes sanguins parmi les différents lots de rats étudiés. La sensibilisation à l'ovalbumine, a provoqué une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) du taux des lymphocytes, comparée à celui observé dans le lot témoin. En revanche, après traitement avec l'huile de cade, on remarque une diminution hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) des taux de lymphocytes chez les rats du lot (OVA+HC) par rapport aux rats uniquement sensibilisés (OVA). Cette réduction des lymphocytes peut refléter une efficacité du traitement dans la modération de la réponse immunitaire hyperactive provoquée par l'OVA. Les résultats de l'étude révèlent aussi des variations significatives dans le taux des monocytes entre les différents groupes de rats. Il a été constaté une diminution significative ( $p \leq 0,01$ ) du taux de monocytes dans le groupe de rats sensibilisés à l'ovalbumine (OVA) en comparaison avec le lot témoin. Intéressant à noter, le traitement avec l'huile de cade chez les rats du groupe OVA+HC a entraîné une augmentation significative ( $p \leq 0,05$ ) du taux de monocytes par rapport aux rats du groupe OVA. Concernant les granulocytes, une augmentation significative ( $p \leq 0,01$ ) a été observée dans le groupe de rats OVA comparativement au lot témoin. De plus, le groupe OVA+HC a montré une réduction significative ( $p \leq 0,05$ ) du taux de granulocytes comparativement aux rats du groupe OVA.

**Tableau 23:** Variations des cellules leucocytaires au niveau du sang

Variations	Lots expérimentaux			
	Témoin	OVA	HC	OVA+HC
Leucocytes ( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	11,11 $\pm$ 0,78	13,36 $\pm$ 0,81 (***)	11,21 $\pm$ 0,84(##)	11,43 $\pm$ 0,84(##)
Lymphocytes ( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	4,5 $\pm$ 0,26	5,63 $\pm$ 0,30 (***)	4,45 $\pm$ 0,41(##)	4,76 $\pm$ 0,43(##)
Monocytes ( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	0,68 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,14 (**)	0,70 $\pm$ 0,12(##)	0,5 $\pm$ 0,10(#)
Granulocytes ( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	5,93 $\pm$ 0,57	7,31 $\pm$ 0,84 (**)	6,06 $\pm$ 0,48(##)	6,16 $\pm$ 0,46(#)

\*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$  ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  comparativement aux rats témoins ;

#  $p \leq 0,05$  ; ##  $p \leq 0,01$  ; ###  $p \leq 0,001$  comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine



**Figure 38:** Effet de l'huile de cade sur les cellules inflammatoires dans le sang

### 3.3.2. Variation des leucocytes dans le liquide Bronchoalvéolaire (LBA)

Les résultats des variations des taux de leucocytes dans le liquide bronchoalvéolaire (LBA) sont détaillés dans le **tableau 24** et illustrés dans la (**Fig. 39**).

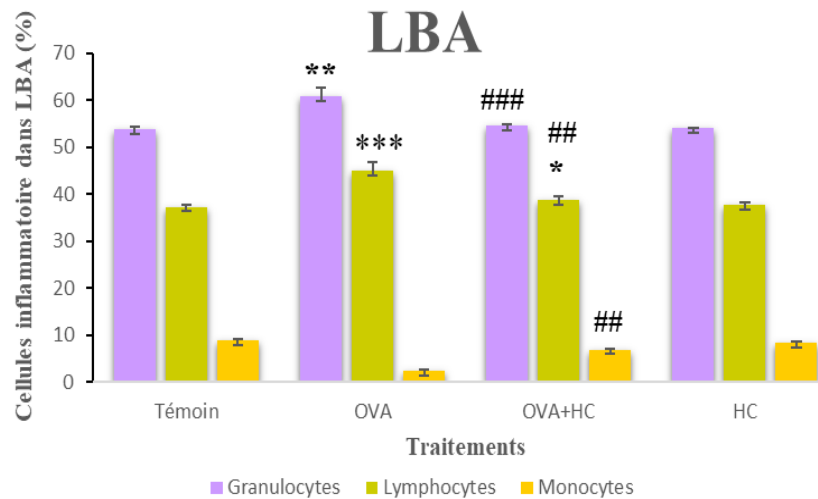
Le tableau indique une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) du nombre de leucocytes dans le liquide bronchoalvéolaire (LBA) des rats sensibilisés à l'ovalbumine (OVA), comparativement au lot témoin. En outre, le traitement avec l'huile de cade chez ces rats a entraîné une réduction très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) des taux de granulocytes, ainsi qu'une diminution hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) des lymphocytes dans le LBA des rats traités sensibilisés et traités avec cette huile.

**Tableau 24 :** Variations des cellules leucocytaires au niveau du LBA

Variations	Lots expérimentaux			
	Témoin	OVA	HC	OVA+ HC
Leucocytes ( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	0,9 $\pm$ 0,17	2,13 $\pm$ 0,25 (***)	1,05 $\pm$ 0,10	1,2 $\pm$ 0,29(###)
Lymphocytes( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	0,33 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,70 (***)	0,4 $\pm$ 0,06	0,48 $\pm$ 0,08(##)(*)
Monocytes ( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	0,07 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01(#)
Granulocytes( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	0,48 $\pm$ 0,01	1,16 $\pm$ 0,12(**)	0,56 $\pm$ 0,08	0,63 $\pm$ 0,15(###)

\*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$  ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  comparativement aux rats témoins ;

#  $p \leq 0,05$  ; ##  $p \leq 0,01$  ; ###  $p \leq 0,001$  comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine



**Figure 39:** L'effet de l'huile de Cade sur les cellules inflammatoires dans LBA

## 4. Discussion de l'expérimentation *in vivo*

### 4.1. Discussion de la partie expérimentale *in vivo* (poids, paramètres physiologiques, hématologiques et biochimiques)

En réalité, aucune étude antérieure n'a été menée pour examiner l'effet de l'huile de cade obtenue à partir du *Juniperus oxycedrus* pour la lutte contre l'asthme allergique. Considérant les données significatives du potentiel antioxydant obtenu dans la partie *in vitro*, l'huile de cade a été évaluée plus profondément à travers un modèle *in vivo* de rat avec un modèle d'asthme allergique qui développe des caractéristiques cellulaires et physiopathologiques similaires à l'asthme humain (Moura et al., 2005).

L'asthme induit par les allergènes est largement associé à une inflammation aiguë des voies respiratoires et à un remodelage des voies aériennes pulmonaires, comme observé dans le modèle d'asthme induit par l'ovalbumine (OVA). Les rats sensibilisés à l'ovalbumine subissent souvent une perte de poids corporel due à des troubles immuno-inflammatoires, comme noté dans des études antérieures (Elwood et al., 1992; Kandhare et al., 2013; Zemmouri et al., 2017; Bai et al., 2019). Ainsi, la différence entre les groupes d'asthme induit par l'ovalbumine et le groupe témoin concernant le poids corporel est couramment observée et nous supposons que cela est probablement expliqué par la réduction de l'apport alimentaire (Djaber et al., 2020) résultant de la combinaison de plusieurs symptômes liés à l'asthme, tels que le sifflement, l'essoufflement, l'épaisseur de la poitrine et la toux. Cependant, le gain de poids observé dans le groupe (OVA+HC) après l'administration d'huile de cade pourrait être considéré comme une preuve de son effet protecteur et de son efficacité contre la réponse asthmatique.

De plus, la réponse inflammatoire lors de l'exposition à des allergènes tels que l'ovalbumine provoque une infiltration cellulaire immunitaire, un œdème, une hypertrophie de l'épithélium bronchique et une production excessive de mucus, ce qui explique l'augmentation du poids relatif du poumon inflammé par rapport au poumon sain (**Ku et al., 2012; Zemmouri et al., 2017; Bai et al., 2019**). Cependant, la perte du poids relatif du poumon a été observée dans le groupe (OVA+HC) après l'administration d'huile de cade, indiquant l'effet potentiel dans la réduction du processus inflammatoire. Étant donné que les changements de poids peuvent servir d'indicateur délicat pour détecter l'effet néfaste des produits chimiques et des médicaments sur l'état de santé général (**El Jemli et al., 2017**) et selon le rapport d'évaluation de la sécurité sur le goudron de *Juniperus oxycedrus*, la DL<sub>50</sub> orale aiguë a été estimée à 8014 mg/kg (**Andersen, 2001**). Par conséquent, l'huile de cade a été classée comme substance de Classe 5, indiquant une DL<sub>50</sub> supérieure à 5000 mg/kg avec une faible toxicité (**El Jemli et al., 2017**). Aucune mortalité ni changement observable dans le comportement général n'ont été observés dans les groupes traités recevant une dose de 1 ml/kg par rapport au groupe témoin.

Selon **Ezeja et al. (2015)**, les variations dans le comportement général et le poids corporel sont des indicateurs essentiels de l'état de santé physiologique et pathologique des animaux. Ces changements servent à détecter les premiers signes de toxicité induits par des médicaments ou des substances chimiques.

Dans notre expérimentation, aucune réduction significative du poids corporel n'a été notée. L'administration d'huile de cade n'a manifesté aucun effet indésirable. D'après ces découvertes, il peut être déduit que l'administration orale d'huile de cade algérien peut être considérée comme non-toxique, la dose utilisée dans cette étude représentant environ 1/80 de la DL<sub>50</sub> (8014 mg/kg) administrée oralement tout au long du protocole expérimental.

L'évaluation des paramètres biochimiques, incluant les fonctions hépatiques et rénales, est importante pour déterminer la toxicité de substances telles que les médicaments et les extraits végétaux. Ces analyses servent également d'indicateurs des atteintes hépatiques et rénales (**Liju et al., 2011**).

Le foie, principal organe de détoxification contre les xénobiotiques, joue un rôle essentiel dans la protection de l'organisme (**Bischoff et al., 2018**). Les lésions hépatocellulaires se manifestent souvent par une élévation des enzymes hépatiques telles que les transaminases (ASAT, ALAT) et la phosphatase alcaline (PAL) dans le sérum, signalant ainsi un dysfonctionnement hépatique (**El-Demerdash et al., 2001**).

Dans cette étude, l'ovalbumine a provoqué une augmentation significative des niveaux sériques d'ALAT, d'ASAT et de PAL par rapport aux témoins. Ce résultat est en accord avec l'étude de

**Khaldi et al. (2017)**. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que lorsque les cellules hépatiques sont endommagées, comme dans les cas de lésion hépatique, l'ALAT et l'ASAT, normalement confinées dans les hépatocytes, sont libérées dans le sérum, entraînant ainsi une augmentation de leurs niveaux sériques (**Ahmed et al., 2008**).

La réduction des niveaux d'ASAT, d'ALAT et de PAL témoigne d'une régénération des membranes hépatocytaires (**Djaber, 2020**). Il est à souligner que l'administration de l'huile de cade dans les groupes (OVA+HC) a atténué partiellement les effets toxiques sur le foie.

Nos résultats peuvent être validés par le fait que l'un des composants majeures de l'huile de cade, le bêta-caryophyllène (**Chalchat et al., 1990**), a atténué les effets toxiques sur le foie induits par le CCl<sub>4</sub>, contribuant ainsi à la régénération des membranes hépatocytaires et à la réduction des dommages hépatiques observés (**Calleja et al., 2013**).

L'intégrité structurale du foie est fondamentale pour le maintien de ses fonctions essentielles, y compris la synthèse de protéines importantes comme l'albumine produite par le foie (**Bischoff et al., 2018**). Des dommages à la structure hépatique peuvent sérieusement perturber la capacité du foie à produire de l'albumine. Par exemple, notre étude a révélé une diminution significative des niveaux sériques d'albumine chez les rats exposés à l'ovalbumine, qui a favorisé la libération de radicaux libres oxygénés (ROS), connus pour endommager les structures cellulaires des organes vitaux, y compris le foie. La normalisation des taux d'albumine observée après l'administration de l'huile de cade indique une amélioration du dysfonctionnement hépatique provoqué par la sensibilisation allergénique dans le modèle d'asthme expérimental chez le rat Wistar. Cette propriété de l'huile de cade renforce son potentiel en tant que traitement complémentaire pour atténuer les effets secondaires hépatiques associés aux conditions allergiques.

Concernant le bilan néphrologique, les reins filtrent un volume élevé de sang et éliminent une variété de toxines qui peuvent s'accumuler dans les tubules rénaux, rendant ces organes particulièrement vulnérables aux composés toxiques (**Aissani, 2023**). Les biomarqueurs tels que la créatinine et l'urée sont utilisés pour évaluer la fonction rénale ; une augmentation de ces paramètres dans le sang est généralement indicative d'une insuffisance rénale. L'ovalbumine n'a pas affecté les niveaux de créatinine et d'urée dans le sérum, ce qui indique l'absence de dysfonctionnement rénal. donc, il n'y avait aucune différence significative dans la concentration de l'urée et de la créatinine dans le sérum de tous les groupes expérimentaux en comparaison avec le groupe témoin, ce qui est en ligne avec l'étude de **Almohawes et Alruhaimi (2020)**.

Il faut noter que l'implication des cellules inflammatoires est essentielle dans le déclenchement de l'asthme. Principalement, les cellules T auxiliaires de type 2 (Th2) sont responsables de l'orchestration et de la coordination de la réponse immuno-inflammatoire des voies respiratoires

asthmatiques. Suite à la pénétration de l'allergène « Ovalbumine », l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T auxiliaires sensibilisés entraîne une augmentation de la production de plusieurs cytokines dans les voies respiratoires, y compris l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (**Lambrecht et Hammad 2015**).

Ces cytokines influencent la différenciation, la survie et la fonction des éosinophiles, ce qui conduit à leur recrutement vers les poumons et à la sécrétion de mucus, avec une augmentation de l'hyper-réactivité des voies respiratoires (AHR) et de la production d'IgE spécifiques aux allergènes (**Lambrecht et Hammad 2015; Shakerinasab et al., 2022**). De plus, des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sont produites en quantités significatives par les cellules épithéliales inflammatoires. Le TNF- $\alpha$  joue un rôle dans l'orchestration de la réponse inflammatoire dans les voies respiratoires, où il fonctionne comme un agent de chimiotaxie, attirant activement les neutrophiles et les éosinophiles sur le site de l'inflammation. En outre, le TNF- $\alpha$  augmente l'abondance des molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules épithéliales (**Rajizadeh et al., 2019**). Suite à l'exposition aux allergènes, l'IL-1 $\beta$  déclenche la génération de cellules Th2. En conséquence, les éosinophiles sont activés sur le site de l'inflammation des voies aériennes, libérant diverses cytokines, y compris l'IL-5 (**Rajizadeh et al., 2019**). De nombreuses études menées sur des modèles animaux d'asthme induit par l'OVA montrent systématiquement une augmentation remarquable de l'expression génique du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  (**Rajizadeh et al., 2019; Jasemi et al., 2022; Shakerinasab et al., 2022**). On peut affirmer que la réduction des cytokines et des chimiokines des cellules inflammatoires dans les voies respiratoires par l'utilisation de médicaments anti-TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  semble être une stratégie thérapeutique efficace pour le traitement de l'asthme (**Lin et al., 2019 ; Lim et al., 2021**).

Dans le même contexte, selon les résultats des analyses de (**Chalchat et al., 1990 ; Barrero et al., 1993**) l'un des composant principal présent dans l'huile de cade était le  $\delta$ -cadinène. Des études antérieures ont confirmé que les huiles essentielles contenant du  $\delta$ -cadinène comme composant majeur possèdent une activité anti-inflammatoire et la capacité de diminuer les niveaux de IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (**de Veras et al., 2021**). Dans la même ligne, L'alpha-humulène, un sesquiterpène présent dans l'huile de cade, se distingue par ses effets anti-inflammatoires, réduisant le recrutement des éosinophiles et la production de cytokines inflammatoires dans les modèles d'inflammation allergique des voies respiratoires (**Rogério et al., 2009**).

Nos données montrent clairement que l'administration d'huile de cade a réduit l'inflammation pulmonaire en diminuant les taux de leucocytes à leurs gammes physiologiques et en minimisant l'infiltration des cellules inflammatoires dans le tissu pulmonaire, notamment les niveaux

d'éosinophiles et de lymphocytes dans le groupe (OVA+HC) par rapport au groupe OVA. Ainsi, ces résultats impliquent que l'huile de cade a eu un impact thérapeutique sur la réponse allergique survenue chez les rats sensibilisés à l'ovalbumine, qui est due à ces composés phénoliques qui agissent pour éliminer les radicaux libres et aux molécules anti-inflammatoires contenues dans l'huile de cade qui ont une influence inhibitrice.

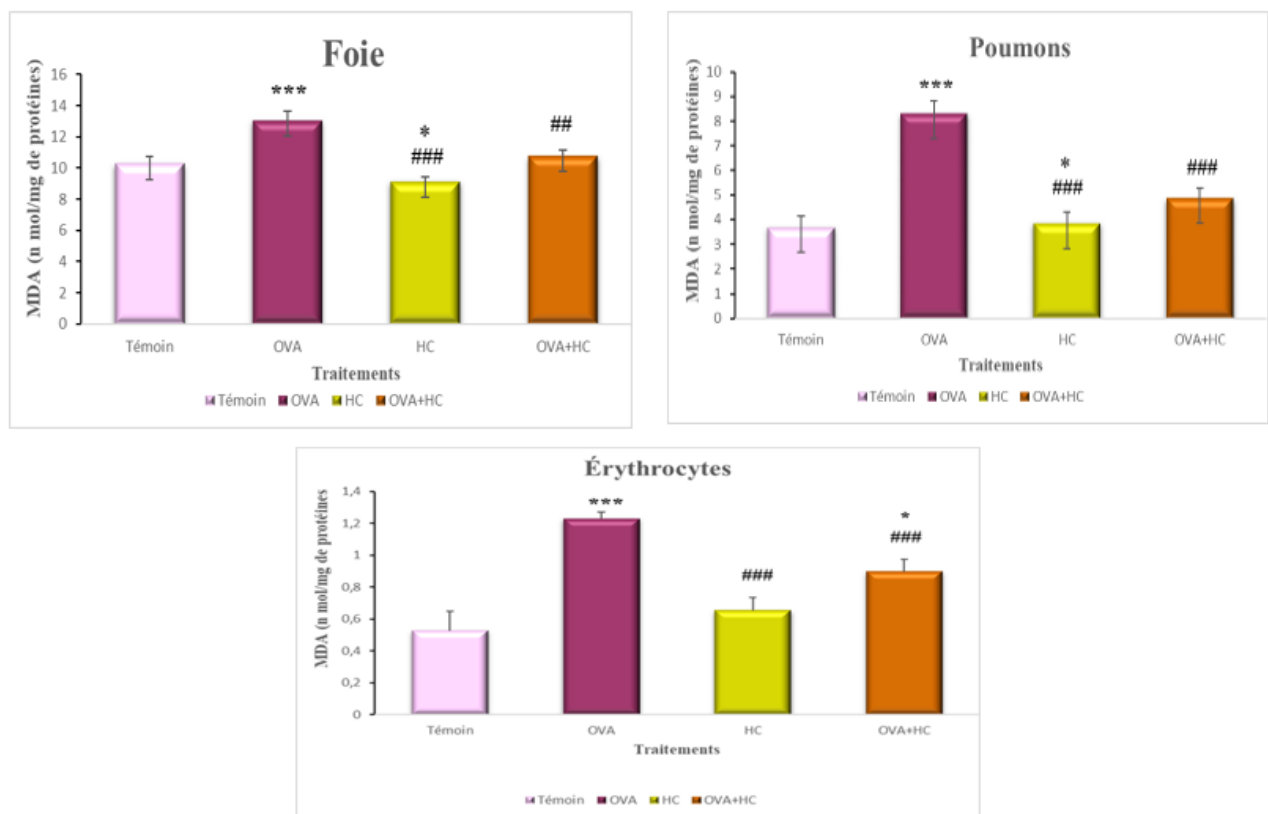
## 5. Stress oxydatif induit par l'ovalbumine : Effets de l'huile de cade sur les paramètres de stress oxydants

### 5.1. Évaluation du statut de défense antioxydante dans les poumons, foie et érythrocytes

#### 5.1.1. Paramètres non-enzymatiques

##### 5.1.1.1. Taux de malondialdéhyde

Les résultats indiquent une élévation très significative des niveaux de MDA dans le foie, les poumons, et les érythrocytes chez les rats exposés à l'ovalbumine par rapport au groupe témoin. Cependant, un traitement avec l'huile de cade a entraîné une réduction remarquablement significative de ces taux de MDA dans tous les organes étudiés chez les groupes sensibilisés puis traités (OVA+HC), comme le montre la (Fig. 40).

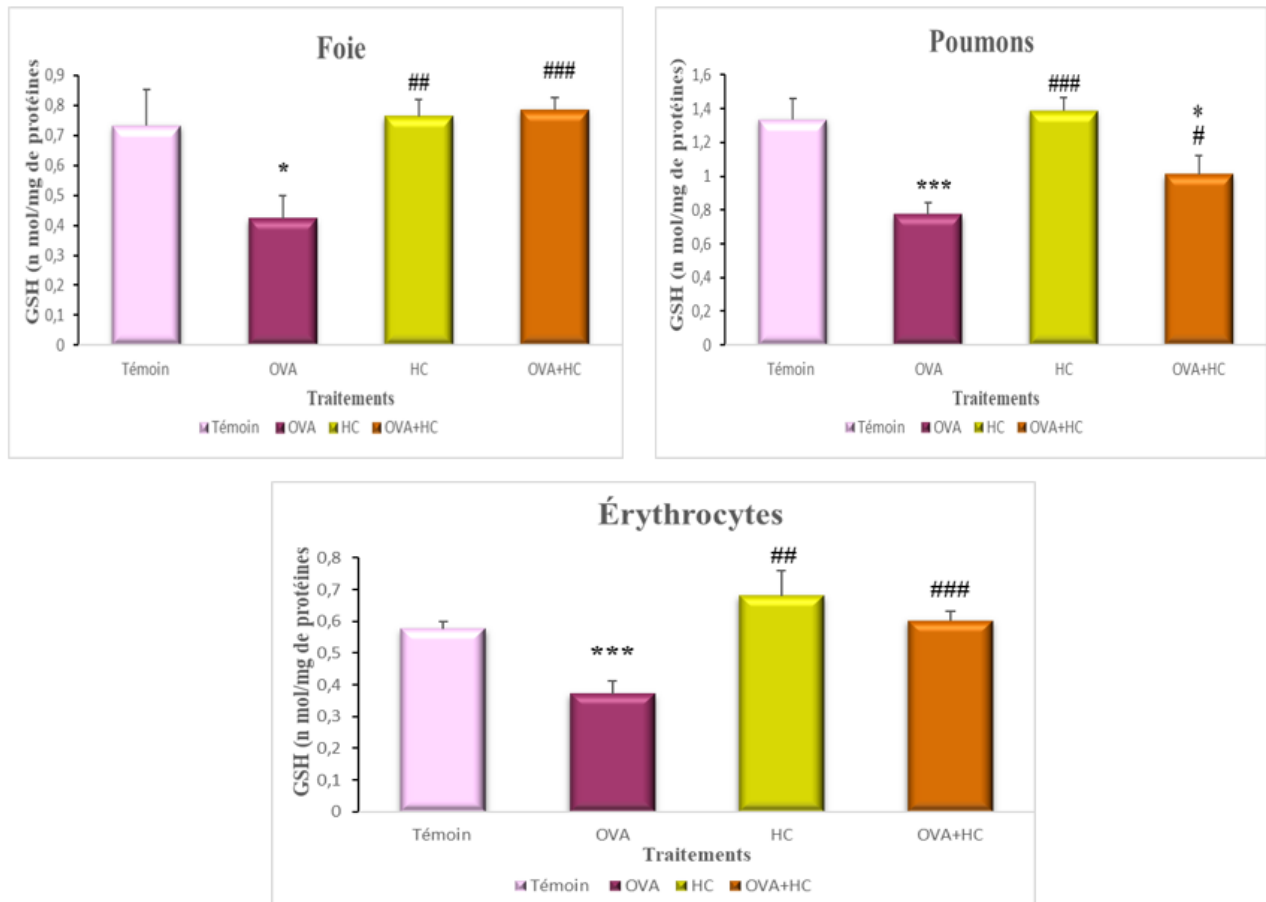


**Figure 40:** Variations des taux de malondialdéhyde (MDA) dans le foie, poumons et les érythrocytes.

##### 5.1.1.2. Taux de la glutathion réduit

L'exposition à l'ovalbumine chez les rats entraîne une réduction significative des niveaux de GSH dans le foie, et hautement significative dans les poumons et les érythrocytes par rapport aux rats du

groupe témoin. Toutefois, un traitement avec l'huile de cade a permis une augmentation très hautement significative des niveaux de GSH dans le foie et les érythrocytes est significative au niveau des poumons chez les rats traités (OVA+HC), comme illustré dans la (Fig. 41).

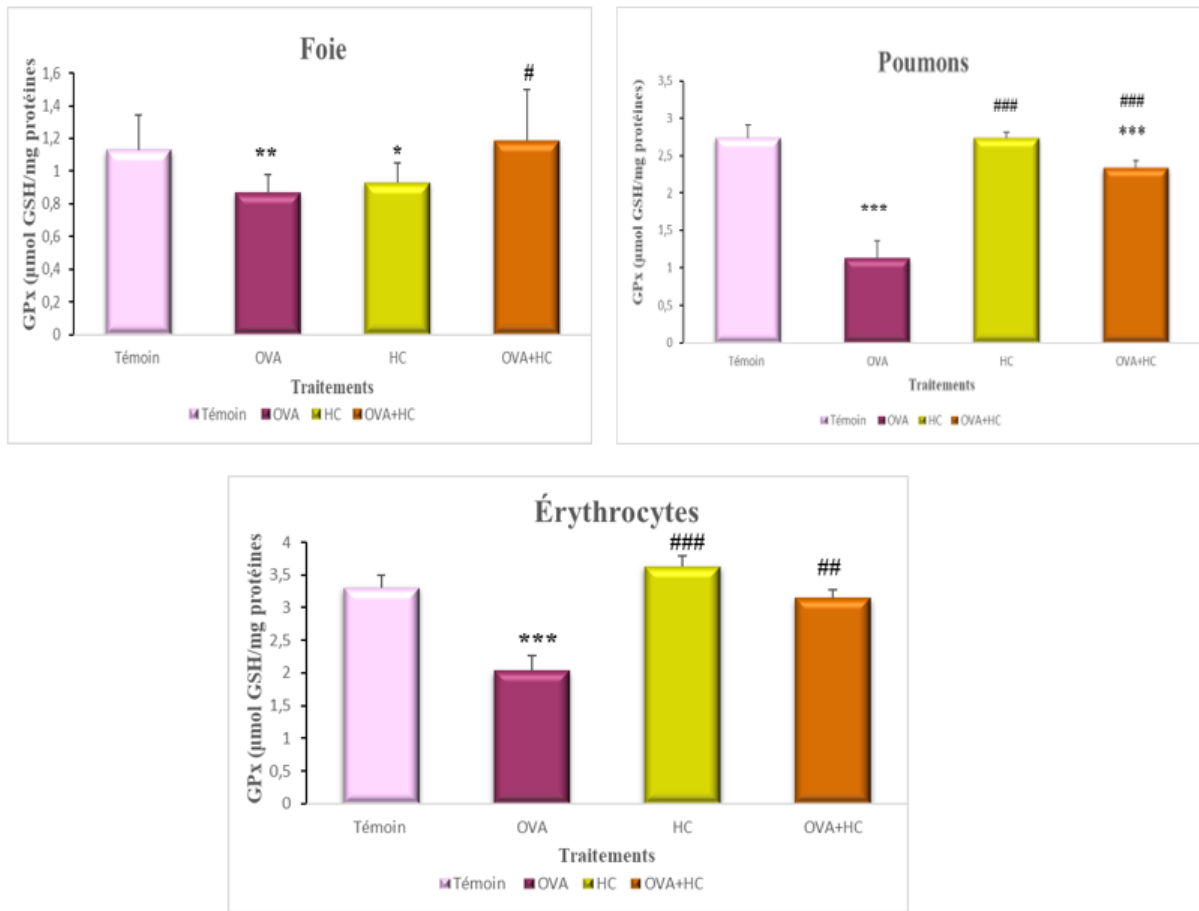


**Figure 41:** Variations des taux de la glutathion réduit (GSH) de dans le foie, poumons et érythrocytes

## 5.1.2. Paramètres enzymatiques

### 5.1.2.1. L'activité de la glutathion peroxydase

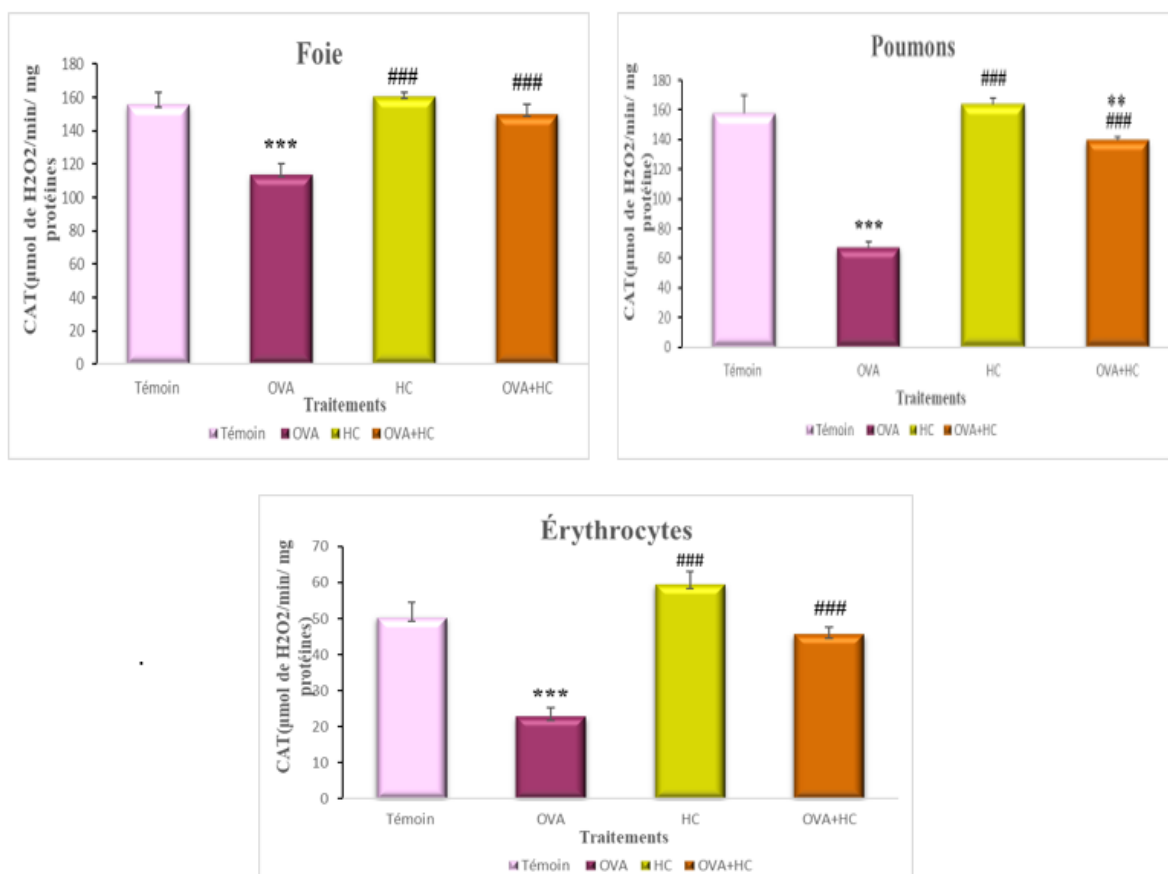
Les résultats présentés dans la (Fig. 42) révèlent une réduction très hautement significative de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase dans le groupe (OVA) par rapport au groupe témoin, observée dans les poumons et les érythrocytes ( $p \leq 0,001$ ), ainsi qu'une réduction hautement significative dans le foie ( $p \leq 0,01$ ). Par contre, une augmentation très hautement significative de l'activité de cette enzyme est enregistrée dans les poumons des rats traités (OVA+HC), avec des élévations également significatives dans les érythrocytes et le foie comparées au groupe exposé seulement à l'OVA.



**Figure 42** : Variations de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) de dans le foie, poumons et érythrocytes

### 5.1.2.2 l'activité de la catalase

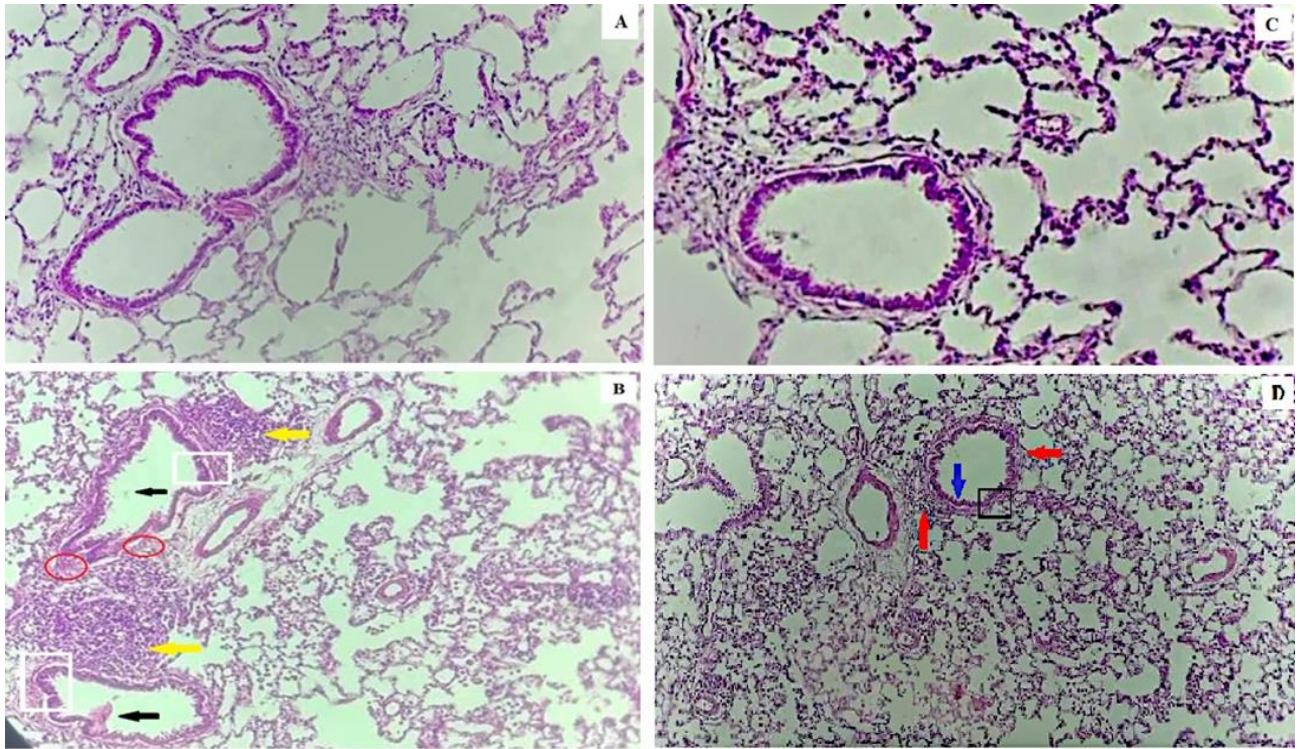
Les données présentées dans la (**Fig. 43**) indiquent une réduction très hautement significative de l'activité de la catalase dans tous les organes étudiés du groupe (OVA) par rapport au groupe témoin. Toutefois, après le traitement à l'huile de cade, une augmentation très hautement significative de l'activité catalytique est observée dans tous les organes du groupe (OVA+HC) en comparaison avec le groupe (OVA).



**Figure 43:** Variations de l'activité de la catalase de dans le foie, poumons et érythrocytes

## 5.2. Etude histologique au niveau des poumons

La structure histologique du rat témoin montre un aspect normal (**Fig. 44 A**). En revanche, le poumon du rat sensibilisé à l'ovalbumine présente des signes d'infiltration de cellules inflammatoires dans les voies bronchiques (indiqué par une flèche jaune), une augmentation de l'épaisseur d'une bronchiole respiratoire (délimitée par un carré blanc), une hyperplasie des cellules caliciformes (marquée par un cercle rouge) et une production accrue de mucus (soulignée par une flèche noire) (**Fig. 44 B**). À l'opposé, dans le poumon du rat traité (OVA+HC), on observe une réduction de la présence de cellules inflammatoires (signalée par une flèche rouge), une diminution de l'épaisseur des cellules des voies aériennes (représentée par un carré noir) et une baisse de la production de mucus (illustrée par une flèche bleue) (**Fig. 44 D**). Le poumon du rat traité avec HC présente une apparence cellulaire normale, comparable à celle du groupe témoin (**Fig. 44 C**).



**Figure 44:** Analyse histopathologique des sections pulmonaires des rats.

**A :** Groupe témoin (x40). **B :** Groupe OVA (x40). **C :** Groupe (HC) (x40). **D :** Groupe (OVA+HC) (x40)

## 6. Discussion

### 6.1. Discussion de l'effet de l'huile de cade sur les paramètres de stress oxydants et des coupes histologiques

Le stress oxydatif est fondamentalement impliqué dans la pathogenèse d'un large éventail de maladies chroniques, y compris l'asthme allergique, soulignant le besoin essentiel d'enquêter sur les mécanismes antioxydants pour des stratégies thérapeutiques potentielles (Reynaert, 2011; Shakerinasab et al., 2022). Malgré de nombreuses recherches dans ce domaine (Chekchaki et al., 2017; Zemmouri et al., 2017; Khaldi et al., 2018; Rouibah et al., 2019), sauf que l'étude de l'effet de l'huile de cade dérivée de *Juniperus oxycedrus*, sur l'asthme allergique reste inexploré. En abordant cette problématique, notre étude vise à élucider les effets de l'huile de cade sur l'asthme allergique, contribuant ainsi à une compréhension plus large de ses avantages thérapeutiques potentiels dans les conditions médiées par le stress oxydatif.

En réponse, une série de tests ont été menés pour déterminer la puissance antioxydante de l'huile de cade. La capacité antioxydante significative trouvée dans nos analyses *in vitro* a incité à des investigations supplémentaires en utilisant un modèle de rat d'asthme allergique, qui développe des caractéristiques cellulaires et physiopathologiques similaires à celles observées dans l'asthme humain, notamment la caractéristique du stress oxydatif, un élément fondamental impliqué dans le début et la progression de l'asthme (Moura et al., 2005).

Nos résultats suggèrent que l'huile de cade possède à la fois une activité antioxydante notable, principalement due à son contenu riche en phénoliques et flavonoïdes, comme le démontrent nos tableaux récapitulatifs (Tableau 5), ainsi qu'une forte activité anti-inflammatoire évaluée par la méthode d'inhibition de la dénaturation du BSA (Fig. 37). Cette double action renforce la validation de l'effet protecteur de cette essence, qui est principalement due à son riche contenu en composés bioactifs. Les sesquiterpènes, tels que le cadinène et le caryophyllène, également présents dans l'huile, jouent un rôle majeur dans ces effets thérapeutiques, augmentant non seulement le potentiel antioxydant mais aussi modulant les réponses inflammatoires. Ces résultats encouragent des études plus approfondies sur l'huile de cade pour exploiter pleinement ses propriétés pharmacologiques et potentiellement développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre des maladies liées à l'oxydation et à l'inflammation. (Rogerio et al., 2009 ; Kundu et al., 2013 ; Egas et al., 2015 ; Francomano et al., 2019 ; Gushiken et al., 2022).

Comme nous l'avons déjà mentionné, le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre un système oxydant suractivé et des défenses antioxydantes diminuées. Cet état est souvent identifié par des niveaux élevés d'oxydants, qui servent de biomarqueurs pour les processus inflammatoires

actifs (**Birben et al., 2012**). Parmi les principaux acteurs de ce phénomène, on trouve les radicaux libres dérivés de l'oxygène, souvent produits à partir des acides gras polyinsaturés. Ces radicaux libres provoquent la peroxydation des lipides au sein des membranes cellulaires, entraînant la formation de Malondialdéhyde (MDA). Le MDA est reconnu comme un indicateur clé du stress oxydatif en raison de ses effets oxydants prononcés (**You et al., 2014; Adam-bonci et al., 2021**). L'excès de Malondialdéhyde (MDA) résulte d'une défaillance des défenses antioxydantes de l'organisme face aux espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cela mène à des dommages oxydatifs par peroxydation lipidique des membranes, un processus initié par les peroxydes d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) non convertis en eau et oxygène, mais transformés en radicaux hydroxyles. Ces radicaux attaquent les lipides des membranes cellulaires, entraînant leur dégradation (**Laguerre, 2007**). En parallèle, ces radicaux oxydent également les acides aminés aromatiques sensibles, notamment ceux avec des groupements thiol, contribuant à une augmentation des produits de carbonylation des protéines (PCO). Ces processus conduisent à une détérioration accrue des cellules, aggravant ainsi les conditions pathologiques associées au stress oxydatif (**Dworski et al., 2000**). Concernant l'asthme, l'accumulation de MDA dans les tissus pulmonaires pourrait favoriser la chimiotaxie des leucocytes, ce qui engendre une surproduction de espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les cellules immunitaires qui infiltrent et exacerbent l'inflammation des voies respiratoires. Ce processus peut alors contribuer à l'aggravation des lésions des voies respiratoires, caractéristique de l'asthme (**You et al., 2014**).

La présente étude a montré que l'exposition à l'ovalbumine a significativement augmenté les quantités de MDA dans le foie, poumons et érythrocytes, cela s'aligne sur la recherche de **Khaldi et al. (2017)** qui ont étudié les effets de l'huile de *Nigella sativa* sur l'inflammation des poumons et le stress oxydatif dans un modèle d'asthme allergique. Intéressant, l'administration de l'huile de cade a considérablement réduit l'altération oxydative des niveaux de peroxydation lipidique dans le groupe (OVA+HC), illustrant ses puissantes propriétés antioxydantes.

En effet, le corps humain dispose de plusieurs mécanismes de protection contre les radicaux libres, empêchant ainsi l'accumulation de molécules endommagées par l'oxydation. Le système de défense antioxydante comprend des antioxydants non enzymatiques endogènes tels que le GSH et des enzymes comme la CAT, la SOD et la GPx qui maintiennent l'état réduit grâce à un apport constant d'énergie métabolique (**Sahiner et al., 2011 ; Bai et al., 2019**). Ainsi, les cibles biologiques sont protégées contre les ROS, de même que les cellules contre leurs effets nocifs, contribuant à la prévention des maladies. Les résultats ont montré que les rats exposés à l'OVA présentaient des signes clairs de stress oxydatif, comme en témoigne la diminution significative des quantités

d'enzymes antioxydantes GSH, GPx et Catalase, accompagnée d'une augmentation des niveaux de MDA (**Bai et al., 2019**).

Concernant le GSH, qui est un antioxydant important dans la défense cellulaire contre les lésions oxydatives, en particulier dans les poumons. En tant que composé contenant un thiol non protéique, le GSH sert de co-substrat pour la glutathionne transférase (GST) et la GPx, réduisant les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène (**Reynaert, 2011; Almadiy et al., 2020**). De plus, dans les cellules, le glutathion interagit avec les radicaux libres pour générer du glutathion sous sa forme oxydée (GSSG). Ce dernier est efficacement régénéré dans son état réduit (GSH) par la réductase GSH, en utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électrons (**Sugiura et Ichinose, 2008**). Dans cette recherche, l'OVA a significativement diminué les niveaux de glutathion (GSH), indiquant une altération du système de défense antioxydant et laissant potentiellement les tissus pulmonaires vulnérables aux dommages oxydatifs et à l'inflammation. Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures qui ont également signalé une baisse similaire des niveaux de GSH dans le contexte de l'inflammation pulmonaire allergique (**Zemmouri et al., 2017 ; Khaldi et al., 2018 ; Rouibah et al., 2019**). De plus, ces résultats ont révélé que les valeurs de GSH étaient élevées dans le groupe traité, indiquant les propriétés antioxydantes de l'huile de cade qui peuvent protéger contre le stress oxydatif en éliminant efficacement les radicaux libres.

En outre, les enzymes antioxydantes endogènes, telles que la GPx et la CAT, ont été évaluées afin de déterminer l'ampleur du stress oxydatif. Une diminution notable de l'activité de la catalase et de la GPx a été remarquée dans les poumons du groupe OVA par rapport au groupe témoin, indiquant une détérioration de la fonction antioxydante, pointant vers un stress oxydatif élevé. La catalase est considérée comme une enzyme antioxydante critique dans les poumons, responsable de la neutralisation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réactif en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub> (**Mittal et al., 2014**). L'épuisement de l'activité de la CAT peut être attribué à son inactivation causée par la synthèse élevée et l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de radicaux superoxydes dans les poumons asthmatiques. De plus, la GPx est une enzyme intracellulaire contenant du sélénium connu pour catalyser la réduction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau, renforçant l'importance du GSH en tant que cofacteur nécessaire (**Sugiura et Ichinose, 2008 ; Mittal et al., 2014**).

L'investigation histologique actuelle du poumon valide les résultats précédents, comme illustré dans la **figure 44**. Le groupe Témoin a démontré une histologie pulmonaire normale, sans infiltration cellulaire inflammatoire ou remodelage des voies respiratoires observés, renforçant que le groupe OVA est un groupe de comparaison approprié. D'autre part, le groupe OVA a montré une infiltration cellulaire inflammatoire massive impliquant le recrutement et l'activation de diverses cellules immunitaires, y compris les éosinophiles, les lymphocytes, les mastocytes et les macrophages. Ces

cellules inflammatoires libèrent des cytokines, des chimiokines et d'autres médiateurs qui favorisent les dommages de l'épithélium bronchique et augmentent la prolifération cellulaire, conduisant à l'épaississement des parois bronchiolaires (**Zemmouri et al., 2017**). La présence de médiateurs inflammatoires peut également stimuler les cellules caliciformes à subir une hyperplasie et à produire un excès de mucus dans la lumière des bronchioles, ce qui peut contribuer davantage à l'obstruction des voies respiratoires et à leur épaississement (**Yang et al., 2011**). Intéressant, la morphologie pulmonaire s'est considérablement améliorée dans le groupe OVA+HC après le traitement à l'huile de cade. La réduction de l'infiltration des cellules inflammatoires, de l'épaississement des voies respiratoires et de la diminution de la production de mucus indique un effet protecteur potentiel du traitement à l'huile de cade contre l'inflammation pulmonaire allergique. Pour conclure, l'analyse approfondie de nos résultats met en lumière le potentiel thérapeutique significatif de l'huile de cade dans le traitement de l'asthme allergique. Cette étude a révélé que l'administration de l'huile de cade a nettement atténué les marqueurs de stress oxydatif, comme le montre la réduction des niveaux de MDA et la restauration des niveaux de GSH, GPx et Catalase dans les tissus pulmonaires, hépatique et érythrocytaires. De plus, l'huile de cade a également contribué à une diminution marquée de l'inflammation des voies respiratoires, comme en témoigne la réduction de l'infiltration cellulaire inflammatoire et de l'épaississement des parois bronchiolaires, ainsi que par la diminution de la production de mucus, améliorant ainsi la morphologie pulmonaire. Ces effets bénéfiques peuvent être attribués à la richesse en composés bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les sesquiterpènes présents dans l'huile de cade, qui offrent une protection antioxydante robuste et modulent les réponses inflammatoires. En neutralisant les ROS et en réduisant l'inflammation, l'huile de cade aide à prévenir les dommages tissulaires associés à l'asthme allergique, tout en favorisant une meilleure fonction pulmonaire.

# Conclusion

## Conclusion

Les découvertes de notre étude sur *Juniperus oxycedrus* révèlent un potentiel significatif pour l'utilisation de cette plante dans les domaines thérapeutique et cosmétique. Une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) des constituants phytochimiques des feuilles de *Juniperus oxycedrus* a permis de détecter la présence de flavonoïdes tels que la rutine et la chrysine. Dans le même contexte, l'huile de cade a montré une forte teneur en polyphénols, tout comme les autres fractions étudiées.

Nos observations indiquent que les extraits d'acétate d'éthyle (EAJO) présentent une activité antioxydante nettement supérieure à celle des autres extraits, évaluée par diverses méthodes telles que DPPH, ABTS, le pouvoir réducteur, CUPRAC, GOR, Phénanthroline, et SNP. Cela dit, les autres extraits affichent également une activité antioxydante notable.

L'activité anti-Alzheimer, évaluée par l'inhibition de l'acétylcholinestérase, montre que l'acétate d'éthyle possède une forte capacité inhibitrice, comparable à celle de la Galantamine. L'huile de cade se distingue également par son efficacité. Parallèlement, l'activité antidiabétique a été étudiée ; l'huile de cade a démontré une activité supérieure à celle de l'acarbose, soulignant son potentiel thérapeutique significatif contre le diabète.

Nous avons aussi exploré l'activité anti-diabétique, anti-uréase et anti-tyrosinase en examinant l'inhibition des enzymes uréase et tyrosinase. Les résultats indiquent que les extraits et l'huile de cade possèdent une activité modérée dans ces tests.

De plus, l'huile de cade a prouvé une excellente capacité à inhiber la dénaturation des protéines induite par la chaleur de manière dose-dépendante, comparable au diclofénac. Elle a également offert une haute protection contre les radiations UV.

En parallèle, dans le cadre de la valorisation des produits traditionnellement utilisés en médecine populaire, l'huile de cade a été étudiée pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, et anti-asthmatiques dans un modèle d'asthme expérimental induit par l'ovalbumine.

L'administration de l'huile de cade dans ce modèle a réduit le stress oxydatif en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène, minimisé l'inflammation pulmonaire en modulant l'infiltration des cellules immunitaires, protégé les lipides membranaires contre la peroxydation, amélioré l'activité des enzymes antioxydantes, et amélioré la morphologie pulmonaire en réduisant les altérations des voies respiratoires.

Pour conclure, ces résultats mettent en lumière le potentiel de *Juniperus oxycedrus* comme source précieuse d'antioxydants naturels, proposant une alternative viable aux antioxydants synthétiques pour des applications en cosmétique, en pharmacie et dans l'industrie alimentaire. Toutefois, pour assurer la sécurité de l'huile de cade pour la consommation humaine, des recherches futures comprenant des évaluations toxicologiques *in vitro* et *in vivo* sont indispensables. Il est essentiel non seulement de confirmer sa sécurité, mais aussi d'identifier et d'isoler les composés actifs possédant un potentiel thérapeutique. Ces composés pourraient être clés dans le développement de nouvelles formulations pharmaceutiques.

Dans le cadre des perspectives futures, les principaux sujets de recherche à envisager comprennent, entre autres :

- Approfondir l'évaluation de la toxicité des constituants de la plante.
- Étudier en détail les constituants phytochimiques de l'huile de cade.
- Élargir le spectre de recherche sur les effets de ces plantes sur certaines maladies chroniques : comme l'Alzheimer, la sclérose en plaques, Creutzfeldt-Jakob...etc.
- Exploiter les effets bénéfiques des constituants de la plante dans la cosmétologie.
- Vérifier les interactions au niveau moléculaire par docking afin de déterminer les mécanismes d'action exacts des composés bioactifs de la plante et de son huile.

# Références

## Références bibliographiques

- [01]. Abdellah F, Laid B, Hammoudi SM, Benaraba R. 2018. *In vitro* Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant activities of *juniperus oxycedrus* essential oil (Cade oil). International Journal of Environmental Science and Research 2(6): 66–76.
- [02]. Adam-Bonci TI, Bonci EA, Pârvu AE, Herdean AI, Moț A, Taulescu M, Irimie A. 2021. Vitamin D supplementation: Oxidative stress modulation in a mouse model of ovalbumin-induced acute asthmatic airway inflammation. International Journal of Molecular Sciences 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22137089>
- [03]. Adeghate E, Schattner P, Dunn E. 2006. An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus. Annals of the New York Academy of Sciences 1084(3): 1–29. <https://doi.org/10.1196/annals.1372.029>
- [04]. Aebi H. 1984. Catalase *in Vitro*. Methods in Enzymology 105(C): 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- [05]. Agustina E, Goak J, Lee S, Seo Y, Park JY, Lee N. 2015. Simple and precise quantification of iron catalyst content in carbon nanotubes using uv/visible spectroscopy. Chemistry open 4(5):613-619. <https://doi.org/10.1002/open.201500096>
- [06]. Ahmed MB, Hasona NA, Selemain HAH. 2008. Protective effects of extract from dates (*Phoenix dactylifera L.*) and ascorbic acid on thioacetamide-induced hepatotoxicity in rats. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 7(3): 193-201. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.765>
- [07]. Aissani, F. 2022. Caractérisation phytochimique, valorisation biologique et toxicologique des différents extraits d'une espèce Algérienne *Sonchus oleraceus L.* Thèse de doctorat. Université 8 Mai 1945 Guelma, Algérie.
- [08]. Akbari B, Baghaei-Yazdi N, Bahmaie M, Mahdavi Abhari F. 2022. The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. BioFactors 48(3) : 611–633. <https://doi.org/10.1002/biof.1831>
- [09]. Alan S, Kürkçüoğlu M, Şener G. 2016. Composition of the Essential Oils of *Juniperus oxycedrus L. subsp. oxycedrus* Growing in Turkey. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences 13(3) : 300–303. <https://doi.org/10.4274/tjps.2016.03>
- [10]. Almadiy AA, Gumaih HS, Al-Hamdani NMH, Almolaiki HA. 2020. The Impact of *Monolluma quadrangula* Extracts on Oxidative Stress in Diabetic Male Rats. PSM Microbiology 5(3): 57–71.
- [11]. Almohawes ZN, Alruhaimi HS. 2020. Effect of *lavandula dentata* extract on ovalbumin-induced asthma in male Guinea pigs. Brazilian Journal of Biology 80(1): 87–96. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.191485>

- [12]. Alqahtani AS, Hidayathulla S, Rehman MT, ElGamal AA, Al-Massarani S, Razmovski-Naumovski V, AlAjmi MF. 2019. Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant potential of 3-oxolupenal and katononic acid isolated from *Nuxia oppositifolia*. *Biomolecules* 10(1), 61.
- [13]. Al-snafi AE. 2018. Pharmacological and Therapeutic Effects of *Juniperus oxycedrus*- A Review. *Indo American Journal Pharmaceutical Sciences* 05(03): 1766–1778. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1214996>
- [14]. Andersen FA. 2001. Final report on the safety assessment of *Juniperus communis* extract, *Juniperus oxycedrus* extract, *Juniperus oxycedrus* tar, *Juniperus phoenicea* extract, and *Juniperus virginiana* extract. *International Journal of Toxicology* 20: 41–56. <https://doi:10.1080/10915810160233758>.
- [15]. Angioni A, Barra A, Russo MT, Coroneo V, Dessí S, & Cabras P. 2003. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10) : 3073–3078. <https://doi:10.1021/jf026203j>
- [16]. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine : CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(26): 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- [17]. Baba Aissa F. 1991. *Les Plantes Medicinal en Algérie*. Bouchéne et Ad Diwan, Alger.
- [18]. Bai F, Fang L, Hu H, Yang Y, Feng X, Sun D. 2019. Vanillic acid mitigates the ovalbumin (OVA)-induced asthma in rat model through prevention of airway inflammation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 83(3) : 531–537. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1543015>
- [19]. Balasubashini, M S., Rukkumani R, Viswanathan P, and Menon VP. 2004. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytother. Res.* 18 :310–314.
- [20]. Barnes BJ. 1990. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radical Biology Medecine* 9:235-4.
- [21]. Barrero AF, Oltra JE, Altarejos J, Barragán A, Lara A, Laurent R. 1993. Minor components in the essential oil of *Juniperus oxycedrus* L. wood. *Flavour and Fragrance Journal* 8(4) : 185–189. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730080404>
- [22]. Barreto RSS, Quintans JSS, Amarante RKL, Nascimento TS, Amarante RS, Barreto AS, Pereira EWM, Duarte MC, Coutinho HDM, Menezes IRA, Zengin G, Aktumsek A, Quintans-Júnior LJ, 2016. Evidence for the involvement of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. (Lamiaceae) essential oil and (-)- $\alpha$ -

- bisabolol, its main compound, in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 191 : 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.022>.
- [23]. Bartnik D, Mohler C, Houlihan M. 2006. Methods for the Production of Food Grade Extracts. United States Pat. Appl. 20060088627.
- [24]. Bartolini M, Bertucci C, Cavrini V, Andrisano V. 2003. beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochemical pharmacology* 65(3): 407–416. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01514-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01514-9)
- [25]. Becker M, Picard J-F, Timbal J. 1982. Larousse des arbres et arbustes. Librairie Larousse, 151-152 et 194-195.
- [26]. Belhaddad OE, Zidane S, Amamra S, Bouchelouche K, Mohamadi S, Bouzidi L, Bouleghlem H. 2023. Phytochemical characterization, biological screening and corrosion inhibition of mild steel from extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Notulae Scientia Biologicae* 15(4): 1–19 <https://doi.org/10.55779/nsb15411635>
- [27]. Belliot A. 2007. Huile de cade, goudron de houille, ichthyol : utilisations dermatologiques et cosmétiques. Thèse pour le diplôme d'états de docteur en pharmacie. Université de Nante, France.
- [28]. Ben Mrid R, Bouchmaa N, Bouargalne Y, Ramdan B, Karrouchi K, Kabach I, Karbane M, Idir A, Ziad A. 2019. Phytochemical Characterization, Antioxidant and *In Vitro* Cytotoxic Activity Evaluation of *Juniperus oxycedrus* Subsp. *oxycedrus* Needles and Berries. *Molecules* 3(24). <https://doi.org/10.3390/molecules24030502>
- [29]. Benarba B. 2016. Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria: an ethnobotanical study. *Journal of intercultural ethnopharmacology* 55(4): 320–330. <https://doi.org/10.5455/jice.20160814115725>
- [30]. Bernstein J, Levy M. (Eds.). 2014. *Clinical Asthma: Theory and Practice*. CRC Press.
- [31]. Bertrand J. 2017. Rôle de Dicer dans la pigmentation et sa régulation par les UVB dans le lignage mélanocytaire. Doctoral dissertation, Sorbonne Paris. P :12-15.
- [32]. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The world allergy organization journal* 5(1): 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- [33]. Bischoff K, Mukai M, Ramaiah SK. 2018. Liver toxicity. In *Veterinary toxicology*. Academic Press : 239-257. DOI : [10.1016/B978-0-12-811410-0.00015-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00015-5)
- [34]. Bisset S, Sobhi W, Bensouici C, Khenchouche A. 2020. Chain-breaking/Preventive Antioxidant, Urate-lowering, and Anti-inflammatory Effects of Pure Curcumin. *Current Nutrition and Food Science* 17(1) : 66–74. <https://doi.org/10.2174/1573401316999200421095134>
- [35]. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(4617) : 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- [36]. Bloom GS. 2014. Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA neurology*, 71(4), 505-508.

- [37]. Bonesi M, Menichini F, Tundis R, Loizzo MR, Conforti F, Passalacqua NG, Menichini F. 2010. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 25(5): 622–628. <https://doi.org/10.3109/14756360903389856>
- [38]. Bonnier G. 1990. La grande flore en couleurs. Tome 4. Ed. Belin, Paris : 1353-1355.
- [39]. Bouayad Z, Afif H. 1998. L'épidémiologie de l'asthme et de la rhinite dans les pays au sud de la méditerranée. *Rev Fr Allergo* 38 : 154-159.
- [40]. Boudjelal A, Henchiri C, Sari M, Sarri D, Hendel N, Benkhaled A, Ruberto G. 2013. Herbalists and wild medicinal plants in M 'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *Journal of Ethnopharmacology* 148(2) : 395–402.
- [41]. Bouhlal K, Meynadier JM, Peyron JL, Peyron L, Marion JP, Bonetti G, Meynadier J. 1988. Le cade en dermatologie. *Parfums, Cosmétiques, Arômes* 83 : 73–82.
- [42]. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochemistry* 72 : 248–254.
- [43]. Bruneton J. 2009. Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes Médicinales. Lavoisier 4e éd, revue et augmentée, Tec & Dac-Editions médicinales internationales Paris : 1288 p.
- [44]. Brus R, Ballian D, Zhelev P, Pandz M, Bobinac M, Acevski J, Raftoyannis Y, Jarni K. 2011. Absence of geographical structure of morphological variation in *Juniperus oxycedrus* L. Subsp. *oxycedrus*. *European Journal of Forest Research* 130(4): 657-67.
- [45]. Burri S, Durand A, Alifriqui M, Satrani B, Ghanmi M, Ollivier D, Cençon-salvayre C, Vaschalde C, Cesarini R. 2017. Ethnoarchaeology of Wood Tar Production in the Atlas Mountains (Morocco) Part 1: from Plant to Tar.
- [46]. Busse WW, Lemanske RF Jr. 2001. Asthma. *The new England journal of medicine* 344(5): 350–362. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102013440507>
- [47]. Çakır EA. 2017. A comparative review of ethnomedicinal utilization of Gymnospermae in Turkey. In *Eurasscience Journals Eurasian Journal of Forest Science* 5. Retrieved from [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org)
- [48]. Calleja MA, Vieites JM, Montero-Meterdez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A, Suárez A. 2013. The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *British Journal of Nutrition* 109(3) : 394–401. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001298>
- [49]. Cassidy L, Fernandez F, Johnson JB, Naiker M, Owoola AG, Broszczak DA. 2020. Oxidative stress in Alzheimer's disease : A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complementary Therapies in Medicine* 49(October 2019): 102294. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102294>

- [50]. Catala A. 2011. Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. *Front BiosciSch* 3(1):52-60. <https://doi.org/10.2741/s131>
- [51]. Chalchat JC, Garry RP, Michet A, Peyron L. 1990. Chemical composition of natural and empyreumatic oils and extracts from *Juniperus oxycedrus* and *Juniperus phoenicea* wood. *Journal of Essential Oil Research* 2(5) : 231–236. <https://doi.org/10.1080/10412905.1990.9697872>
- [52]. Chaouche TM, Haddouchi F, Atik-Bekara F. 2015. Antioxidant, haemolytic activities and HPLC-DAD-ESI-MSn characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Industrial Crops and Products* 64(1):182-187. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.051>
- [53]. Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Medini F, Atik-Bekara F. 2013. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Phytotherapie* 11(4) : 244–249. <https://doi.org/10.1007/s10298-013-0779-5>
- [54]. Chaouche, TM. (2014). Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat, Université Abou-Bakr-Belkaid Tlemcen, Algérie.
- [55]. Chast F. 2008. A brief history of drugs: from plant extracts to DNA technology. Vol. 1. Wermuth CG, ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 3-28.
- [56]. Chekchaki N, Khaldi T, Rouibah Z, Rouag M, Sekiou O, Messarah M, Boumendjel A. 2017. Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Two Extracts from *Pistacia lentiscus* in Liver and Erythrocytes, in an Experimental Model of Asthma. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 42(1): 77-84.
- [57]. Cheraif K, Bakchiche B, Gherib A, Bardaweel SK. 2020. Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Tyrosinase, Anti-Cholinesterase and Cytotoxic Activities of Essential Oils of Six Algerian Plants. *Molecules* 25(7) : 1710. <https://doi.org/10.3390/molecules25071710>
- [58]. Chermat S, Gharzouli R. 2015. Ethnobotanical study of medicinal flora in the North East of Algeria-An empirical knowledge in Djebel Zdimm (Setif). *J Mater Sci Eng* 5 : 50–59.
- [59]. Choquenot B, Couteau C, Papisaris E, Coiffard IJ. 2008. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents : determination of efficacy by an *in vitro* method. *Journal of Natural Products* 71: 1117–1118.
- [60]. Church MK. 2017. Allergy, Histamine and Antihistamines. *Handb Exp Pharmacol* 241: 321-31.
- [61]. Ciftci OI, Ozdemir M, Aydin M, Beytur A. 2012. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia* 44 : 181–186.
- [62]. Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors : pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology* 11(3): 315-335. <https://doi.org/10.2174/1570159x11311030006>
- [63]. Comhair SA, Erzurum SC. 2010. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling* 12(1) : 93-124.

- [64]. Commission des communications européennes. 2006. Recommandation du 22 septembre 2006 relative aux produits de protection solaire et aux allégations des fabricants.
- [65]. Dai J, Mumper RJ. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15(10): 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- [66]. Dandu AM, Inamdar NM. 2009. Evaluation of beneficial effect of antioxidant properties of some plants in diabetic rats. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 22(1), 49–52.
- [67]. Davies KJ. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals: IV. Degradation of denatured protein. *The Journal of biological chemistry*, 262(20), 9914–9920.
- [68]. de Veras BO, de Oliveira JRS, de Menezes Lima VL, do Amaral Ferraz Navarro DM, de Oliveira Farias de Aguiar JCR, de Medeiros Moura GM, de Souza Lopes AC. 2021. The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.). Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. *Journal of Ethnopharmacology* 30(1)265: 113–248. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248>
- [69]. Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant (aspects biologiques et pathologiques). *TEC & DOC - Lavoisier éditions médicales internationales*, Paris, pp. 54.
- [70]. Derwich E, Chabir R. 2011. Identification of the volatile constituents of the essential oil of *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) from the north centre region of Morocco. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 4(SUPPL. 1) : 50–54.
- [71]. Deveci E, Tel-çayan G, Duru ME. 2018. Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *ferula elaeochytris* and *Sideritis stricta*. *International Journal of Food Properties* 21(1): 771–783. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1431660>
- [72]. Dimitrov M, Alattia JR, Lemmin T. 2013. Alzheimer's disease mutations in APP but not  $\gamma$ -secretase modulators affect epsilon-cleavage-dependent AICD production. *Nat Commun* 4, 2246. <https://doi.org/10.1038/ncomms3246>
- [73]. Ding W, Liping N, Xing H, Wei Z, Zhoua Q, Nong R, Chen J. 2020. Essential oil extracted from leaf of *Phoebe bournei* (Hemsl.) Yang: chemical constituents, antitumor, antibacterial, hypoglycemic activities. *Natural Product Research* 34(17): 2524–2527. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1542393>
- [74]. Djaber N, Ounaceur LS, Moubine BN, Khaldi T, Rouag M, Berrouague S, Messarah M. 2020. Roundup-induced biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of rats: The ameliorative effects of *linum usitatissimum* oil. *Acta Biochimica Polonica* 67(1) : 53–64. [https://doi.org/10.18388/ABP.2020\\_2898](https://doi.org/10.18388/ABP.2020_2898)

- [75]. Djellouli S, Larbi KS, Meddah B, Rebiai A. 2022. Chemical composition, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* extracts from Algeria. 12(3) : 271–281.
- [76]. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH. 2013. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. Journal of Food and Drug Analysis 22: 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- [77]. Dob T, Dahmane D, Chelghoum C. 2006. Essential oil composition of *Juniperus oxycedrus* growing in Algeria. Pharmaceutical Biology 44(1) : 1–6. <https://doi.org/10.1080/13880200500530922>
- [78]. Dumas BT. 1971. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clinica Chimica Acta. 31: 87-96.
- [79]. Dworski R. 2000. Oxidant stress in asthma. Thorax 55 (2), S51–S53. [https://doi.org/10.1136/thorax.55.suppl\\_2.s51](https://doi.org/10.1136/thorax.55.suppl_2.s51)
- [80]. Ebrahimzadeh MA, Enayatifard R, Khalili M, Ghaffarloo M, Saeedi M, Charati JY. 2014. Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 13(3): 1041–1048.
- [81]. Egas V, Toscano RA, Linares E, Bye R, Espinosa-García FJ, Delgado G. 2015. Cadinane-Type Sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*: Absolute Configuration and Anti-inflammatory Activity. Journal of Natural Products 78(11): 2634–2641. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00571>
- [82]. El Hajjouji H, Rahhal R, Gmouh S, Hsaine M, Fougrach H, Badri W. 2019. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Juniperus phoenicea*, *Juniperus thurifera* and *Juniperus oxycedrus*. Mediterranean Journal of Chemistry 9(3) : 190–198. <https://doi.org/10.13171/mjc93191002145heh>
- [83]. El Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, Doukkali Z, Boudida EH, Touati D, Alaoui K. 2017. Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetraclinis articulata* L. Journal of Traditional and Complementary Medicine 7(3): 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.06.006>
- [84]. El-Abid H, Amaral C, Cunha SC, Augusto TV, Fernandes JO, Correia-da-Silva G, Moumni M. 2019. Chemical composition and anti-cancer properties of *Juniperus oxycedrus* L. essential oils on estrogen receptor-positive breast cancer cells. Journal of Functional Foods 59(March): 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.042>

- [85]. El-Demerdash FM, Yousef MI, Elagamy EI. 2001. Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (*in vitro*). *Journal of Environmental Science and Health* 36(1): 29-42.
- [86]. Elidrissi AE, Mssillou I, Agour A, Tourabi M, Nouioura G, Lyoussi B, Derwich E. 2023. Phytochemical Analysis and Evaluation of Antifungal and Antioxidant Activities of Essential Oil of Fruits from *Juniperus oxycedrus* L. Obtained from Morocco. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 59(6). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902023e21088>
- [87]. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7(2) : 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- [88]. Elwood W, Barnes PJ, Chung KF. 1992. Airway hyperresponsiveness is associated with inflammatory cell infiltration in allergic Brown-Norway rats. *International Archives of Allergy and Immunology* 99(1): 91–97. <https://doi.org/10.1159/000236340>
- [89]. Enogieru AB, Haylett W, Hiss DC, Bardien S, Ekpo OE. 2018. Rutin as a potent antioxidant: Implications for neurodegenerative disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2018/6241017>
- [90]. Er Kemal M, Bakchiche B, Kemal M, Cheraif K, Kara Y, Bardaweel SK, Ghareeb MA. 2023. Six Algerian plants: Phenolic profile, antioxidant, antimicrobial activities associated with different simulated gastrointestinal digestion phases and antiproliferative properties. *Journal of Herbal Medicine* 38(1). <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100636>
- [91]. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine* 13(4) : 341–390. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90181-F](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90181-F)
- [92]. Evrard B. 2020. Physiopathologie de l’allergie IgE-dépendante. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2020(521) : 20–31. [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(20\)30124-6](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(20)30124-6)
- [93]. Ezeja MI, Anaga AO, Asuzu IU. 2015. Antidiabetic, antilipidemic, and antioxidant activities of *Gouania longipetala* methanol leaf extract in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology* 53(4): 605-614.
- [94]. Fadel H, Benayache F, Benayache S. 2016. Antioxidant properties of four Algerian medicinal and aromatic plants *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* L. *Der Pharmacia Lettre*. 2016; 8(3): 72-79.
- [95]. Fan Chung I, Adcock K. 2000. *Asthma: Mechanisms and Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ (44).
- [96]. Farasat A, Ghorbani M, Gheibi N, Shariatifar H. 2020. *In silico* assessment of the inhibitory effect of four flavonoids (Chrysin, naringin, quercetin, kaempferol) on tyrosinase activity using the md simulation approach. *Biotechnologia* 101(3) : 193–204. <https://doi.org/10.5114/bta.2020.97878>

- [97]. Farnsworth, NR. (1990) The Role of Ethno Pharmacology in Drug Development. Ciba Foundation Symposium 154. Bioactive Compounds from Plants. John Wiley & Sons, Baffins Lane, Chichester (England), 2-21.
- [98]. Favier A. 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. 108-115
- [99]. Fleming E, Luo Y. Co-delivery of synergistic antioxidants from food sources for the prevention of oxidative stress. Journal of Agriculture and Food Research 1 (3) :100-107.
- [100]. Flohé L, Günzler WA. 1984. Assays of Gluthathione Peroxidase. Methods in Enzymology 105: 114–120.
- [101]. Francomano F, Caruso A, Barbarossa A, Fazio A, La Torre C, Llamaci R, Matefania. 2019.  $\beta$ -Caryophyllene a sesquiterpene with countless. Applied Sciences 9: 5420–5438.
- [102]. Freitas JV, Gaspar LR. 2016. *In vitro* photosafety and efficacy screening of apigenin, chrysin and beta-carotene for UVA and VIS protection. European Journal of Pharmaceutical Sciences 89: 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.04.032>
- [103]. Garnier G, Bézanger-Beauquesne L, Debraux G. 1961. Ressources médicinales de la flore française. Tome 1. Vigot Frères Éditeurs, Paris, 124-133.
- [104]. Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie 4: 162-16
- [105]. Global Asthma Network. 2014. The Global Asthma Report.
- [106]. Global Burden of Disease Study 2019. 2020. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet 396 (10258): 1204-1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- [107]. Gould HJ, Sutton BJ. 2008. IgE in allergy and asthma today. Nat Rev Immunol 8(3): 205-17.
- [108]. Graf E, et al. 2000. Antioxidant potential of ferulic acid. Free Radic Biol Med 28: 1249–1256.
- [109]. Gülçin İ. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of Toxicology 86(3) : 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- [110]. Gupta S, Yildirim S, Andrikopoulos B, Wille U, Roessner U. 2023. Deciphering the Interactions in the Root–Soil Nexus Caused by Urease and Nitrification Inhibitors: A Review. Agronomy 13(6):1-30. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061603>
- [111]. Gushiken LFS, Beserra FP, Hussni MF, Gonzaga MT, Ribeiro VP, De Souza PF, Pellizzon CH. 2022. Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9004014>

- [112]. Habtemariam S, Lentini G. 2015. The Therapeutic Potential of Rutin for Diabetes: An Update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 15(7) : 524–528. <https://doi.org/10.2174/138955751507150424103721>
- [113]. Hadji Warda, Messaitfa Amar. 2019. Activité antibactérienne de l’huile de cade sur quelques souches de staphylocoques : Application sur des eaux usées traitées par Lagunage Aere. *Algerian journal of arid environment* 9 (12) : 58-65.
- [114]. Hagerman, AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW and Riechel TL. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry* 46(5):1887-1892.
- [115]. Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. 2007. Le stress oxydant. *Revue Medical de Liege* 10 : 628-638
- [116]. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press.
- [117]. Halliwell B. 1993. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*. 23 (Suppl 1) :118-126.
- [118]. Hanifi N. 1991. Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In *conservation des ressources végétales*. Publication d’Actes éditions : 47-49.
- [119]. Harborne JB. 2013. *The flavonoids: advances in research since 1980*.
- [120]. Hider RC, Liu ZD, Khodr HH. 2001. Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymology* 335(February 2001): 190–203. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)35243-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)35243-6)
- [121]. Holgate ST. 2002. Airway inflammation and remodeling in asthma: Current concepts. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* 22(2): 179–189. <https://doi.org/10.1385/MB:22:2:179>
- [122]. Hui LM, Zhao GD, Zhao JJ. 2015.  $\delta$ -Cadinene inhibits the growth of ovarian cancer cells via caspase-dependent apoptosis and cell cycle arrest. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8(6): 6046–6056.
- [123]. James W. Mims M. 2015. Asthma: Definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy and Rhinology* 5(September): S2–S6. <https://doi.org/10.1002/alr.21609>
- [124]. Jasemi SV, Khazaei H, Fakhri S, Mohammadi-noori E, Farzaei MH. 2022. Naringenin Improves Ovalbumin-Induced Allergic Asthma in Rats through Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* (4): 9110-798. <https://doi.org/10.1155/2022/9110798>
- [125]. Jemli M, El, Kamal R, Marmouzi I, Zerrouki A, Cherrah Y, Alaoui K. 2016. Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea*

- (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.) Advances in Pharmacological Sciences 2016 (4).  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/6392656>
- [126]. Jenner PM, Hagan EC, Taylor JM, Cook EL, Fitzhugh OG. 1964. Food flavourings and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. Food and Cosmetics Toxicology (2): 327-343. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(64\)80192-9](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(64)80192-9).
- [127]. Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. 2002. Oxidative stress, inflammation, and diabetic vasculopathies: the role of alpha tocopherol therapy. Free radical research, 36(12), 1331-1336.
- [128]. Jijith US, Jayakumari S. 2017. Recent Advances and Methods for *in-Vitro* Evaluation of Antidiabetic Activity: a Review. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy 8(1): 81–87. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.08117>
- [129]. Johnson SL, Kirk RD, DaSilva NA, Ma H, Seeram NP, Bertin MJ. 2019. Polyphenol microbial metabolites exhibit gut and blood–brain barrier permeability and protect murine microglia against LPS-induced inflammation. Metabolites, 9(4), 78.
- [130]. Jung CH, Lee JY, Cho CH, Kim CJ. 2007. Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. Arch Pharm Res 30(12): 1599–1607.
- [131]. Kandhare AD, Bodhankar SL, Singh V, Mohan V, Thakurdesai PA. 2013. Anti-asthmatic effects of type-A procyanidine polyphenols from cinnamon bark in ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness in laboratory animals. Biomedicine and Aging Pathology 3(1): 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2013.01.003>
- [132]. Kaplan A. 1984. Urea. In: Kaplan A, Kaplan A. Clin Chem. The C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1257-1260.
- [133]. Karaman I, Şahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Şengül M, Adigüzel A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. Journal of Ethnopharmacology 85(2-3):231-235. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00006-0)
- [134]. Karnouf, N. 2009. Effet des extraits de *Capparis spinosa* L. sur la dégranulation et le chimiotactisme des neutrophiles humains. Mémoire de magister. Université de Farhat Abbas, Setif, Algérie. 79 p.
- [135]. Karthik K, Kumar P, Rathore RSB. 2013. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium Parviflorum* by *in vitro* method. Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology 5674(10): 2320–2322.
- [136]. Kavirajan H, Schneider LS. 2007. Efficacy and adverse effects of cholinesterase inhibitors and memantine in vascular dementia: a meta-analysis of randomised controlled trials. The Lancet. Neurology 6(9): 782–792. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70195-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70195-3)

- [137]. Kerbouche L. 2010. Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de quelques plantes des familles de labiacées et de cupressacées. Doctoral dissertation, INA
- [138]. Khaldi T, Chekchaki N, Boumendjel M, Taibi F, Abdellaoui M, Messarah M, Boumendjel A. 2018. Allergologia et Ameliorating effects of *Nigella sativa* oil on aggravation of inflammation, oxidative stress and cytotoxicity induced by smokeless tobacco extract in an allergic asthma model in Wistar rats. *Allergologia et immunopathologia* 46(5) : 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.02.005>
- [139]. Khan H, Marya, Amin S, Kamal MA, Patel S. 2018. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 101 : 860–870. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.007>.
- [140]. Khan H, Sureda A, Belwal T, Çetinkaya S, Süntar İ, Tejada S, Aschner M. 2019. Polyphenols in the treatment of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 18(7): 647–657. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.05.001>
- [141]. Kowluru RA, Chan PS. 2009. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research* 4 : 436-73. <https://doi.org/10.1155/2007/43603>
- [142]. Ku SK, Kim JW, Cho HR, Kim KY, Min YH, Park JH, Roh SS. 2012. Effect of  $\alpha$ -Glucan originated from *aureobasidium pullulans* on asthma induced by ovalbumin in mouse. *Archives of Pharmacal Research* 35(6) : 1073–1081. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0615-8>
- [143]. Kumar N, Goel N. 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* 24 : e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- [144]. Kundu A, Saha S, Walia S, Ahluwalia V, Kaur C. 2013. Antioxidant potential of essential oil and cadinene sesquiterpenes of *Eupatorium adenophorum*. *Toxicological and Environmental Chemistry* 95(1) : 127–137. <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.759577>
- [145]. Küpeli E. 2009. A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *Journal of Ethnopharmacology* 125 : 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.031>
- [146]. Kurpejović E, Wendisch VF, Sariyar Akbulut B. 2021. Tyrosinase-based production of l-DOPA by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105(24) : 9103–9111. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11681-5>
- [147]. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research* 46(5) : 244–282. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.05.002>.
- [148]. Lambrecht BN, Hammad H. 2010. The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet* 376 : 835–43.

- [149]. Lambrecht BN, Hammad H. 2015. The immunology of asthma. *Nature Immunology* 16(1). <https://doi.org/10.1038/ni.3049>
- [150]. Larche M, Robinson DS, Kay AB. 2003. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111(3): 450–63. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.169>
- [151]. Lee Y, Berglund ED, Yu X, Wang MY, Evans MR, Scherer PE, Holland WL, Charron MJ, Roth MG, Unger RH. 2014. Hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes requires insulin-resistant alpha cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(36): 13217–13222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409638111>
- [152]. Lenta B N, Vonthron-Sénécheau C, Weniger D, Devkota K P, Ngoupayo J, Kaiser M, Naz Q, Choudhary MI, Tsamo E, Sewald N. 2007. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*, *Molecules* 12 :1548–15. <https://doi.org/10.3390/12081548>
- [153]. Létuvé S, Taillé C. 2013. Physiopathologie de la réponse inflammatoire dans l’asthme de l’adulte. *EMC - Pneumologie* 10(2) : 1–8. [https://doi.org/10.1016/s1155-195x\(12\)50795-4](https://doi.org/10.1016/s1155-195x(12)50795-4)
- [154]. Liju VB, Jeena K, Kuttan R. 2011. An evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of essential oil from *Curcuma longa*. *L. Indian Journal of Pharmacology* 43(5) : 526–531. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.84961>
- [155]. Lim JO, Song KH, Lee IS. 2021. *Cimicifugae rhizoma* extract attenuates oxidative stress and airway inflammation via the upregulation of Nrf2/HO-1/NQO1 and downregulation of NF-κB phosphorylation in ovalbumin-induced Asthma. *Antioxidants* 10: 16-26. <https://doi.org/10.3390/antiox10101626>
- [156]. Lin SC, Shi LS, Ye YL. 2019. Advanced molecular knowledge of therapeutic drugs and natural products focusing on inflammatory cytokines in asthma. *Cells* 8(7). <https://doi.org/10.3390/cells8070685>
- [157]. Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang CC, Kandaswamy E, Zhou T, Zuo L. 2018. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Frontiers in Physiology* 9(5): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00477>
- [158]. Liyanaarachchi GD, Samarasekera JKR, Mahanama KRR, Hemalal KDP. 2018. Tyrosinase, elastase, hyaluronidase inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. *Industrial Crops and Products* 111: 597-605. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.019>
- [159]. Lleo A, Greenberg SM, Growdon JH. 2006. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine* 57: 513-533.

- [160]. Llorens-Molina JA, Vacas S, Sabater J. 2016. Essential oil composition of berries and leaves of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. from two typical substrates of Valencia (Spain). *Volatiles & Essent. Oils* 3(1) : 23–30.
- [161]. Loizzo MR, Saab AM, Statti GA, Menichini F. 2007. Composition and  $\alpha$ -amylase inhibitory effect of essential oils from *Cedrus libani*. *Fitoterapia* 78(4) : 323–326. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.00>
- [162]. Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Statti GA, Menichini F, Lampronti D, Doerr HW. 2008. Phytochemical analysis and *in vitro* antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. *Chemistry and Biodiversity* 5(3): 461–470. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890045>
- [163]. Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. 2007. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chemistry* 105(2) : 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.015>
- [164]. Lorençoni MF, Figueira MM, Toledo e Silva MV, Pimentel Schmitt EF, Endringer DC, Scherer R, Barth T, Bertolucci SKV, Fronza M. 2020. Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112562>.
- [165]. Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves V D. 2019. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules* 24(22) : 14–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>
- [166]. Luca M, Luca A, Calandra C. 2015. The Role of Oxidative Damage in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Oxid Med Cell Longev* 2015:504678. <https://doi:10.1155/2015/504678>
- [167]. Madore AM, Laprise C. 2010. Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *J Asthma Allergy* 20 (3):107-21. <https://doi.org/10.2147/JAA.S8970>
- [168]. Mahmood N. 2016. A review of  $\alpha$ -amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological state such as obesity and diabetes. *Comparative Clinical Pathology* 25(6) : 1253–1264. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-1967-x>
- [169]. Mani RJ, Mittal K, Katare DP. 2018. Protective effects of quercetin in zebrafish model of Alzheimer's disease. *Asian Journal of Pharmaceutics* 12(2): S660–6.
- [170]. Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD. 2016. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease: a mini review *Oxidative medicine and cellular longevity* (2016) : 8590578. <https://doi.org/10.1155/2016/8590578>

- [171]. Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulay RD. 1986. Determination of sun protection factor by spectrophotometry. *An Bras Dermatol Rio de Janeiro* 61 : 121-124.
- [172]. Marongiu B, Porcedda S, Caredda A, Gioannis B, Vargiu L, Colla P. 2003. Extraction of *juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour and Fragrance Journal* 18 (7) : 390-397. <https://doi.org/10.1002/ffj.1224>
- [173]. Mazari K. 2008. Étude phytochimique et pouvoir antimicrobien de *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L., et *Cupressus sempervirens* L. de la région de Tlemcen. Mémoire de magister, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
- [174]. Meringolo L, Bonesi M, Sicari V, Rovito S, Passalacqua NG, Loizzo MR, Tundis R. 2022. Essential Oils and Extracts of *Juniperus macrocarpa* Sm. and *Juniperus oxycedrus* L.: Comparative Phytochemical Composition and Anti-Proliferative and Antioxidant Activities. *Plants* 11(8). <https://doi.org/10.3390/plants11081025>
- [175]. Mërtiri I, Păcularu-Burada B, Stănciuc N. 2024. Phytochemical Characterization and Antibacterial Activity of Albanian *Juniperus communis* and *Juniperus oxycedrus* Berries and Needle Leaves Extracts. *Antioxidants* 13(3) : 345. <https://doi.org/10.3390/antiox13030345>
- [176]. Miara MD, Bendif H, Rebbas K, Rabah B, Hammou MA, Maggi F. 2019. Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine* 16(6): 100262. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100262>
- [177]. Miara MD, Hammou MA, Aoul SH. 2013. Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie). *Phytothérapie* 11(4) : 206–218.
- [178]. Miceli N, Marino A, Köroğlu A. 2020. Comparative study of the phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts of five *Juniperus* L. (Cupressaceae) taxa growing in Turkey. *Natural Product Research* 34(11):1636-1641. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1523162>
- [179]. Mirmortazavi SS, Farvandi M, Ghafouri H, Mohammadi A, Shourian M. 2019. Evaluation of novel pyrimidine derivatives as a new class of mushroom tyrosinase inhibitor. *Drug Design Development and Therapy* 8(13) :2169-2178. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S209324>
- [180]. Mironczuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. 2018. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences* 63 (1) :68-78. <https://doi:10.1016/j.advms.2017.05.005>
- [181]. Mishra A, Mishra PS, Bandopadhyay R, Khurana N, Angelopoulou E, Paudel YN, Piperi C. 2021. Neuroprotective potential of chrysin: Mechanistic insights and therapeutic potential for neurological disorders. *Molecules* 26(21) : 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules2621645>

- [182]. Mishra AK, Mishra A, Chattopadhyay P. 2011. Herbal cosmeceuticals for photoprotection from ultraviolet B radiation: A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 10(3): 351–360. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i3.7>
- [183]. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. 2014. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants and Redox Signaling* 20(7) : 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- [184]. Moreno L, Bello R, Beltran B, Calatayud S, Primo-Yúfera E, Esplugues J. 1998. Pharmacological screening of different *Juniperus oxycedrus* L. extracts. *Pharmacology and Toxicology* 82(2): 108–112. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1998.tb01407.x>
- [185]. Mouffouk C, Mouffouk S, Oulmi K, Mouffouk S, Haba H. 2020. *In vitro* photoprotective, hemostatic, anti-inflammatory and antioxidant activities of the species *Linaria scariosa* Desf. *South African Journal of Botany* 130: 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.003>
- [186]. Moura CTM, Bezerra FC, De Moraes IMI, Magalhães PJC, Capaz FR. 2005. Increased responsiveness to 5-hydroxytryptamine after antigenic challenge is inhibited by nifedipine and niflumic acid in rat trachea *in vitro*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 32(12): 1119–1123. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04308.x>
- [187]. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 14(4), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.02.002>
- [188]. Mulyaningsih S, Youns M, El-Readi MZ, Ashour ML, Nibret E, Sporer F, Wink M. 2010. Biological activity of the essential oil of *Kadsura longipedunculata* (Schisandraceae) and its major components. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62(8): 1037–1044. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01119.x>
- [189]. Murray R. 1984. Alanine Aminotransferase. Kaplan A et al. *Clinical Chemistry*. Toronto, Princeton. 1088-1090.
- [190]. Murray R. 1984. Aspartate aminotransferase. In: Kaplan, A. et al. (Eds.), *Clinical Chemistry*. Toronto. Princeton. pp. 1112–1116
- [191]. Murray R. 1984. Creatinine. Kaplan A et al. *Clinical chemistry*. Toronto. Princeton. 1261-1266.
- [192]. Nafti S, Tarigh S, El Ftouh M, et al. 2009. Prevalence of asthma in North Africa: the asthma insights and reality in the Maghreb. *Respiratory medicine* 103(2): S2–S11. [https://doi.org/10.1016/S0954-6111\(09\)70022-8](https://doi.org/10.1016/S0954-6111(09)70022-8)
- [193]. Naz R, Saqib F, Awadallah S, Wahid M, Latif MF, Iqbal I, Mubarak MS. 2023. Food Polyphenols and Type II Diabetes Mellitus: Pharmacology and Mechanisms. *Molecules* 28(10) : 3996. <https://doi.org/10.3390/molecules28103996>

- [194]. Naz S, Imran M, Rauf A, Orhan IE, Shariati MA, Iahtisham-UI-Haq, Heydari M. 2019. Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. Life Sciences 235(07). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116797>
- [195]. Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 Years. Journal of natural products 70(3) : 461–477. <https://doi.org/10.1021/np068054v>
- [196]. Niki E. 2016. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? Archives of Biochemistry and Biophysics 595: 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.017>
- [197]. Ninich O, Et-Tahir A, Kettani K, Ghanmi M, Aoujdad J, El-Antry S, Satrani B. 2022. Moroccans Ethnobotanical Knowledge about Medicinal Tar. Tropical Journal of Natural Product Research 6(3): 317–329. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v6i3.5>
- [198]. Noori T, Dehpour AR, Sureda A, Sobarzo-Sanchez E, Shirooie S. 2021. Role of natural products for the treatment of Alzheimer’s disease. European Journal of Pharmacology 898(November 2020): 173974. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173974>
- [199]. Nunes C, Pereira AM, Morais-Almeida M. 2017. Asthma costs and social impact. Asthma Research and Practice 3(1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40733-016-0029-3>
- [200]. Oboh G, Ademosun AO, Ayeni PO, Omojokun OS, Bello F. 2015. Comparative effect of quercetin and rutin on  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in rat pancreas. Comparative Clinical Pathology 24(5): 1103–1110. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-2040-5>
- [201]. Oliveira S de, Oliveira B, Veras D, Lúcia V, Lima DM, Maria D, Lopes DS. 2021. The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.). Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. Journal of Ethnopharmacology 265(6). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248>
- [202]. Orhan Nilüfer, Aslan M, Demirci B, Ergun F. 2012. A bioactivity guided study on the antidiabetic activity of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* L. leaves. Journal of Ethnopharmacology 140(2) : 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.042>
- [203]. Orhan Nilüfer, Berkkan A, Deliorman Orhan D, Aslan M, Ergun F. 2011. Effects of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* on tissue lipid peroxidation, trace elements (Cu, Zn, Fe) and blood glucose levels in experimental diabetes. Journal of Ethnopharmacology 133(2) : 759–764. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.002>
- [204]. Orhan Nilufer, Orhan IE, Ergun F. 2011. Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five *Juniperus* species. Food and Chemical Toxicology 49(9) : 2305–2312. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.031>

- [205]. Oršolić N, Nemrava J, Jeleč Ž, Kukulj M, Odeh D, Jakopović B, Bagatin D. 2022. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activities of Chrysin and Naringenin in a Drug-Induced Bone Loss Model in Rats. *International Journal of Molecular Sciences* 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052872>
- [206]. Ouelbani R, Bensari S, Mouas TN, Khelifi D. 2016. Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology* 194 : 196–218.
- [207]. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44(6) : 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- [208]. Öztürk M, Tümen I, Uğur A, Aydoğmuş-Öztürk F, Topçu G. 2011. Evaluation of fruit extracts of six Turkish Juniperus species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(5): 867–876. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4258>
- [209]. Özyürek M, Güngör N, Baki S, Güçlü K, Apak R. 2012. Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols. *Analytical Chemistry* 84(18): 8052-9. <https://doi.org/10.1021/ac301925b>
- [210]. Palmer AM. 2011. Neuroprotective therapeutics for Alzheimer's disease: Progress and prospects. *Trends in Pharmacological Sciences* 32(3): 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.007>
- [211]. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. 2016. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science* 5: e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- [212]. Pandey BK, Rizvi SI. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 5(2): 270–278.
- [213]. Panhwar QK, Memon S. 2014. Synthesis, characterisation, and antioxidant study of Cr (III)-rutin complex. *Chemical Papers* 68(5): 614–623. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0494-6>
- [214]. Papoutsis K, Zhang J, Bowyer MC, Brunton N, Gibney ER, Lyng J. 2021. Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition properties: A review. *Food and Chemical* 338 : 128119.
- [215]. Patelis A, Gunnbjornsdottir M, Alving K et al. 2016. Allergen extract vs. component sensitization and airway inflammation, responsiveness and new-onset respiratory disease. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 46(5): 730–740. <https://doi.org/10.1111/cea.12607>
- [216]. Pathak MP, Patowary P, Das A, Goyary D, Karmakar S, Bhutia YD, Chattopadhyay P. 2021. Crosstalk between AdipoR1/AdipoR2 and Nrf2/HO-1 signal pathways activated by  $\beta$ -caryophyllene suppressed the compound 48/80 induced pseudo-allergic reactions. *Clinical and*

- Experimental Pharmacology and Physiology 48(11) : 1523–1536. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13555>
- [217]. Peng Y, Jin H, Xue YH, Chen Q, Yao SY, Du MQ, Liu S. 2023. Current and future therapeutic strategies for Alzheimer’s disease: an overview of drug development bottlenecks. *Frontiers in Aging Neuroscience* 15(9) : 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1206572>
- [218]. Peraro MD, Behr D, Fraering PC. 2013. Alzheimer’s disease mutations in APP but not  $\gamma$ -secretase modulators affect epsilon-cleavage-dependent AICD production. *Nature communications* 4 (2013): 2246. <https://doi.org/10.1038/ncomms3246>
- [219]. Perron NR, Brumaghim JL. 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics* 53(2): 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>
- [220]. Phadke AV, Tayade AA, Khambete MP. 2021. Therapeutic potential of ferulic acid and its derivatives in Alzheimer’s disease—A systematic review. *Chemical Biology and Drug Design* 98(5): 713–721. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13922>
- [221]. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Bitto A. 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- [222]. Prasad N, Yang B, Kong KW, Khoo HE, Sun J, Azlan A, Romli Z Bin. 2013. Phytochemicals and antioxidant capacity from *Nypa fruticans* Wurm. *Fruit. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/154606>
- [223]. Prasher P, Sharma M, Mehta M, Paudel KR, Satija S, Chellappan DK, Dua K. 2020. Plants derived therapeutic strategies targeting chronic respiratory diseases: Chemical and immunological perspective. *Chemico-Biological Interactions* 325(4): 109125. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109125>
- [224]. Qanash H, Al-Rajhi AMH, Almashjary MN, Basabrain AA, Hazzazi MS, Abdelghany TM. 2023. Inhibitory potential of rutin and rutin nano-crystals against *Helicobacter pylori*, colon cancer, hemolysis and Butyrylcholinesterase *in vitro* and *in silico*. *Applied Biological Chemistry* 66(1). <https://doi.org/10.1186/s13765-023-00832-z>
- [225]. Quezel S, Santa P. 1962. *Nouvelle Flore de l’Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*. CNRS, Paris.
- [226]. Rajizadeh MA, Najafipour H, Fekri MS, Rostamzadeh F, Jafari E, Bejeshk MA, Masoumi-Ardakani Y. 2019. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of myrtenol in the rats with allergic asthma. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 18(3) : 1488–1498. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100749>

- [227]. Ramshaw HS, Lopez A, Woodcock O JM, Baglay CJ, McClure BJ. 2001. New approaches in the treatment of asthma. *Immunology and Cell Biology* 79: 154–159.
- [228]. Randhawa M, Seo I, Liebel F, Southall MD, Kollias N, Ruvolo E. 2015. Visible light induces melanogenesis in human skin through a photoadaptive response. *PLOS ONE* 10(6) : e0130949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130949>
- [229]. Randjelović P, Veljković S, Stojiljković N, Sokolović D, Ilić I, Laketić D, Randjelović N. 2015. The beneficial biological properties of salicylic acid. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 32(4): 259–265. <https://doi.org/10.1515/afmnai-2015-0026>
- [230]. Rasouli H, Hosseini-Ghazvini SMB, Adibi H, Khodarahmi R. 2017. Differential  $\alpha$ -amylase/ $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food and Function* 8(5) : 1942-1954. <https://doi.org/10.1039/c7fo00220c>
- [231]. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biology Medicine* 26(9-10):1231-7. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- [232]. Reynaert NL. 2011. Glutathione biochemistry in asthma. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1810(11): 1045–1051. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.01.010>
- [233]. Rishitha N, Muthuraman A. 2018. Therapeutic evaluation of solid lipid nanoparticle of quercetin in pentylenetetrazole induced cognitive impairment of zebrafish. *Life sciences* 199: 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.010>
- [234]. Rogerio AP, Andrade EL, Leite DFP, Figueiredo CP, Calixto JB. 2009. The med section: Mediators and receptors in the resolution of inflammation preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene  $\alpha$ -humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology* 158(4): 1074-87. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00177.x>
- [235]. Rouibah Z, Ben Mensour A, Rekik O, Boumendjel M, Taibi F, Bouaziz M, Boumendjel A. 2019. Chemical composition, antioxidant activities, in an allergic asthma model, of *Olea europaea* L. leaf extracts from Collo (Skikda, Algeria). *Drug and chemical toxicology* 45(1): 197–208. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1679827>
- [236]. Saab AM, Gali-Muhtasib H, Maietti S, Grandini A, Rossi D, Lampronti I, Gambari R. 2014. Comparative antiproliferative activities of wood and seeds essential oils of *Juniperus Oxycedrus* L. against K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *Journal of Essential Oil Research* 26(4): 301–307. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.829006>

- [237]. Sabokbar A, Millett PJ, Myer B, Rushton N. 1994. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells *in vitro*. *Bone and Mineral* 27: 57-67.
- [238]. Saewan N, Jimtaisong A. 2013. Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3(9) : 129–141. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3923>
- [239]. Sahiner UM, Birben E, Erzurum S, Sackesen C, Kalayci O. 2011. Oxidative stress in asthma. *World Allergy Organization Journal* 4(10): 151–158. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e318232389e>
- [240]. Saravanan S, Parimelazhagan T. 2014. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. *Food Science and Human Wellness* 3(2): 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.05.001>
- [241]. Sastre M, Steiner H, Fuchs K, et al. 2001. Presenilin-dependent  $\gamma$ -secretase processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2: 835–841. <https://doi:10.1093/embo-reports/kve180>
- [242]. Satrani B, Ghanmi M, Mansouri N, Amusant N. 2015. Antioxidant properties of essential oils extracted from three species of Moroccan junipers. *Environmental Science: An Indian Journal* 11(7): 239–247.
- [243]. Sayre RM, Agin PP, Levee GJ, Marlowe EA. 1979. Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sun screening formulas. *Photochemistry and Photobiology* 29(3) : 559-566.
- [244]. Sekiou O, Boumendjel M, Taibi F, Boumendjel A, Sekiou O, Boumendjel M. 2018. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia herba alba* aqueous extract on hyperlipidemia and oxidative damage in alloxan-induced diabetic rats. *Archives of physiology and biochemistry* 125(2): 163–173. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1443470>
- [245]. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *Nature* 138(7) : 32 <https://doi.org/10.1038/138032a0>
- [246]. Shahidi F, Ambigaipalan P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *Journal of Functional Foods* 18 : 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- [247]. Shakerinasab N, Bejeshk MA, Pourghadamyari H, Najafipour H, Eftekhari M, Mottaghipisheh J, Doustimotlagh AH. 2022. The Hydroalcoholic Extract of *Nasturtium officinale* Reduces Lung Inflammation and Oxidative Stress in an Ovalbumin-Induced Rat Model of Asthma. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2022: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/5319237>
- [248]. Sherwin ER. 1976. Antioxidants for vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* 53: 430–436. <https://doi.org/10.1007/BF02605739>

- [249]. Shi H, Noguchi N, Niki E. 2001. Galvinoxyl Method for Standardizing Electron and Proton Donation Activity 335:157-66. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(01\)35240-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(01)35240-0)
- [250]. Sicherer SH, Sampson HA. 2018. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. The Journal of allergy and clinical immunology 141(1): 41-58. <https://doi:10.1016/j.jaci.2017.11.003>
- [251]. Siddappaji KK, Gopal S. 2021. Molecular mechanisms in Alzheimer's disease and the impact of physical exercise with advancements in therapeutic approaches. AIMS Neuroscience 8(3) : 357–389. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2021020>
- [252]. Siddhuraju P, Becker K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera Lam.*) leaves. Journal of Agriculture and Food Chemistry 51: 2144–2155. <https://doi.org/10.1021/jf020444>.
- [253]. Sies H. 2018. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. Current Opinion in Toxicology 7(2018) : 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>
- [254]. Silveira AC, Dias JP, Santos VM, Oliveira PF, Alves MG, Rato L, Silva BM. 2018. The Action of Polyphenols in Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: A Common Agent for Overlapping Pathologies. Current Neuropharmacology 17(7) : 590–613. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180803162059>
- [255]. Simpson CR, Sheikh A. 2014. Epidemiology of Asthma. Clinical Asthma: Theory and Practice 1.
- [256]. Singleton VL, Rossi JA. 1965 Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16(3):144-58. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- [257]. Sirois P. 2019. Leukotrienes: One step in our understanding of asthma. Respiratory Investigation 57(2) : 97-110.
- [258]. Souilah N, Bendif H, Ullah Z, Hamel T, Djarri L, Öztürk M, Mustafa AM. 2021. Lc-ms/ms simultaneous determination of 37 bioactive compounds in *bunium crassifolium* batt. And its biological activities. Journal of Research in Pharmacy 25(4): 450–463. <https://doi.org/10.29228/jrp.36>
- [259]. Sri Balasubashini M, Rukkumani R, Menon VP. 2003. Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. Acta Diabetologica 40: 118-122.
- [260]. Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP. 2007. Ferulic acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 40(2): 92–100. <https://doi.org/10.3164/jcbn.40.92>

- [261]. Stevanato R, Bertelle M, Fabris S. 2014. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 69(1) : 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.02.014>
- [262]. Stevenson DD, Szczeklik A. 2006. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 118 (4): 773-86; 787-8. <https://doi:10.1016/j.jaci.2006.07.024>
- [263]. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2): S73-80
- [264]. Sugiura H, Ichinose M. 2008. Oxidative and nitrative stress in bronchial asthma. *Antioxidants and Redox Signaling* 10(4) : 785–797. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1937>
- [265]. Swain, Tony, ed. 1968. *Plants in the Development of Modern Medicine*. Harvard University Press. ISBN 0-674-67330-1.
- [266]. Szwajgier D, Borowiec K, Zapp J. 2020. Activity-guided isolation of cholinesterase inhibitors quercetin, rutin and kaempferol from *Prunus persica* fruit. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 75(3–4): 87–96. <https://doi.org/10.1515/znc-2019-0079>
- [267]. Szydłowska-Czeraniak A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E. 2008. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta* 76(4) : 899–905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.055>
- [268]. Taha M, Ullah H, Al Muqarrabun LMR, Khan MN, Rahim F, Ahmat N, Khan KM. 2018. Bisindolylmethane thiosemicarbazides as potential inhibitors of urease : Synthesis and molecular modeling studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 26(1): 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.028>
- [269]. Tamfu AN, Kucukaydin S, Quradha MM, et al. 2022. Ultrasound-Assisted Extraction of *Syringa vulgaris* Mill., *Citrus sinensis* L. and *Hypericum perforatum* L.: Phenolic Composition, Enzyme Inhibition and Anti-quorum Sensing Activities. *Chemistry Africa* 5: 237–249. <https://doi.org/10.1007/s42250-022-00315-6>
- [270]. Tavares L, McDougall GJ, Fortalezas S, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN. 2012. The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperus* species found in Portugal. *Food Chemistry* 135(2): 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.023>
- [271]. Topçu M, Ay A, Bilici C, Sarikürkcü M, Öztürk M, Ulubelen A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103(3):816-822. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.028>

- [272]. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39: 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- [273]. Verma A, Chen J. 2016. Introduction to the Brain and Nervous System. *Alzheimer's Disease Decoded* : 3–29. [https://doi.org/10.1142/9789813109261\\_0001](https://doi.org/10.1142/9789813109261_0001)
- [274]. Waldemar G, Burns A. 2017. *Alzheimer's Disease*. 2nd edn. Oxford Neurology Library. Oxford: Oxford Academic 2 (4). <https://doi.org/10.1093/med/9780198779803.001.0001>
- [275]. Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, La Voie EJ, Huang TC, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4869-4873
- [276]. Wang SW, Wang YJ, Su YJ, Zhou WW, Yang SG, Zhang R, Zhao M, Li YN, Zhang ZP, Zhan DW, Liu RT. 2012. Rutin inhibits  $\beta$ -amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *Neurotoxicology* 33(3) : 482–490.
- [277]. Weckbecker G, Cory JG. 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters* 40(3): 257–264. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(88\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0304-3835(88)90084-5)
- [278]. Wenger C. 1984. Alkaline phosphatase: In Kaplan A et al. *Clin. Chem.* The C.V. Mosby Co. St Louis. Princeton, Toronto. 1094-1098.
- [279]. Whitcomb DC, Lowe ME. 2007. Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive Diseases and Sciences* 52: 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9589-z>
- [280]. Williams LAD, O'Connar A, Latore L, Dennis O, Ringer S, Whittaker JA, Kraus W. 2008. The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (Immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals. *West Indian Medical Journal* 57(4): 327–331
- [281]. Xie Yixi, Yang Weijie X CJ. 2017. Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure-activity relationship. *Food and Function* 5(10): 2582–2589. <https://doi.org/10.1039/c4fo00287c>
- [282]. Yaglioglu AS, Eser F. 2017. Screening of some Juniperus extracts for the phenolic compounds and their antiproliferative activities. *South African Journal of Botany* 113: 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.005>
- [283]. Yanishlieva NV, Marinova E, Pokorný J. 2006. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108(9): 776–793. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600127>

- [284]. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. 2013. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 6(1): 19–33. <https://doi.org/10.1177/1756285612461679>
- [285]. You H, Chen S, Mao L, Li B, Yuan Y, Li R, Yang X. 2014. The adjuvant effect induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is mediated through oxidative stress in a mouse model of asthma. *Food and Chemical Toxicology* 71 : 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.012>
- [286]. Zaidi SF, Muhammad JS, Shahryar S, Usmanghani K, Gilani AH, Jafri W, Sugiyama T. 2012. Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology* 141(1) : 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.001>
- [287]. Zemmouri H, Boumendjel A, Messarah M. 2020. Effets de l'extrait de feuilles de *Borago officinalis* sur l'inflammation et les paramètres du stress oxydants dans un modèle murin d'asthme expérimental. *Revue Française d'Allergologie* 60(4) : 385. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2020.02.228>
- [288]. Zemmouri Hanene, Sekiou O, Ammar S, Feki A El, Bouaziz M, Messarah M, Boumendjel A. 2017. *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. *Biology* 55(1) : 1561–1568. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.131090>
- [289]. Zengin G, Aktumsek A, Guler GO, Cakmak YS, Yildiztugay E. 2011. Antioxidant properties of methanolic extract and fatty acid composition of *Centaurea urvillei* DC. subsp. *hayekiana* Wagenitz. *Records of Natural Products* 5(2) : 123–132.
- [290]. Zengin G, Sarikurkcu C, Aktumsek A, Ceylan R, Ceylan O. 2014. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. Endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products* 53: 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.043>
- [291]. Zhang L, Li D, Cao F, Xiao W, Zhao L, Ding G, et al. 2018. Identification of human acetylcholinesterase inhibitors from the constituents of EGB761 by modeling docking and molecular dynamics simulations. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 21 : 41–47.
- [292]. Zheng Z, Wu L, Deng W, Yi K, Li Y. 2023. Polyphenol Composition, Antioxidant Capacity and Xanthine Oxidase Inhibition Mechanism of Furong Plum Fruits at Different Maturity Stages. *Foods* 12(23). <https://doi.org/10.3390/foods12234253>

- [293]. Živić N, Milošević S, Dekić V, Dekić B, Ristić N, Ristić M, Sretić L. 2019. Phytochemical and antioxidant screening of some extracts of *Juniperus communis* L. and *Juniperus oxycedrus* L. Czech Journal of Food Sciences 37(5): 351–358. <https://doi.org/10.17221/28/2019-CJFS>

# **ANNEXES**

## ANNEXES

**Annexe 1:** Composition de l'aliment pour 1 kilogramme de nourriture (ONAB, Bejaïa)

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
<b>Mais</b>	620	62
<b>Soja</b>	260	26
<b>Phosphate</b>	16	1.6
<b>Calcaire</b>	9	0.9
<b>Cellulose</b>	10	1.0
<b>Minéraux</b>	10	1.0
<b>Vitamines</b>	10	1.0

**Annexe 2:** Solutions utilisées pour le dosage des paramètres du stress oxydant.

Solutions	Composition	Quantités
<b>Solution de lavage</b> (pH=7,4)	- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>1,36 g</b>
	- NaCl	<b>9 g</b>
	- Eau distillée	<b>1 L</b>
<b>Solution de BRADFORD</b>	- Bleu de Coomassie (G-250)	<b>100 mg</b>
	- Ethanol 95%	<b>50 mL</b>
	- Acide ortho-phosphorique	<b>100 mL</b>
	- Eau distillée	<b>1 L</b>
<b>Tampon phosphate</b> (pH=7,4)	- Tris 50 mM	<b>6,057 g</b>
	- NaCl 150 mM	<b>8,775 g</b>
<b>TCA-BHT</b>	- TCA	<b>20 g</b>
	- BHT	<b>1 g</b>
	- Eau distillée	<b>100 mL</b>
<b>Tris-TBA</b>	- Tris	<b>0,315 g</b>
	- TBA	<b>1, 729</b>
	- Eau distillée	<b>100 mL</b>
<b>Tampon TBS</b> (pH=7,4)	- NaCl 150 mM	<b>4,387 g</b>
	- Tris 50 mM	<b>3,028 g</b>
<b>GSH</b>	- Eau distillée	<b>500 mL</b>
	- GSH	<b>0,491 g</b>
	- Eau distillée	<b>16 mL</b>
<b>DTNB</b>	- DTNB	<b>5,151 g</b>
	- Eau distillée	<b>13 mL</b>
<b>TCA</b>	- TCA	<b>0,4 g</b>
	- Eau distillée	<b>40 mL</b>

**Annexe 3: Réactifs utilisés pour le dosage de l'aspartate aminotransférase**

<b>Réactif R1: Tampon</b>	Tris pH 7.8	80 mmol/L
	L- Aspartate	200 mmol/L
<b>Réactif R2: Substrat</b>	NADH	0.18 mmol/L
	Lactate déshydrogénase (LDH)	800 U/L
	Malate déshydrogénase (MDH)	600 U/L
	$\alpha$ -Cétoglutarate	12 mmol/L

**Annexe 4: Réactifs utilisés pour le dosage de l'alanine aminotransférase**

<b>Réactif R1: Tampon</b>	Tris pH 7.8	100 mmol/L
	L- Alanine	500 mmol/L
<b>Réactif R2: Substrat</b>	NADH	0.18 mmol/L
	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200 U/L
	$\alpha$ -Cétoglutarate	15 mmol/L

**Annexe 5: Réactifs utilisés pour le dosage de la phosphatase alcaline.**

<b>Réactif R1: Tampon</b>	Diéthanolamine (DEA) pH 10.4	1mmol/L
	Chlorure de magnésium	0.5mmol/L
<b>Réactif R2: Substrat</b>	p-Nitrophénylphosphate (pNPP)	10 mmol/L

**Annexe 6: Réactifs utilisés pour le dosage de l'albumine.**

Réactifs	Composition	Concentration
<b>R1</b>	Vert de bromocrésol pH 4.2	0.12 mmol/L.
<b>Étalon</b>	Albumine	5 g/dL

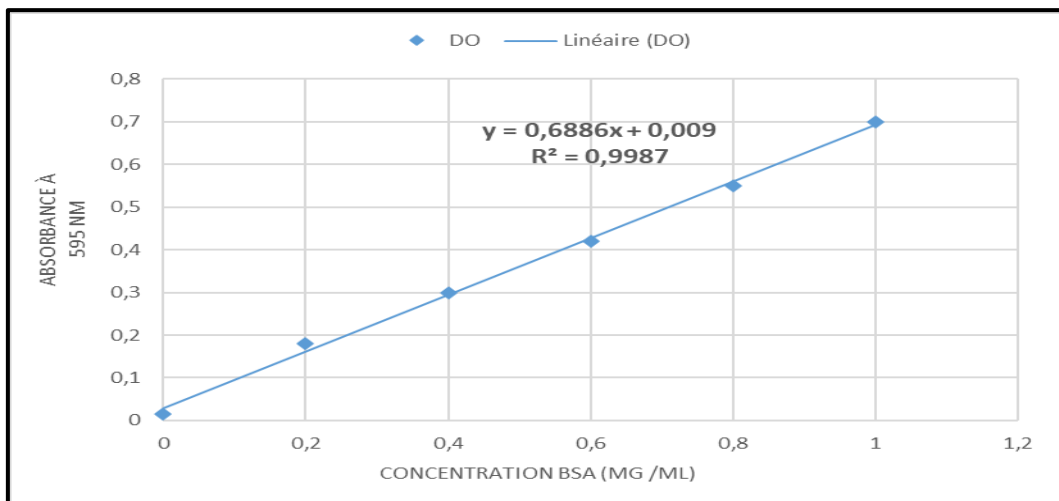
**Annexe 7 : Réactifs utilisés pour le dosage de l'urée.**

<b>Réactif R1: Tampon</b>	Phosphate pH 6.7 EDTA	50 mmol/L
	Sodium salicylate	2 mmol/L
	Sodium nitroprusside	400 mmol/L
		10 mmol/L
<b>Réactif 2: NaClO</b>	Sodium hydrochlorite (NaClO)	140 mmol/L
	Sodium hydroxyde	150 mmol/L
<b>Réactif 3: Enzymes</b>	Uréase	30000 U/L
<b>Urée calibrant</b>	Urée aqueux (Standard)	50 mg/dL

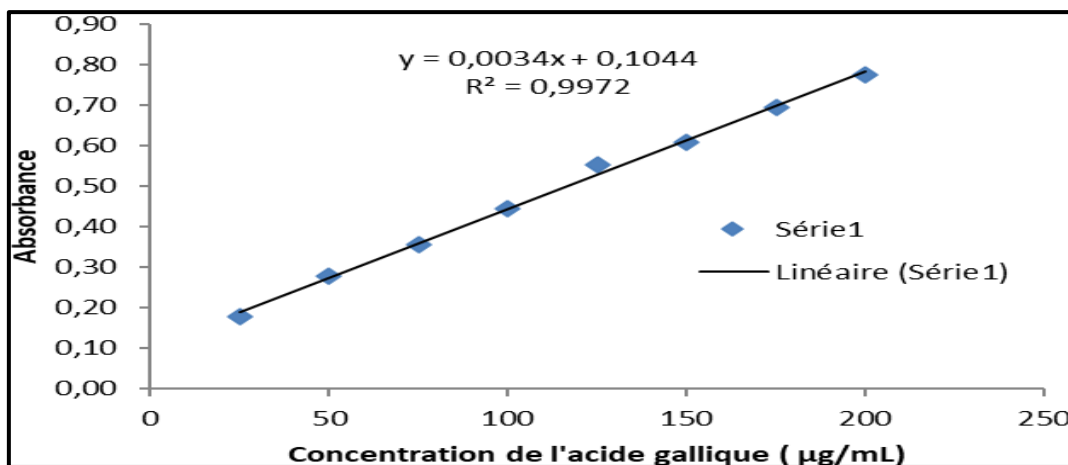
**Annexe 8: Réactifs utilisés pour le dosage de la créatinine**

<b>Réactif 1</b>	Acide picrique 17.5 mmol/L
<b>Réactif 2</b>	Hydroxyde de sodium 0.29mol/L
<b>créatinine calibrant</b>	Créatinine aqueux (standard) 2 mg/dL

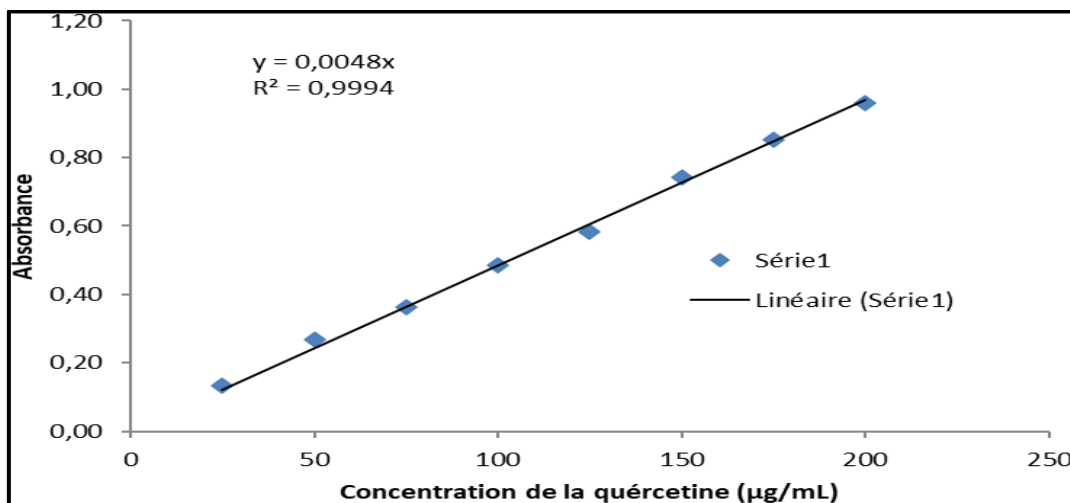
**Annexe 9: Courbe d'étalonnage de la BSA (1mg/mL).**



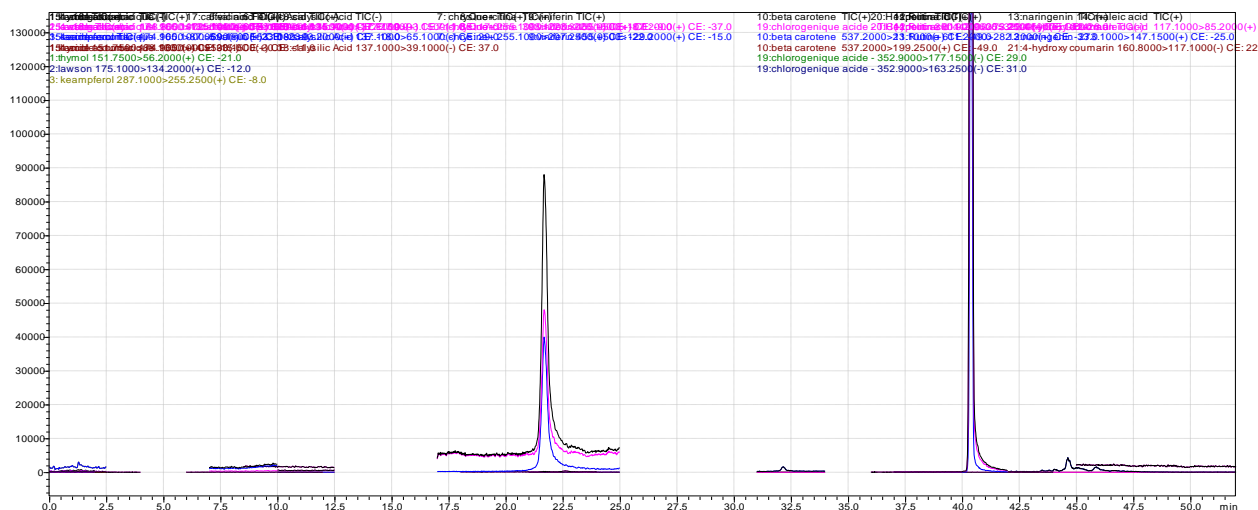
**Annexe 10:** Courbe d'étalonnage à l'acide gallique pour mesurer les polyphénols totaux



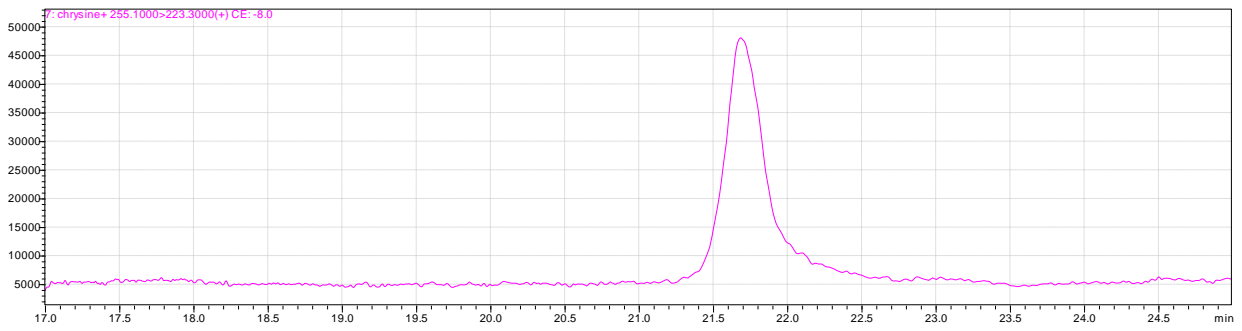
**Annexe 11:** Courbe d'étalonnage à la quercétine pour mesurer les flavonoïdes



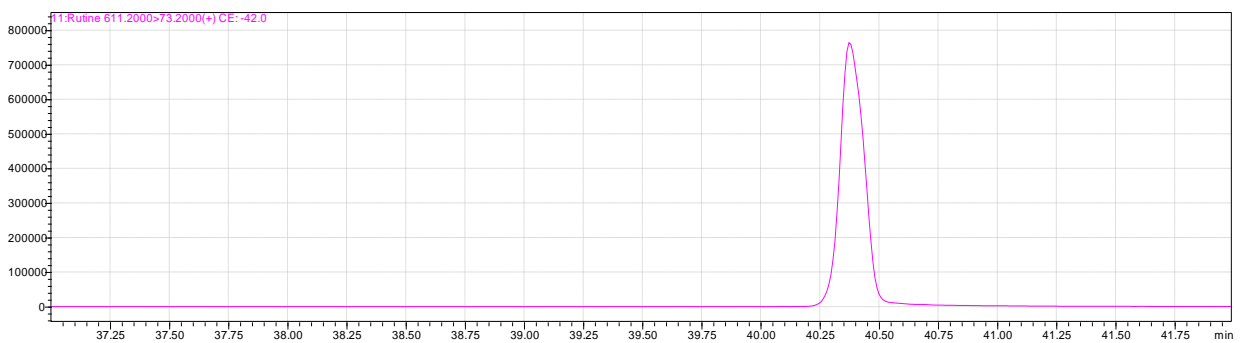
**Annexe 12:** Chromatogramme de l'extrait EAJO



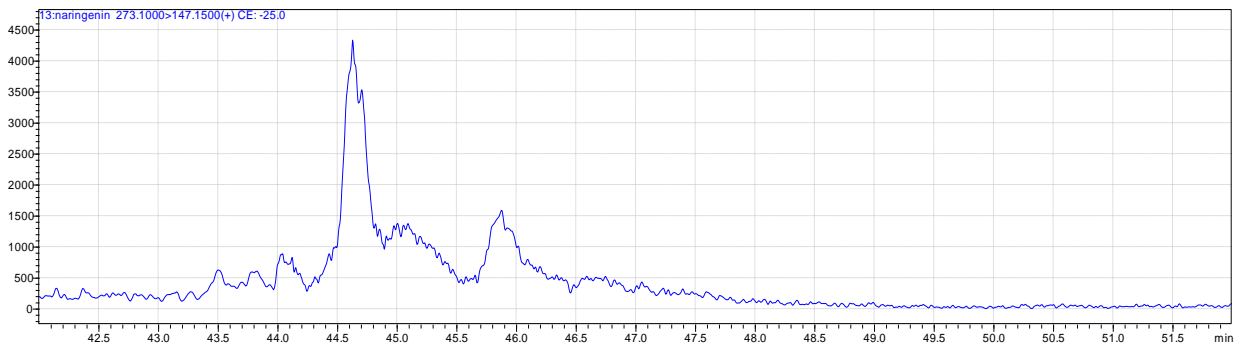
### Annexe 13: Pic de la chryisine (EAJO)



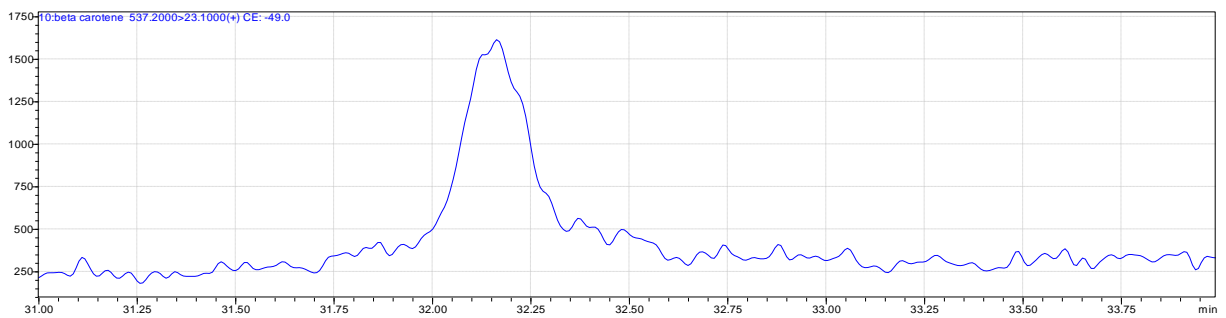
### Annexe 14: Pic de la rutine (EAJO)



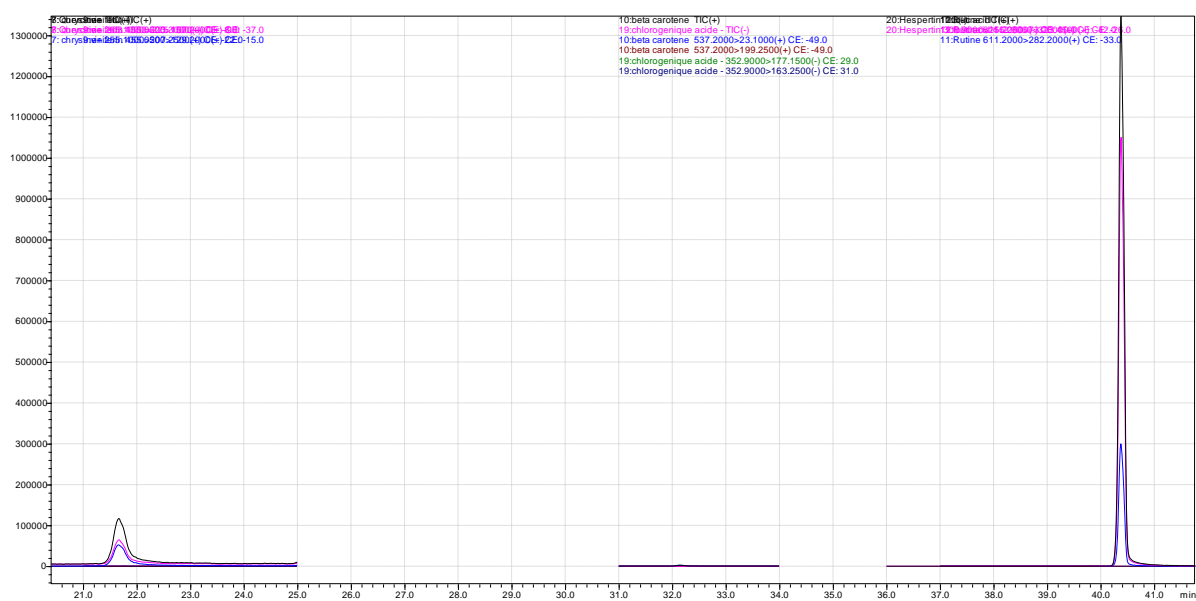
### Annexe 15: Pic de la naringénine (EAJO)



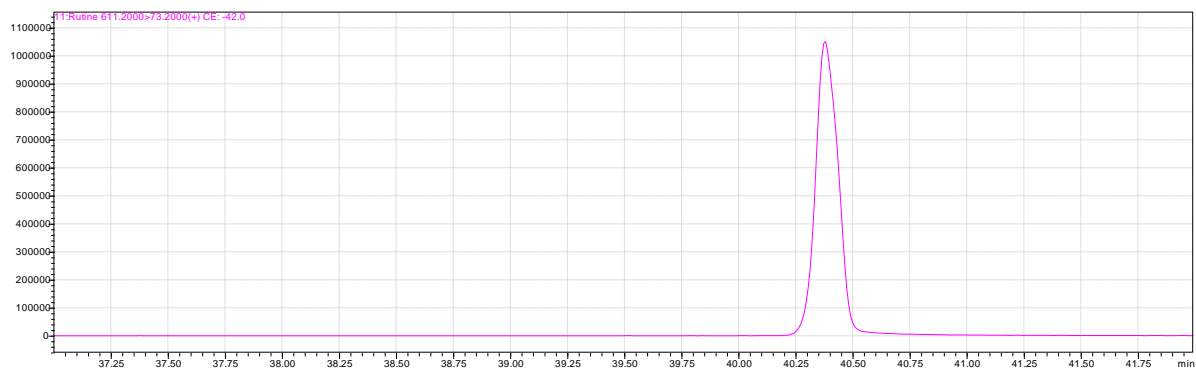
### Annexe 16: Pic de la beta carotène (EAJO)



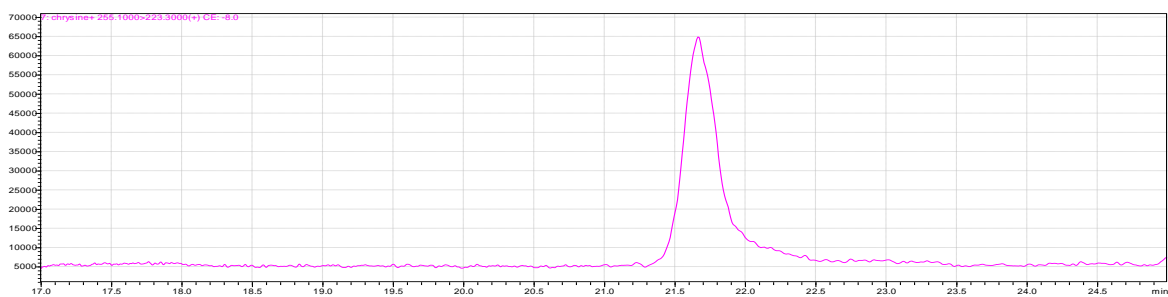
## Annexe 17: Chromatogramme de l'extrait NBJO



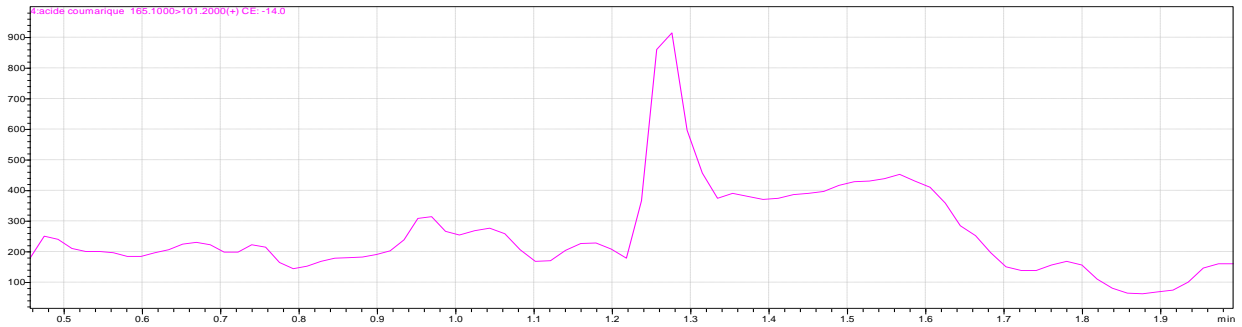
## Annexe 18: Pic de la rutine (NBJO)



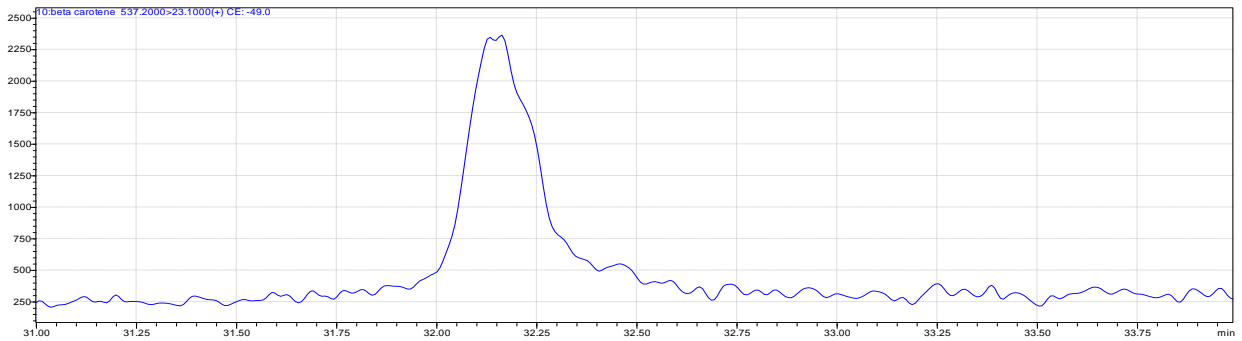
## Annexe 19: Pic de la chrysin (NBJO)



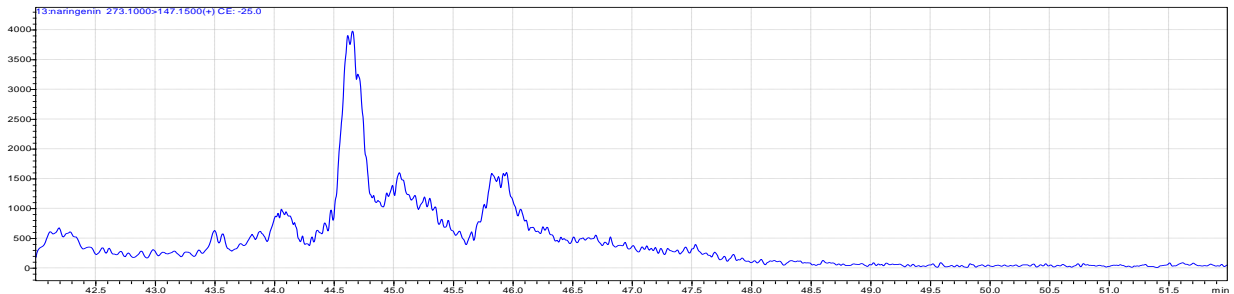
### Annexe 20: Pic de l'acide coumarique (NBJO)



### Annexe 21: Pic de la bêta carotène (NBJO)



### Annexe 22: Pic de la naringénine (NBJO)



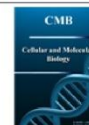
Annexe 23: Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF (Mansur et al., 1986).

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

**Annexe 24:** Catégories de protection affichées sur les produits solaires en fonction des facteurs de protection mesurés, selon la Recommandation de la Commission Européenne 2006

Catégorie indiquée	Facteur de protection indiqué	Facteur de protection solaire mesuré	Facteur de protection UVA minimal recommandé	Longueur d'onde critique minimale recommandée
« Faible protection »	6	6 - 9,9	1/3 du facteur de protection solaire indiqué sur l'étiquette	370 nm
	10	10 - 14,9		
« Protection moyenne »	15	15 - 19,9		
	20	20 - 24,9		
	25	25 - 29,9		
« Haute protection »	30	30 - 49,9		
	50	50 - 59,9		
« Très haute protection »	50+	$60 \leq$		

**Publications et  
Communications  
scientifiques**



Original Article

### Exploring the *In vitro* and *In vivo* therapeutic efficacy of *Juniperus oxycedrus* Cade oil: Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-asthmatic effects in an allergic asthma model

Meryem Ahmida<sup>1</sup>, Mustapha Hichem Zadam<sup>1</sup>, Nesrine Djaber<sup>1</sup>, Taha Khaldi<sup>2</sup>, Chawki Bensouici<sup>2</sup>, Latifa Khattabi<sup>2</sup>, Hichem Amara<sup>3</sup>, Moncef Zaafour<sup>4</sup>, Amel Boumendjel<sup>1</sup>, Mahfoud Messarah<sup>1</sup>, Mahieddine Boumendjel\*

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria.

<sup>2</sup>National Center for Biotechnological Research (CRBT), Constantine, Algeria

<sup>3</sup>Anatomic Pathology Services, Eph El Hadi Bendjedid, El Tarf, Algeria

<sup>4</sup>Department of Biology, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

#### Article Info



#### Article history:

Received: December 21, 2023

Accepted: April 02, 2024

Published: July 31, 2024

Use your device to scan and read the article online



#### Abstract

This investigation aimed to explore the antioxidant, anti-inflammatory effects of Cade oil and its efficacy within a Wistar allergic asthma model. The antioxidant activity was assessed through various *in vitro* tests using chain-breaking antioxidant effects (radical scavenging and reducing abilities assays). *In vivo* experiments involved Wistar rats categorized into four groups: negative control group, Ovalbumin-sensitized/challenged group, Cade oil-treated group, and Ovalbumin-sensitized/challenged Cade oil-treated group. These experiments aimed to evaluate oxidative stress parameters in the lungs and erythrocytes. The results indicated that the Cade oil exhibited significant antioxidant capabilities, evidenced by its radical scavenging activity against DPPH, ABTS, and Galvinoxyl radicals, with  $IC_{50}$  values ranging from 21.92 to 24.44  $\mu\text{g/mL}$ . Besides, the reducing abilities methods showed  $A_{0.5}$  value ranging from 11.51 to 30.40  $\mu\text{g/mL}$  for reducing power, Cupric ion reducing antioxidant capacity, and O-phenanthroline assays. Additionally, the  $IC_{50}$  value for  $\beta$ -carotene scavenging was found to be  $(8.2 \pm 0.25 \mu\text{g/ml})$ . Analysis revealed high levels of polyphenols and flavonoids in Cade oil, indicating rich polyphenol ( $275.21 \pm 3.14 \text{ mg GAE/g DW}$ ) and flavonoid ( $28.23 \pm 1.91 \mu\text{g QE/mg}$ ) content. *In vivo* findings highlighted Cade oil's efficacy in reducing inflammatory cell recruitment, enhancing antioxidant status, reducing lipid peroxidation, and improving histopathological alterations within the allergic asthma model. These results demonstrated that Cade oil has a potent antioxidant, anti-inflammatory, and anti-asthmatic properties, suggesting its potential therapeutic application in asthma treatment.

**Keywords:** Allergic asthma model, Antioxidant activity, Cade oil, *Juniperus oxycedrus*, Lung inflammation, Oxidative stress.

#### 1. Introduction

Asthma is a complex, heterogeneous condition affecting the conducting respiratory tract, characterized by chronic inflammation, reversible airflow blockage, heightened bronchial hyper-responsiveness and oxidative stress [1, 2]. Despite advances in effective treatment during the last decades, asthma currently affects around 0.3 billion people worldwide, incurring a heavy burden on public health, as noted by the World Health Organization [3]. Recent studies have emphasized the significant role of oxidative stress in exacerbating asthma symptoms, including airway inflammation, decreasing lung function, and tissue damage. Chronic inflammation in the respiratory tract is recognized as the fundamental pathological feature of asthma, exacerbated by an increase in oxidative stress-induced inflammatory mediators [2]. The lungs, due to their

exposure to environmental and endogenous antioxidants, are particularly vulnerable to oxidative damage, contributing to an imbalance arises between the generation and accumulation of reactive species (ROS/RNS) and the antioxidant defence systems [4]. This imbalance intensifies the inflammatory process, highlighting the need for treatments that can effectively modulate these responses with minimal side effects [5].

Natural compounds, including flavonoids and polyphenols, have shown promise in asthma treatment due to their antioxidant and immunomodulatory properties [5]. Among these, *Juniperus oxycedrus* L. known locally as (Tagga) and found in the Mediterranean region, including parts of Algeria [6], is reported to possess numerous biological activities, essentially antioxidant [6] and anti-inflammatory properties [7]. Cade oil, sesquiterpene oil derived

\* Corresponding author.

E-mail address: mahieddine@yahoo.com (M. Boumendjel).

Doi: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2024.70.7.8>

from the destruction distillation of *Juniperus oxycedrus* branches and wood, has been traditionally exploited in Turkish folk medicine to treat various ailments, including asthma, cold, cough, rheumatism and skin conditions [8].

However, despite the several known benefits, many studies described in the literature reported the adverse effects and incidents of poisoning arising from the randomly excessive consumption of Cade oil [9]. These incidents highlight the importance of a balanced approach, based on rigorous scientific evidence, to validate the traditional uses of Cade oil [9]. Although many traditional medicines exhibit inherent toxicity, they are considered safe when used in controlled dosages [10].

The main focus of this study is to examine the *in vitro* antioxidant activity and *in vivo* antioxidant, anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of Cade oil in a Wistar rat model of allergic respiratory disorder by Cade oil administration.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Plant material

The traditional production of Cade oil is based on a direct steam distillation of the woods and branches of *Juniperus oxycedrus*, collected from the Eastern Mediterranean coast of Algeria and marketed by local herbalists.

### 2.2 Chemicals

All chemicals and reagents used in the *in vitro* experiments were purchased from both Sigma Chemicals Co and Biochem Chemopharma. Chicken egg albumin (Ovalbumin, OA, grade II), Bovine serum albumin (BSA) and each chemical utilised in the *in vivo* study were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo).

### 2.3 Determination of total bioactive content

#### 2.3.1 Determination of the total phenolic content (TPC)

Spectrophotometric analysis was carried out using the Folin-Ciocalteu reagent, according to a modified procedure by Singleton and Rossi [11]. The absorbance against a blank was measured at 765nm. The total phenolic content was expressed as micrograms of gallic acid equivalents per milligrams of extract ( $\mu\text{g GAE/mg}$ ).

#### 2.3.2 Determination of the total flavonoid content (TFC)

A modified method based on the procedure described by Topçu et al. [12] was employed. The absorbance was measured at 415nm. The total flavonoid content was expressed as micrograms quercetin equivalents per milligram of extract ( $\mu\text{g QE/mg}$ ).

### 2.4 *In vitro* antioxidant activity determination

#### 2.4.1 Free Radical Scavenger Activity by DPPH

The capacity of Cade oil to inhibit the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was determined using the method reported by Meziat et al. [13]. The results were compared to reference antioxidant standards (BHA and BHT and Ascorbic acid). The findings were presented regarding the concentration required for 50% inhibition (IC<sub>50</sub>), expressed in  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 2.4.2 ABTS scavenging activity

The ABTS+ radical cation decolourisation assay was employed to carry out the ABTS scavenging activity, according to the method described by Meziat et al. [13].

#### 2.4.3 $\beta$ -carotene bleaching inhibition

The  $\beta$ -carotene/linoleic acid assay was assessed following the protocol described by Lekouaghet et al. [14], and the results were given as 50% inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) ( $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 2.4.4 Reducing power assay

The ferric-reducing power was assessed according to Meziat et al. [13]. The results were presented as A<sub>0.50</sub> (0.50 absorbance), indicating the concentration level required to achieve an absorbance of 0.5.

#### 2.4.5 Phenanthroline assay

Phenanthroline antioxidant activity was performed in a 96-well microplate following the method detailed by Bakhouche et al. [15]. The absorbance of the resulting solution was determined at 510 nm, with BHT and BHT utilised as standards.

#### 2.4.6 Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

The evaluation of the reducing antioxidant capacity was assessed by the (CUPRAC) assay following the method described by Lekouaghet et al. [14]. Results were expressed as A<sub>0.5</sub>. BHA, BHT and Ascorbic acid were used as antioxidant standards.

#### 2.4.7 Galvinoxyl free radicals scavenging assay (GOR)

The extract impact on the Galvinoxyl free radicals was estimated according to Bakhouche et al. [15]. The absorbance was measured at 428 nm. Galvinoxyl solution in methanol was used as a control, while BHA and BHT served as standards in this study. The results were represented as EC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ), indicating the concentration at which 50% absorbance intensity was observed.

### 2.5 Determination of the *in vivo* antioxidant activity

#### 2.5.1 Animals

Twenty-four male Wistar rats weighing between (240 and 250g) were utilised. The rats were obtained from the Pasteur Institute of Algiers (Algiers, Algeria) and provided unrestricted access to water and the standard feed supplied by the ONAB of Bejaia (Algeria) throughout the experiment. The animals were housed under natural photoperiod conditions, with an average temperature maintained at 21-25°C.

The methodologies applied in this study received approval from the Ethical Committee of the Directorate General for Scientific Research and Technological Development, which operates under the auspices of the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research. This endorsement was formalised with the issuance of license number PNR/SF 08/2012, ensuring adherence to ethical standards in the research process.

#### 2.5.2 Experimental group design

Twenty-four rats were divided into four groups, with six in each group. The control group (CTL), which received no treatment, was considered as a negative control group. Rats challenged and sensitised with Ovalbumin are included in the asthma group (OVA), which is regarded as the positive control. The treated Group with Cade oil (CO) received oral administration of Cade oil (1mL/kg) for 10 days following the experimental protocol. Asthma treated Group (OVA+CO) corresponding to Ovalbumin-challen-

ged rats, treated for 10 days with Cade oil (1 mL/kg).

### 2.5.3 Sensitisation and airway challenge

In the OVA and OVA+CO groups, sensitisation was performed on days 0 and 14 by intraperitoneal injections of Ovalbumin (Ovalbumin, OA, grade II) (1 mg/mL) along with alum (1 mg/mL in saline solution) as an adjuvant. Subsequently, on the 21st, 22nd, and 23rd days, the rats in these groups were subjected to a 30-minute OVA inhalation challenge (5 mg/mL) using an OMRON nebuliser (NE-C29-E). On the other hand, the CTL and CO groups were injected and challenged with saline on the same dates. The methodologies described by Moura et al. [16] and Yang et al. [17] were adopted. The samples collected for analysis were namely lung tissue, blood and bronchoalveolar fluid samples.

### 2.5.4 Samples preparation

Animals were sacrificed twenty-four hours following the final aerosol challenge, by cervical decapitation. The blood samples were collected in plain vials and heparin tubes to obtain serum and plasma, respectively. Blood samples in plain vials were centrifuged (3000 rpm for 15 minutes at 4°C) and then preserved at -20°C. The erythrocytes in the blood sediment were centrifuged after being twice suspended in PBS (pH 7.4), first at 3000 g for 15 minutes at 4°C and then at 4000 g for 30 minutes. Then, the erythrocyte solution was collected in Eppendorf tubes and stored at 20°C. The trachea of each rat was cannulated, and the lungs of each rat underwent three successive lavages with PBS (2mL). This lavage fluid was centrifuged at 4000 x g for 10 min. Eppendorf tubes containing Broncho Alveolar Lavage Fluid (BALF) were stored at -20 °C. The cell pellet was vortexed and suspended in 500 µL of PBS for cell counting using an improved Neubauer hemocytometer (Full Automatic Blood Cell Counter MODEL PCE-210N). Afterwards, Lung tissues were promptly extracted, rinsed with a 0.9% saline solution, and then weighed after carefully removing adjacent connective tissues. Approximately 1g of the lung was homogenised in a 2:1 volume of PBS (Tris 50mM, NaCl 150mM, pH 7.4) under an ice-cold condition. After centrifugation at 3000 × g for 35 minutes at 4°C, the resulting supernatants were conserved at -20°C.

### 2.5.5 Lipid peroxidation levels measurement

Lipid peroxidation levels in both lungs and erythrocytes were evaluated using Malondialdehyde (MDA) as a biomarker. MDA, a final product of lipid peroxidation, interacted with thiobarbituric acid (TBA) to form a red complex known as TBARS. The concentration of TBARS was quantified by measuring its absorbance at 530, following the method described by Esterbauer et al. [18].

### 2.5.6 Reduced glutathione (GSH) levels measurement

GSH levels in both lung and erythrocytes were assessed using a colourimetric method following Weekbecker and Corry [19]. In this method, SH groups of glutathione reduced DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), producing a characteristic yellow colour. The absorbance at 412 nm was recorded, and the total GSH concentration was presented in nmol GSH/mg protein.

### 2.5.7 Determination of antioxidant enzyme activities

In both lung tissue and erythrocytes, the roles of antioxidant enzymes were determined through glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activities. The procedure outlined by Flohé and Günzler [20] served as the basis for measuring GPx activity; this implies that the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was reduced to glutathione disulfide (GSSG) in the presence of reduced glutathione (GSH). The specific GPx activity was quantified at 420 nm and presented as mmol GSH/mg protein. In addition, catalase activity was assessed by measuring the ability of the enzyme to catalyse the degradation of hydrogen peroxide, which led to a decline in absorbance, following the method reported by Aebi's method [21]. Measurements were recorded at 240 nm at 15-second intervals for 1 minute using UV/visible light. CAT activity was expressed as µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed/min/mg protein.

### 2.6 Histopathological examination

Following the method described by Zemmouri et al. [22], lung tissues were collected and subsequently fixed in 10% formaldehyde. Afterwards, specimens underwent dehydration using ethanol solutions and then embedded in paraffin. Sections of 5 µm thickness were obtained from the paraffin blocks and stained using hematoxylin/eosin (H&E). The stained sections were examined using a LEICA DM 1000LED microscope.

### 2.7 Statistical analysis

All data were analysed using SPSS version 25. The *in vivo* data were expressed as mean ± standard error (SEM). All *in vitro* antioxidant tests have been expressed as an average of three replicates ± the standard deviation (SD). The IC<sub>50</sub> and A<sub>0.50</sub> values were calculated by linear regression analysis. Group comparisons were performed by ANOVA one-way followed by the HSD Tukey post Hoc test. The level of statistical significance was determined at a p-value <0.05.

## 3. Results

### 3.1 Total bioactive content

The current study demonstrated the level of bioactive content in Cade oil as presented in Table 1. The total phenolic content in the Cade oil was assessed using The Folin–Ciocalteu method. Cade oil showed a high quantity

**Table 1.** Total polyphenols and flavonoids content of Cade oil.

Sample	Total phenolic (µg GAE/mg DW)	Total flavonoid (µg QE/mg DW)
Cade oil	275.21 ± 3.14	28.23 ± 1.91

Data are expressed as mean ± SD of three parallel measurements. Total phenolic content is expressed as µg Gallic acid equivalents/mg of extract, and total flavonoids are expressed as µg Quercetin equivalents/mg of extract.

of phenolic content, reaching  $275.21 \pm 3.14$  mg GAE/g DW. While flavonoids reached  $28.23 \pm 1.91$   $\mu$ g QE/mg, as indicated in Table 1.

### 3.2 In vitro antioxidant activity of Cade oil

To assess the antioxidant potential of Cade oil, various assays were employed, including DPPH and ABTS scavenging activity,  $\beta$ -carotene/linoleic acid bleaching capacity, Cupric reducing antioxidant capacity, Phenanthroline and Galvinoxyl scavenging assays. The obtained results from these different tests were expressed in terms of  $IC_{50}$  and  $A_{0.5}$  values, as presented in Table 2.

DPPH, a stable purple-coloured free radical, transforms to yellow hydrazine when reduced by an antioxidant. This characteristic was utilised in a DPPH assay to evaluate the radical-scavenging capability of Cade oil. The assay revealed that Cade oil possesses considerable anti-radical capacity, reported by an  $IC_{50}$  value of  $24.29 \pm 0.39$   $\mu$ g/mL. However, this efficacy is lower compared to the well-known antioxidants BHA and BHT, which recorded  $IC_{50}$  values of  $12.99 \pm 0.41$   $\mu$ g/mL and  $6.14 \pm 0.41$   $\mu$ g/mL, respectively. Consistent findings were observed in both ABTS and Galvinoxyl Radical (GOR) assays, with Cade oil manifesting  $IC_{50}$  values of  $24.44 \pm 1.27$   $\mu$ g/mL and  $21.92 \pm 1.27$   $\mu$ g/mL, respectively. These results indicate a moderate level of antiradical efficacy relative to established antioxidants BHT and BHA.

The reducing ability of Cade oil was analysed using three distinct methods: reducing power, CUPRAC, and phenanthroline assays. The reducing power assay highlighted cade oil's potential in electron transfer, indicated by its effective conversion of  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$  through potassium ferricyanide; exhibiting moderate activity with an  $A_{0.5}$  value of  $19.40 \pm 0.45$   $\mu$ g/mL, surpassing that of BHT ( $A_{0.5} > 50$   $\mu$ g/mL). In the CUPRAC assay, based on the copper reduction method, Cade oil achieved a value of  $30.40 \pm 1.52$ , slightly lower than those recorded for BHT and BHA ( $A_{0.5}$  values of  $5.35 \pm 0.71$   $\mu$ g/mL and  $8.97 \pm 3.94$   $\mu$ g/mL, respectively). The phenanthroline assay, assessing the reduction of metal iron, demonstrated Cade oil's effective potential, with an  $A_{0.5}$  value of  $11.52 \pm 0.48$   $\mu$ g/mL, indicating a lower concentration requirement compared to BHT and BHA ( $A_{0.5}$  values of  $0.88 \pm 0.04$   $\mu$ g/mL and  $2.12 \pm 0.04$   $\mu$ g/mL, respectively).

To conclude, the antioxidant capacity of Cade oil, the  $\beta$ -carotene bleaching assay, showed high activity with an  $IC_{50}$  value of  $8.20 \pm 0.25$   $\mu$ g/mL. However, this effectiveness was less than that of standard antioxidants BHT and

BHA, which displayed  $IC_{50}$  values of  $1.11 \pm 0.06$   $\mu$ g/mL and  $0.88 \pm 0.03$   $\mu$ g/mL, respectively.

### 3.3 In vivo antioxidant activity of Cade oil

#### 3.3.1 Cell count levels in Bronchoalveolar BALF and serum

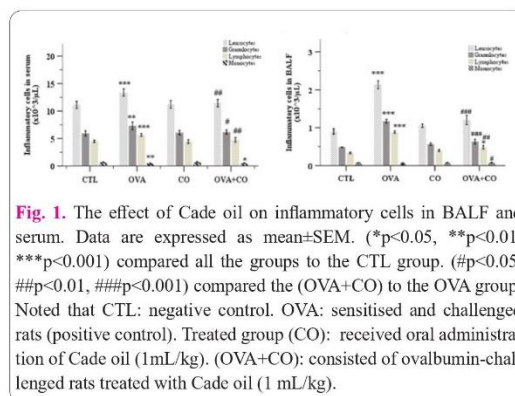
The findings regarding cell count in BALF and serum are depicted in (Fig.1), revealing notable results. In the BALF and serum of OVA-induced rats, inflammatory cells, including lymphocytes, monocytes and granulocytes, were evaluated. A significant cell number increment was noted ( $p < 0.001$ ) in the OVA-challenged group compared to the control group. Importantly, administration of Cade oil significantly decreased ( $p < 0.05$ ) the infiltration of these inflammatory cells both in BALF and serum relative to the OVA-challenged group.

#### 3.3.2 Evaluation of the antioxidant defence status in lung and erythrocytes

In the lung and erythrocytes, Ova-sensitisation had a noticeable effect on the antioxidant defence level. MDA levels were significantly increased, while GSH, GPx and CAT levels were significantly decreased in the sensitised group compared to the control group (Fig. 2). Regarding the CO group, the treatment administration demonstrated a noteworthy improvement in all these parameters in the organs under study.

### 3.4 Histopathological results

The histological analysis assessed the pathological characteristics of OVA-induced allergic lung inflammation

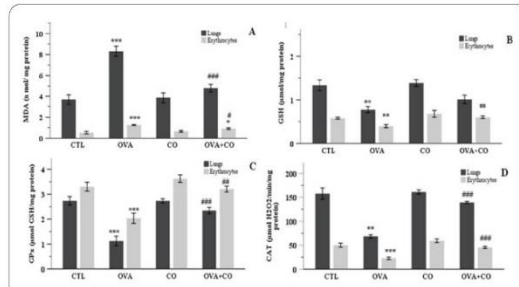


**Fig. 1.** The effect of Cade oil on inflammatory cells in BALF and serum. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) compared all the groups to the CTL group. (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ ) compared the (OVA+CO) to the OVA group. Noted that CTL: negative control. OVA: sensitised and challenged rats (positive control). CO: received oral administration of Cade oil (1mL/kg). (OVA+CO): consisted of ovalbumin-challenged rats treated with Cade oil (1 mL/kg).

**Table 2.** Antioxidant activities of Cade oil.

	DPPH $IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	ABTS $IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	GOR $IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	$\beta$ -Carotene $IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	Reducing Power Assay $A_{0.50}$ ( $\mu$ g/mL)	Cuprak $A_{0.50}$ ( $\mu$ g/mL)	Phenanthroline $IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)
CO	$24.29 \pm 0.39^a$	$24.44 \pm 1.27^a$	$21.92 \pm 1.27^a$	$8.2 \pm 0.25^a$	$19.4 \pm 0.45^a$	$30.40 \pm 1.52^a$	$11.51 \pm 0.48^a$
BHT*	$6.07 \pm 0.2^b$	$1.75 \pm 0.2^b$	$3.32 \pm 0.18^b$	$0.88 \pm 0.03^b$	$>50^c$	$5.35 \pm 0.71^b$	$0.88 \pm 0.04^b$
BHA*	$12.9 \pm 0.24^c$	$1.14 \pm 0.11^b$	$5.38 \pm 0.06^c$	$1.11 \pm 0.06^b$	NT	$8.97 \pm 3.94^c$	$2.12 \pm 0.05^c$
AA*	NT	NT	NT	NT	$6.73 \pm 1.15^b$	NT	NT

$IC_{50}$  and  $A_{0.50}$  values are expressed as the concentration of 50% inhibition percentages and the concentration at 0.50 absorbance, respectively. Both metrics, calculated by linear regression analysis and expressed as Mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Different superscripts (a, b, c) in a column indicate significant differences, while identical superscripts (b, b) denote no significant difference, determined by ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ). CO: Cade oil; BHA: butylated hydroxyanisole; BHT: butylated hydroxytoluene; AA: ascorbic acid; NT: not tested.



**Fig. 2. Antioxidant defense status in lungs and erythrocytes of the control and treated groups.** (A): Malondialdehyde (MDA) levels in both lungs and erythrocytes; (B): Reduced Glutathione (GSH) levels in lungs and erythrocytes; (C): Glutathione peroxidase activity in lung and erythrocyte (GPx) and (D): Catalase activity in both lungs and erythrocytes. Data are expressed as mean±SEM. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) compared all the groups to the CTL group. (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ ) compared the OVA+CO to the OVA group: the asthma group. Noted that CTL: negative control. OVA: sensitised and challenged rats (positive control). Treated group (CO): received oral administration of Cade oil (1 mL/kg). (OVA+CO): consisted of ovalbumin-challenged rats treated with Cade oil (1 mL/kg).

(Fig. 3). Upon H&E staining, lung tissue of the OVA group (Fig. 3, B) exhibited a pronounced peribronchial inflammation by excessive leukocyte infiltration as compared to the normal tissue (Fig. 3, A). Additionally, there was an increase in the thickness of the respiratory bronchioles and an enhanced production of mucus by goblet cells. Interestingly, the (OVA+CO) group demonstrated enhanced lung morphology, characterised by reduced inflammatory cells, decreased thickening of airway cells and a decline in mucus production (Fig. 3, D). Moreover, the CO-treated group did not display any histological damage in the lung compared to the control group (Fig. 3, C).

#### 4. Discussion

Oxidative stress is fundamentally implicated in the pathogenesis of a broad spectrum of chronic health conditions, including allergic asthma, highlighting the essential need to investigate antioxidant mechanisms for potential therapeutic strategies [5]. Despite extensive research in this area, the specific impact of natural remedies, such as Cade oil derived from *Juniperus oxycedrus*, on allergic asthma remain unexplored, with existing studies primarily limited to the extracts and essential oils derived from *Juniperus oxycedrus* [7, 23]. Addressing this gap, our investigation aims to elucidate the effects of Cade oil on allergic asthma, thereby contributing to a broader comprehension of its potential therapeutic benefits in oxidative stress-mediated conditions.

In response, a series of assays were conducted to ascertain the antioxidant potency of Cade oil. The significant antioxidant capacity found in our *in vitro* analyses prompted further investigations using a rat model of allergic asthma, which develops cellular and pathophysiological characteristics similar to those observed in human asthma [16], notably oxidative stress feature, a fundamental element implicated in the onset and progression of asthma [5].

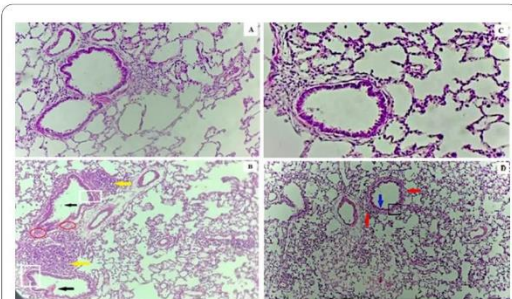
Our results suggest that Cade oil possesses notable antioxidant activity, primarily due to its abundant pheno-

lics and flavonoid content. Remarkably, the therapeutic properties of many bioactive compounds, especially herbal polyphenols and flavonoids, stem from their redox potential, which plays a critical role in electron transfer processes, neutralization of free radicals, and chelation of metal ion [24].

In the context of asthma, inflammatory cell activation, particularly by T-helper 2 (Th2) cells, is crucial in directing and managing the immune-inflammatory response in asthmatic airways. Following exposure to the ovalbumin allergen, the interaction between antigen-presenting cells and sensitised helper T lymphocytes result in increased secretion of several airway cytokines, notably IL-4, IL-5, and IL-13 [1].

These cytokines are fundamental in eosinophil differentiation, survival, and function, leading to the recruitment of inflammatory cells to the lungs, increased mucus secretion, enhanced airway hyperresponsiveness and allergen-specific IgE production [1, 5]. Moreover, inflammatory epithelial cells markedly produce pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) [17].

TNF- $\alpha$  is involved in orchestrating the airway inflammatory, acting as a chemotactic agent for recruiting neutrophils and eosinophils, and enhancing the expression of adhesion molecules on the epithelial cell surface [25]. On the other side, IL-1 $\beta$  triggers the generation of Th2 cells following allergen exposition, leading to eosinophils activation and subsequent cytokines release, including IL-5 [25]. Animal models studies have consistently demonstrated a remarkable upsurge in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  gene expression in OVA-induced asthma [5, 16, 25]. Arguably, reducing the inflammatory cell cytokines and chemokines in the airway using the anti-TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  drugs represent an efficient therapeutic strategy for treating asthma [26].



**Fig. 3. Histopathological analysis of the lungs section of rats.** A: Control group (x40). B: Asthma group (x40). C: Normal group treated only with Cade oil 1mL/kg/day orally (x40). D: Asthma group treated with Cade oil 1mL/kg/day orally (x40). The histological structure of the control rat exhibits a normal appearance. In contrast, the Ova-sensitised lung presents evidence of inflammatory cell infiltration in the bronchial airways (indicated by the yellow arrow), an increase in the thickening of a respiratory bronchiole (depicted by the white square), hyperplasia of goblet cells (shown by the red circle), and production of mucus (highlighted by the black arrow). Conversely, in the OVA+CO rat lung, a reduction in inflammatory cell presence (indicated by the red arrow), a decrease in the thickening of airway cells (represented by the black square), and a decrease in mucus production (illustrated by the blue arrow) are observed. The CO-treated rat lung exhibits a normal cellular appearance comparable to the control group.

Consistent with the findings of Chalchat et al. [27] and Barrero et al. [28], the major component present in Cade oil is  $\delta$ -cadinene, known for its anti-inflammatory effects and ability to reduce IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels [29]. Our data indicates clearly that the oral administration of Cade oil reduced lung inflammation by decreasing leukocyte rates to their physiological ranges and minimising inflammatory cell infiltration into lung tissue, especially eosinophil and lymphocyte levels in OVA+CO group compared to the OVA group. These findings indicate that Cade oil had a therapeutic influence on the allergic response observed in Ova-sensitized rats, suggesting that  $\delta$ -cadinene directly contributes to the oil's capacity to mitigate allergic responses in sensitized rats, aligning with previous findings that associate this compound with anti-inflammatory activity and a reduction in pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Therefore, may be attributed significantly to different phenolic compounds present in Cade oil, which not only neutralise free radicals but also demonstrate anti-inflammatory properties, contributing to the its inhibitory impact on allergic responses in sensitized rats.

Oxidative stress represents a fundamental hallmark of asthma, characterised by an imbalance between a heightened oxidant system and reduced antioxidant defences. The presence of high oxidant rates serves as an indicative marker of the ongoing inflammatory processes [5, 30]. In this context, numerous studies have investigated the bond between oxidative stress and asthma, focusing on a possible therapeutic strategy revolves around antioxidants [31, 32].

Particularly, oxygen-derived free radicals, especially from polyunsaturated fatty acids, lead to lipid peroxidation within the cell membranes, producing Malondialdehyde (MDA), known as an indicator of oxidative stress due to its oxidant properties [33]. Hence, the accumulation of MDA in lung tissue could potentially enhance the leukocyte chemotaxis, releasing an excess of ROS production by immune cells infiltrating airway inflammation, leading to asthma-related airway injury [33]. The present investigation showed that the OVA challenge significantly increased MDA amounts in lungs and erythrocytes samples; this aligns with the research of Khaldi et al. [31], who investigated the effects of *Nigella sativa* oil on lungs inflammation and oxidative stress. Interestingly, the administration of Cade oil significantly reduced the oxidative alteration of lipid peroxidation levels in the OVA+CO group, illustrating its potent antioxidant properties.

The human body has several mechanisms that ensure its protection against free radicals, including endogenous non-enzymatic antioxidants such as GSH and enzymatic antioxidants such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) [34, 35]. These systems help in neutralising free radicals and protecting biological targets from oxidative harm, thereby aiding in disease prevention [34]. Our data demonstrated that rats exposed to OVA showed clear signs of oxidative stress, as indicated by reduced amounts of antioxidant enzymes GSH, GPx and Catalase, accompanied by an increase in MDA levels. Accordingly, it may be suggested that oxidative stress provoked increased inflammation, given the significant presence of inflammatory cells in the OVA-induced asthmatic rats [22, 35].

GSH, a vital antioxidant, plays a crucial role in cellu-

lar defense against oxidative injury, especially in the lungs [22, 30]. As a non-protein thiol-containing compound, GSH serves as a co-substrate for glutathione transferase (GST) and GPx, reducing oxidative damage caused by reactive oxygen species [30]. Additionally, in cells, glutathione interacts with free radicals to generate glutathione in its oxidised form (GSSG). The latter is efficiently regenerated into its reduced state (GSH) by GSH reductase, using NAD(P)H as the electron donor [2].

In this research, the OVA challenge significantly decreased glutathione (GSH) levels, indicating impairment in the antioxidant defence system and potentially leaving the lung tissues vulnerable to oxidative damage and inflammation. These results are consistent with earlier studies [22, 31, 32], which also reported a similar decline in GSH levels in the context of allergic lung inflammation. Furthermore, these results revealed that GSH values were elevated in the treated group, indicating the antioxidant properties of Cade oil that can protect against oxidative stress through its effective role as a scavenger of free radicals.

Additionally, endogenous antioxidant enzymes, such as GPx and CAT, have been evaluated in order to determine the extent of oxidative stress. A notable decrease in catalase and GPx activity was noticed in the lungs of the Ova group when compared to the Control group, indicating deterioration in the antioxidant function, pointing to elevated oxidative stress. Catalase has been regarded as a critical antioxidant enzyme in the lungs, responsible for neutralising reactive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub> [34]. The depletion of CAT activity can be attributed to its inactivation caused by elevated synthesis and accumulation of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and superoxide radicals within the asthmatic lungs [22]. Moreover, GPx is an intracellular, selenium-containing enzyme known to catalyse the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to water [33], reinforces the importance of GSH as a necessary cofactor [2, 34].

The current histological investigation of the lung is consistent with earlier findings; as illustrated in (Fig. 3), the control group demonstrated normal lung histology, with no observed inflammatory cell infiltration or airway remodelling, reinforcing that the Control group is a suitable comparison group. On the other hand, the Ova group showed a massive inflammatory cell infiltration involving the recruitment and activation of various immune cells, including eosinophils, lymphocytes, mastocytes, and macrophages. These inflammatory cells release cytokines, chemokines, and other mediators that promote bronchial epithelium damage and increase cell proliferation, leading to the thickening of the bronchiolar walls [22]. The presence of inflammatory mediators can also stimulate goblet cells to undergo hyperplasia and produce excessive mucus within the lumen of the bronchioles, which can further contribute to airway obstruction and thickening [17]. Interestingly, lung morphology significantly improved in the OVA+CO group after receiving treatment with Cade oil. The reduction in inflammatory cell infiltration, airway thickening, and the decline in mucus production indicate a potential protective effect of Cade oil treatment against allergic lung inflammation.

## 5. Conclusion

This study explored the antioxidant, anti-inflammatory and anti-asthmatic properties of Cade oil through both in

vitro and in vivo experiments. Our research yielded several significant insights. Firstly, Algerian Cade oil is rich in phenolic compounds, which could explain its impressive antioxidant and anti-inflammatory activities observed in vitro. Additionally, the administration of the Cade oil in an OVA-induced asthma model has counteracted oxidative stress by neutralising ROS, minimising pulmonary inflammation through modulating immune cell infiltration, as well as protecting membrane lipids from peroxidation, enhancing the activity of antioxidant enzymes, besides improving lung morphology by reducing the alteration of the airways. Future research involving in vitro and in vivo toxicological assessments will be necessary to establish the safety of this oil for human consumption. It is crucial not only to confirm its safety but also to identify and isolate the active compounds that hold potential therapeutic value, which might serve as promising components for novel pharmaceutical formulations.

#### Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest related to this article.

#### Consent for publications

The authors read and approved the final manuscript for publication.

#### Ethics approval and consent to participate

The methodologies applied in this study received approval from the Ethical Committee of the Directorate General for Scientific Research and Technological Development, which operates under the auspices of the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research. This endorsement was formalised with the issuance of license number PNR/SF 08/2012, ensuring adherence to ethical standards in the research process. Rigorous measures were employed to reduce to a minimum the number of animals used and mitigate any distress they might experience.

#### Informed consent

The authors declare not used any patients in this research.

#### Availability of data and material

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request

#### Author's contributions

MA: Conducted all laboratory procedures and prepared the manuscript. MA, M HZ, ND, TK: Conducted animal experiments, ensuring adherence to ethical guidelines and proper data collection. CB: Supervised experiments and provided laboratory resources at CRBT. MA and LK: Conducted statistical analysis and data interpretation, HA: Conducted the microscopic analysis for the histological study. MZ: methodology, MM: provided laboratory resources at LBTE. AB and MB: Designed the research framework, supervised the overall project to ensure coherence and scientific integrity. All authors: Contributed to manuscript revision, provided critical feedback, and approved the final version for publication.

#### Funding

The present work was supported by DG-RSDT (General Directorate of Scientific Research and Technological

Development, Algeria) through the Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba (Algeria) and The National Center for Biotechnological Research (Constantine, Algeria).

#### References

- Lambrecht BN, Hammad H (2015) The immunology of asthma. *Nat Immunol* 16(1): 45-56. <https://doi.org/10.1038/ni.3049>
- Sugiura H, Ichinose M (2008) Oxidative and nitritative stress in bronchial asthma. *Antioxidants Redox Signaling*. 10(4):785-798. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1937>
- World Health Organization (2023) Asthma. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>.
- Rahman I, Biswas SK, Kode A (2006) Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 533(1-3): 222-239. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.087>
- Shakerinasab N, Bejeshk MA, Pourghadamyari H, Najafipour H, Eftekhari M, Mottaghishah J, et al. (2022) The Hydroalcoholic Extract of *Nasturtium officinale* Reduces Lung Inflammation and Oxidative Stress in an Ovalbumin-Induced Rat Model of Asthma. *Evidence-Based Complement Altern Med* 21(6):1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/5319237>
- Chaouche TM, Haddouchi F, Atik-Bekara F, Ksouri R, et al. (2015) Antioxidant, haemolytic activities and HPLC-DAD-ESI-MSn characterisation of phenolic compounds from the root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Ind Crops Prod* 64(1):182–187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.051>
- Akkol EK, Güvenç A, Yesilada A (2009) A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *J Ethnopharmacol* 125(2): 330-336. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.031>
- Ninich O, Et-Tahir A, Kettani K, Ghanmi M, Aoujdad J, et al. (2022) Moroccans ethnobotanical knowledge about medicinal tar. *Trop J Nat Prod Res* 6(3): 317–29. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114889>
- Skalli S, Chebat A, Badrane N, Soulaymani Bencheikh, et al. (2014) Side effects of cade oil in Morocco: An analysis of reports in the Moroccan herbal products database from 2004 to 2012. *Food Chem Toxicol* 64: 81-85. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.009>
- Al-Qura'n S (2005) Ethnobotanical survey of folk toxic plants in the southern part of Jordan. *Toxicol* 46(2):119–29. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2005.04.010>
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colourimetry to total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16(3): 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Topçu G, Ay M, Bilici A, Sarikürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A (2007) A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem* 103(3): 816–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.028>
- Meziant L, Bachir-bey M, Bensuici C, Saci F, Boutiche M, et al. (2021) Assessment of inhibitory properties of flavonoid-rich fig (*Ficus carica* L.) peel extracts against tyrosinase,  $\alpha$ -glucosidase, urease and cholinesterases enzymes, and relationship with antioxidant activity. *European Journal of Integrative Medicine*. 43: 101272. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101272>
- Lekouaghet A, Boutefnouchet A, Bensuici C, Gali L, Ghenaïet K, et al. (2020) In vitro evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extract and its fractions from *Leuzea conifera* L. roots. *South African J of Bot* 132: 103-107. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.042>
- Bakhouché I, Aliat T, Boubellouta T, Gali L, Şen A, Bellik Y

- (2021) Phenolic contents and in vitro antioxidant, anti-tyrosinase, and anti-inflammatory effects of leaves and roots extracts of the *halophyte Limonium delicatulum*. South African J Bot 139(July):42–9 <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.030>
16. Moura CT, Bezerra FC, de Moraes IM, Magalhães PJ, Capaz FR (2005) Increased responsiveness to 5-hydroxytryptamine after antigenic challenge is inhibited by nifedipine and niflumic acid in rat trachea in vitro. Clinical and experimental pharmacology and physiology Clin Exp Pharmacol Physiol 32(12):1119-23. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04308.x>
  17. Yang EJ, Lee JS, Song BB, Yun CY, Kim DH, Kim IS (2011) Anti-inflammatory effects of ethanolic extract from *Lagerstroemia indica* on airway inflammation in mice. J Ethnopharmacol 136(3): 422–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.066>
  18. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med 13(4):341-90. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90181-f](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90181-f)
  19. Weckbecker G, Cory JG (1988) Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. Cancer Lett 40(3):257-64. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(88\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0304-3835(88)90084-5)
  20. Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol 105:114-21. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1)
  21. Aebi H (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol 105:121-6. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
  22. Zemmouri H, Sekiou O, Ammar S, Feki AEI, Bouaziz M, Messarah M, Boumendjel A (2017) *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma models. Pharm Biol 55(1): 1561-1568. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1310905>
  23. El-Abid H, Amaral C, Cunha SC, Augusto TV, et al. (2019) Chemical composition and anti-cancer properties of *Juniperus oxycedrus* L. essential oils on estrogen receptor-positive breast cancer cells. J Funct Foods 59(3):261–71. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.042>
  24. Bisset S, Sobhi W, Bensouici C, Khenchouche A (2020) Chain-breaking/Preventive Antioxidant, Urate-lowering, and Anti-inflammatory Effects of Pure Curcumin. Curr Nutr Food Sci 17(1): 66–74. <https://doi.org/10.2174/1573401316999200421095134>
  25. Rajizadeh MA, Najafipour H, Samareh Fekr M, Rostamzadeh F, Jafari E, et al. (2019) Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of myrtenol in the rats with allergic asthma. Iran J Pharm Res 18(3):1488-1498. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100749>
  26. Lin SC, Shi LS, Ye YL (2019) Advanced molecular knowledge of therapeutic drugs and natural products focusing on inflammatory cytokines in asthma. Cells 8(7):685. <https://doi.org/10.3390/cells8070685>
  27. Chalchat JC, Garry RP, Michet A, Peyron L (1990) Chemical composition of natural and empyreumatic oils and extracts from *Juniperus oxycedrus* and *Juniperus phoenicea* wood. J Essent Oil Res 2(5): 231–236. <https://doi.org/10.1080/10412905.1990.9697872>
  28. Barrero AF, Oltra JE, Altarejos J, Barragán A, Lara A, Laurent R (1993) Minor components in the essential oil of *Juniperus oxycedrus* L. wood. Flavour Fragr J 8(4): 185–189. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730080404>
  29. de Veras BO, de Oliveira JRS, de Menezes Lima VL, et al. (2022) The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F. Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. J Ethnopharmacol 265:113248
  30. Reynaert NL (2011) Glutathione biochemistry in asthma. Biochim Biophys Acta - Gen Subj 1810(11):1045–1051. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.01.010>
  31. Khaldi T, Chekchaki N, Boumendjel M, Taibi F, Abdellaoui M, Messarah M, Boumendjel A (2018) Ameliorating effects of *Nigella sativa* oil on aggravation of inflammation, oxidative stress and cytotoxicity induced by smokeless tobacco extract in an allergic asthma model in Wistar rats. Allergol Immunopathol (Madr) 46(5): 472-481. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.02.005>
  32. Rouibah Z, Ben Mensour A, Rezik O, Boumendjel M, Taibi F, Bouaziz M, et al. (2019) Chemical composition, antioxidant activities, in an allergic asthma model, of *Olea europaea* L. leaf extracts from Collo (Skikda, Algeria). Drug Chem Toxicol 45(1): 197-208. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1679827>
  33. Djaber N, Ounaceur LS, Moubine BN, Khaldi T, Rouag M, Berrouague S, et al. (2020) Roundup-induced biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of rats: The ameliorative effects of *Linum usitatissimum* oil. Acta Biochim Pol 67(1): 53–64. [https://doi.org/10.18388/abp.2020\\_2898](https://doi.org/10.18388/abp.2020_2898)
  34. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ J 5(1): 9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
  35. Sahiner UM, Birben E, Erzurum S, Sackesen C, Kalayci Ö (2018) Oxidative stress in asthma: Part of the puzzle. Pediatr Allergy Immunol 29(8):789–800. <https://doi.org/10.1111/pai.12965>



## UPLC-MS/MS Analysis and Evaluation of the Photoprotective, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Enzymatic Properties of Ethyl Acetate and n-Butanol Fractions from Algerian *Juniperus oxycedrus* L. Leaves

Meryem Ahmida<sup>1</sup>, Mostapha Hichem Zadam<sup>1</sup>, Amel Boumendjel<sup>1</sup>, Mahfoud Messarah<sup>1</sup>, Zaafour Moncef<sup>1</sup>, Dendougui Hocine<sup>2</sup>, Chawki Bensouici<sup>3</sup>, Mahieddine Boumendjel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, 23000 Annaba, Algeria.

<sup>2</sup> Valorization and Promotion of Saharan Resources (VPRS) Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Material Sciences, University of Kasdi Merbah, 30 000 Ouargla, Algeria

<sup>3</sup> National Center for Biotechnological Research (CRBT), BP E73 Ali Mendjili, 25000 Constantine, Algeria

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Article history:

Received: 04 June 2024

Revised: 07 June 2024

Accepted: 18 June 2024

Published online 01 August 2024

**Copyright:** © 2024 Ahmida *et al.* This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

*Juniperus oxycedrus* is prevalent in the arid and semi-arid regions of the Mediterranean and Near East and, is traditionally employed for both culinary and medicinal applications. This research evaluates the potential health benefits of ethyl acetate (EAJO) and n-butanol (NBJO) fractions derived from leaves. Quantitative analysis revealed enhanced concentrations of phenolic and flavonoid compounds in the EAJO fraction at  $252.56 \pm 3.91$  mg GAE/g DW and  $47.70 \pm 2.21$  mg QE/g DW, respectively. UPLC-ESI-MS/MS identified a rich array of twelve phenolic acids and flavonoids, with rutin and chrysin identified as the predominant compounds in both fractions. Comprehensive antioxidant assessments through seven distinct assays demonstrated strong properties, with most activities displaying an  $IC_{50}$  values under  $30 \mu\text{g/mL}$ . Additionally, *in vitro* anti-inflammatory activity showed that the EAJO and NBJO fractions effectively inhibited albumin denaturation at different concentrations, indicating a moderate effect compared to the standard drug diclofenac sodium. EAJO fraction surpassed NBJO in inhibiting key enzymes associated with Alzheimer's disease, diabetes, hyperpigmentation, dermatological disorders, and select bacterial infections, evidenced by  $IC_{50}$  values for acetylcholinesterase, alpha-amylase, tyrosinase, and urease with  $IC_{50}$  values of  $14.60 \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$ ,  $639.48 \pm 7.43 \mu\text{g/mL}$ ,  $206.44 \pm 18.48 \mu\text{g/mL}$ , and  $245.77 \pm 3.75 \mu\text{g/mL}$ , respectively. Both fractions also displayed promising photoprotective properties, with SPF ratings of  $31.71 \pm 0.31$  for NBJO and  $22.62 \pm 1.52$  for EAJO. This study highlights the significant potential of *Juniperus oxycedrus* in the development of pharmaceutical, cosmetic, and nutritional products, underlining its substantial bioactive profile with antioxidant, anti-inflammatory, anti-enzymatic, and photoprotective capabilities.

**Keywords:** *Juniperus oxycedrus*, flavonoids, acetylcholinesterase, alpha-amylase, tyrosinase, urease.

### Introduction

Historically, people across the globe have exploited the healing powers of wild plants as a practice documented in traditional recipes from ancient Greek, African, American, European, and Asian cultures.<sup>1</sup> As the World Health Organization outlines, traditional medicine involves a wide range of practices, knowledge, and belief systems focused on employing plant, animal, and mineral-based spiritual therapies. These techniques are exclusively applied to prevent and treat various diseases and illnesses.<sup>2</sup>

In our current era, a surge of interest in the human health sector has been noticeably discernible among researchers investigating natural pharmacological agents, particularly those exhibiting minimal adverse impacts on human physiological functions.<sup>3</sup>

Concurrently, the demand for herbal cosmetics used in sunscreens has experienced rapid growth. This demand stems from the desire to provide enhanced protection against Ultraviolet (UV) radiation, which can potentially cause significant damage and contribute to the development of various skin diseases.<sup>4</sup> This rising interest arises partly from the awareness of the toxicity associated with the overuse of synthetic drugs, which have been linked to various diseases, including cancer.<sup>5,6</sup> This consciousness has directed research and consumer demand towards safer products devoid of artificial additives, focusing on natural antioxidants.<sup>5</sup> The therapeutic potential of plants has increasingly gained significant attention due to their antioxidant properties, chelate catalytic metals, and act as oxygen scavengers. Consequently, plants are viewed as a valuable resource in mitigating oxidative damage caused by free radicals.<sup>5,7</sup> This aspect is particularly significant given that oxidative stress plays a pivotal role in the initiation and progression of numerous diseases such as neurodegenerative disorders, inflammatory diseases, cancer, diabetes mellitus, and skin diseases,<sup>5,8</sup> which mainly develop from the overproduction of reactive oxygen species (ROS) within the human

\*Corresponding author. E mail: [mahieddine@yahoo.com](mailto:mahieddine@yahoo.com)

Tel: +213 556 31 88 45

**Citation:** Ahmida M, Zadam MH, Boumendjel A, Messarah M, Zaafour M, Dendougui H, Bensouici C, Boumendjel M. UPLC-MS/MS Analysis and Evaluation of the Photoprotective, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Enzymatic Properties of Ethyl Acetate and n-Butanol Fractions from Algerian *Juniperus oxycedrus* L. Leaves. Trop J Nat Prod Res. 2024; 8(7): 7639-7649 <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v8i7.3>

Official Journal of Natural Product Research Group, Faculty of Pharmacy, University of Benin, Benin City, Nigeria

7639

© 2024 the authors. This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License

body and the insufficient effectiveness of endogenous antioxidant mechanisms. This imbalance disrupts cellular homeostasis, damaging essential biological molecules such as DNA, proteins, and lipids.<sup>8</sup> Extensive research has focused on identifying additional antioxidants derived from natural sources, especially polyphenols and flavonoids.<sup>9-14</sup> These compounds identified as secondary plant metabolites, are extensively found in a diverse range of plant materials.<sup>3,5,7</sup> *Juniperus*, a genus in the Cupressaceae family, consists of about 75 species widespread throughout the Northern Hemisphere and especially along the Mediterranean coasts, including Algeria, Morocco, Tunisia, France, Italy and Turkey.<sup>15,16</sup> The Algerian flora is characterized by the presence of five distinct species of *Juniperus*; among these, *Juniperus oxycedrus* L., commonly known as "Tagga" in Algeria, which is a small shrub growing wild on semi-arid slopes and hills.<sup>16</sup> This plant is extensively used in traditional medicine. In Turkey, juniper tar, leaves, and fruits are famous for treating wounds, stomach and abdominal pain, gynaecological conditions, haemorrhoids, colds, coughs, bronchitis, fungal infections and kidney stones.<sup>15,17</sup> Additionally, *J. oxycedrus* fruit and leaf infusions are consumed internally, and its pounded fruits are used to manage diabetes.<sup>17</sup> Furthermore, an oil known as Cade oil, derived from the destructive distillation of the branches and wood of *Juniperus oxycedrus*, has been used for centuries to treat skin conditions in humans and animals, including psoriasis, eczema, inflamed wounds, hair issues like dandruff.<sup>18</sup> In various studies, *Juniperus oxycedrus* has been reported to exhibit a range of biological activities. These include essentially antioxidant,<sup>16,19-21</sup> antiviral,<sup>22</sup> anti-inflammatory and antinociceptive,<sup>15,21</sup> antidiabetic,<sup>23,24</sup> anti-cancer,<sup>25</sup> anti-proliferative<sup>19</sup> and neurodegenerative.<sup>26</sup> The present study provides a comprehensive phytochemical and biological assessment of *Juniperus oxycedrus* L. leaf fractions, particularly emphasizing the use of ethyl acetate and n-butanol extracts. This marks the first time these extracts have been employed using advanced LC-ESI-MS/MS techniques for detailed analysis, and it is also the first application of these extracts for exploring antioxidant, anti-inflammatory, anti-enzymatic, and Sun protection factor (SPF) properties.

The methods chosen, including LC-ESI-MS/MS for compound identification and various bioassays for testing antioxidant and anti-inflammatory effects, are particularly suited to this study's objectives. These techniques allow for precise measurements of compound activity and interactions, essential for establishing a scientific basis for traditional uses and developing potential therapeutic applications. This investigation explores the specific bioactive compounds of *J. oxycedrus*, uncovering novel antioxidant, anti-inflammatory, and photoprotective properties, and evaluates their *in vitro* efficacy against protein denaturation. Moreover, it examines the enzymatic inhibitory properties related to chronic diseases such as diabetes and neurodegenerative disorders, offering a new dimension to our understanding of this plant's capabilities. This approach not only confirms the known benefits of *J. oxycedrus* but also identifies potential therapeutic applications that set a precedent for future pharmacological explorations within the genus.

## Materials and Methods

### Chemicals

The chemical products and reagents used in our experiments encompassed various antioxidants, assay reagents, and solvents, all of analytical grade, which were procured from two main suppliers: Sigma-Aldrich (Germany) and Biochem Chemopharma. From Sigma-Aldrich, we obtained a range of key reagents including Folin-Ciocalteu's reagent, antioxidants such as butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, compounds like galantamine, kojic acid, and thiourea, as well as biological enzymes like Acetylcholinesterase from electric eel and others including alpha amylase from *Aspergillus oryzae*, tyrosinase from mushroom, and urease from *Canavalia ensiformis*. Other significant chemicals from Sigma-Aldrich included various assay reagents like DPPH, ABTS, and compounds for chelation and reduction reactions such as neocuproine and potassium ferricyanide. From Biochem Chemopharma, we

sourced essential chemicals including acetylthiocholine iodide, sodium carbonate, aluminum nitrate, several metal chlorides (iron (III) chloride, iron (II) chloride, copper (II) chloride), and other vital laboratory chemicals like potassium persulfate, potassium acetate, ammonium acetate, phosphate buffer, silver nitrate, trisodium citrate, and bovine serum albumin (BSA). The equipment used were rotavapor (BUCHI R-210), a 96-well microplate reader (Multimode Plate Reader, EnSpire, PerkinElmer, Waltham (US) United States of America) and an UPLC-ESI-MS Shimadzu 8040 Ultra-High sensitivity with UFMS technology was employed and equipped with binary pump Nexera XR LC-20AD.

### Plant material

The aerial parts of *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* were harvested in March 2019 from the Abdelaziz municipality, located in the Jijel province (36°50'45.7"N 6°01'45.4"E, Algeria). A voucher specimen was deposited at the herbarium of the faculty under the number (JNP/01/2020). The collected plant specimens were air-dried in a shaded area. Subsequently, the leaves were separated from the stems and ground into a fine powder.

### Extraction

The dried aerial parts of *J. oxycedrus* (25g) were subjected to thrice maceration using 200 mL of a hydro-alcoholic solution (80 % methanol, 20 % distilled water) at ambient temperature. This process was conducted in the dark with constant shaking for 48 hours. The resulting solutions were filtered through Whatman filter paper No. 1, followed by solvent removal under pressure in a rotary evaporator. After filtration, the remaining aqueous phase underwent successive extraction with solvents of increasing polarity: 100 mL of petroleum ether (repeated twice), 100 mL of dichloromethane (twice), 100 mL of ethyl acetate (twice), and 100 mL of n-butanol (twice). These solvents were then removed using a rotary evaporator (BUCHI R-210) at (40 °C). The resulting concentrated fractions were stored dry at -20 °C in smoked glass vials until analysed. This paper focuses on two of these fractions: ethyl acetate and n-butanol.

### Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry analysis LC-ESI-MS/MS

The analysis of various phytochemicals in the n-butanol and ethyl acetate fractions of *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* leaves were conducted using a Shimadzu 8040 UPLC-ESI-MS-MS, featuring Ultra-high sensitivity with (UFMS) technology, equipped with a Nexera XR LC-20AD binary pump. Chromatographic separation was achieved using an Ultra-force C18 column (150 mm × 4.6 mm, 3 µm particle size; Restek). The separation process utilised a mobile phase A of water with 0.1% formic acid and methanol for mobile phase B, following a specific gradient elution schedule: 80% A for 0-1 minute, transitioning to 20% A over 1-30 minutes, then to 0% A for the next 10 minutes, maintained at 0% A for 40-45 minutes, and finally returning to 80% A for the last 15 minutes. The flow rate was maintained at 0.3 mL/min, with an injection volume of 10 µL, and the column temperature was set at 40°C. ESI conditions for the LC-MS-MS included a CID gas pressure of 230 KPa, a conversion dynode at -6.00 Kv, interface temperature at 350 °C, DL temperature at 250 °C, nebulising gas flow at 3.00 L/min, heat block at 400 °C, and a drying gas flow at 15.00 L/min. An ion trap mass spectrometer was employed in both negative and positive ion modes, utilising Multiple Reaction Monitoring (MRM).

### Determination of bioactive compounds in *J. oxycedrus* leaves.

#### Determination of total phenolic content (TPC)

The total phenolic content in the ethyl acetate fraction was assessed spectrophotometrically, following the Folin-Ciocalteu method detailed by Singleton and Rossi<sup>27</sup> with slight modifications. In this procedure, 20 µL of the plant extract was mixed with 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent (diluted 1:10 with distilled water) and 75 µL of sodium carbonate solution (7.5%) in a 96-well microplate. After incubation for 120 minutes at room temperature in the dark, the absorbance was measured at 765 nm using a Multimode Plate Reader, EnSpire, PerkinElmer, Waltham (US). A blank was prepared similarly,

substituting the extract with methanol. The phenolic content was determined using a standard curve generated with gallic acid (equation:  $y = 0.0034x + 0.1044$ ;  $R^2 = 0.997$ ). The results were expressed as micrograms of gallic acid equivalent per milligram of extract ( $\mu\text{g GAE/mg}$ ).

#### Determination of total flavonoid content (TFC)

Total flavonoid content was determined using the aluminium chloride colourimetric assay described by Topçu *et al.*<sup>28</sup> Specifically, 50  $\mu\text{L}$  of the extract (1 mg/mL) was combined with 130  $\mu\text{L}$  of methanol, 10  $\mu\text{L}$  of 1 M potassium acetate, and 10  $\mu\text{L}$  of 10% aluminum nitrate in a 96-well microplate. After allowing the mixture to incubate at room temperature for 40 minutes. The absorbance was observed at 415 nm. The flavonoid concentration was quantified by referencing a standard calibration curve of quercetin (equation:  $y = 0.0048x$ ;  $R^2 = 0.9994$ ), and the results were reported as micrograms of quercetin equivalent per milligram of extract ( $\mu\text{g QE/mg}$ ).

#### Determination of the in vitro Antioxidant activity

##### DPPIH free radical scavenging activity

The antioxidant potential of the fractions from *J. oxycedrus* leaves was assessed using the DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical based on the protocol established by <sup>29</sup>. In this assay, 40  $\mu\text{L}$  of each extract, with concentrations ranging for ethyl acetate from 0.78125 to 50  $\mu\text{g/mL}$  and for n-butanol from 3.125 to 200  $\mu\text{g/mL}$ , combined with 160  $\mu\text{L}$  of a pre-prepared DPPH solution (0.1 mM in methanol) in a 96-well microplate. The reaction mixtures were incubated in the dark at room temperature for 30 minutes. Following incubation, the absorbance was measured at 517 nm using a Multimode Plate Reader, EnSpire, PerkinElmer, Waltham (US). BHT (Butylated Hydroxytoluene) and BHA (Butylated Hydroxyanisole) were employed as antioxidant standards. The findings regarding the concentration required for 50% inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) expressed in  $\mu\text{g/mL}$  were quantified.

##### ABTS scavenging activity

The scavenging activity against  $\text{ABTS}^+$  radical was assessed using the ABTS radical cation decolourisation test, according to the method described by Re *et al.*<sup>30</sup> Initially, the  $\text{ABTS}^+$  radical cation was formed by mixing 7 mM ABTS solution with 2.45 mM potassium persulfate ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) and allowing the reaction to occur in the dark at room temperature for 16 hours. This resulting  $\text{ABTS}^+$  solution was then diluted with distilled water to reach an absorbance of 0.7 at 734 nm. In a 96-well microplate, 160  $\mu\text{L}$  of the diluted  $\text{ABTS}^+$  solution was combined with 40  $\mu\text{L}$  of each extract prepared in methanol at varying concentrations ranging from 1.5625 to 100  $\mu\text{g/mL}$ . The mixtures were incubated at room temperature for 10 minutes, and absorbance was subsequently measured at 734 nm. Standards such as BHT and BHA were used as antioxidant. The percentage of inhibition (I%) was calculated for each concentration, with results expressed as  $\text{IC}_{50}$  values, representing the concentration needed to inhibit 50% of the  $\text{ABTS}^+$  radicals.

##### Reducing power assay

The reducing potential of the *Juniperus oxycedrus* fractions was assessed, employing the method described by Oyaizu *et al.*<sup>31</sup> In this assay, 10  $\mu\text{L}$  of each extract at varying concentrations from 12.5 to 800 mg/mL, was combined with 40  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) and 50  $\mu\text{L}$  of 1% potassium ferricyanide ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). The mixture was incubated at 50°C for 20 minutes. Following incubation, 50  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid, 40  $\mu\text{L}$  of distilled water, and 10  $\mu\text{L}$  of 0.1% ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ) solution were added. The absorbance of the resulting solution was measured at 700 nm using a spectrophotometer. The results were expressed as  $\text{A}_{0.50}$ , indicating the concentration that achieves a 0.5 absorbance. Ascorbic acid served as the reference standard.

##### Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

The antioxidant capacity of the fractions in terms of cupric- reduction was measured using the CUPRAC test outlined by Apak *et al.*<sup>32</sup> In each well of a 96-well microplate, 40  $\mu\text{L}$  of the extract at varying

concentrations from 12.5 to 800 mg/mL, was combined with 50  $\mu\text{L}$  of 10 mM copper (II) chloride ( $\text{CuCl}_2$ ), 50  $\mu\text{L}$  of 7.5 mM neocuproine ( $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2$ ), and 60  $\mu\text{L}$  of 1 M ammonium acetate buffer (pH 7.0). The mixture was allowed to incubate at room temperature for 1 hour. After incubation, the absorbance was recorded at 450 nm using a spectrophotometer. Butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) served as antioxidant standards. The  $\text{A}_{0.5}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) results corresponded to the concentration indicating 0.50 absorbance.

##### Silver nanoparticle assay (SNP)

The reduction of  $\text{Ag}^+$  to spherical silver nanoparticles (SNPs) was according to the method developed by Özyürek *et al.*<sup>33</sup> The preparation of the spherical silver nanoparticles (SNP) solution, 50 mL of 1 mM silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) was mixed with 5 mL of 1% trisodium citrate. The trisodium citrate solution was gradually introduced to the silver nitrate solution until a pale-yellow hue developed, indicating the formation of SNPs. In a 96-well microplate, 20  $\mu\text{L}$  of the extracts at varying concentrations from 12.5 to 800 mg/mL were combined with 130  $\mu\text{L}$  of the SNP solution and 50  $\mu\text{L}$  of distilled water. The mixture was incubated at 25°C for 30 minutes. After incubation, the absorbance measurements were taken at 423 nm, and the results were expressed as  $\text{A}_{0.5}$ . Ascorbic acid served as the reference standard.

##### Galvinoxyl free radicals scavenging assay (GOR)

As proceeded by Shi *et al.*<sup>34</sup> the evaluation of the antioxidant activity utilising the galvinoxyl method was rigorously conducted. Initially, 40  $\mu\text{L}$  of the extracts, at concentrations ranging from 12.5 to 800 mg/mL, were mixed with 160  $\mu\text{L}$  of 0.1 mM galvinoxyl solution in methanol in a 96-well microplate. The microplate was then incubated in the dark at room temperature for 120 minutes. After the incubation period, the absorbance was measured at 428 nm. Ascorbic acid served as the standard in this study. The results were represented as  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), indicating the concentration at which 50% absorbance intensity was observed.

##### Phenanthroline assay

Based on the phenanthroline method, the antioxidant activity was evaluated following the protocol described by Szydłowska-Czerniak *et al.*<sup>35</sup> with slight modifications. In a microplate, 10  $\mu\text{L}$  of each extract at concentrations ranging from 12.5 to 800 mg/mL was combined with 50  $\mu\text{L}$  of 0.2% ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ), 30  $\mu\text{L}$  of 0.5% 1,10-phenanthroline in methanol and 110  $\mu\text{L}$  of methanol, making up a final volume of 200  $\mu\text{L}$ . The mixture was incubated in the dark at 30°C for 20 minutes. After incubation, the absorbance was measured at 510 nm using a spectrophotometer. Data were expressed as  $\text{A}_{0.50}$ , representing the concentration corresponding to a 0.50 absorbance. BHA and BHT were employed as reference antioxidant standards for comparison.

##### Inhibition of albumin denaturation

The *in vitro* evaluation of the anti-inflammatory properties was performed using the protein denaturation technique, according to the detailed protocol by Karthik *et al.*<sup>36</sup> To perform the assay, 1 mL of each extract was mixed with 1 mL of 0.2% Bovine Serum Albumin (BSA) solution prepared in a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.6). The reaction mixture was incubated at 37°C for 15 minutes, followed by heating at 72°C for 5 minutes. After cooling, spectrophotometric turbidity measurements at 660 nm were carried out. Water was the blank, while a standard drug (Diclofenac) was a reference. The experiment was replicated three times. For the percentage of protein denaturation inhibition, the following equation 1 was followed:

$$\% \text{ Inhibition denaturation} = \frac{[\text{Absorbance control} - \text{Absorbance sample}]}{\text{Absorbance control}} \times 100 \quad [1]$$

##### Anti-enzymatic activities

##### Evaluation of acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity

The fractions derived from the leaves of *Juniperus oxycedrus* were analysed to ascertain any potential inhibitory effects on AChE activity.

This quantification was done using the method that Ellman *et al.* determined.<sup>37</sup> Different concentrations of the sample solution, from 12.5 to 800 mg/mL (10 µL), were mixed with 150 µL of sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.0) and 20 µL of AChE solution in a 96-well microplate. The mixture was incubated at 25°C for 15 minutes. Following this, 10 µL of 0.5 mM dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) and 10 µL of acetylthiocholine iodide were added to each well. Absorbance at 412 nm was measured using a Multimode Plate Reader, EnSpire, PerkinElmer, Waltham (US, with results given as IC<sub>50</sub> values. Galantamine served as a reference standard.

#### Evaluation of $\alpha$ -amylase inhibitory activity

$\alpha$ -Amylase inhibitory activity was performed using the iodine/potassium iodide (IKI) method of Zengin *et al.*<sup>38</sup> In each well of a 96-well microplate, 25 µL of the sample at varying concentrations (12.5 to 800 mg/mL) was combined with amylase in 1 unit of sodium phosphate buffer (pH 6.9 containing 6 mM NaCl). The mixture was incubated at 37°C for 10 minutes before initiating the reaction by adding 50 µL of a 1% starch solution. Concurrently, a control was prepared, excluding the enzyme solution. After a further 20 minutes of incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 25 µL of 1 M hydrochloric acid and 100 µL of an iodine-potassium iodide solution. The absorbance was measured at 630 nm, and the results were given as IC<sub>50</sub> value.

#### Evaluation of tyrosinase inhibition ability

The tyrosinase inhibition activity was measured using the method described by Deveci *et al.*<sup>39</sup> Samples of 10 µL of extracts at concentrations ranging from 12.5 to 800 mg/mL, were placed in a 96-well microplate. To each well, 150 µL of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) and 20 µL of tyrosinase enzyme solution (150 units/mL) were added. After a 10-minute incubation at room temperature, 20 µL of 5 mM L-DOPA was introduced to initiate the reaction. The microplate was then incubated at 37°C for another 10 minutes. Absorbance was measured at 475 nm using a Multimode Plate Reader, EnSpire, PerkinElmer, Kojic acid was used as a standard. The absorbance was measured at 475 nm, and the results were given as IC<sub>50</sub> value.

#### Evaluation of urease inhibitory activity

The urease inhibitory capability was assessed by measuring ammonia production utilising the indophenol method described by Taha *et al.*<sup>40</sup> The process involved combining 25 µL of urease, 10 µL of the test sample at concentrations ranging from 12.5 to 800 mg/mL, and 50 µL of a 17 mM solution of urea in each well of a 96-well plate. This setup was incubated at 30°C for 15 minutes. Following this, 45 µL of a phenol solution (8% w/v phenol with 0.1% w/v sodium nitroprusside) and 70 µL of an alkaline mixture (2.85% NaOH and 4.7% sodium hypochlorite) were added. The reaction's absorbance was then read at 630 nm after an additional 50 minutes using a microplate reader. Thiourea was employed as a reference inhibitor, and the effectiveness of the inhibition was quantified in terms of the IC<sub>50</sub> value.

#### Photoprotective activity (SPF)

The ethyl acetate and n-butanol fractions were solubilised in ethanol to achieve a concentration of 2 mg/mL (2000 ppm) and then spectrally analyzed across a wavelength range of 290 to 320 nm with 5 nm intervals. The sun protection efficacy was assessed through the *in vitro* determination of the Sun Protection Factor (SPF), utilizing the formula proposed by Mansur *et al.*<sup>41</sup> for SPF calculations. The absorbance of each sample was measured three, as shown in the referenced equation 2.

$$SPF_{\text{spectrophotometry}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad [2]$$

Where; EE: erythemal effect spectrum, I: solar intensity spectrum, Abs: absorbance of sunscreen product, CF: correction factor (= 10). The product  $E(\lambda) \times I(\lambda)$  is constant.

#### Statistical analysis

Results are reported as Mean  $\pm$  SD of three replicates; the IC<sub>50</sub> and A<sub>0.50</sub> values were calculated by linear regression analysis. All data were analysed using SPSS version 25. Depending on the normality of

the results determined by the Shapiro-Wilk test, a one-way ANOVA with a Tukey's post hoc analysis or Kruskal-Wallis non-parametric test was carried out. Statistical difference was set at  $p < 0.05$ .

## Results and Discussion

### Exploring the bioactive contents and *in vitro* antioxidant activity of ethyl acetate and n-butanol fractions

#### Total bioactive content

Polyphenols, widely prevalent as secondary metabolites in plants, are the primary source of natural antioxidants. Due to their hydroxyl groups, they can effectively neutralise free radicals. These primary antioxidants, including phenolic acids, flavonoids, tannins, stilbenes and coumarins, among others, have been shown to offer several therapeutic properties that diminish the risk of cancer and diabetes, demonstrating antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, and anti-allergenic properties.<sup>42</sup> The quantification of total phenolic and flavonoids in ethyl acetate (EAJO) and n-butanol (NBJO) fractions derived from the hydro-methanolic extract of the *J. oxycedrus* leaves is shown in Table 1. Considering the obtained findings, the EAJO fraction exhibited a superior polyphenolic concentration (252.56 $\pm$ 3.91 µg GAE/mg dw) compared to the NBJO fraction (119.14 $\pm$ 3.39 µg GAE/mg dw). Concurrently, the flavonoid content was notably higher in the EAJO fraction (47.70 $\pm$ 2.20 µg QE/mg dw), followed by NBJO (31.14 $\pm$ 2.50 µg QE/mg dw).

In the literature, a range of results has been documented on the bioactive content in the aerial parts of various extracts from *J. oxycedrus*. However, studies specifically concerning ethyl acetate and n-butanol fractions were scarcely reported. According to previous studies, Chaouche *et al.*<sup>43</sup> reported a polyphenols content of 133.08 $\pm$ 4.1 mg GAE/g DW in the hydro-methanolic extract of the needle from the *J. oxycedrus* collected in Tlemcen, Algeria, which was lower than the TPC content found in our EAJO fraction. Similarly, the ethanolic extract of the aerial parts of the *J. oxycedrus* from Batna, Algeria, exhibited a lower flavonoid content of 23.11 $\pm$ 3.22 µg QE/mg,<sup>44</sup> which was also lower than the level we obtained. In contrast, Ben Mrid *et al.*<sup>45</sup> reported notably higher phenolic (292.52 $\pm$ 11 mg GAE/g) and flavonoid contents (54.58  $\pm$  2.98 mg QE/g) in the methanolic extract from Moroccan *J. oxycedrus* species. Similarly, Djellouli *et al.*<sup>21</sup> reported a high flavonoid content of 90.56 $\pm$ 2.23 mg QE/g dw in the methanolic extract from *J. oxycedrus* leaves collected from Mascara, Algeria, which is significantly higher than our findings. The differences between these results may be attributed either to the extraction method, the geographical environments, or the plant development stage.<sup>45</sup>

**Table 1:** Total bioactive content of the ethyl acetate and n-butanol fractions of *Juniperus oxycedrus* leaves

Fractions	Total bioactive content	
	Phenolic content (µg GAE/mg)	Flavonoid content (µg QE/mg)
EAJO	252.56 $\pm$ 3.91	47.70 $\pm$ 2.20
NBJO	119.14 $\pm$ 3.39	31.14 $\pm$ 2.50

Results are expressed as means  $\pm$  standard deviation of triplicate.

EAJO: ethyl acetate fraction from *Juniperus oxycedrus* leaves; NBJO: n-butanol fraction from *Juniperus oxycedrus* leaves.

#### Identification of the phenolic compounds by UPLC LC-MS/MS

In light of the considerable antioxidant capacities and the significant flavonoids/phenolic contents, the EAJO and NBJO fractions were selected to identify and characterize their main compounds. To our knowledge, this study is the first to employ LC-MS/MS for analyzing the secondary metabolites in these specific fractions derived from the *Juniperus oxycedrus* leaves. The UPLC-MS/MS analysis, as presented in Table 2, indicated that the EAJO and NBJO fractions from the plant leaves were almost similar. Nevertheless, there were notable differences in the presence and quantities of certain components. Overall, the analysis revealed the presence of eleven distinct compounds in the EAJO and ten compounds in the NBJO; most of

these compounds are classified as flavonoid and phenolic acid classes. Specifically, the analysis revealed the presence of two phenolic acids (salicylic acid and ferulic acid), five flavonoids (chrysin, quercetin, rutin, naringenin and hesperitin), one carotenoid (beta carotene), one vitamin (folic acid), one coumarin (hydroxycoumarin) and one stilbenoid (viniferin).

The analysis demonstrated variations in the total area percentage of the identified compounds across different fractions derived from *J. oxycedrus*. Rutin was detected as the major flavonoid component in both EAJO and NBJO fractions, with 86.78 and 88.14 % area percentages, respectively. These findings were followed by the presence of chrysin, naringenin and quercetin. In the EAJO fraction, ferulic acid was the main phenolic acid, representing 1.14% of the total area. In contrast, the NBJO fraction had a minimal presence of salicylic acid, with an area percentage of 0.01%. Regarding chrysin, quercetin, rutin, naringenin, hesperitin, beta carotene, folic acid and viniferin were detected in both fractions. On the other hand, ferulic acid was only found in EAJO, whereas traces of hydroxycoumarin and salicylic acid were exclusively found in the NBJO fraction (Table 2).

Only a limited number of studies have analysed the chemical composition of the *Juniperus* genus, with even fewer focusing on *J. oxycedrus*. Notably, a recent investigation by Meringolo *et al.*<sup>19</sup> demonstrated that (–)-epicatechin, rutin and quercetin-3-O-glucoside were the major identified constituents in the polar fractions of the aerial part of the *J. oxycedrus* collected in Italy. In a previous study, Yaglioglu *et al.*<sup>46</sup> demonstrated that rutin and catechin were identified as the most abundant phenolic compounds in the methanolic extract of *J. oxycedrus* collected in Turkey. Furthermore, a recent study revealed that chlorogenic acid, naringin and rutin were the most identified compounds detected in the methanolic extract of *J. oxycedrus* leaves from Algeria.<sup>21</sup> On the other hand, salicylic acid, hesperidin, rutin and naringenin were reported as the most abundant compounds in the methanolic extract obtained from the Moroccan *J. oxycedrus* species.<sup>45</sup> The comparison of the phenolic compounds profile of EAJO and NBJO leaf fractions from *J. oxycedrus* in our study with those identified in the aerial parts of the same species in earlier research highlighted variations in the compounds detected. Indeed, rutin, naringenin and hesperitin have been previously reported in *J. oxycedrus* extracts.<sup>21,45,47</sup> However, catechin, caffeic acid, chlorogenic acid and gallic acid, commonly detected in the above research,<sup>19,46</sup> were not found in our study. In contrast, chrysin and ferulic acid detected in this study were scarcely mentioned and were first reported in *J. oxycedrus* aqueous extract from Algeria by Mehatp *et al.*<sup>47</sup> Concerning quercetin, beta-carotene, viniferin, and folic acid, these compounds were detected for the first time in our study, albeit in low concentrations. Our chemical composition results of *J. oxycedrus* did not completely align with the existing literature data on the same species. This difference may stem from variations in the plant species examined, the selection and the types of standard compounds used in our analysis. Further exploration using a broader range of standard compounds in future research could potentially provide a more comprehensive understanding of the chemical profile of *J. oxycedrus* subspecies.

#### Antioxidant activities

The antioxidant activity of plant extracts is commonly assessed through various *in vitro* methods. These methods primarily assess the capacity of the extracts to neutralise stable free radicals effectively. Since there is no singular method universally and precisely recommended to provide the antioxidant potential of plant extracts<sup>5</sup>, our study employed several complementary *in vitro* tests to investigate the antioxidant activity of the EAJO and NBJO fractions, such as free-radical scavenging with DPPH, ABTS and GOR, as well as reducing abilities with CUPRAC, phenanthroline and reducing power assays, in addition to the silver nanoparticle (SNP). The findings of the antioxidant activities are presented in Table 3, expressed in terms of IC<sub>50</sub> and A<sub>0.5</sub>, compared to antioxidant standards (BHT, BHA, and ascorbic acid). In this study, the leaf fractions from *J. oxycedrus* exhibited moderate antiradical activity in the DPPH assay. The EAJO fraction was the most potent, with an IC<sub>50</sub> value of 30.36±0.20 µg/mL, while the NBJO fraction followed with an IC<sub>50</sub> value of 73.55±0.67

µg/mL. However, both EAJO and NBJO fractions show no significant difference compared to the standards BHT and BHA in the DPPH assay, which have IC<sub>50</sub> values of 6.14±0.41 µg/mL and 12.99±0.41 µg/mL, respectively. This DPPH scavenging activity agreed with the findings of Meringolo *et al.*<sup>19</sup> and Djellouli *et al.*<sup>21</sup> but contrasted with those reported by Chaouche *et al.*<sup>43</sup>

The radical scavenging activity was also evaluated using the ABTS assays. The ABTS assay results revealed that the EAJO fraction exhibited greater antiradical activity, followed by the NBJO fraction, with an IC<sub>50</sub> value of 1.57±0.09 µg/mL. This value was lower than that of the standard antioxidant BHT, which was 1.14 ±0.11 µg/mL, demonstrating the potent capacity of the EAJO fraction to neutralise ABTS free radicals. The IC<sub>50</sub> value of the NBJO fraction was found to be 1.83±0.01 µg/mL, which is relatively close to the IC<sub>50</sub> values of BHT and BHA 1.75±0.20 and 1.14±0.11 µg/mL, respectively. Moreover, this significant antioxidant activity is in harmony with previous research that found the methanolic extract of *J. oxycedrus* needles to have the ability to quench ABTS<sup>•+</sup> with an IC<sub>50</sub> of 0.12±0.00 mg/mL.<sup>45</sup> In contrast, Meringolo *et al.*,<sup>19</sup> Jemli *et al.*<sup>20</sup> and Chaouche *et al.*<sup>43</sup> reported an ABTS activities of 9.3±1.3 µg/mL, 19.80 ± 0.55 µg/mL and 90.16 ± 4.2 µg/mL, respectively, which are less effective compared to our findings. In the reducing power assay, both EAJO and NBJO fractions demonstrated noteworthy antioxidant activity. Compared to the Ascorbic acid standard, which had an A<sub>0.5</sub> value of 6.73±1.15 µg/mL, the EAJO extract exhibited a considerable reducing power with an A<sub>0.5</sub> value of 12.67±0.5 µg/mL. Conversely, the NBJO extract exhibited a weak antioxidant capacity with an A<sub>0.5</sub> value of 23.44±0.57 µg/mL.

In the same context, Jemli *et al.*<sup>20</sup> reported that the aqueous extract of the Moroccan *J. oxycedrus* leaves also exhibited a considerable reducing power of IC<sub>50</sub> of 24.23±0.07 µg/mL. In comparison to our findings, Meringolo *et al.*,<sup>19</sup> Ben Mrid *et al.*<sup>45</sup> and Chaouche *et al.*<sup>43</sup> reported an IC<sub>50</sub> of 99.5±3.7 µg/mL, 139.14±2.77 mg/mL and 290±18.3 µg/mL, respectively, this value indicated lower antioxidant activities than those observed in our study. The variation in extraction procedures could explain the differences. Specifically, using more polar solvents in the extraction process may lead to the higher antioxidant activity observed, as these solvents are known to extract a greater amount of total phenolic content (TPC), which is closely linked to antioxidant efficacy.<sup>21,48</sup>

Regarding the GOR assay, The EAJO was more active than the NBJO, with IC<sub>50</sub> values of 7.10±0.64 µg/mL and 20.80±1.21 µg/mL, respectively. The IC<sub>50</sub> value of the EAJO fraction was notably close to that of the BHA, which was 5.38±0.06 µg/mL, indicating a competitive scavenging ability. Although the activity of the NBJO fraction was higher, indicating lower potency than the Ascorbic acid, with an IC<sub>50</sub> value of 6.73±0.29 µg/mL, it still demonstrated a potent free radical scavenging activity. In the CUPRAC assay, EAJO demonstrated the most potent activity with an A<sub>0.5</sub> value of 9.58±0.72 µg/mL, which was notably close to the A<sub>0.5</sub> values of the established antioxidant standards BHT and BHA, possessing an A<sub>0.5</sub> of 5.35±0.71 and 8.97±3.94 µg/mL, respectively. In contrast, the NBJO fraction presented an A<sub>0.5</sub> value of 20.80±1.21 µg/mL, indicating comparatively weaker antioxidant capacity. The assessment of metal iron reduction was carried out using the phenanthroline assay. As detailed in Table 3, the highest antioxidant activity was recorded in the NBJO fraction, with an IC<sub>50</sub> of 2.09±0.57 µg/mL, followed by the EAJO fraction, with an IC<sub>50</sub> of 2.77±0.28 µg/mL. Furthermore, NBJO showed a superior antioxidant capacity compared to the BHA standard, with an IC<sub>50</sub> of 2.12±0.04 µg/mL. In the silver nanoparticle assay, EAJO was more efficient than the NBJO fraction, with an A<sub>0.5</sub> value of 16.11± 1.18 µg/mL, followed by the NBJO with an A<sub>0.5</sub> value of 220.00±3.54 µg/mL, demonstrating a lower concentration compared to the Ascorbic acid standard with an A<sub>0.5</sub> 7.14±0.05 µg/mL. The GOR, CUPRAC, phenanthroline and silver nanoparticle assay results are obtained for the first time with the Algerian *J. oxycedrus* species; no study has been carried out before.

In the aforementioned results, EAJO demonstrated superior antioxidant properties compared to the NBJO fraction. This enhanced activity may be attributed to their phenolic and flavonoid composition and quantity differences. The variety of bioactive compounds in plant

extracts, known for their antioxidant and biological benefits, play a crucial role in determining their effectiveness. These compounds contribute significantly to the overall antioxidant capacity of the fractions. These include rutin, as reported by Sharma *et al.*<sup>49,50</sup> In addition to chrysin, naringenin, ferulic acid and quercetin, as mentioned in recent studies.<sup>51-54</sup> These compounds were detected and

identified through LC-ESI-MS/MS analysis, as outlined in Table 2. Additionally, the synergistic effect of these bioactive molecules, along with the sensitivity and specific mechanisms of action of the reagents used in the study, might also play a significant role in the observed differences in antioxidant efficacy between the two fractions.

**Table 2:** Phenolic profile determined by LC-MS-MS of EAJO and NBJO fractions of *Juniperus oxycedrus* leaves

Compound	Molecular formula	Rt Time. EAJO	Area %. EAJO	Rt Time. NBJO	Area %. NBJO
Salysilic Acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	No peak is detected	0	10.759	0.011826
Ferulic Acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	10.797	1.148471	No peak	0
Chrysin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	21.687	11.6941	21.668	11.31354
Quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	21.661	0.01145	22.676	0.018721
Viniferin	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	23.042	0.006167	24.489	0.001485
Chlorogenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	No peak is detected.	0	No peak	0
Beta Carotene	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	32.165	0.183112	32.162	0.233544
Hesperitin	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	37.903	0.0075	39.044	0.004819
Folic Acid	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	39.187	0.00305	37.583	0.002416
Rutin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	40.376	86.78932	40.379	88.1493
Hydroxy coumarin	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	No peak is detected.	0.00	46.045	0.000176
Naringenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	47.397	0.156913	45.948	0.264179

\*RT: Time retention

**Table 3:** Antioxidant activity of EAJO and NBJO fractions from *Juniperus oxycedrus* leaves.

	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)	ABTS IC <sub>50</sub> (µg/mL)	CUPRAC A <sub>0.50</sub> (µg/mL)	Reducing Power Assay A <sub>0.50</sub> (µg/mL)	SNP IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Phenanthroline IC <sub>50</sub> (µg/mL)	GOR IC <sub>50</sub> (µg/mL)
EAJO	30.36 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.83 ± 0.01 <sup>a</sup>	9.58 ± 0.72 <sup>b</sup>	12.67 ± 0.51 <sup>b</sup>	16.11 ± 1.18 <sup>b</sup>	2.77 ± 0.28 <sup>a</sup>	7.10 ± 0.64 <sup>b</sup>
NBJO	73.55 ± 0.67 <sup>b</sup>	1.57 ± 0.09 <sup>ab</sup>	20.80 ± 1.21 <sup>a</sup>	23.44 ± 0.57 <sup>a</sup>	220.00 ± 3.54 <sup>a</sup>	2.09 ± 0.57 <sup>a</sup>	9.84 ± 1.31 <sup>a</sup>
BHT <sup>+</sup>	6.07 ± 0.2 <sup>d</sup>	1.75 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.35 ± 0.71 <sup>d</sup>	NT	NT	0.88 ± 0.04 <sup>a</sup>	NT
BHA <sup>+</sup>	12.9 ± 0.24 <sup>c</sup>	1.14 ± 0.11 <sup>ab</sup>	8.97 ± 3.94 <sup>c</sup>	NT	NT	2.12 ± 0.05 <sup>b</sup>	NT
AA*	NT	NT	NT	6.73 ± 1.15 <sup>c</sup>	7.14 ± 0.05 <sup>c</sup>	NT	6.73 ± 0.29 <sup>b</sup>

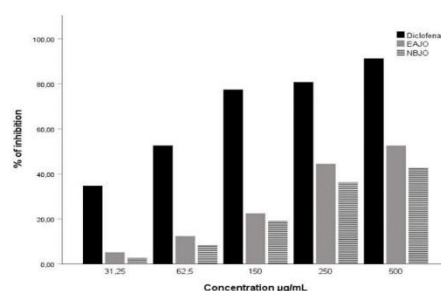
IC<sub>50</sub> and A<sub>0.50</sub> were calculated by linear regression analysis and expressed as Mean ± SD (n=3). The values with different superscripts (a, b, c) in the same columns differ significantly.). EAJO: ethyl acetate fraction; NBJO: n-butanol fraction; BHA: butylated hydroxyanisole; BHT: butylated hydroxytoluene; AA: ascorbic acid; NT: not tested.

#### *In vitro* anti-inflammatory test

One of the fundamental characteristics of inflammation is protein denaturation, in which proteins lose their tertiary and secondary structure by applying external stress or compounds, such as ROS. Denaturation of proteins often results in the loss of their biological functions and the induction of the inflammatory reaction dysfunctions that may manifest as rheumatic and inflammatory disorders.<sup>55</sup> Traditionally, plants have been utilised for treating inflammatory conditions, suggesting they could be reservoirs for novel compounds beneficial in creating medications to alleviate or cure inflammatory symptoms.<sup>55</sup>

In our study, the anti-inflammatory potential of *J. oxycedrus* fractions was examined by assessing their effects on protein denaturation *in vitro*. Regarding the results in Table 4, the ethyl acetate fraction (EAJO) and the n-butanol fraction (NBJO) exhibited relatively weak inhibition, with IC<sub>50</sub> values of 430.27±8.22 µg/mL and 586.12±11.38 µg/mL, respectively. As shown in Fig. 1, this performance was notably less effective than the standard anti-inflammatory drug diclofenac, which exhibited a substantially lower IC<sub>50</sub> value of 61.87±0.49 µg/mL and a strong anti-inflammatory effect. Furthermore, at a 500 µg/mL concentration, EAJO and NBJO showed moderate anti-inflammatory activity, inhibiting protein denaturation by 52.59% and 43.01%, respectively. These values are significantly lower than the 99.87% inhibition achieved by diclofenac under the same conditions. Corroborating our findings, a study by Djellouli *et*

*al.*<sup>21</sup> reported that both methanolic and aqueous extracts of *J. oxycedrus* exhibited *in vitro* anti-inflammatory activities inferior to diclofenac. Specifically, at a 500µg/mL concentration, their activities ranged between 62.85% and 23.35%, respectively. Prior studies have suggested that the anti-inflammatory properties of plant extracts may be linked to their antioxidant capacities.<sup>21</sup> In addition, compounds such as rutin, quercetin and chrysin are known for their anti-inflammatory effect.<sup>49,52</sup>



7644

**Figure 1:** *In vitro* anti-inflammatory activity of ethyl acetate and n-butanol fractions derived from the *Juniperus oxycedrus* leaves. Values are mean  $\pm$  SD (n = 3), compared to diclofenac.

**Table 4:** Effect of *Juniperus oxycedrus* leaves fractions on albumin denaturation.

Fractions/standard	BSA denaturation inhibition	
	IC <sub>50</sub> $\mu$ g/mL	
EAJO	430.27 $\pm$ 8.22 <sup>b</sup>	
NBJO	586.12 $\pm$ 11.38 <sup>a</sup>	
*Diclofenac	61.87 $\pm$ 0.49 <sup>c</sup>	

IC<sub>50</sub> values were calculated by linear regression analysis and expressed as Mean  $\pm$  SD (n=3). The values with different superscripts (a, b, c) in the same columns differ significantly. EAJO: Ethyl acetate fraction; NBJO: N-butanol fraction; \* Compounds used as standard references.

#### Enzymatic activity

Alzheimer's disease (AD), commonly known as dementia, represents a critical issue in global public health, affecting around 10% of the elderly population worldwide. Alzheimer's disease is associated with impairments in central cholinergic neurotransmission, primarily due to a depletion of the neurotransmitter acetylcholine, as noted by Grossberg *et al.*<sup>56</sup> Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme responsible for the hydrolysis of acetylcholine in neurons<sup>48</sup>. Acetylcholine is vital for the nervous system, notably in memory enhancement. By inhibiting the AChE, the acetylcholine levels in the nervous system increase, hence extenuating the risk of brain-related pathologies like Alzheimer's.<sup>57</sup> Previous studies suggest that oxidative stress may also contribute to the development of Alzheimer's disease (AD).<sup>3</sup> Furthermore, inhibiting acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) have been identified as powerful strategies for treating the symptoms of (AD).<sup>58</sup>

The acetylcholinesterase inhibitory activity of the *J. oxycedrus* leaf fractions was evaluated, and galantamine was served for comparison, as seen in Table 5. The EAJO exhibited the most potent inhibitory effect against AChE (IC<sub>50</sub>: 14.60 $\pm$ 0.98 $\mu$ g/mL) followed by NBJO (IC<sub>50</sub>: 201.22 $\pm$ 1.88  $\mu$ g/mL). These results were compared to the standard galantamine, which had recorded an IC<sub>50</sub> of 6.27 $\pm$ 1.15  $\mu$ g/mL, where the IC<sub>50</sub> measured in EAJO is closer to the standard reference. On the other hand, the available literature concerning the AChE inhibitory effect of *J. oxycedrus* leaf fractions was scarce. According to the existing data, the essential oil derived from the aerial parts of *J. oxycedrus* collected in Laghouat, Algeria, exhibited an AChE inhibitory activity of 65.88% at 200  $\mu$ g/mL.<sup>59</sup> In the same line, Öztürk *et al.*<sup>60</sup> reported that the hexane extract from *J. oxycedrus* berries growing in Turkey was the most effective extract against AChE among the other six studied extracts, with an 81.40% inhibition at 200  $\mu$ g/mL.<sup>60</sup> However, the ethanolic extract of the aerial parts of the *J. oxycedrus* badia collected in Portugal exhibited weak inhibition of 24.02 % at 200  $\mu$ g/mL.<sup>61</sup> Similarly, Orhan *et al.* reported that the ethanolic extract derived from the Turkish *J. oxycedrus* leaves exhibited a moderate inhibition of 14.65% at 100  $\mu$ g/mL, while the aqueous extract had an inhibition of 39.17% at 200  $\mu$ g/mL.<sup>26</sup>

From the aforementioned results, we may conclude that our ethyl acetate fraction exhibited the most effective inhibitory activity against AChE, suggesting that this inhibitory capacity may be linked to the abundant phenolic compounds, especially flavonoids like chrysin, rutin, quercetin and ferulic acid are recognized for their neuroprotective properties and potential benefits in treating neurodegenerative diseases.<sup>3,49,51,62</sup> These compounds were present in varying quantities in both fractions, with ferulic acid exclusively found in the EAJO fraction. Ferulic acid is known for combating oxidative stress and alleviating neurodegenerative diseases.<sup>62</sup> This could explain the higher effectiveness of EAJO over the NBJO fraction. EAJO also exhibited a potent radical scavenging capacity, highlighting its potential as a source of compounds that can diminish oxidative stress, which is significant because oxidative stress is known

to contribute to the onset and advancement of neurodegenerative diseases.<sup>3,7,62</sup>

Diabetes mellitus, primarily characterized by prolonged hyperglycemia, is a metabolic disorder that often results from impaired insulin production and function.<sup>63,64</sup> Inhibiting key enzymes involved in carbohydrate metabolism is a pivotal therapeutic strategy to manage hyperglycemia, particularly  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. These enzymes in the mouth and small intestine are crucial in breaking down starch into simpler sugars.<sup>65</sup> Inhibiting  $\alpha$ -amylase, which catalyses the hydrolysis of starch, can prevent the breakdown of starch and subsequent glucose absorption, leading to lower blood glucose levels.<sup>65</sup> This mechanism is not only beneficial in controlling diabetes but also valuable for treating obesity.<sup>65</sup> Consequently, significant research efforts have been directed towards developing effective  $\alpha$ -amylase inhibitor.<sup>63,65,66</sup>

As seen in Table 5, the ethyl acetate and n-butanol fractions of *J. oxycedrus* exhibited significant antidiabetic activity, surpassing the acarbose standard with an IC<sub>50</sub> value of 639.48 $\pm$ 7.43 $\mu$ g/mL, 975.83 $\pm$ 15.95  $\mu$ g/mL and 3650.93 $\pm$ 10.70  $\mu$ g/mL, respectively. According to Oboh *et al.*<sup>66</sup> quercetin and rutin inhibit  $\alpha$ -amylase activity in a dose-dependent manner, with rutin being more effective than quercetin. This inhibition occurs through the formation of hydrogen bonds between the hydroxyl groups in the flavonoids and the polar groups at the enzyme's allosteric site near the catalytic site. This interaction is believed to alter the enzyme's molecular structure and its hydrophilic and hydrophobic characteristics, ultimately decreasing its activity. Combinations of rutin and quercetin, especially a mix of 75% rutin and 25% quercetin, show a synergistic effect, further enhancing  $\alpha$ -amylase inhibition.<sup>66</sup>

Tyrosinase plays a crucial role in the early phase of melanogenesis, the process responsible for melanin production. Melanin is the pigment that determines the colouration of skin and hair. Nevertheless, imbalances in melanin production can lead to conditions like hyperpigmentation or vitiligo.<sup>67</sup>

The current research exploring the effects of different fractions from *J. oxycedrus* focused on tyrosinase inhibition. As seen in Table 5, the ethyl acetate fraction of *J. oxycedrus* showed weak tyrosinase inhibitory activity, with an IC<sub>50</sub> value of 206.44 $\pm$ 18.48  $\mu$ g/mL. This activity is noticeable but less potent than the standard kojic acid, which has an IC<sub>50</sub> of 25.23 $\pm$ 0.78  $\mu$ g/mL. Further supporting these findings, Cheraif *et al.*<sup>59</sup> conducted a study that aligned with these results. Their research revealed that the essential oil (EO) from *J. oxycedrus* leaves, particularly those grown in Algeria, also exhibited limited tyrosinase inhibitory activity, measured at 36%.<sup>59</sup> Tyrosinase enzyme inhibition, crucial for managing hyperpigmentation, is effectively achieved by aromatic aldehydes, acids, flavonoids, and copper chelators, with rutin particularly noted for its strong anti-pigment properties.<sup>67</sup> However, despite its abundance in ethyl acetate (NBJO) and n-butanol (NBJO) fractions, the overall tyrosinase inhibitory activity is moderate in the EAJO and absent in the NBJO. This could suggest that in this specific context, the efficacy of rutin is influenced by factors such as the nature of its interaction within the fraction, whether synergistic or antagonistic, rather than the involvement of other bioactive molecules.<sup>68</sup>

Urease, a metalloenzyme found in diverse organisms like bacteria, fungi, and plants, plays a key role in converting urea into ammonia and carbamate, which subsequently decomposes into carbon dioxide and a second ammonia molecule.<sup>40,68</sup>

This reaction can significantly increase pH levels, impacting human health and agriculture. Urease is notably involved in serious infections in the gastric tract caused by pathogens such as *Helicobacter pylori*.<sup>69</sup> Its inhibition is, therefore, pivotal in developing treatments for conditions like ulcers and gastric cancer. Urease inhibitors, targeting the enzyme's active site, show promise in treating infections and mitigating urease's harmful effects on living organisms.<sup>68,69</sup>

With the aim of identifying urease inhibitors, as presented in Table 5, the two fractions of *J. oxycedrus* were evaluated for their urease inhibition effects in comparison to the standard compound, thiourea. The tested EAJO fraction showed a weak urease inhibitory activity with an IC<sub>50</sub> of 245.77  $\pm$  3.75 $\mu$ g/ml, followed by the NBJO fraction. These results are obtained for the first time with the *J. oxycedrus*

species; no study has been carried out before. A wide variety of urease inhibitors have been identified in plants, including terpenoids, polyphenols, and alkaloids. These compounds act by either competing with urea, the substrate, or by chelating nickel, an essential co-factor for the enzyme.<sup>68</sup> Among these inhibitors, rutin was the main compound in the fractions tested and has demonstrated the ability to inhibit urease, exhibiting an IC<sub>50</sub> value of 97.8 µg/mL.<sup>69</sup>

#### Sun protection activity

Sunscreen used as a photoprotective agent for UV protection has gained widespread popularity, primarily due to its capacity to absorb, reflect, or scatter solar rays. The Sun Protection Factor (SPF) serves as a key indicator of their effectiveness against sunburn, where higher SPF values reflect superior effectiveness protection.<sup>70</sup> Concurrently, prolonged exposure to UV radiation, particularly UV-B (280–320 nm), is known to escalate the risk of skin diseases like cancer and photo-allergic reactions. Recent research has turned towards natural substances as viable sunscreen options, attributable to their UV absorption and antioxidant properties. Notably, there exists a

strong correlation between SPF values and the phenolic content in plant extracts, as reported by Ebrahimzadeh *et al.*<sup>71</sup> further endorsing the efficacy of these natural compounds in sun protection applications. In Table 6, the sun protection factor (SPF) values of various fractions are presented. The NBJO fraction exhibited the highest SPF value at 31.71 ± 0.31, followed by the EAJO fraction, which has an SPF of 22.62 ± 1.52. The inhibitory activity observed may be attributed to the photoprotective effects of compounds such as rutin, quercetin, chrysin, ferulic acid, and beta-carotene.<sup>72–74</sup>

In the literature, the data about the photoprotective activity of *J. oxycedrus* was unavailable. SPF classifications are categorized into four levels: low (SPF 6–15), medium or moderate (SPF 15–30), high (SPF 30–50), and very high (SPF > 50). Based on this classification, the NBJO fraction falls into the high sunscreen activity category, whereas the EAJO fraction is categorized as having moderate sunscreen activity. Comparatively, methanolic extracts from *J. Phoenicia* leaves showed moderate sunscreen activity with an SPF of 26.13 ± 1.73, aligning closely with the findings of this study.<sup>75</sup>

**Table 5:** The enzyme inhibitory activities of EAJO and NBJO of the *Juniperus oxycedrus* leaves.

Samples	Anti-AchE IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Anti-Alpha Amylase IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Anti-Tyrosinase IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Anti-Urease IC <sub>50</sub> (µg/mL)
EAJO	14.60 ± 0.98 <sup>b</sup>	639.48 ± 7.43	206.44 ± 18.48 <sup>a</sup>	245.77 ± 3.75 <sup>a</sup>
NBJO	201.22 ± 1.88 <sup>a</sup>	975.83 ± 15.95 <sup>b</sup>	NA	>200 <sup>a</sup>
Galantamine*	6.21 ± 0.12 <sup>c</sup>	NT	NT	NT
Acarabose*	NT	3650.93 ± 10.70 <sup>a</sup>	NT	NT
Kojic Acid*	NT	NT	25.23 ± 0.78 <sup>b</sup>	NT
Thiourea*	NT	NT	NT	11.35 ± 0.3 <sup>b</sup>

IC<sub>50</sub> and A<sub>0.50</sub> were calculated by linear regression analysis and expressed as Mean ± SD (n=3). The values with different superscripts (a, b, c) in the same columns differ significantly. EAJO: Ethyl acetate fraction; NBJO: N-butanol fraction; NT: not tested, NA: not activated, \* Compounds used as standard references.

**Table 6:** Sun protection factor calculation for the ethyl acetate fraction obtained from *Juniperus oxycedrus* leaves.

λ (nm)	EE x I (nm)	EAJO		NBJO		Vichy*	
		Abs	SPF	Abs	SPF	Abs	SPF
290	0.015	3.095 ± 0.12	0.464 ± 0.01	3.088 ± 0.02	0.463 ± 0.03	4.457 ± 0.02	0.668 ± 0.00
295	0.0817	2.837 ± 0.11	2.318 ± 0.09	3.156 ± 0.02	2.580 ± 0.02	4.464 ± 0.02	3.647 ± 0.01
300	0.2874	2.485 ± 0.16	7.142 ± 0.46	3.161 ± 0.04	9.084 ± 0.11	4.409 ± 0.03	12.671 ± 0.10
305	0.3278	2.193 ± 0.16	7.190 ± 0.53	3.187 ± 0.01	10.45 ± 0.04	4.416 ± 0.03	14.47 ± 0.11
310	0.1864	1.990 ± 0.14	3.709 ± 0.27	3.189 ± 0.05	5.945 ± 0.09	4.428 ± 0.04	8.25 ± 0.08
315	0.0837	1.804 ± 0.13	1.510 ± 0.11	3.144 ± 0.01	2.631 ± 0.01	4.415 ± 0.02	3.704 ± 0.01
320	0.018	1.589 ± 0.11	0.286 ± 0.02	3.084 ± 0.06	0.555 ± 0.01	4.49 ± 0.05	0.808 ± 0.00
Total	1		22.62 ± 1.52		31.71 ± 0.31		44.23 ± 0.35

The values are expressed as Mean ± SD (n=3). \* Reference compounds. EE: erythral effect spectrum, I: solar intensity spectrum, Abs: absorbance of sunscreen product.

#### Conclusion

The study highlights *Juniperus oxycedrus*, collected from Jijel, Algeria, as a promising natural source for treating diabetes and skin disorders due to its α-amylase, photoprotective, and tyrosinase inhibitory activities. The ethyl acetate and n-butanol leaf fractions are rich in phenolic compounds, offering strong antioxidant and anti-inflammatory properties. These findings support its use in traditional medicine. Moreover, the study emphasises the importance of *J. oxycedrus* in developing pharmaceuticals for combating neurodegenerative disorders, owing to its potent anti-cholinesterase activity. It is concluded that the bioactive compounds isolated from the ethyl acetate fraction could offer significant therapeutic benefits, particularly in neurodegenerative and antidiabetic diseases. Additionally, the high efficacy of the n-butanol fraction as photoprotective agent suggests promising prospects for their

application in cosmetic products, particularly in sunscreens. Future studies should focus on evaluating their suitability in cosmetic formulations, enhancing their value for dermatological use. Further *in vivo* investigations are required to confirm the safety and efficacy of these compounds and to fully explore their therapeutic potential. This ongoing research will be important for understanding the full spectrum of applications for *J. oxycedrus* in medical and pharmaceutical contexts, potentially leading to new treatments for chronic conditions.

#### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Authors' Declaration

The authors hereby declare that the work presented in this article is original and that any liability for claims relating to the content of this article will be borne by them.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the National Centre for Biotechnology Research (Constantine) for their respective support.

#### References

- Ullah Z, Shad AA, Fahim M. *In vitro* antioxidant, anticholinesterase inhibitory, and antimicrobial activity studies of *Terminalia chebula* (Retz) and *Terminalia arjuna* (Roxb). *S Afr J Bot*. 2021; 146(8): 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.11.016>
- World Health Organization. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines. Report of a WHO global survey World Health Organization. *WHO Libr Cat Data Natl*. 2005;(May). ISBN: 92415932373.
- Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *J Funct Foods*. 2015; 18(10):820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Napagoda MT, Malavi B, Shamila A. Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka. *BMC Complement Altern Med*. 2016; 24(1):1–6. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1455-8>
- Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*. 2019; 24(22): 14–6. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>
- Jeong SH, Kim BY, Kang HG, Ku HO, Cho JH. Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of the reproductive system in rats. *Toxicology*. 2005; 208(1): 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.11.014>
- Akbari B, Baghaci-Yazdi N, Bahmaic M, Mahdavi Abhari F. The role of plant-derived natural antioxidants in the reduction of oxidative stress. *BioFactors*. 2022; 48(3): 611–33. <https://doi.org/10.1002/biof.1831>
- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok EJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr*. 1998; 80(S1): 77–112. <https://doi.org/10.1079/bjn19980106>
- Chouala K, Boudjema K, Khelef Y, Nani S, Ouali K, Boumendjel M, Boumendjel A, Messarah M. Antioxidant compounds from the *Arthrospira platensis* protect against Bisphenol A-induced nephrotoxicity in rats. *J Toxicol Environ Health Sci*. 2024; <https://doi.org/10.1007/s13530-023-00203-7>
- Zadam MH, Ahmida M, Djaber N, Ounacer LS, Sekiou O, Taibi F, Bencheikh R, Chouala K, Boudjema K, Tichati L, Zaafour M, Boumendjel A, Messarah M, Boumendjel M. *In-vivo* anti-inflammatory effects of Roman Chamomile (*Chamaemelum nobile*) aqueous extracts collected from the National Park of El-Kala (North-East, Algeria). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2023; 69(9): 245–254. <https://doi.org/10.14715/cmb/2023.69.9.38>
- Djaber N, Ounaceur LS, Moubine BN, Khaldi T, Rouag M, Berrouague S, Amara H, Taibi F, Boumendjel M, Boumendjel A, Messarah M. Roundup-induced biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of rats: the ameliorative effects of *Linum usitatissimum* oil. *Acta Biochim Pol*. 2020; 67(1):53–64. <https://doi.org/10.18388/abp.2020.2898>
- Rouag M, Berrouague S, Djaber N, Khaldi T, Boumendjel M, Taibi F, Abdennour C, Boumendjel A, Messarah M. Pumpkin seed oil alleviates oxidative stress and liver damage induced by sodium nitrate in adult rats: biochemical and histological approach. *Afr Health Sci*. 2020; 20(1):413–425. <https://doi.org/10.4314/ahs.v20i1.48>
- Rouibah Z, Ben Mensour A, Rezik O, Boumendjel M, Taibi F, Bouaziz M, El Feki A, Messarah M, Boumendjel A. Chemical composition, antioxidant activities, in an allergic asthma model, of *Olea europaea* L. leaf extracts from Collo (Skikda, Algeria). *Drug Chem Toxicol*. 2022; 45(1):197–208. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1679827>
- Zemmouri H, Sekiou O, Ammar S, El Feki A, Bouaziz M, Messarah M, Boumendjel A. *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. *Pharm Biol*. 2017; 55(1):1561–1568. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1310905>
- Küpel EA, Güvenç A, Yesilada E. A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *J Ethnopharmacol*. 2009; 125(2):330–6. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.031>
- Chaouche TM, Haddouchi F, Atik-Bekara F, Ksouri R, Azzi R, Boucherit Z, Tefiani C, Larbat R. Antioxidant, haemolytic activities and HPLC-DAD-ESI-MSn characterisation of phenolic compounds from the root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Ind Crops Prod*. 2015; 64(1): 182–7. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.051>
- Orhan N. *Juniperus* Species: Features, Profile and Applications to Diabetes. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*. Elsevier Inc. 2019; 447–459. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813822-9.00030-8>
- Ninich O, Et-tahir A, Kettani K, Ghanmi M, Aoujadj J, El Anry S, Ouajdi M, Satrani B. Plant sources, techniques of production and uses of tar: A review. *J Ethnopharmacol*. 2022; 285(1): 114889. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114889>
- Meringolo L, Bonesi M, Sicari V, Rovito S, Passalacqua NG, Loizzo MR, Tundi R. Essential Oils and Extracts of *Juniperus macrocarpa* Sm. and *Juniperus oxycedrus* L.: Comparative Phytochemical Composition and Anti-proliferative and Antioxidant Activities. *Plants (Basel)*. 2022; 11(8): 1025. <https://doi.org/10.3390/plants11081025>
- El Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, Zerrouki A, Cherrah Y, Alaoui K. Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of *Juniperus thurifera*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea* and *Tetraclinis articulata*. *Adv Pharmacol Sci*. 2016; 2016:6392656. <https://doi.org/10.1155/2016/6392656>
- Djellouli S, Larbi KS, Meddah B, Rebiai A. Chemical composition, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* extracts from Algeria. *Eur J Biol Res*. 2022; 12(3): 271–81. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.7135281>
- Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Statti GA, Menichini F, Lampronti I, Gambari R, Cinatl J, Doerr HW. Phytochemical analysis and *in vitro* antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. *Chem Biodivers*. 2008; 5(3): 461–70. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890045n>
- Orhan N, Aslan M, Demirci B, Ergun F. A bioactivity guided study on the antidiabetic activity of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* L. leaves. *J Ethnopharmacol*. 2012; 140(2): 409–15. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.042>
- Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chem*. 2007; 105(2):572–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.015>
- El-Abid H, Amaral C, Cunha SC, Augusto T V., Fernandes JO, Correia-da-Silva G, Teixeira AN, Mounmi M.

- Chemical composition and anti-cancer properties of *Juniperus oxycedrus* L. essential oils on estrogen receptor-positive breast cancer cells. *J Funct Foods*. 2019; 59(3):261–71. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.042>
26. Orhan N, Orhan IE, Ergun F. Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five *Juniperus* species. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49(9):2305–12. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.031>
  27. Singleton VL, Rossi JA. Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965; 16(3):144–58. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
  28. Topçu G, Ay M, Bilici A, Sarikürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem*. 2007; 103(3):816–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.028>
  29. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nat*. 1958; 181(4617):1199–200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
  30. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(9–10):1231–7. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
  31. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr Diet*. 1986; 44(6):307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
  32. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(26):7970–81. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
  33. Özyürek M, Güngör N, Bakı S, Güçlü K, Apak R. Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols. *Anal Chem*. 2012; 84(18):8052–9. <https://doi.org/10.1021/ac301925b>
  34. Shi H, Noguchi N, Niki E. Galvinoxyl method for standardising electron and proton donation activity. *Methods Enzymol*. 2001; 335:157–66. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(01\)35240-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(01)35240-0)
  35. Szydłowska-Czermiak A, Dianoczi C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 2008; 76(4):899–905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.055>
  36. Karthik K, Kumar P, Rathore RSB. Evaluation of the anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by *in vitro* method. *Indian J Res Pharm Biotech*. 2013; 5674(10): 2320–2.
  37. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961; 7(2):88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
  38. Zengin G, Sarikurkcü C, Aktumsek A, Ceylan R, Ceylan O. A comprehensive study on phytochemical characterisation of *Haplophyllum myrsinifolium* Boiss. Endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer's, skin diseases and type II diabetes. *Ind Crops Prod*. 2014; 53:244–51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.043>
  39. Deveci E, Tel-qayan G, Duru ME. Phenolic profile, antioxidant, anti-cholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *ferula elaeochytris* and *sideritis stricta*. *Int J Food Prop*. 2018; 21(1):771–83. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1431660>
  40. Taha M, Ullah H, AlMuqarrabun LMR, Khan MN, Rahim F, Ahmat N, avid MT, Ali M, Khan KM. Bisindolylmethane thiosemicarbazides as potential inhibitors of urease: Synthesis and molecular modelling studies. *Bioorganic Med Chem*. 2018; 26(1):152–60. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.028>
  41. Mansur, JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulay RD. Determination of sun protection factor by spectrophotometry. *An Bras Dermatol*. 1986; (61):121–124.
  42. Bhooshan PK, Ibrahim RS. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009; 5(2):270–8. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
  43. Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Medini F, Atik-Bekara F. *In vitro* evaluation of the antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Phytother*. 2013; 11(4):244–9. <https://doi.org/10.1007/s10298-013-0779-5>
  44. Fadel H, Benayache F, Benayache S. Antioxidant properties of four Algerian medicinal and aromatic plants *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* L. *Der Pharmacia Lettre*. 2016; 8(3): 72–79.
  45. Ben Mrid R, Bouchmaa N, Bouargalme Y, Ramdan B, Karrouchi K, Kabach I, El Karbane M, Idir A, Ziyad A, Nhiri M. Phytochemical characterisation, antioxidant and *in vitro* cytotoxic activity evaluation of *Juniperus oxycedrus* Subsp. *oxycedrus* needles and berries. *Molecules*. 2019; 24(3):502. <https://doi.org/10.3390/molecules24030502>
  46. Yaglioglu AS, Eser F. Screening of some *Juniperus* extracts for the phenolic compounds and their anti-proliferative activities. *S Afr J Bot*. 2017; 113: 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.005>
  47. Er Kemal M, Bakchiche B, Kemal M, Cherah K, Kara Y, Bardaweel SK, Miguel MG, Yildiz O, Ghareeb M. Six Algerian plants: Phenolic profile, antioxidant, antimicrobial activities associated with different simulated gastrointestinal digestion phases and anti-proliferative properties. *J Herb Med*. 2023; 38(2):100636. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100636>
  48. Chaabna N, Naili O, Ziane N, Bensouici C, Dahamna DH, Harzallah D. *In vitro* Antioxidant, anti-Alzheimer and Antibacterial Activities of Ethyl acetate and n-Butanol Fractions of *Punica granatum* Peel from Algeria. *Trop J Nat Prod Res*. 2023; 7(7):3470–7. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v7i7.27>
  49. Enogieru AB, Haylett W, Hiss DC, Barden S, Ekpo OE. Rutin as a potent antioxidant: Implications for neurodegenerative disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018:62410. <https://doi.org/10.1155/2018/6241017>
  50. Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013; 22(8):1063–79. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.805744>
  51. Mishra A, Mishra PS, Bandopadhyay R, Khurana N, Angelopoulou E, Paudel YN, Piperi C. Neuroprotective potential of chrysin: Mechanistic insights and therapeutic potential for neurological disorders. *Molecules*. 2021; 26(21):1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules26216456>
  52. Oršolić N, Nemrava J, Jeleč Ž, Kukulj M, Odeh D, Jakopović B, Jazvinščak Jembrek M, Bagatin T, Fureš R, Bagatin D. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activities of Chrysin and Naringenin in a Drug-Induced Bone Loss Model in Rats. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(5):2872. <https://doi.org/10.3390/ijms23052872>
  53. Xu D, Hu MJ, Wang YQ, Cui YL. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*. 2019; 24(6):1123. <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>
  54. Itagaki S, Kurokawa T, Nakata C, Saito Y, Oikawa S, Kobayashi M, Hirano T, Iseki K. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem*. 2009; 114(2):466–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.073>

55. Mouffouk C, Mouffouk S, Oulmi K, Mouffouk S, Haba H. *In vitro* photoprotective, hemostatic, anti-inflammatory and antioxidant activities of the species *Linaria scariosa* Desf. *S Afr J Bot*. 2020; 130:383–8. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.003>
56. Grossberg GT, Desai AK. Management of Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003; 58(4):331–53. <https://doi.org/10.1093/gerona/58.4.m331>
57. Bonesi M, Menichini F, Tundis R, Loizzo MR, Conforti F, Passalacqua NG, Statti GA, Menichini F. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2010; 25(5):622–8. <https://doi.org/10.3109/14756360903389856>
58. Palmer AM. Neuroprotective therapeutics for Alzheimer's disease: Progress and prospects. *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 32(3):141–7. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.007>
59. Cheraif K, Bakchiche B, Gherib A, Bardaweel SK, Çol Ayvaz M, Flamini G, Ascerizzi R, Ghareeb MA. Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Tyrosinase, Anti-Cholinesterase and Cytotoxic Activities of Essential Oils of Six Algerian Plants. *Molecules*. 2020; 25(7):1710. <https://doi.org/10.3390/molecules25071710>
60. Öztürk M, Tümen I, Uğur A, Aydoğmuş-Öztürk F, Topçu G. Evaluation of fruit extracts of six Turkish Juniperus species for their antioxidant, anti-cholinesterase and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric*. 2011;91(5):867–76. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4258>
61. Tavares L, McDougall GJ, Fortalezas S, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN. The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four Juniperus species found in Portugal. *Food Chem*. 2012; 135(2):562–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.023>
62. Phadke AV., Tayade AA, Khambete MP. Therapeutic potential of ferulic acid and its derivatives in Alzheimer's disease—A systematic review. *Chem Biol Drug Des*. 2021; 98(5):713–21. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13922>
63. Habtemariam S, Lentini G. The Therapeutic Potential of Rutin for Diabetes: An Update. *Mini Rev Med Chem*. 2015; 15(7): 524–8. <https://doi.org/10.2174/138955751507150424103721>
64. Sekiou O, Boumendjel M, Taibi F, Boumendjel A, Messarah M. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia herba alba* aqueous extract on hyperlipidemia and oxidative damage in alloxan-induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*. 2019; 125(2):163–173. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1443470>
65. Mahmood N. A review of  $\alpha$ -amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological states such as obesity and diabetes. *Comp Clin Path*. 2016; 25(6):1253–64. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-1967-x>
66. Oboh G, Ademosun AO, Ayeni PO, Omojokun OS, Bello F. Comparative effect of quercetin and rutin on  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in rat pancreas. *Comp Clin Path*. 2015; 24(5):1103–10. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-2040-5>
67. Souilah N, Bendif H, Ullah Z, Hamel T. LC-MS/MS simultaneous determination of 37 bioactive compounds in *bunium crassifolium* batt. And its biological activities. *J Res Pharm*. 2021;25(4):450–63. <https://doi.org/10.29228/jrp.36>
68. Zaidi SF, Muhammad JS, Shahryar S, Usmanghani K, Gilani AH, Jafri W, Sugiyama T. Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *J Ethnopharmacol*. 2012; 141(1):403–10. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.001>
69. Qanash H, Al-Rajhi AMH, Almashjary MN, Basabrain AA, Hazzazi MS, Abdelghany TM. Inhibitory potential of rutin and rutin nano-crystals against *Helicobacter pylori*, colon cancer, hemolysis and butyrylcholinesterase *in vitro* and *in silico*. *Appl Biol Chem*. 2023; 66(1). <https://doi.org/10.1186/s13765-023-00832-z>
70. Mishra AK, Mishra A, Chattopadhyay P. Herbal cosmeceuticals for photoprotection from ultraviolet B radiation: A review. *Trop J Pharm Res*. 2011; 10(3):351–60. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i3.7>
71. Ebrahimzadeh MA, Enayatifard R, Khalili M, Ghaffarloo M, Saeedi M, Charati JY. Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. *Iran J Pharm Res*. 2014; 13(3):1041–8.
72. Saewan N, Jimtaisong A. Photoprotection of natural flavonoids. *J App Pharm Sci*. 2013; 3(9):129–41. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3923>
73. Stevanato R, Bertelle M, Fabris S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2014; 69(1):71–7. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.02.014>
74. Freitas JV, Gaspar LR. *In vitro* photo safety and efficacy screening of apigenin, chrysin and beta-carotene for UVA and VIS protection. *Eur J Pharm Sci*. 2016; 89: 146–53. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.04.032>
75. Telaidji AN. Chemical characterisation and biological activity (*in vitro* and *in vivo*) of the methanolic extract of *Juniperus phoenicea* L. [Master's thesis]: University of Brother Mentouri Constantine; 2018; 56–57p.

## Séminaires nationaux et internationaux





People's Democratic Republic of Algeria  
 Ministry of Higher Education and Scientific Research  
 University August 20, 1955 Skikda  
 Faculty of Sciences  
 Department of Agronomic Sciences  
 Laboratory for the Optimization of Agricultural Production in Sub-humid Zones (LOPAZS)



**INTERNATIONAL SEMINAR ON VALORIZATION OF AGRONOMIC, ECOLOGICAL  
 AND FOOD RESOURCES (ISVAEFR 2022)- 18, 19 & 20 OCTOBER 2022  
 CERTIFICATE OF PARTICIPATION**

The President of the International Seminar on the Valorization of Agronomic, Ecological and Food Resources, certified that:  
**Mrs. AHMIDA MERYEM**

Presented an **Oral** communication entitled:

**CHEMICAL ANALYSIS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY EVALUATION OF JUNIPERUS OXYCEDRUS  
 AERIAL PARTS OXYCEDRUS ARIAL WATER EXTRACT**

**CO-AUTEURS: MAHIEDDINE BOUMENDJEL, AMEL BOUMENDJEL, MAHFOUD MESSARAH, CHAWKI BENSOUICI,  
 MUSTAFA HICHEM ZEDDAM, ILHEM SILINI**

Université 20 Août 1955 - Skikda  
 Faculté des Sciences  
 Département des Sciences Agronomiques  
 Séminaire International Sur la Valorisation des Ressources  
 Agronomiques, Ecologiques et Alimentaires - 18 - 19 - 20 Octobre 2022  
 ISVAEFR 2022



