

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Centre Eau, Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable (CERNE2D)

Structure de Recherche : Équipe "Énergie, matériaux et développement durable" (EMDD)

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie, Pharmacologie et Santé

Présentée et soutenue le : 21/12/2023 par :

Smail AMTAGHRI

Étude des Activités Antihypertensive, Vasorelaxante et Inhibitrice de l'ACE2 de Quelques Plantes Médicinales Chez le Rat

JURY

Souad EL HAJJAJI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Présidente
Saïd LAZAR	PES, Université Hassan II-Casablanca, Faculté des Sciences et Techniques - Mohammedia	Rapporteur/Examineur
Younes ABROUKI	PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Rapporteur/Examineur
Driss HMOUNI	PH, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences - Kénitra	Rapporteur/Examineur
Nadia FELLAT	PES, Université Mohammed V, Faculté de Médecine et de Pharmacie - Rabat	Examinatrice
Ali OUASSRI	PES, Centre Régional des Métiers de l'Education et de la Formation - Rabat	Examineur
Souad BENAICH	PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Examinatrice
Mohamed EDDOUKS	PES, Université Moulay Ismail, Meknes, Faculté des Sciences et Techniques - Errachidia	Co-directeur de thèse
Miloudia SLAOUI	PH, Ecole Supérieure de Technologie - Salé	Directrice de Thèse

Année Universitaire : 2023/2024

Dedicace

«Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas, c'est

parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles» Sénèque.

La chose la plus belle et la plus importante c'est le savoir qui donne un vrai

sens à la vie et qui nous aide à exister dans ce monde, pour ce fait, je dédie ce

travail :

-A ma chère mère que j'aime, à mon cher père que j'aime,

Un Grand merci, sans vous, je ne serais pas entrain d'écrire ces mots,

-A mon frère Mohamed et à mes sœurs Dounia, Ikram et Leila,

Je ne sais comment vous remercier pour votre soutien, votre présence dans les

moments de difficultés,

-A tous les membres de ma famille,

-A tous mes amis,

-A tous ceux que j'aime,

-A tous ceux qui m'aiment,

Je dédie ce travail.

Aimablement

Remerciements

Tout d'abord, je dois remercier ALLAH, le tout puissant, qui m'a donné le courage, la volonté et la force de mener à bien ce travail. Cette thèse est le résultat de quatre ans de travail acharné, elle n'aurait pu être achevée sans le soutien et les conseils de nombreuses personnes à qui je suis profondément redevable.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Energie, Matériaux et Développement Durable (EMDD) - Ecole Supérieure de Technologie-SALE, Centre de l'Eau, des Ressources Naturelles, de l'Environnement et du Développement Durable (CERNE2D) de l'Université Mohammed V de Rabat, dirigée par Madame **Miloudia SLAOUI**, Professeur Habilitée à l'Ecole Supérieure de Technologie de Salé. Les différents travaux expérimentaux ont été réalisés à la Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia, au sein de l'équipe d'Ethnopharmacologie et Pharmacognosie dirigée par Monsieur **Mohamed EDDOUKS**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia.

Nous remercions chaleureusement l'Académie Hassan II des Sciences & Techniques et le CNRST d'avoir financé ce travail.

Je remercie amplement mon encadrante, Madame **Miloudia SLAOUI**, Professeur Habilitée à l'Ecole Supérieure de Technologie de Salé, d'avoir accepté de diriger ma thèse. Son aide, sa sympathie et ses directives tout au long des études doctorales, m'ont été d'une grande utilité pour arriver à ce stade final de la formation. Qu'il me soit permis de lui exprimer mon profond respect et mes vifs remerciements.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à mon co-directeur, Monsieur **Mohamed EDDOUKS**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir consacré son temps, ses efforts et sa patience à la co-direction de cette thèse ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée durant la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude et de ma grande estime.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Madame **Souad EL HAJJAJI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Monsieur **Saïd Lazar**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteur de thèse et examinateur.

Je remercie vivement Monsieur **Younes ABROUKI**, Professeur Habilité à la Faculté des Sciences de Rabat d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur de thèse et examinateur.

Je remercie également Monsieur **Driss HMOUNI**, Professeur Habilité à la Faculté des Sciences de Kénitra d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur de thèse et examinateur.

Mes remerciements vont à Madame **Nadia FELLAT**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de participer à la soutenance.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à Monsieur **Ali OUASSRI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur au Centre Régional des Métiers de l'Education et de la Formation à Rabat, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de participer à la soutenance.

Je tiens à remercier profondément Madame **Souad BENAICH**, Professeur Habilitée à la Faculté des Sciences de Rabat, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de participer à la soutenance.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Je pense à mes collègues du laboratoire d'Errachidia : Ayoub Amssayef, Ismail Bouadid, Mourad Akdad, Amine Azzane et Adil Qabouche avec qui j'ai passé des moments agréables.

J'adresse aussi mes remerciements à mon frère, Mohammed et mes sœurs : Dounia, Ikram et Leila pour leur soutien moral et matériel durant ces années de thèse.

Enfin, je ne peux que remercier ma mère et mon père, sans qui tout cela n'aurait jamais été possible et qui m'ont éduqué, encouragé et motivé pour réaliser mes objectifs.

Encore une fois un grand merci à tous. . .

Résumé

L'hypertension artérielle est une maladie chronique "silencieuse" affectant plus d'un milliard de personnes dans le monde. Elle est définie par une valeur de pression artérielle supérieure ou égale à 140 mmHg pour la pression artérielle systolique et/ou supérieure ou égale à 90 mmHg pour la pression artérielle diastolique. Elle représente un facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires et d'insuffisance rénale et constitue une cause majeure de mortalité. Le développement de médicaments antihypertenseurs efficaces qui tiennent compte des caractéristiques uniques des populations du monde est donc d'une importance capitale pour la santé publique. Notre travail a été consacré à l'étude de plantes antihypertensives et vasodilatatrices chez le rat.

L'objectif de cette thèse était d'apporter des arguments scientifiques et pharmacologiques permettant de valider et de développer l'usage traditionnel de plantes médicinales connues dans la pharmacopée marocaine pour leurs vertus thérapeutiques contre l'hypertension, plus précisément d'*Hibiscus rosa-sinensis*, *Euphorbia cheiradenia*, *Haloxylon Scoparium*, *Ammodaucus leucotrichus* et *Ammi visnaga*. Les extraits aqueux de ces espèces ont été étudiés *in vivo* pour leurs propriétés antihypertensives en utilisant des rats normaux et des rats hypertendus, et *in vitro* pour leurs activités vasodilatatrices basées sur l'étude de la contractilité vasculaire des anneaux aortiques isolés de rat. De même, les mécanismes responsables de ces dernières propriétés ont été déterminés par l'utilisation d'agents pharmacologiques standards.

Nos résultats ont montré que les extraits aqueux des fleurs d'*Hibiscus rosa-sinensis*, testés sur des rats normotendus et hypertendus, ont montré un effet antihypertenseur significatif. L'extrait aqueux d'*Hibiscus rosa-sinensis* a révélé une propriété antihypertensive chez les rats hypertendus à la dose de 100 mg/kg. En outre, l'extrait a induit une réponse de vasorelaxation significative dans les anneaux vasculaires de l'aorte de rat et sa capacité antihypertensive semble être au moins liée à la relaxation des vaisseaux sanguins via le blocage des canaux Ca^{2+} et la stimulation de l'ACE-2. Cependant, l'extrait aqueux des parties aériennes d'*Euphorbia cheiradenia* n'a eu aucun effet chez les rats normotendus mais a eu une activité remarquable chez les rats hypertendus à une dose de 100 mg/kg. De plus, cet extrait a eu un effet vasorelaxant qui a partiellement relaxé les anneaux aortiques en activant le canal KATP et en inhibant le canal bêta-adrénergique. Néanmoins, dans les aortes isolées de rat, l'extrait n'a eu aucun effet sur l'ACE-2. L'extrait aqueux des parties aériennes d'*Haloxylon scoparium* a révélé uniquement une activité antihypertensive importante, puisqu'il n'a eu aucun effet sur les rats normotendus, mais son activité a été remarquable chez les rats hypertendus à des doses de 60 et 100 mg/kg. En outre, cet

extrait possède des propriétés vasorelaxantes via le blocage des canaux Ca^{2+} . L'extrait aqueux du fruit d'*Ammodaucus leucotrichus* a montré une activité antihypertensive significative chez les rats hypertendus à des doses de 60 et 100 mg/kg. En outre, l'extrait aqueux de cette plante a induit une vasodilatation des vaisseaux sanguins via les voies de synthèse du NO-guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et des prostaglandines. De plus, l'extrait aqueux des parties aériennes d'*Ammi visnaga* a montré une activité antihypertensive significative chez les rats hypertendus à des doses de 70 et 140 mg/kg. Cependant, dans les aortes thoraciques isolées de rat, tous les médicaments utilisés dans notre étude n'étaient pas responsables de la voie de signalisation et n'avaient aucun effet sur la vasorelaxation induite par l'extrait.

Les résultats de la présente étude valident favorablement l'utilisation de ces espèces dans la médecine traditionnelle marocaine pour le traitement de l'hypertension dans l'attente de confirmation par des études phytochimiques, toxicologiques et cliniques.

Mots clés : Plantes médicinales, Hypertension, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Euphorbia cheiradenia*, *Haloxylon Scoparium* Pomel, *Ammodaucus leucotrichus*, *Ammi visnaga*, vasodilatation, canaux calciques, canaux KATP, récepteurs adrénergiques β , oxyde nitrique, sGC-cGMP, cyclooxygénase vasculaire, Enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (ECA-2).

Abstract

Hypertension is a chronic "silent" disease affecting more than one billion people worldwide. It is defined by a blood pressure value greater than or equal to 140 mmHg for systolic blood pressure and/or greater than or equal to 90 mmHg for diastolic blood pressure. It represents a major risk factor of cardiovascular disease and renal failure and it is a major cause of mortality. The development of effective antihypertensive drugs that take into account the unique characteristics of the world's populations is therefore of great importance for public health. Our work was devoted to the study of the antihypertensive and vasodilator activities of some medicinal plants in rat.

This thesis aimed to provide scientific and pharmacological arguments to validate and develop the traditional use of medicinal plants known in the Moroccan pharmacopeia for their therapeutic virtues against hypertension, specifically *Hibiscus rosa-sinensis*, *Euphorbia cheiradenia*, *Haloxylon Scoparium* Pomel, *Ammodaucus leucotrichus*, and *Ammi visnaga*. The aqueous extracts of these species were studied *in vivo* for their antihypertensive properties using normal and L-NAME-induced hypertensive rats, and *in vitro* for their vasorelaxant activities based on the study of aortic rings; likewise, the mechanisms responsible for the latter properties were determined through the use of standard pharmacological agents.

The results showed that the aqueous extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* flowers, tested on normotensive and hypertensive rats showed a significant antihypertensive effect. Aqueous extract of *Hibiscus rosa-sinensis* showed antihypertensive properties in hypertensive rats at the dose of 100 mg/kg. The extract induced a significant vasorelaxant response in rat aortic rings, and its antihypertensive ability was at least related to blood vessel relaxation via Ca^{2+} channel blockade and ACE-2 stimulation. However, the aqueous extract of the aerial parts of *Euphorbia cheiradenia* had no effect in normotensive rats but had remarkable activity in hypertensive rats at a dose of 100 mg/kg. Moreover, this extract had a vasorelaxant effect that partially relaxed the aortic rings by activating the KATP channel and inhibiting the beta-adrenergic channels. Nevertheless, in isolated rat aortas, the extract had no effect on ACE-2. The aqueous extract of the aerial parts of *Haloxylon scoparium* showed significant antihypertensive activity, and it had no effect in normotensive rats, but its activity was remarkable in hypertensive rats at the doses of 60 and 100 mg/kg. In addition, this extract possessed vasorelaxant properties via blocking Ca^{2+} channels. The aqueous extract of the fruits of *Ammodaucus leucotrichus* showed a significant antihypertensive activity in hypertensive rats at the doses of 60 and 100 mg/kg. In addition, this plant exhibited vasodilatation of blood vessels via the NO-cyclic guanosine monophosphate

(cGMP) and prostaglandin synthesis pathways. Thus, the aqueous extract of the aerial parts of *Ammi visnaga* showed significant antihypertensive activity in hypertensive rats at the doses of 70 and 140 mg/kg. Moreover, in isolated rat thoracic aortas, all the drugs used in the study were not responsible for the signaling pathway and had no effect on the vasorelaxation induced by the extract.

The results of the present study favorably validate the use of these species in Moroccan traditional medicine for the treatment of hypertension in an attempt to additional phytochemical, toxicological, and clinical studies.

Keywords: Medicinal plants, Hypertension, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Euphorbia cheiradenia*, *Haloxylon Scoparium* Pomel, *Ammodaucus leucotrichus*, *Ammi visnaga*, vasodilation, calcium channels, KATP channels, β -adrenergic receptors, nitric oxide, sGC-cGMP; vascular cyclooxygenase, Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2).

ملخص

يعد ارتفاع ضغط الدم حالة مرضية شائعة ومزمنة تصيب أكثر من مليار شخص حول العالم. وتُشخص الإصابة بارتفاع ضغط الدم عندما يتجاوز أو يساوي الضغط داخل الأوعية الدموية 140 ملم زئبق للضغط الانقباضي (أثناء انقباض القلب أو نبضه). و/ يتجاوز أو يساوي 90 ملم زئبق للضغط الانبساطي (فترة راحة القلب بين النبضات). إذ أن ارتفاع ضغط الدم يزيد من خطر الإصابة بأمراض القلب و يُعتبر عاملاً رئيسياً للوفاة الناتجة عن أمراض الكلى، فهو قاتل صامت، وهنا تكمن ضرورة تطوير أدوية تأخذ بعين الاعتبار أنماط العيش المختلفة لسكان العالم لما لذلك من تأثير على فعاليتها لمكافحة هذا المرض على اوسع نطاق ومنه الحفاظ على الصحة العامة، وفي هذا الصدد كرسنا أبحاثنا لدراسة بعض النباتات ضمن مراجع الصيدلة المغربية ذات مفعول مضاد لارتفاع ضغط الدم و تأثير على توسيع الأوعية الدموية.

الغاية من هذه الأطروحة هو تقديم ادلة علمية قائمة على اختبارات تدعم استخدام النباتات الطبية المعروفة في مراجع الصيدلة المغربية كخطمي وردي صيني (*Hibiscus rosa-sinensis*)، الفربيون شيرادنيا (*Euphorbia cheiradenia*) ، الكمون الصوفي (*Ammodaucus leucotrichus*) الرمث، (*Haloxylon Scoparium*) و خلة (*Ammi visnaga*) في الطب البديل نظرا لخصائصها العلاجية ضد ارتفاع ضغط الدم، وتم اختبار خصائص مضادات ارتفاع ضغط الدم لهذه النباتات باستعمال مستخلصاتها المائية، وذلك داخل اجسام جردان حية سليمة وجردان مصابة بارتفاع ضغط الدم، في حين جرت دراسة أنشطة توسع الاوعية الدموية في المختبر وذلك بناءا على انقبضات حلقات الشريان الابهر لهذه الجرذان.

من خلال نتائج اختبارات المستخلصات المائية لنباتات السالف ذكرها اظهر مستخلص نبات الخطمي وردي صيني ، المطبق على كل من الجرذان السليمة والجرذان المصابة بارتفاع ضغط الدم تأثيراً مضاداً ملحوظاً في خفض ضغط الدم بجرعة 100 ملغ/كغ لدى عينة الجرذان المصابة بارتفاع ضغط الدم علاوة على ذلك، أدى المستخلص إلى ارتخاء في الاوعية الدموية لحلقات الشريان الأبهر للجرذان، ومنه نستنتج ان قدرة هذا الأخير على خفض ضغط الدم مرتبطة بحجب قنوات الكالسيوم وتحفيز الانزيم المحول للأنجيوتنسين 2. (ACE-2) اما المستخلص المائي لنبات الفربيون شيرادنيا فلم يكن له اي تأثير على الجرذان السليمة بينما أظهر مفعولا بجرعة 100 ملغ/كغ على الفئران المصابة بارتفاع ضغط الدم وساعد ايضا على ارتخاء الاوعية من خلال تنشيط قناة KATP وتنشيط قناة بيتا-أدرينرجيك. وعلى غرار مستخلص الفربيون شيرادنيا لم ياثّر مستخلص الفربيون شيرادنيا على الجرذان السليمة لكن كان له تأثير مباشر في خفض ضغط دم الفئران المصابة بجرعات 60 و 100 ملغ/كغ حيث ان هذا الأخير يتميز بخصائص مرخية للأوعية الدموية وذلك بحجب قنوات الكالسيوم. في حين اظهر المستخلص المائي لثمرة الكمون الصوفي نشاطاً ملحوظاً مضاداً لارتفاع ضغط الدم عند الفئران المصابة بجرعات 60 و 100 ملغ/كغ. وأدى هذا المستخلص المائي لهذا النبات الى توسع في الأوعية الدموية عبر توليف أكسيد النيتريك (NO) وثنائي فوسفات غوانوزين السايكلي (GMPc) والبروستاغلاندينات. وقدم أيضا المستخلص المائي لنبات خلة مفعولا جيدا في خفض ضغط دم بجرعة تبلغ 70 و 140 ملغ/كغ. وتجدر الإشارة الى ان جميع الادوية المستعملة داخل حلقات الشرايين الابهرية للفئران ليس لها أي تأثير على الميكانيزمات

على ضوء هذه النتائج، نخلص الى ان استخدام هذه الأنواع من النباتات في الطب المغربي التقليدي لعلاج ارتفاع ضغط الدم سيكون له تأثير إيجابي. إذ يجب تعزيز هذه النتائج باختبارات فيتوكيميائية، سمية وسريرية.

الكلمات المفتاحية: النباتات الطبية، ارتفاع ضغط الدم، خطمي وردي صيني، الفربيون شيرادنيا، الكمون الصوفي، و الرمث، و خلة، توسع الأوعية الدموية، قنوات الكالسيوم، مستقبلات الأدرينالية، أكسيد النيتريك، انزيمات الأكسدة الحلقية الأوعية الدموية، الإنزيم المحول للأنجيوتنسين2 .

Financement

- Recherches menées avec le concours de l'Académie Hassan II des Sciences et Techniques.**
- Ce travail a été également financé par le CNRST sous contrat N° PPR/2015/35.**

Liste des publications

Cette thèse a abouti à la publication de plusieurs articles scientifiques dans des revues internationales et des communications orales et affichées dans des congrès nationaux et internationaux.

Articles :

Articles inclus dans ce mémoire de thèse :

- 1) **Smail Amtaghri**, Ayoub Amssayef, Miloudia Slaoui, and Mohamed Eddouks. (2022). Antihypertensive and Vasorelaxant Effects of *Hibiscus rosa-sinensis* through Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2), and Ca^{2+} Channels Pathways. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*, 22(1), 27-37.
- 2) **Smail Amtaghri**, Ayoub Amssayef, Miloudia Slaoui, and Mohamed Eddouks. (2023). Antihypertensive Effect of *Euphorbia cheiradenia* in Rats. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 21(3), 213-222
- 3) **Smail Amtaghri** and Mohamed Eddouks. (2022). Study of the Antihypertensive and Vasorelaxant Activities of *Haloxylon scoparium* in Rats. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 21(2), 139-153.
- 4) **Smail Amtaghri**, Miloudia Slaoui, and Mohamed Eddouks. (2023). *Ammodaucus leucotrichus* acts as an antihypertensive and vasorelaxant agent through sGC and prostaglandin synthesis pathways. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 21(3), 177-192.
- 5) **Smail Amtaghri**, Miloudia Slaoui, and Mohamed Eddouks. (2023). Potential Antihypertensive Activity of the Aqueous Extract of *Ammi visnaga* and its Effect on ACE-2 in Rats, *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*, **Accepté**.

Articles non inclus dans ce mémoire de thèse :

- 1) **Smail Amtaghri**, Mourad Akdad, Miloudia Slaoui, and Mohamed Eddouks. (2022). Traditional Uses, Pharmacological, and Phytochemical Studies of *Euphorbia*: A Review. *Curr Top Med Chem*, 22(19), 1553-1570.
- 2) **Smail Amtaghri**, Omar Farid, Nadia Lahrach, Miloudia Slaoui, Mohamed Eddouks. (2022). Antihyperglycemic effect of *Rhamnus alaternus* L. Aqueous extract in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 22, 245–255.
- 3) Fadwa, E.O., **Smail Amtaghri**, Mourad Akdad, Ahmed El-Haidani, and Mohamed Eddouks. (2022). Effect of *Pelargonium graveolens* on glucose metabolism in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*, 22(1), 18-26.
- 4) **Smail Amtaghri**, & Mohamed Eddouks. (2023). Ethnopharmacology, Nutritional Value, Therapeutic Effects, Phytochemistry, and Toxicology of *Salvia hispanica* L.: A Review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 23(28), 2621-2639.
- 5) **Smail Amtaghri**, Adil Qabouche, Miloudia Slaoui, & Mohamed Eddouks. (2023). Antidiabetic Effect of Star Anise (*Illicium verum*) in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders)*, 23(2), 92-98.

Liste des communications

➤ **Communications orales :**

- 1) **Smail Amtaghri**, Ayoub Amssayef, Miloudia Slaoui, and Mohamed Eddouks. Effect of *Euphorbia cheradenia* on vascular contractility and angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) of the isolated thoracic rat aorta. I^{er} Symposium International; Pharmacologie, Phytothérapie et Phytochimie des Plantes Aromatiques et Médicinales. 27-28 Juillet **2021**, EST Khénifra.
- 2) **Smail Amtaghri**, Ayoub Amssayef, Miloudia Slaoui, and Mohamed Eddouks. Antihypertensive activity of *Euphorbia cheiradenia* and effect on angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) on the isolated thoracic rat aorta. International Congress of Industry, Environment, and Health, 5-7 October **2021**, FST Mohamedia.
- 3) **Smail Amtaghri**, Ayoub Amssayef, Miloudia Slaoui, and Mohamed Eddouks. Antihypertensive activity of *Hibiscus rosa-sinensis* and Effect on Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE2) in the Isolated Thoracic Rat Aorta. The 2nd International Congress on Pure and Applied Science. 6-10 June **2022**. FS Meknes.
- 4) **Smail Amtaghri**, Miloudia Slaoui and Mohamed Eddouks. *Ammodaucus leucotrichus* fruit aqueous extract acts as an antihypertensive and vasorelaxant agent mediated by blockage of the sGC-cGMP pathway and inhibition of prostaglandin synthesis on vascular tone. *In vivo* and *in vitro* assessments. The international Congress- VARENA 2022- the role of scientific research in the new model of Development. 30-2 Juillet **2022**. FS Rabat.
- 5) **Smail Amtaghri**, Miloudia Slaoui, and Mohamed Eddouks. Antihypertensive and Vasorelaxant Effects of *Hibiscus rosa-sinensis* through Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2), and Ca²⁺ channels Pathways. The Third Edition of the International Congress of Industry, Environment, and Health, 6-8 October **2022**, ISPITS Casablanca.
- 6) **Smail Amtaghri**, Miloudia Slaoui, and Mohamed Eddouks. Study of the Antihypertensive and Vasorelaxant Activities of *Haloxylon Scoparium* in Rats. II^{ème} Symposium International « Pharmacologie, Phytothérapie et Phytochimie des Plantes Aromatiques et Médicinales ». 29 et 30 Décembre **2022**, EST Khénifra.

➤ **Communications affichées**

- 1) **Smail Amtaghri**, Mourad Akdad, Ismail Bouadid, Ayoub Amssayef, Meriem Slaoui, and Mohamed Eddouks. Effect of *Euphorbia cheradenia* on vascular contractility and angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) in the isolated thoracic rat aorta. La recherche scientifique: nouveaux défis et pistes d'innovation. 27-29 Mai **2021**, FST Errachidia.

Liste des abréviations

A. leucotrichus: *Ammodaucus leucotrichus*

A. Visnaga: *Ammi visnaga*

ACE: Angiotensin Converting Enzyme

ACE-2: Enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (Angiotensin converting enzyme-2)

Ach: Acétylcholine

ACS: *Acute Coronary Syndrome*

ADH: *Antidiuretic Hormone*

AEAL: Extrait aqueux de fruits d'*Ammodaucus leucotrichus*

AEAV: Extrait aqueux d'*Ammi visnaga*

AEEC: Extrait aqueux d'*Euphorbia cheiradenia*

AEHRS: Extrait aqueux d'*Hibiscus rosa-sinensis*

AEHS: Extrait aqueux d'*Haloxylon scoparium*

AMP: Adénosine monophosphate

Ang (1-7) : Angiotensine (1-7)

Ang (1-9): Angiotensine (1-9)

Ang I: Angiotensine I

Ang II: Angiotensine II

AP: Pression artérielle

ARA: Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine

AT1-R: Récepteur de l'angiotensine II de type I

AT2-R: Récepteur de l'angiotensine II de type II

B-AR: β adrenergic

BMI: Indice de masse corporelle

Bpm: Battements par minute

BW: Poids corporel

Ca²⁺: Calcium

cAMP: Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique

CE50: Concentration effective à demi-maximum

CEI: Inhibiteur de l'enzyme de conversion

cGMP: Guanosine monophosphate cyclique

cGMP: NO-guanosine monophosphate

CI: Inhibiteur calcique

Covid19: Coronavirus 2019

COX: Cyclooxygenase

CVA: Accident vasculaire cérébral

CVD: Maladies cardiovasculaires

DBP: Pression artérielle diastolique (Diastolic blood pressure)

DHP: Dihydropyridines

E. cheiradenia: *Euphorbia cheiradenia*

H. rosa-sinensis: *Hibiscus rosa-sinensis*

H. Scoparium: *Haloxylon scoparium*

HBP: Hypertension artérielle

HR: Fréquence cardiaque

IC50: Concentration d'inhibition 50

IC50: Concentration inhibitrice 50

JNC: Comité National Conjoint

K⁺ ATP channel: Canal potassique sensible à l'ATP

KCl: Potassium chloride

L-Name: L-NG nitroarginine méthyl ester

MB: Bleu de méthylène

MBP: Pression artérielle moyenne (Mean blood pressure)

NE: Norepinephrine

NO: Nitric oxide

NO: Nitrique oxide

Nos : Nitrique oxide synthase

NOS: Nitric oxide synthase

NSAI: Anti-inflammatoire non stéroïdien

PG: Prostaglandine

PGI₂: Prostaglandin I₂

R_{max}: Relaxation maximale

RNA: Acide ribonucléique

SARS-COV-2: coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère

SBP: Pression artérielle systolique (Systolic blood pressure)

SEM: Erreur standard de la moyenne

sGC: Guanylate cyclase soluble

SMC: les cellules musculaires lisses

SRAA: Système rénine angiotensine aldostérone

TPA: Adénosine triphosphate

VSMC: Cellules du muscle lisse vasculaire

Liste des figures

Chapitre I :

I. Etat des connaissances

Figure 1 : Coupe longitudinale du cœur : vue antérieure interne.....	<u>4</u>
Figure 2 : Structure d'une artère, comprenant les l'adventice, la média et l'intima, trois tuniques concentriques.....	<u>6</u>
Figure 3 : Prévalence de l'hypertension chez les adultes (≥ 25 ans) par genre dans certains pays.....	<u>10</u>
Figure 4 : Puissance approximative des divers mécanismes de contrôle de la pression artérielle, en fonction du temps écoulé depuis le début du stimulus perturbant la pression artérielle.....	<u>11</u>
Figure 5 : Voies de fonctionnement de l'arc baroréflexe. Ach : acétylcholine ; NA : noradrénaline.....	<u>13</u>
Figure 6 : Localisation schématique des sites chimiorécepteurs centraux et périphériques	<u>14</u>
Figure 7 : Schéma représentant le rôle du système rénine-angiotensine-aldostérone dans la régulation de la pression artérielle.	<u>16</u>
Figure 8 : Schéma représentant le mécanisme d'action du tabac sur les artères coronaires : spasme et thrombose.	<u>22</u>
Figure 9 : Schéma représentant les mécanismes de l'hypertension induite par l'alcool.	<u>23</u>
Figure 10 : Association des classes thérapeutiques favorisant la baisse tensionnelle.	<u>30</u>
Figure 11 : Schéma de présentation générale des médicaments antihypertenseurs.	<u>30</u>

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

Figure 12 : Caractéristiques botaniques des plantes médicinales étudiées.	<u>41</u>
Figure 13 : Préparation de l'extrait aqueux des plantes étudiées.	<u>41</u>
Figure 14 : Rats albinos Wistar utilisés pour l'étude.	<u>42</u>
Figure 15 : Appareil de mesure de la pression artérielle : moniteur de pression artérielle à queue (rat).	<u>47</u>
Figure 16 : Schéma représentatif du protocole expérimental pour l'étude <i>in vitro</i>	<u>49</u>

Chapitre III :

Article 1

Figure 1: Effect of repeated oral administration of AEHRS (100 mg/kg) on body weight (g) in anesthetized normal (A) and L-NAME-induced hypertensive (B) rats.	<u>68</u>
Figure 2: Effect of AEHRS on EP or KCl-induced contraction in aortic rings. Cumulative dose-dependent curves for AEHRS-induced relaxation and of the vehicle (distilled water) in rat aortic rings.	<u>69</u>
Figure 3: Representative tracings illustrating the vasorelaxant effect of AEHRS and acetylcholine (ACh) (10^{-5} M) on rat aortic rings, pre-contracted with EP (10^{-5} M). (A): vasorelaxation effect induced by Ach (10^{-5} M) (30% of relaxation), (B): vasorelaxant effect induced by AEHRS. EP 10^{-5} M (87.5% of relaxation): addition of epinephrine, ACh: addition of acetylcholine, 1 to 4: addition of different doses of AEHRS (125, 300, 600, and 1000 μ g/ml	<u>70</u>

respectively).	
Figure 4: Effect of AEHRS on tension in EP (10 μ M) pre-contracted aortic rings with endothelium (E+) or without endothelium (E-). Tension (%) indicates the percentage of EP-induced contraction.	70
Figure 5: Effect of MLN-4760 (specific inhibitor of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2)) drug incubation on AEHRS-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHRS in the absence (black) or presence (gray) of standard drugs.....	71
Figure 6: Effect of different drugs incubation on AEHRS-induced relaxation after EP-induced contraction in aortic rings. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHRS in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) L-NAME, (B) Indomethacin.....	72
Figure 7: Effect of propranolol (A) and glibenclamide (B) incubation on AEHRS-induced vasorelaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHRS in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs.....	73
Figure 8: Effect of methylene blue (A) and nifedipine (B) drugs incubation on AEHRS-induced vasorelaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHRS in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs.	74
Figure 9: Graphical abstract illustrating the simplified representation of the mechanical process of bioactive compounds of AEHRS through the blockade of Ca ²⁺ calcium channels in rat thoracic aortic smooth muscle.	75

Chapitre IV:

Article 2

Figure 1: Effect of AEEC extract (190 to 1330 μ g/mL) on vasorelaxation of aortic rings. Cumulative dose-dependent curves for AEEC-induced relaxation and of the vehicle (distillated water) in rat aortic rings pre-contracted with Norepinephrine (10 μ M). n=6. **p<0.01; ****p<0.0001.	93
Figure 2: Effect of AEEC on vasorelaxation in EP (10 μ M) pre-contracted aortic rings with endothelium (E+) or without endothelium (E-). Tension (%) indicates the percentage of EP-induced contraction. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM.	94
Figure 3: Effect of pre-incubation of aortic ring in the presence of propranolol and glibenclamide on AEEC-induced relaxation. The aortic rings were incubated with cumulative doses of AEEC in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) propranolol, (B) glibenclamide. Data represent mean $\pm$ SEM (n=6; for AEEC <i>versus</i> drug plus AEEC). *p<0.05; **p<0.01.....	95
Figure 4: Effect of pre-incubation of aortic ring in the presence of L-Name and indomethacin on AEEC-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEEC in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) L-NAME, (B) indomethacin, Data represent mean $\pm$ SEM (n=6) for AEEC <i>versus</i> drug plus AEEC..	96
Figure 5: Effect of pre-incubation of aortic ring in the presence of methylene blue and nifedipine on AEEC-induced relaxation. The aortic rings were incubated with cumulative	97

doses of AEHC in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) methylene blue, (B) nifedipine. Data represent mean $\pm$ SEM (n=6; for AEHC versus drug plus AEHC).....

Figure 6: Effect of pre-incubation with AEHC (10 μ g/ml) on diminazene-induced relaxation in aortic rings. DIZE: Represents the vasorelaxation effect induced by DIZE 6.10⁻⁵ M in aortic rings pre-contracted with EP (10⁻⁵ M). **98**

Figure 7: Schematic illustration of the mechanisms of action involved in the vasorelaxant effect of *Euphorbia cheiradenia*. BK_{Ca}: Ca²⁺-activated K⁺ channels ; Kv : voltage-dependent K⁺ channels ; K_{ATP}: ATP-sensitive K⁺ channels ; Kir : inward rectifier K⁺ channels ; PKA : protein kinase A ; PKG : protein kinase G..... **99**

Chapitre V:

Article 3

Figure 1: Effect of repeated oral administration of AEHS (60 mg/kg) on body weight (g) in anesthetized normal (a) and L-NAME-induced hypertensive (b) rats..... **117**

Figure 2: Effect of repeated oral administration of AEHS (100 mg/kg) on body weight (g) in anesthetized normal (c) and L-NAME-induced hypertensive (d) rats..... **118**

Figure 3: Representative tracings illustrating the relaxation response produced by the application of AEHS on epinephrine and KCl-precontracted rat aortic rings. AEHS produced a dose-dependent vasorelaxant response in epinephrine-precontracted rat aortic rings (A); EP: addition of epinephrine, 1 to 4: addition to different doses of AEHS (375-1250 μ g/ml), 5: Wash and KCl precontracted rat aortic rings (B); 1: addition of KCl, 1 to 4: addition to different doses of AEHS (375-1250 μ g/ml) and Wash..... **119**

Figure 4: Effect of AEHS extract on EP or KCl-induced contraction in aortic rings. Cumulative dose-dependent curves for AEHS-induced relaxation and of the vehicle (distilled water) in rat aortic rings..... **120**

Fig. 5. Effect of MLN-4760 (inhibitor specific of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2)) drug incubation on AEHS-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHS in the absence (circles) or presence (squares) of standard drugs. Data represent mean $\pm$ SEM (n=6; for AEHS versus drug plus AEHS)..... **121**

Figure 6: Effect of different drugs incubation on AEHS- relaxation of EP-induced contraction in aortic rings. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHS in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) L-NAME, (B) Indomethacin..... **122**

Figure 7: Effect of Propanolol (A) and Glibenclamide (B) incubation on AEHS-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHS in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs..... **123**

Figure 8: Effect of Methylene blue (A) and Nifedipine (B) drugs incubation on AEHS-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHS in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs..... **124**

Chapitre VI:

Article 4

- Figure 1:** Effect of repeated oral administration of ALAE (60 mg/kg) on body weight (g) in normal (a) and L-NAME-induced hypertensive (b) rats. Data are expressed means $\pm$ SEM, n=6..... **146**
- Figure 2:** Effect of repeated oral administration of ALAE (100 mg/kg) on body weight (g) in normal (c) and L-NAME-induced hypertensive (d) rats. Data are expressed means $\pm$ SEM, n=6.*p<0.05..... **147**
- Figure 3:** Representative tracings illustrating the relaxation response produced by the application of ALAE on epinephrine and KCl-precontracted rat aortic rings. ALAE produced a dose-dependent vasorelaxant response in epinephrine-precontracted rat aortic rings (A); EP: addition of epinephrine, 1 to 4: addition to different doses of ALAE (0.250, 0.750, 1.250 and 1.625 mg/ml), Wash and KCl precontracted rat aortic rings (B); addition of KCl, 1 to 4: addition to different doses of ALAE (0.250-1.625 mg/ml) and Wash..... **148**
- Figure 4:** Effect of ALAE fruits on EP or KCl-induced contraction in aortic rings. Cumulative dose-dependent curves for ALAE-induced relaxation and of the vehicle (distillated water) in rat aortic rings. n = 6. A: pre-contraction with epinephrine (10 μ M); B: pre-contraction KCl (80 mM). *p<0.05, ****p<0.0001..... **149**
- Figure 5:** Effect of MLN-4760 (specific inhibitor of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2)) drug incubation on ALAE-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of ALAE in the absence (circles) or presence (squares) of standard drugs..... **150**
- Figure 6:** Effect of different drugs incubation on ALAE- relaxation of EP-induced contraction in aortic rings. Aortic rings were incubated with cumulative doses of ALAE in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) L-NAME, (B) Indomethacin..... **151**
- Figure 7:** Effect of Glibenclamide (A) and Propanolol (B) drugs incubation on ALAE-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of ALAE in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs..... **152**
- Figure 8:** Effect of Methylene blue (A) and Nifedipine (B) drugs incubation on ALAE-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of ALAE in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs..... **153**
- Figure 9:** Graphical abstract illustrating the simplified schematic representation of the mechanical process of AEAL bioactive compounds through the sGC and prostaglandin synthesis pathways in rat thoracic aortic smooth muscle..... **154**

Chapitre VII:

Article 5

- Fig. 1.** Effect of repeated oral administration of AVAE (70 mg/kg) on body weight (g) in anesthetized normal (a) and L-NAME-induced hypertensive (b) rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=6..... **170**
- Fig. 2.** Effect of repeated oral administration of AVAE (140 mg/kg) on body weight (g) in anesthetized normal (c) and L-NAME-induced hypertensive (d) rats. Data are expressed as

means $\pm$ SEM, n=6.*p<0.05.....	
Fig. 3. Representative tracings illustrating the relaxation response produced by the application of AVAE on epinephrine and KCl-precontracted rat aortic rings. AVAE produced a dose-dependent vasorelaxant response in epinephrine-precontracted rat aortic rings (A); EP: addition of epinephrine, 1 to 4; addition to different doses of AVAE (0.375, 0.875, 1.250 and 1.375 mg/ml), Wash and KCl precontracted rat aortic rings (B); addition of KCl, 1 to 4; addition to different doses of AVAE (0.375-1.375 mg/ml) and Wash.....	<u>172</u>
Fig. 4. Effect of AVAE on EP or KCl-induced contraction in aortic rings. A: pre-contraction with epinephrine (10 μ M); B: pre-contraction KCl (80 mM).....	<u>173</u>
Fig. 5. Effect of MLN-4760 (specific inhibitor of Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2)) drug incubation on AVAE-induced relaxation.....	<u>174</u>
Fig. 6. Effect of different drugs incubation on AVAE- relaxation of EP-induced contraction in aortic rings. (A) L-NAME, (B) Indomethacin.....	<u>175</u>
Fig. 7. Effect of glibenclamide (A) and propranolol (B) drugs incubation on AVAE-induced relaxation.....	<u>176</u>
Fig. 8. Effect of methylene blue (A) and nifedipine (B) drugs incubation on AVAE-induced relaxation.....	<u>177</u>
Fig. 9. Effect of Atropine (a competitive inhibitor of muscarinic cholinergic receptors) drug incubation on AVAE-induced relaxation.	<u>178</u>

Liste des Tableaux

Chapitre I : Etat des connaissances

Tableau 1 : Classification basée sur le niveau de pression clinique.....	<u>8</u>
Tableau 2 : Autres définitions. Comparaison entre l'hypertension systolique et diastolique.....	<u>9</u>
Tableau 3 : Réduction de la PAS lors des modifications du style de vie selon l'AHA/ACC/CDC.....	<u>28</u>

Chapitre III :

Article 1

Table 1: Effect of a single oral administration of aqueous <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> extract (100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n = 6. *p<0.05, **p<0.01.....	<u>66</u>
Table 2: Effect of repeated oral administration of aqueous <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> extract (100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n = 6, **p<0.01, ****p<0.0001.....	<u>67</u>

Chapitre IV:

Article 2

Table 1: Effect of a single oral administration of <i>Euphorbia cheradina</i> (100 mg/kg b.w) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in anesthetized normal and L-NAME-induced hypertensive rats.....	<u>90</u>
Table 2: Effect of repeated oral administration of <i>Euphorbia cheiradenia</i> (100 mg/kg) on (I) systolic, (II) mean, (II) diastolic arterial blood pressure (mm Hg) in anesthetized normal and L-NAME-induced hypertensive rats.....	<u>91</u>

Chapitre V:

Article 3

Table 1: Effect of a single oral administration of AEHS (60 and 100 mg/kg b.w) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in anesthetized normal and L-NAME-induced hypertensive rats.....	<u>114</u>
Table 2: Effect of repeated oral administration of AEHS (60 and 100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in anesthetized normal and L-NAME-induced hypertensive rats.....	<u>115</u>

Chapitre VI:

Article 4

Table 1: Effect of a single oral administration of ALAE (60 and 100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in normal and L-NAME-induced hypertensive rats.....	<u>143</u>
---	-------------------

Table 2: Effect of repeated oral administration of ALAE (60 and 100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bmp) in normal and L-NAME-induced hypertensive rats.....	<u>144</u>
---	-------------------

Chapitre VII :

Article 5

Table 1: Effect of AVAE (70 and 140 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bmp) over 6 hours.	<u>167</u>
--	-------------------

Table 2: Effect of AVAE (70 and 140 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bmp) over seven days.....	<u>168</u>
--	-------------------

SOMMAIRE

Dédicace.....	xiv	x
Remerciements.....	iv	xx
Résumé.....	xiv	x
Abstract.....	iv	xx
ملخص.....	xxiv	
Financement.....	xiv	x
	Liste des	
publications.....		xxiv
	Liste des	
communications.....		xxiv
	Liste des	
abréviations.....		xxiv
	Liste des	
figures.....		xxiv
	Liste des	
tableaux.....		xxiv
Introduction générale.....		1
Chapitre I. Revue de la littérature.....		3
I. Etat des connaissances.....		4
1. Généralités sur l'hypertension artérielle.....		4
1.1 Généralités sur le système cardiovasculaire.....		4
1.1.1 Structure et histologie du système artériel.....		5
2. Définition, épidémiologie et causes de l'hypertension artérielle.....		7
3. Les mécanismes de régulation de la pression artérielle et de développement de l'hypertension.....		11
3.1. Mécanismes régulateurs à court terme.....		11
3.2. Mécanismes régulateurs à moyen terme.....		15
3.3. Mécanismes régulateurs à long terme.....		15
4. Physiopathologie de l'hypertension artérielle.....		17
4.1. L'hypertension artérielle essentielle.....		17
4.2. L'hypertension artérielle secondaire.....		17
4.3. L'hypertension artérielle gravidique.....		19
4.4. Facteurs relatifs au risque d'hypertension.....		19
4.4.1. Facteurs de risque modifiables.....		19
4.4.2. Facteurs de risque non modifiables.....		25
4.5. Symptomatologie associée à l'hypertension.....		26
5. Prévention et traitement de l'hypertension.....		26
5.1. Modalités de traitement non pharmacologique dites « hygiéno-diététiques ».....		27
5.2. Approches thérapeutiques médicamenteuses.....		28

5.3. Un modèle animal expérimental d'hypertension : Rat hypertendu au L-NAME.....	34
5.4. Phytothérapie.....	35
Chapitre II. Matériel & Méthodes.....	37
I. Matériel et Méthodes	38
1. Choix des plantes médicinales étudiées.....	38
1.1. Données bibliographiques de l' <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	38
1.2. Données bibliographiques de l' <i>Euphorbia cheiradenia</i>	38
1.3. Données bibliographiques de l' <i>Haloxylon scoparium</i>	39
1.4. Données bibliographiques de l' <i>Ammodaucus leucotrichus</i>	39
1.5. Données bibliographiques de l' <i>Ammi visnaga</i>	40
2. Matériel végétal et préparation de l'extrait aqueux.....	40
3. Animaux expérimentaux.....	42
4. Les réactifs chimiques et médicaments.....	42
5. Protocole expérimental.....	45
5.1. Activité hypotensive.....	45
5.2. Activité vasorelaxante.....	47
6. Analyses statistiques.....	49
Chapitre III: Antihypertensive and Vasorelaxant Effects of <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> through Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2), and Ca²⁺ Channels Pathways.....	51
1. Introduction.....	54
2. Material and methods.....	55
3. Results.....	56
4. Discussion.....	58
5. Conclusion.....	61
Chapitre IV: Antihypertensive Effect of <i>Euphorbia cheiradenia</i> in Rats.....	77
1. Introduction.....	80
2. Material and methods.....	80
3. Results.....	83
4. Discussion.....	86
5. Conclusion.....	87
Chapitre V: Study of the antihypertensive and vasorelaxant activities of <i>Haloxylon scoparium</i> in rats.....	101
1. Introduction.....	104
2. Material and methods.....	104
3. Results.....	107
4. Discussion.....	110
5. Conclusion.....	111

Chapitre VI: <i>Ammodaucus leucotrichus</i> acts as an antihypertensive and vasorelaxant agent through sGC and prostaglandin synthesis pathways.....	126
1. Introduction.....	129
2. Material and methods.....	129
3. Results.....	132
4. Discussion.....	136
5. Conclusion.....	138
Chapitre VII: Potential Antihypertensive Activity of the Aqueous Extract of <i>Ammi visnaga</i> and its Effect on ACE-2 in Rats.....	156
1. Introduction.....	159
2. Material and methods.....	159
3. Results.....	160
4. Discussion.....	162
5. Conclusion.....	163
Conclusion générale et perspectives.....	180
Références bibliographiques.....	182

Introduction générale

Le Maroc possède une biodiversité extrêmement impressionnante en raison de sa situation géographique unique et son climat. Ces circonstances offrent pour le Maroc l'environnement idéal pour le développement d'une couverture floristique riche et diversifiée. En effet, le Maroc se distingue par une grande variété de plantes vasculaires, avec plus de 4200 espèces et sous-espèces et 600 espèces fréquemment utilisées en médecine traditionnelle [1, 2]. Toutes ces particularités se traduisent par un merveilleux arsenal de plantes médicinales qui caractérisent cette région et dont une grande variété est utilisée par la communauté locale pour soigner diverses maladies cardiovasculaires, dont l'hypertension artérielle [3]. Elle représente en effet un problème majeur de santé humaine aux échelles régionale et mondiale, car cet état constitue un important facteur de risque de maladies cardiovasculaires et d'insuffisance rénale, tout en représentant l'une des principales causes de décès dans le monde entier [4]. Compte tenu des limites des traitements modernes dans la prise en charge de cette maladie, les méthodes médicinales alternatives, telles que la médication traditionnelle marocaine, doivent être prises en considération. Par conséquent, de nombreux scientifiques se sont orientés à l'ethnopharmacologie pour découvrir de nouveaux produits actifs naturels dans des domaines très variés, dont la médecine cardiovasculaire [5]. Afin de fournir une base scientifique valable pour l'utilisation médicinale de ces plantes, les études se sont concentrées sur les effets bénéfiques des plantes médicinales. La validation des effets antihypertenseurs des plantes médicinales et la compréhension des mécanismes impliqués permettraient l'identification de nouvelles cibles et molécules pour le développement d'un traitement antihypertenseur efficace.

L'objectif de cette thèse était de présenter des preuves scientifiques pour justifier l'usage traditionnel de plusieurs plantes antihypertensives de la pharmacopée marocaine, notamment celles de la région de Darâa-Tafilalet. D'une part, on visait à révéler les qualités pharmacologiques des extraits aqueux de plantes médicinales marocaines ainsi que leurs mécanismes d'action associés. Compte tenu de l'importance de la régulation du tonus vasculaire dans l'efficacité des médicaments antihypertenseurs, nous avons voulu étudier les propriétés antihypertensives *in vivo* et d'établir l'activité vasodilatatrice *in vitro* des différents extraits aqueux dans le modèle animal du rat Wistar (anneau aortique). Ce modèle est très utilisé en pharmacologie expérimentale du fait de sa facilité et de sa rapidité d'exécution, de l'abondance de la littérature le concernant et des informations intéressantes obtenues sur la fonction vasculaire que ce soit au niveau de l'endothélium ou des muscles lisses.

Un screening préliminaire a été effectué afin de tester l'effet vasodilatateur des extraits aqueux des différentes plantes antihypertensives envisagées, y compris *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Euphorbia cheiradenia* L., *Haloxylon Scoparium* Pomel, *Ammodaucus leucotrichus* L., et *Ammi visnaga* L.

L'activité antihypertensive des extraits aqueux des fleurs d'*Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae), d'*Euphorbia cheiradenia* (Euphorbiaceae), des parties aériennes de *Haloxylon Scoparium* Pomel (Chenopodiaceae), des fruits de *Ammodaucus leucotrichus* (Apiaceae) et des parties aériennes de *Ammi visnaga* (Apiaceae) n'a jamais été scientifiquement explorée, par conséquent, ces extraits ont été sélectionnés pour une étude expérimentale afin de valider leurs activités antihypertensives *in vivo* et pour évaluer leur action vasodilatatrice *in vitro*. Ces extraits aqueux ont servi de point de départ à notre recherche de thèse, qui comprend des études pharmacologiques. Enfin, les données expérimentales seront examinées dans un contexte plus large dans le cadre d'une discussion générale et d'une conclusion qui concluront cette thèse.

Ce travail a été rédigé selon la méthode de la "thèse par articles". Il est composé de sept parties organisées autour de sept chapitres :

- **Le Chapitre I :** consacré pour la partie bibliographique et englobe une introduction générale, les généralités sur le système cardiovasculaire, les mécanismes de régulation de la pression artérielle, l'épidémiologie de l'hypertension artérielle, la physiopathologie de l'hypertension artérielle et le traitement pharmacologique et non pharmacologique de l'hypertension.
- **Chapitre II :** présentant le choix des plantes médicinales étudiées. Les techniques et méthodes utilisées pour les différentes études sont également présentées.
- **Chapitre III :** présentant l'effet antihypertenseur et vasorelaxant d'*Hibiscus rosa-sinensis* L. De plus, son action sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE-2) dans des aortes de rats isolées a été démontrée.
- **Chapitre IV :** présentant l'activité antihypertensive et vasorelaxante d'*Euphorbia cheiradenia* L. En outre, l'effet d'*Euphorbia cheiradenia* sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (ECA-2) dans des aortes de rats isolées a été mis en évidence.
- **Chapitre V :** présentant l'effet antihypertenseur *in vivo* d'*Haloxylon scoparium* L., ainsi que son activité vasorelaxante *in vitro*.
- **Chapitre VI :** présentant les propriétés antihypertensives et vasorelaxantes d'*Ammodaucus leucotrichus*.
- **Chapitre VII :** présentant les propriétés antihypertensives et vasorelaxantes d'*Ammi visnaga*. Finalement, la conclusion générale et les perspectives sont présentées.

Chapitre I.

Revue de la littérature

I. Etat des connaissances

1. Généralités sur l'hypertension artérielle

1.1. Généralités sur le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire a pour fonction principale de transporter le sang dans tout l'organisme afin d'apporter des nutriments aux organes, aux tissus et aux cellules, et d'éliminer les déchets du métabolisme cellulaire. Il est constitué du cœur, point central de la circulation sanguine, et des vaisseaux sanguins (artères, veines, artérioles et veinules) qui servent de conduits pour le passage du sang et sont reliés à diverses structures de type et de taille variables qui assurent cette fonction. Le sang des organes est collecté par la veine cave supérieure et la veine cave inférieure pour le cœur droit. Au niveau du ventricule droit, le sang est éjecté dans la circulation pulmonaire, puis retourne au cœur gauche, d'où il est éjecté dans la circulation systémique [6]. La **Figure 1** représente le schéma du cœur.

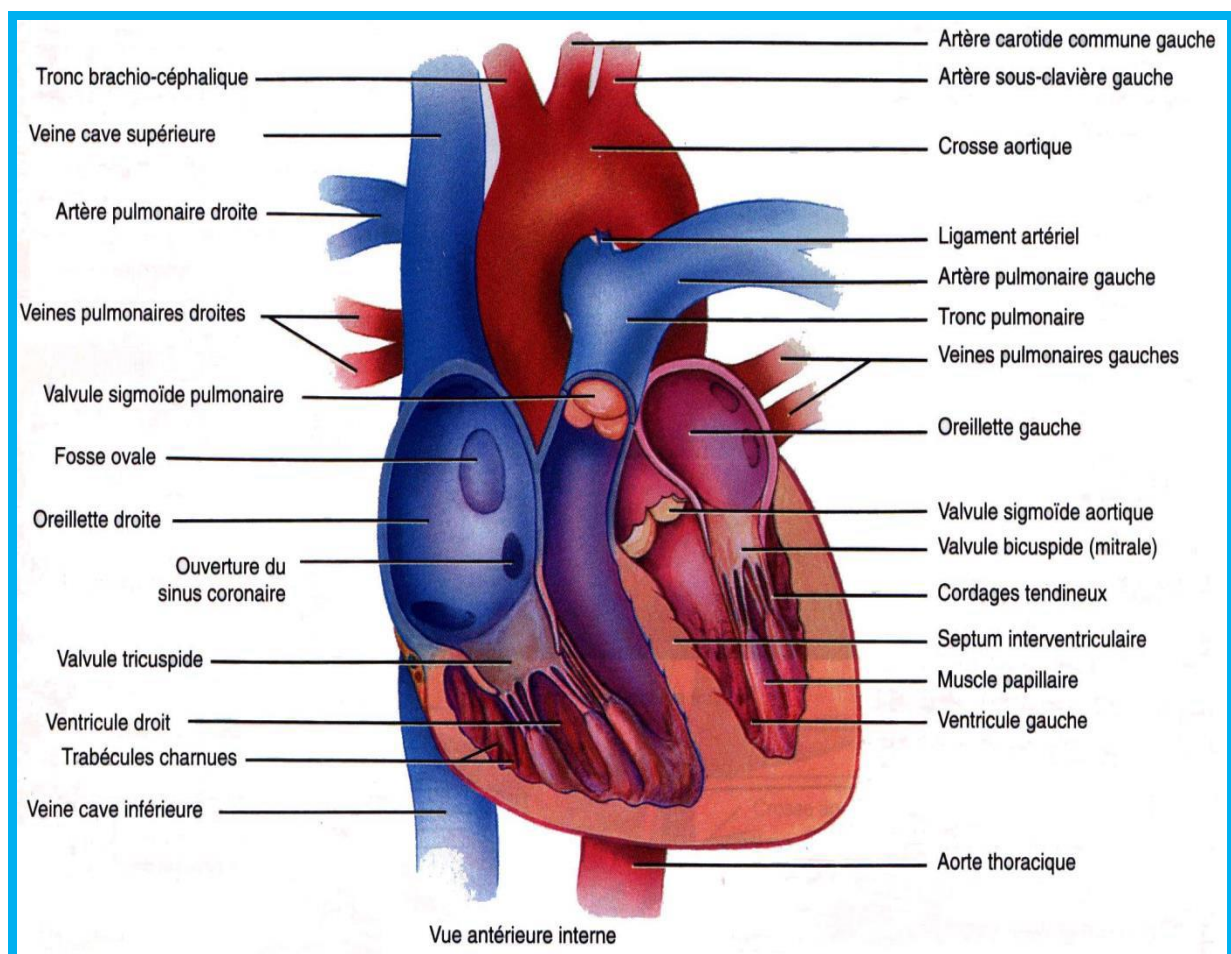


Figure 1. Coupe longitudinale du cœur : vue antérieure interne [7].

Dans le cœur humain, les quatre compartiments ou cavités du cœur sont:

- Deux cavités forment la partie supérieure ou base du cœur, appelées oreillettes et recevant le sang de toutes les parties du corps au moyen de gros vaisseaux nommés veines.
- Deux cavités forment la partie inférieure ou la pointe du cœur, appelées ventricules et destinées à chasser le liquide sanguin dans toutes les parties du corps au moyen de gros vaisseaux nommés artères [7].

D'un point de vue anatomique, le cœur est divisé en deux parties droite et gauche, La partie droite est divisée elle-même en deux chambres, l'atrium droit (chambre haute) et le ventricule droit (la chambre basse), et la partie gauche contenant l'atrium gauche (chambre haute) et le ventricule gauche (la chambre basse) ces deux parties du cœur sont séparées par un mur interne dénommé le septum.

- La partie droite du cœur est responsable de la récupération du sang désoxygéné depuis les cellules du corps à travers la veine cave supérieure et la veine cave inférieure et puis le renvoyer vers les poumons pour le réoxygéner à travers l'artère pulmonaire.
- La partie gauche prend charge de la réception du sang oxygéné depuis les poumons à travers les veines pulmonaires et puis le transmet vers tous les organes du corps à travers l'aorte. Comme tous les points du corps, le cœur nécessite en lui-même du sang oxygéné, pour cela, le ventricule droit pompe le sang riche en oxygène aux cellules cardiaques par le biais des artères coronaires qui sont situées sur la surface du cœur et qui vont à leur tour diffuser du sang oxygéné sur tous les points du cœur [8].

1.1.1. Structure et histologie du système artériel

Le système artériel est une structure passive en forme d'arbre qui transporte le sang du ventricule gauche du cœur vers les tissus et organes du corps via des artères sanguines plus petites. La première section de l'arbre artériel reçoit le flux pulsatile du cœur, tandis que la dernière section de l'arbre artériel reçoit généralement un flux non pulsatile. Par conséquent, le système artériel remplit deux fonctions :

- ✓ Un conduit pour transporter le sang vers les tissus et les organes du corps.
- ✓ Un coussin pour atténuer les impulsions de débit provoquées par l'éjection ventriculaire gauche intermittente.

La principale fonction de l'aorte est d'agir comme un coussin, en stockant le sang pendant la systole et la diastole et en le libérant vers la périphérie. On pense que l'aorte est responsable de 70 % de l'activité d'amortissement de l'arbre artériel [9].

La paroi artérielle est constituée de cellules maintenues ensemble par une matrice extracellulaire. Le rôle de cette dernière est de maintenir la cohésion des cellules et les organiser en tissus, d'assurer la rigidité de la paroi et de maintenir le liquide sanguin à l'intérieur de la lumière artérielle du fait de ses caractéristiques hydrophobes [10]. La paroi artérielle, quel que soit le type d'artère, est constituée de trois structures différentes: l'intima, la media et l'adventice (Figure 2).

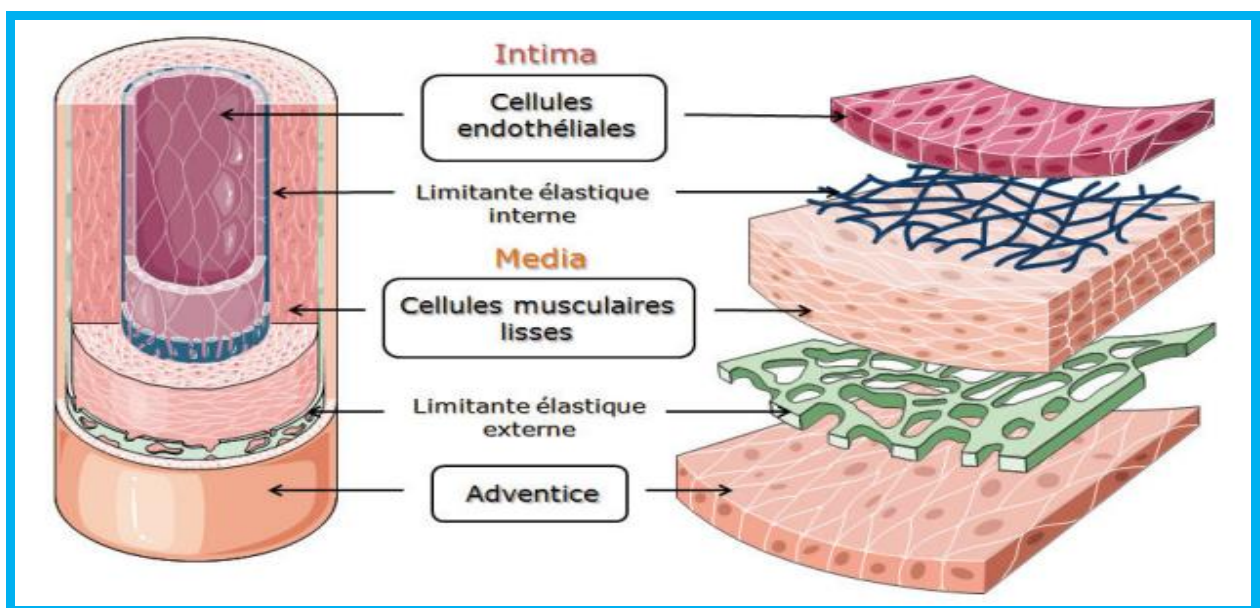


Figure 2: Structure d'une artère, comprenant l'adventice, la média et l'intima ; trois tuniques concentriques [11].

1.1.1.1. Intima

L'intima d'un vaisseau sanguin est constitué d'une seule couche de cellules endothéliales squameuses placées dans un contact direct avec le sang et reposant sur une couche basale (~80 nm) de collagène et de mucopolysaccharides, de tissu conjonctif et d'une seule couche de cellules endothéliales en contact avec la lumière du vaisseau. Ce dernier (ou endothélium, ~0,3 à 0,5 μm) est critique car il constitue le lieu de contact entre le sang et les vaisseaux, lui-même en contact étroit avec le sous-endothélium [12]. L'endothélium est recouvert d'une enveloppe cellulaire (glycocalyx) riche en protéoglycanes (héparane sulfate) qui joue un rôle essentiel dans la thromborésistance. De plus, une membrane élastique plus mince appelée limitante élastique

externe se situe entre la média et l'adventice, alors que l'intima et la média sont séparées par une membrane élastique fine appelée limite interne élastique (~5 à 20 μm) [13].

1.1.1.2. Média

La média, localisée sous l'intima, est généralement la tunique la plus épaisse. Celle-ci est formée de couches (~ 3 μm) composées de cellules de muscles lisses (CML) recouvertes de matrice extracellulaire, notamment de fibres de collagène et d'élastine. Ces CML sont les cellules responsables de la vasomotricité. Elles régissent activement le débit sanguin et la tension artérielle par le biais d'un mécanisme de contraction/relaxation [14].

1.1.1.3. Adventice

L'adventice est composée d'un tissu conjonctif dense constitué de fibroblastes, de fibres de collagène ainsi que quelques fibres élastiques. Dans les grosses artères, elle est traversée par des vaisseaux nourriciers, les *vasa vasorum*, des vaisseaux lymphatiques et des fibres nerveuses. Son épaisseur est très variable selon sa localisation et sa structure varie avec l'âge. Elle ancre le vaisseau aux tissus environnants, assure la nutrition de la paroi et contrôle le calibre vasculaire [15, 16]. L'adventice entourant les artères de conduit contient un mélange de macrophages résidents, de cellules T, de cellules dendritiques, de mastocytes, de nerfs périphériques sensoriels et sympathiques, de fibroblastes, de péricytes, d'adipocytes et de cellules endothéliales microvasculaires. L'adventice a été décrite comme un régulateur principal de la Physiologie et de la maladie de la paroi artérielle car elle agit comme un centre de traitement de l'information qui communique entre la paroi artérielle elle-même d'une part et le système immunitaire, le système nerveux, les adipokines locales et les cellules microvasculaires d'autre part pour coordonner les fonctions essentielles de l'homéostasie et de la réparation des vaisseaux sanguins [16, 17].

2. Définition, épidémiologie et causes de l'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est un "tueur silencieux" insidieux qui entraîne un risque accru d'autres maladies cardiovasculaires (MCV) y compris les maladies coronariennes, les accidents vasculaires cérébraux et l'insuffisance cardiaque. La résistance périphérique vasculaire est un indicateur essentiel de la tension artérielle (TA) qui dépend de l'état de contraction du muscle lisse vasculaire, en particulier dans les artérioles [18].

L'hypertension artérielle est définie par une PAS ≥ 140 mmHg et une PAD ≥ 90 mmHg [19]. Chaque augmentation de 20/10 (PAS/PAD mmHg) indique un stade de risque plus élevé d'hypertension [20].

Selon le « *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC7)* », l'hypertension est définie comme une PA $\geq 140/90$ mmHg. Les personnes dont la pression artérielle est supérieure aux niveaux optimaux, mais qui ne souffrent pas d'hypertension clinique (PAS de 120-139 mmHg ou PAD de 80-89 mmHg), sont définis en tant que "préhypertension" [21].

L'hypertension artérielle est responsable d'environ 16,5 % des décès annuels dans le monde [22], et elle est en effet la première cause de mortalité et de morbidité associées aux maladies cardiovasculaires (MCV) [23]. D'ici 2030, le nombre de décès annuels atteindrait 23,5 millions de personnes [22]. Selon l'enquête nationale Stepwise 2017-2018, 29,3% des adultes marocains sont hypertendus [24]. **Le tableau 1** illustre les définitions de l'hypertension normale et de l'hypertension élevée chez l'adulte, d'après les récentes directives relatives aux pressions cliniques. Les notions d'hypertension systolique isolée ou d'hypertension diastolique isolée s'appliquent lorsque l'une des deux pressions est élevée et que l'autre ne l'est pas [25].

Tableau 1 : Classification basée sur le niveau de pression clinique.

Définition	Intervalle de la pression artérielle (mmHg)	Commentaire / source
Pression normale/optimale	< 120/80	Toutes les directives
Préhypertension	120-139/80-89	JNC-7 [21]
Haute pression normale	130-139/85-89	Société Européenne d'Hypertension (SEH) [26]
Hypertension	$\geq 140/90$	La plupart des directives
Hypertension résistante	$\geq 140/90$	Sur le traitement avec 3+ antihypertenseurs, y compris généralement un diurétique [27]

Source : *Disorders of Blood Pressure Regulation* [28].

Pendant l'exercice, la pression systolique augmente, mais la variation de la PAS augmente, alors que la variation de la PAD est moins constante. **Le tableau 2** montre également les critères de l'hypertension due à l'exercice physique.

Tableau 2 : Autres définitions. Comparaison entre l'hypertension systolique et diastolique.

Définition	Pression systolique clinique	Pression diastolique clinique	Commentaire
Hypertension systolique isolée	≥ 140 mmHg	< 90 mmHg	Chez les patients plus jeunes liés à une raideur artérielle accrue
Hypertension diastolique isolée	< 140 mmHg	≥ 90 mmHg	Vue chez des patients plus jeunes et elle est souvent associée à un risque accru
Hypertension liée à l'exercice physique	≥ 210 mmHg pour hommes ≥ 190 mmHg pour femmes	≥ 90 mmHg pour hommes ou ≥ 10 mmHg pour femmes	Associée à une augmentation des facteurs de risque ou à une hypertrophie ventriculaire gauche

Source : *Disorders of Blood Pressure Regulation* [28].

On distingue l'hypertension artérielle (HTA) **primaire** (ou essentielle) et l'hypertension artérielle **secondaire** [29]. Le premier type dépend très fortement du mode de vie et constitue 80 à 90 % des cas d'HTA. L'hypertension secondaire se manifeste chez 5 à 10 % des patients hypertendus [29]. Le diagnostic précis de l'hypertension secondaire est un processus difficile et souvent long qui exige une expertise et des efforts considérables. Cependant, une fois l'étiologie secondaire identifiée, le patient bénéficie profondément d'un traitement potentiellement curatif qui peut conduire à des améliorations significatives de la qualité de vie, de la morbidité et de la mortalité [30].

L'hypertension est un véritable problème de santé publique à l'échelle mondiale [31]. Plus d'un quart de la population adulte est concernée aujourd'hui, soit près d'un milliard de personnes, la proportion de personnes hypertendues atteindrait 29 % en 2025, soit 1,56 milliard de personnes [32]. Étant le principal facteur de risque de maladie cardiovasculaires (accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde, décès d'origine coronarienne) et d'insuffisance rénale, l'hypertension est une cause majeure de décès dans le monde entier. Elle a provoqué la mort d'environ 7,6 millions de personnes en 2001, ce qui représente 13,5 % de l'ensemble des personnes décédées [33]. Selon la « *Metropolitan Life Insurance Company* », l'espérance de vie d'un individu est étroitement liée aux chiffres de sa tension artérielle. Par exemple, un homme de

35 ans ayant une tension artérielle de 150/100 mmHg a une espérance de vie inférieure de 40 % à celle d'une personne du même âge ayant une tension artérielle de 120/80 mmHg [34]. Les études statistiques indiquent que le pourcentage de patients souffrant d'hypertension est plus important dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, dont les taux de prévalence étaient respectivement de 37,3 % et de 22,9 % en 2000 (**Figure 3**) [32].

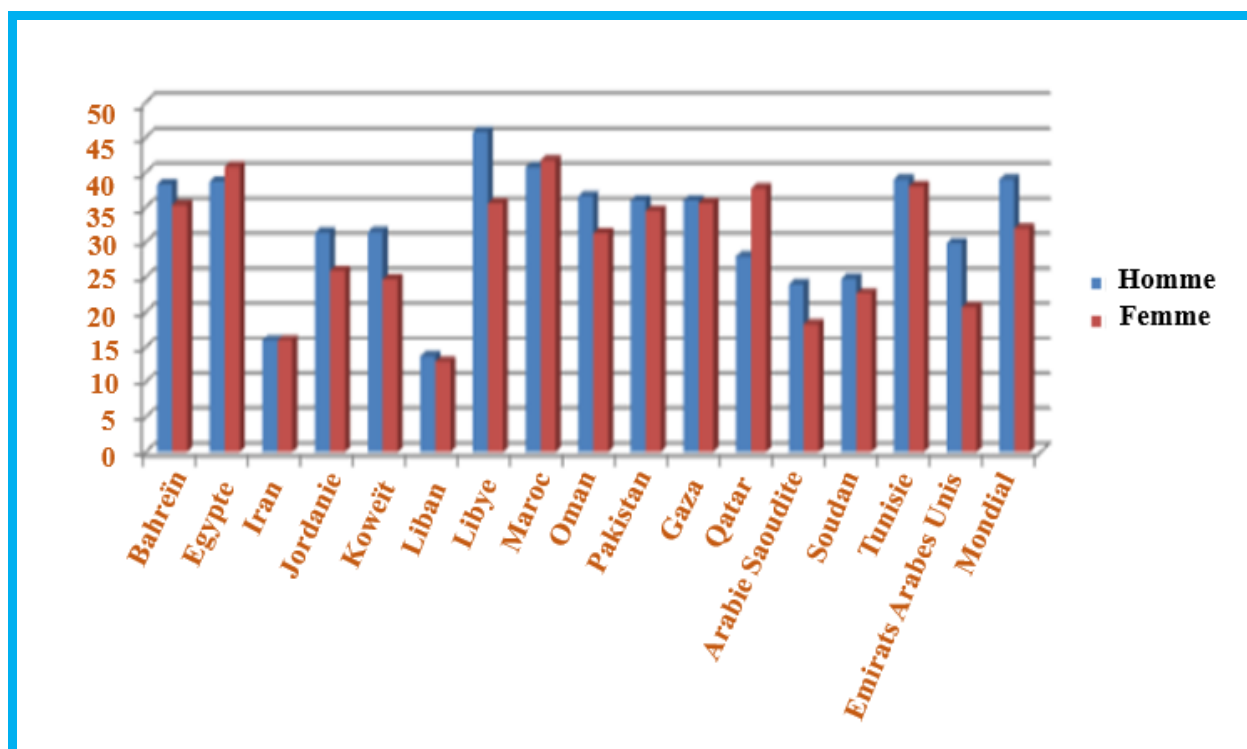


Figure 3 : Prévalence de l'hypertension chez les adultes (≥ 25 ans), par genre, dans certains pays.

Source : Rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles 2010 [35].

Au Maroc, l'hypertension est l'un des motifs les plus fréquents de consultation externe. La prévalence de l'hypertension chez les adultes au Maroc est de 33,6% (30,2% chez les hommes et 37% chez les femmes) [36].

La cause de l'hypertension est inconnue dans 90 % des cas, autre que le vieillissement progressif des artères, plus ou moins rapide selon la génétique et le comportement de vie (excès de consommation de sel, tabagisme, sédentarité, obésité, surpoids, diabète, excès de cholestérol et alimentation déséquilibrée de manière générale qui sont des facteurs modifiables). Il est possible d'agir sur ces facteurs pour prévenir et réduire l'hypertension, contrairement aux facteurs qui ne sont pas modifiables parmi lesquels l'âge, l'hérédité, la grossesse, la ménopause et le genre [37].

3. Les mécanismes de régulation de la pression artérielle et de développement de l'hypertension

De nombreux mécanismes régissent la pression artérielle dans des conditions physiologiques normales en modulant la fréquence cardiaque, le volume d'éjection systolique, la résistance périphérique et le volume sanguin. Certains processus permettent une régulation à long terme, tandis que d'autres sont plus lents et réagissent rapidement aux changements rapides de la pression artérielle. **La figure 4** est une illustration schématique des effets de la régulation à court et à long terme.

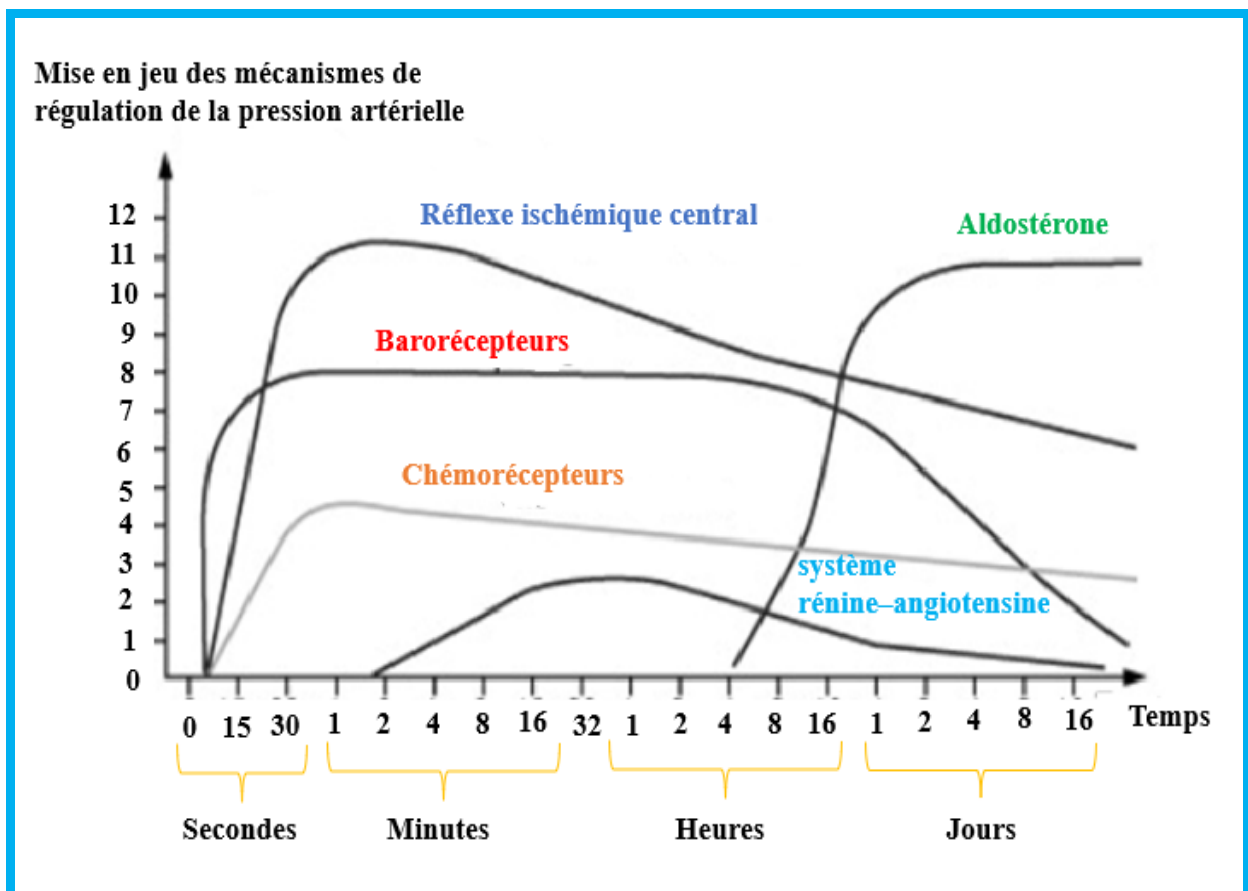


Figure 4: Puissance approximative des divers mécanismes de contrôle de la pression artérielle, en fonction du temps écoulé depuis le début du stimulus perturbant la pression artérielle [34].

3.1. Mécanismes régulateurs à court terme

Le système nerveux fait intervenir des chémorécepteurs, des barorécepteurs et une réponse ischémique du système nerveux central pour réguler la pression artérielle à court terme [38], ainsi que certains substances chimiques véhiculées par le sang. Ils permettent un contrôle

instantané des changements ponctuels de la tension sanguine en agissant sur la résistance périphérique et le débit cardiaque.

3.1.1. Le système baroréflexe

Les barorécepteurs sont un type de mécanorécepteurs permettant de relayer les informations dérivées de la pression artérielle dans le système nerveux autonome. Les informations sont ensuite transmises en séquence rapide pour modifier la résistance périphérique totale et le débit cardiaque, qui favorise le maintien de la tension artérielle dans une plage normalisée prédéfinie. Il existe deux types de barorécepteurs : Les barorécepteurs artériels à une forte pression et les récepteurs volumétriques à une faible pression, qui sont tous deux stimulés par l'étirement de la paroi du vaisseau. Les barorécepteurs artériels sont localisés dans les sinus carotidiens et la crosse aortique. Les récepteurs volumétriques à basse pression, ou récepteurs cardiopulmonaires, sont situés dans les oreillettes, les ventricules et le système vasculaire pulmonaire [39, 40].

Le barorécepteur exerce un contrôle sur la pression artérielle moyenne sous forme de boucle de rétroaction négative. Les impulsions nerveuses des barorécepteurs artériels sont toniquement actives; une élévation de la pression artérielle entraîne une augmentation de la fréquence des impulsions. La stimulation accrue du noyau *tractus solitarius* par les barorécepteurs artériels conduit à une augmentation de l'inhibition accrue du flux sympathique toniquement actif vers le système vasculaire périphérique, ce qui entraîne une vasodilatation et une réduction de la résistance vasculaire périphérique. L'inverse est vrai pour les diminutions de la pression artérielle moyenne, résultant en une réduction des excitations nerveuses et de la stimulation du *nucleus tractus solitarius*, atténuant ainsi l'inhibition et augmentant le débit sympathique vers le système vasculaire périphérique et la vasoconstriction (**Figure 5**). De même, les impulsions nerveuses provenant des barorécepteurs cardiopulmonaires sont également toniquement actives et augmentent leur taux d'excitation en raison de l'augmentation du volume sanguin et de la pression artérielle moyenne, ce qui entraîne une diminution du débit sympathique vers le nœud sinusal et une diminution de la fréquence cardiaque et du débit cardiaque. À la différence notable, le débit sympathique vers les reins augmente, ce qui accroît le débit sanguin rénal et la production d'urine, diminuant ainsi le volume de liquide du corps [41].

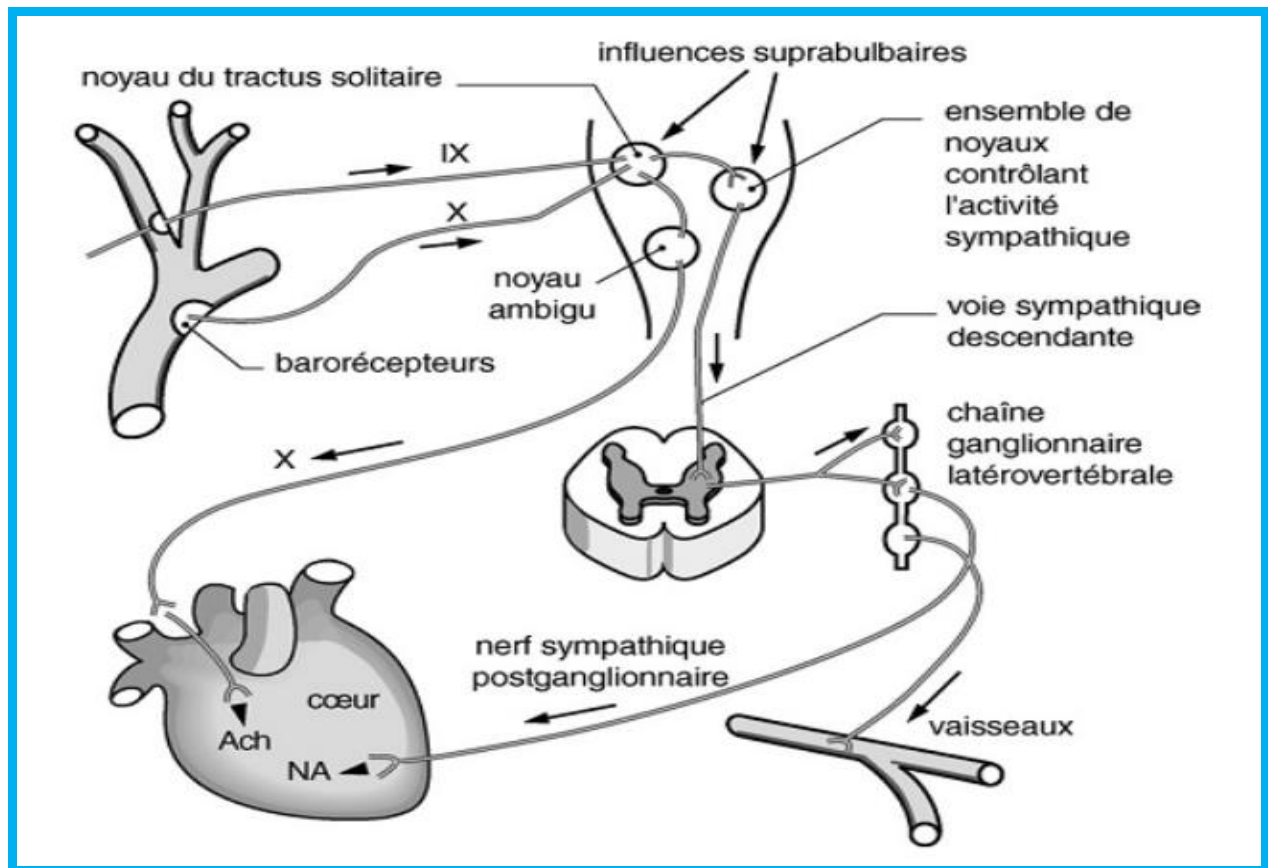


Figure 5: Voies de fonctionnement de l'arc baroréflexe. Ach : acétylcholine ; NA : noradrénaline [34].

3.1.2. Les chémorécepteurs

Le glomus carotidien et la crosse aortique possèdent des chimiorécepteurs (**Figure 6**). Ce sont des puissants modulateurs du contrôle neuronal de la circulation et de la ventilation. Ils restent sous l'emprise du feedback négatif comme l'influence du barorécepteur ou des afférences thoraciques. Les anomalies de fonctionnement de ces structures expliquent en partie la physiopathologie, la progression et le pronostic de certaines affections cardiovasculaires. La modulation de l'activité de ces structures suggère leurs rôles potentiels comme cibles d'intérêt dans des pathologies comme l'HTA ou l'insuffisance cardiaque [42]. Les chimiorécepteurs réagissent aux variations du pH sanguin et de la teneur en oxygène en envoyant des impulsions nerveuses au centre vasomoteur, tout comme le font les barorécepteurs. La stimulation du centre vasomoteur est provoquée par l'activation des chimiorécepteurs, qui entraîne une vasoconstriction lorsque la concentration de CO₂ dans le sang augmente, que le pH du sang devient brusquement plus acide ou que la concentration d'oxygène diminue. Grâce à cette

vasoconstriction, le cœur et les poumons reçoivent plus de sang, ce qui permet à l'oxygène de remplacer le CO₂ [43].

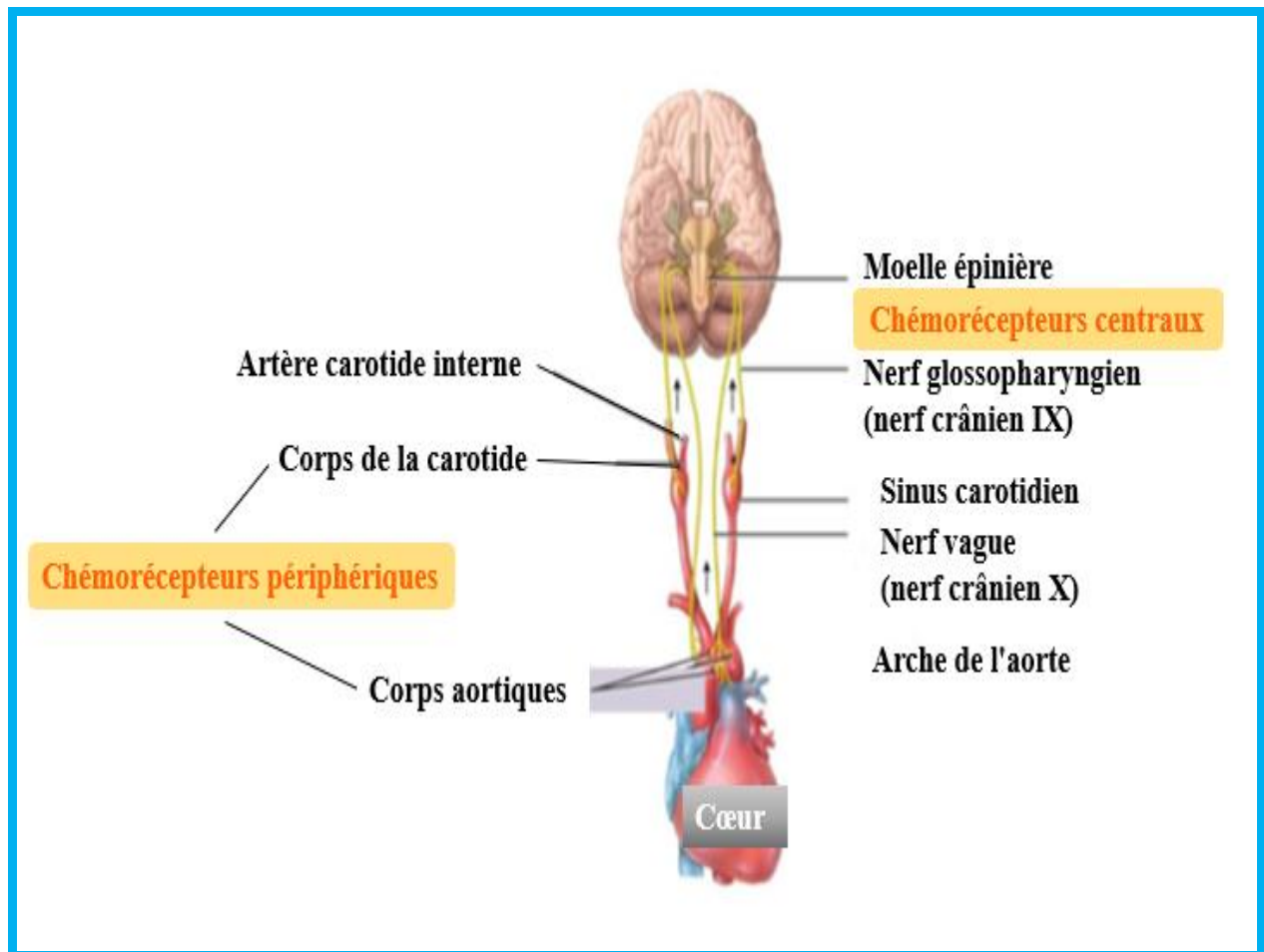


Figure 6: Localisation schématique des sites chimiorécepteurs centraux et périphériques [44].

3.1.3. Le réflexe ischémique central

Le réflexe d'ischémie cérébrale, similaire à celui des chimiorécepteurs, n'est déclenché qu'en cas d'insuffisance circulatoire aiguë [34].

3.1.4. Le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome régule la fréquence cardiaque (FC) et la vasomotricité par l'intermédiaire des branches sympathique (vasoconstricteur, accélérateur) et branches parasympathiques (vasodilatateur et ralentisseur). Par conséquent, le système nerveux parasympathique réduit la fréquence cardiaque et exerce un effet vasodilatateur lorsque la tension artérielle augmente. D'autre part, le système nerveux sympathique augmente la fréquence cardiaque (FC) en réponse à un effet vasoconstricteur quand la tension artérielle baisse [45].

3.2. Mécanismes régulateurs à moyen terme

Les mécanismes d'action à moyen terme comprennent:

- ✓ L'endothélium du système vasculaire possède des récepteurs distincts pour les substances chimiques qui dilatent les vaisseaux sanguins (comme les prostaglandines) ou les compressent (comme les catécholamines et l'endothéline).
- ✓ Un système réflexe régulé par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire est le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). La rénine provoque la synthèse de l'angiotensine II (AII), qui a un effet vasoconstricteur et augmente la pression artérielle lorsque celle-ci baisse.

3.3. Mécanismes régulateurs à long terme

L'équilibre rénale et cardiovasculaire est efficacement régulée par le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Elle constitue l'un des plus importants régulateurs de la tension artérielle. L'aldostérone et l'Ang II sont ses effecteurs. Les médiateurs du SRAA régulent la vasoconstriction, la prolifération cellulaire et la rétention de sel. En outre, le SRAA intervient dans les réactions inflammatoires. Le dysfonctionnement diastolique, l'hypertension, le dysfonctionnement rénal et le diabète sont tous des troubles liés à la pathogenèse qui sont tous affectés par un dérèglement du SRAA [46].

Les reins contrôlent la volémie à l'aide de deux principaux mécanismes :

3.3.1. Le système rénine–angiotensine-l'aldostérone (SRAA)

Le SRAA a pour fonction de réguler l'homéostasie de la pression artérielle. Les cellules juxta-glomérulaires sécrètent de la rénine en réponse à l'activation sympathique par les récepteurs β 1-adrénergiques ou à une réduction du volume sanguin. Elle agit comme une protéase, transformant l'angiotensinogène en angiotensine I (Ang I). L'enzyme de conversion de l'Ang I (ECA) convertit l'Ang I inactif à Ang II. L'Ang II stimule la zone glomérulée (zone externe du cortex surrénalien) pour produire de l'aldostérone via le récepteur AT1 [47]. L'Ang II régule la pression artérielle en agissant sur les vaisseaux, les reins et le cœur. Elle agit à travers deux types de récepteurs, AT1 et AT2. L'inhibition de l'ECA et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA) sont devenus l'une des options thérapeutiques modernes de l'hypertension [48].

L'Ang II a un rôle important dans la stimulation de la pression artérielle systémique et locale en raison de son action vasoconstrictrice, de la rétention d'eau dans les tubules rénaux, de

la stimulation et de la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales [49]. Lorsque l'Ang II agit à différents niveaux pour augmenter la rétention d'eau et la pression artérielle, il diminue la sécrétion de rénine par rétroaction négative (**Figure 7**). En effet, l'Ang II favorise la sécrétion d'aldostérone, ce qui provoque la réabsorption d'eau et de sodium, et par conséquent augmente le volume sanguin et les niveaux de pression sanguine [50].

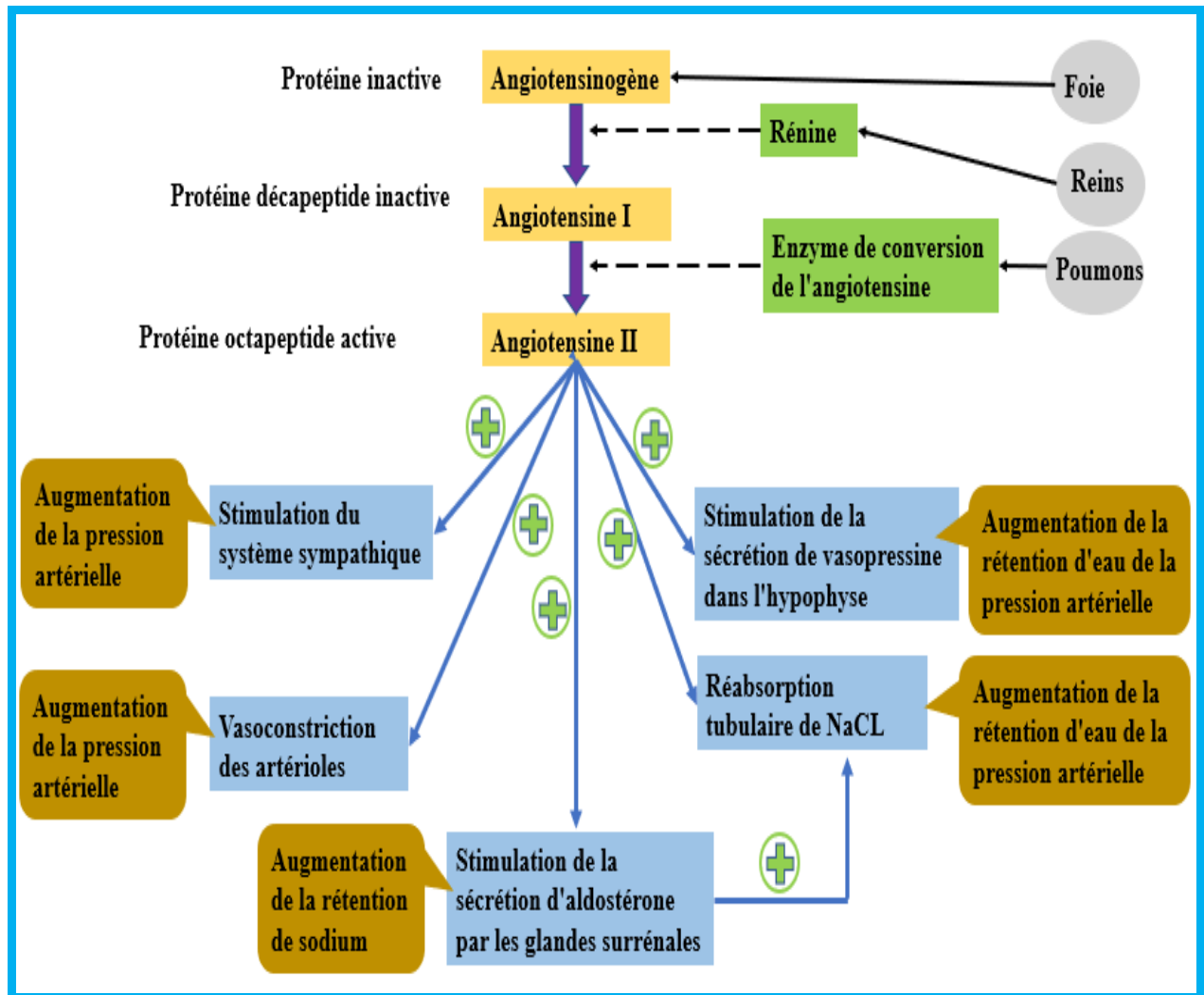


Figure 7: Schéma représentant le rôle de système rénine-angiotensine-aldostérone dans la régulation de la pression artérielle [51].

3.3.2. L'hormone antidiurétique (ADH)

Lorsque la pression artérielle baisse, l'hypothalamus produit l'hormone antidiurétique, qui stimule la réabsorption de l'eau dans l'appareil juxtaglomérulaire, conduisant à une élévation du volume sanguin [52, 53].

L'absence de régulation de la pression artérielle mène à un certain nombre de pathologies, telles que l'hypertension artérielle.

4. Physiopathologie de l'hypertension artérielle

4.1. L'hypertension artérielle essentielle

L'hypertension essentielle s'avère être la maladie cardiovasculaire la plus fréquente dans le monde. Elle affecte environ 26 % de la population mondiale et devient de plus en plus fréquente [32], [54]. Le processus causal qui est derrière cet état n'est cependant pas encore complètement compris. Une plus grande pulsion sympathique a été constatée dans les premiers stades de l'hypertension essentielle, ce qui indique qu'un dérèglement neurohormonal pourrait en être la cause [55], la progression de l'hypertension et les lésions ultérieures des organes cibles, y compris une rigidité artérielle accrue et une hypertrophie du ventricule gauche [55]. Outre les effets du traitement médicamenteux antihypertenseur sur ce dysfonctionnement, les processus précis par lesquels cela se produit sont encore inconnus [56].

Généralement, la pression artérielle est notée en même temps par rapport à certains autres facteurs de risque cardiovasculaire. L'étiologie de l'hypertension essentielle repose sur l'incapacité primaire ou secondaire du rein à éliminer le sel à une pression artérielle normale. Les grosses artères, le système nerveux central, les variables endocriniennes et la microcirculation contribuent tous à cette maladie. Bien qu'il existe des formes monogéniques de dérèglement de la pression artérielle, l'hypertension se manifeste souvent comme un phénomène quantitatif complexe [57].

Le plus souvent, l'hypertension essentielle est liée à la présence d'autres facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'âge, l'obésité, la résistance à l'insuline, le diabète et l'hyperlipidémie. Au début de l'évolution de la maladie cardiovasculaire hypertensive, des lésions subtiles des organes finaux, comme l'hypertrophie ventriculaire gauche, la microalbuminurie et le dysfonctionnement cognitif, se produisent, tandis que des événements catastrophiques comme l'accident vasculaire cérébral, l'infarctus, l'insuffisance rénale et la démence surviennent généralement après des périodes prolongées d'hypertension non contrôlée [58].

4.2. L'hypertension artérielle secondaire

Le terme "hypertension secondaire" désigne une pression artérielle (PA) systémique élevée dont l'étiologie est connue. Seulement 5 à 10 % des personnes atteintes d'hypertension artérielle développent un état secondaire, alors que l'hypertension essentielle (ou primaire) touche la

grande majorité. La recherche de causes secondaires d'hypertension chez chaque patient n'est pas rentable en raison de la rareté des formes secondaires et du caractère coûteux et long de leur dépistage [59, 60].

La majorité des patients souffrant d'hypertension sont classés dans la catégorie des hypertendus primaires car la cause n'est souvent pas claire. La prévalence de l'hypertension artérielle secondaire et les étiologies potentielles diffèrent en fonction de l'âge. Chez les enfants, les causes les plus courantes sont les maladies du parenchyme rénal ainsi que la coarctation aortique. La sténose athérosclérotique de l'artère rénale, l'insuffisance rénale et l'hypothyroïdie sont des causes fréquentes chez les adultes âgés de 65 ans et plus. L'hypertension secondaire doit être envisagée en présence de symptômes et de signes évocateurs, tels qu'une hypertension sévère ou résistante, un âge de début inférieur à 30 ans (surtout avant la puberté), une hypertension maligne ou accélérée et une augmentation aiguë de la pression artérielle par rapport à des valeurs précédemment stables. L'hypertension secondaire peut également être causée par l'hyperaldostéronisme, l'apnée obstructive du sommeil, le phéochromocytome, le syndrome de Cushing, la maladie thyroïdienne, la coarctation de l'aorte et l'utilisation de certains médicaments [29], les maladies rénales parenchymateuses, l'aldostéronisme primaire et l'hypertension rénovasculaire [61].

Les maladies rénales parenchymateuses ou vasculaires, ainsi que la coarctation aortique, sont les deux causes les plus typiques d'hypertension chez les enfants prépubères [62]. Le dépistage des formes secondaires doit être effectué chez les jeunes (30 ans) sans antécédents familiaux d'hypertension ou autres facteurs de risque. Une augmentation rapide de la pression artérielle ou la présence d'une hypertension sévère chez des personnes âgées présentant une athérosclérose documentée est symptomatique d'une manifestation secondaire, telle qu'une sténose de l'artère rénale. Les patients en surpoids et présentant une hypertension résistante doivent faire l'objet d'un dépistage du syndrome d'apnée obstructive du sommeil et de l'hypertension endocrinienne (Cushing, hypothyroïdie) [59].

L'hypertension réno-vasculaire reste l'une des causes les plus courantes et les plus importantes, mais aussi potentiellement réversibles, de l'hypertension secondaire. La sténose athérosclérotique de l'artère rénovasculaire et la dysplasie fibromusculaire rénale sont les principales causes de sténose de l'artère rénale. Ce syndrome est susceptible de provoquer un œdème pulmonaire aigu, des problèmes cardiovasculaires et une insuffisance rénale progressive [63].

L'aldostéronisme primaire est l'une des formes les plus répandues d'hypertension secondaire [64]. Ce syndrome clinique était un trouble endocrinien peu fréquent. Il provoque des lésions importantes des organes cardiovasculaires et une hypertension, ainsi qu'une pression artérielle élevée et potentiellement une hypokaliémie. Il a été démontré que l'aldostéronisme primaire était associée à un risque significativement accru de maladie coronarienne, d'accident vasculaire cérébral, d'insuffisance cardiaque, de fibrillation auriculaire, de diabète sucré, de syndrome métabolique et d'hypertrophie ventriculaire gauche par rapport aux personnes souffrant d'hypertension essentielle [65, 66].

4.3. L'hypertension artérielle gravidique

La tension artérielle des femmes enceintes est mesurée à chaque visite prénatale. L'hypertension induite par la grossesse est définie comme une hypertension lorsque la PAS $\geq$ 140 mmHg et/ou la PAD $\geq$ 90 mmHg lors de deux mesures au repos. L'hypertension induite par la grossesse survient chez les femmes enceintes sans protéinurie en raison de perturbations hormonales et placentaires. Elle constitue un type d'hypertension transitoire qui apparaît chez les femmes après la vingtième semaine d'aménorrhée. Elle peut également être découverte dans les 24 premières heures suivant la naissance. Cette hypertension disparaît généralement dans les six semaines suivant l'accouchement. Ce phénomène est dû à des artères spiralées utérines de calibre insuffisant qui perfusent le placenta et ne fournissent donc pas assez d'oxygène, ce qui entraîne une ischémie placentaire, qui peut provoquer une souffrance fœtale chronique pour le fœtus et des dommages cérébraux, vasculaires, rénaux, hépatiques et hématologiques pour la mère. Les crises tonico-cloniques peuvent survenir au cours du troisième trimestre de la grossesse, pendant le travail ou après l'accouchement [67, 68].

4.4. Facteurs relatifs au risque d'hypertension

De nombreux facteurs environnementaux (tels que le tabagisme, l'obésité, le comportement sédentaire et la consommation excessive de sel), les caractéristiques génétiques (ethniques), l'âge et le genre font partie des causes de l'hypertension [69]. En outre, certains facteurs métaboliques augmentent le risque de maladies cardiaques, d'accidents vasculaires cérébraux, d'insuffisance rénale et d'autres complications de l'hypertension comme le diabète, l'hypercholestérolémie et l'obésité. L'interaction du tabagisme et de l'hypertension artérielle augmente encore plus le risque de maladies cardiovasculaires [70]. L'hypertension provoque 13 % de la mortalité dans le monde. Les facteurs associés au développement de l'hypertension peuvent être classés comme étant des facteurs de risque modifiables et non modifiables [71].

4.4.1. Facteurs de risque modifiables

L'obésité, une alimentation riche en sel, la consommation de tabac, d'alcool, la prise de pilules contraceptives, une mauvaise alimentation, le diabète, le stress et la sédentarité sont autant de facteurs de risque modifiables de l'hypertension artérielle [37]. Ce sont des facteurs de risque que le patient doit cibler et améliorer afin de préserver sa santé. Il est possible de les gérer avec l'aide d'un pharmacien [72].

4.4.1.1. L'obésité

L'obésité est une maladie complexe et multifactorielle qui est associée à une hypertension essentielle chez 78 % des hommes et 65 % des femmes [73]. Il a été établi qu'il existe un lien entre l'hypertension et l'obésité ou le surpoids. Il convient de noter que la forte augmentation de l'IMC moyen de la population chinoise contribue à l'augmentation de la prévalence de l'hypertension en Chine [74]. Chez les personnes âgées souffrant d'hypertension, l'obésité favorise la détérioration de l'état de santé par un certain nombre de voies moléculaires et cliniques. Par exemple, les personnes âgées ont souvent une mauvaise condition physique ou des restrictions fonctionnelles [75].

L'obésité peut entraîner une diminution de l'activité physique, ce qui peut avoir des effets supplémentaires et indépendants sur la pression artérielle [33]. L'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène est plus élevée dans la graisse viscérale, ce qui contribue à expliquer le lien entre l'hypertension et l'obésité dans le syndrome métabolique [76].

4.4.1.2. Une alimentation riche en sel

La consommation de chlorure de sodium doit toujours être prise en compte (au maximum 5 g/jour de NaCl) [77]. Cette restriction de la consommation a un effet positif sur la pression artérielle et la mortalité due aux maladies cardiovasculaires. L'augmentation initiale de la pression artérielle provoquée par une alimentation riche en sel est liée à l'expansion du volume plasmatique et à une augmentation de la pression artérielle. Il est largement reconnu que les reins retiennent le sel et l'eau, ce qui constitue un facteur majeur dans le déclenchement de l'hypertension induite par le sel. Chez les humains hypertendus, une légère élévation de la concentration plasmatique de Na^+ (d'environ 1-3 mM) avec une normovolémie apparente est courante [78].

Une consommation élevée de sel a la capacité de réduire les niveaux plasmatiques de nitrate et l'excrétion urinaire [79]. Le dysfonctionnement endothélial, en particulier la réduction de la

réactivité vasculaire causée par l'altération de la production d'oxyde nitrique (NO), semble être un facteur important de l'hypertension dans les modèles animaux sensibles au sel et chez l'Homme [80].

Les principales perturbations fonctionnelles qui relient la consommation de sel à la pression artérielle se situent au niveau des reins. La consommation élevée de sel a été liée à des modifications cardiovasculaires et rénales qui endommagent les organes cibles, en plus des répercussions sur le contrôle de la pression artérielle [81, 82]. La consommation excessive du sel constitue un défi important pour les reins, qui doivent excréter de grandes quantités de sel administré. L'un des principaux systèmes organiques vulnérables aux effets négatifs d'un excès de sodium alimentaire est le système cardiovasculaire. L'excès de sodium alimentaire augmente le risque d'hypertension artérielle [83, 84].

Une pression artérielle supérieure à la normale amène les reins à expulser plus de sel et d'eau dans l'urine que l'organisme n'en absorbe. Les volumes extracellulaire et sanguin diminuent en conséquence. La pression artérielle diminue parce que le cœur pompe moins de sang. En revanche, lorsque la pression tombe en dessous de la normale, l'organisme absorbe du sel et de l'eau pour équilibrer le liquide expulsé, ce qui augmente la pression artérielle [85].

4.4.1.3. Le tabac

Le tabagisme est responsable de 9 % de la mortalité dans le monde [71]. Il a un effet négatif plus important sur l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, l'anévrisme aortique et la maladie coronarienne. Le tabagisme a un impact rapide sur le système nerveux autonome, ce qui peut affecter temporairement la régulation de la tension artérielle. En outre, le tabagisme accélère le vieillissement des artères, ce qui contribue à une hypertension persistante et augmente la rigidité des vaisseaux. La stimulation sympathique permanente provoquée par le tabagisme prolongé affecte également la résistance à l'insuline et le métabolisme des lipides, deux facteurs de la maladie athéromateuse. Ainsi, le tabagisme peut favoriser la survenue de sténoses athéromateuses de l'artère rénale, qui sont des facteurs aggravants de l'hypertension artérielle. Le tabagisme diminue l'efficacité de la majorité des familles de médicaments antihypertenseurs et il est fréquemment lié à une consommation accrue d'alcool, ce qui entraîne un mauvais contrôle de la pression artérielle chez ces patients à haut risque [86].

Le spasme, la thrombose et l'inflammation sont à l'origine des syndromes coronariens aigus (SCA). Le tabagisme double l'incidence de maladies cardiovasculaires et augmente la mortalité coronarienne de 50 %. Le risque de maladies cardiovasculaires est plus élevé en fonction du

nombre de cigarettes fumées, la durée du tabagisme et l'âge. Ce risque est plus important chez la femme et les jeunes [87]. À long terme, le tabac conduit à une détérioration des artères, d'autant plus rapide s'il est associé à un autre risque cardio-vasculaire. **La figure 8** montre le mécanisme d'action du tabac sur les artères coronaires.

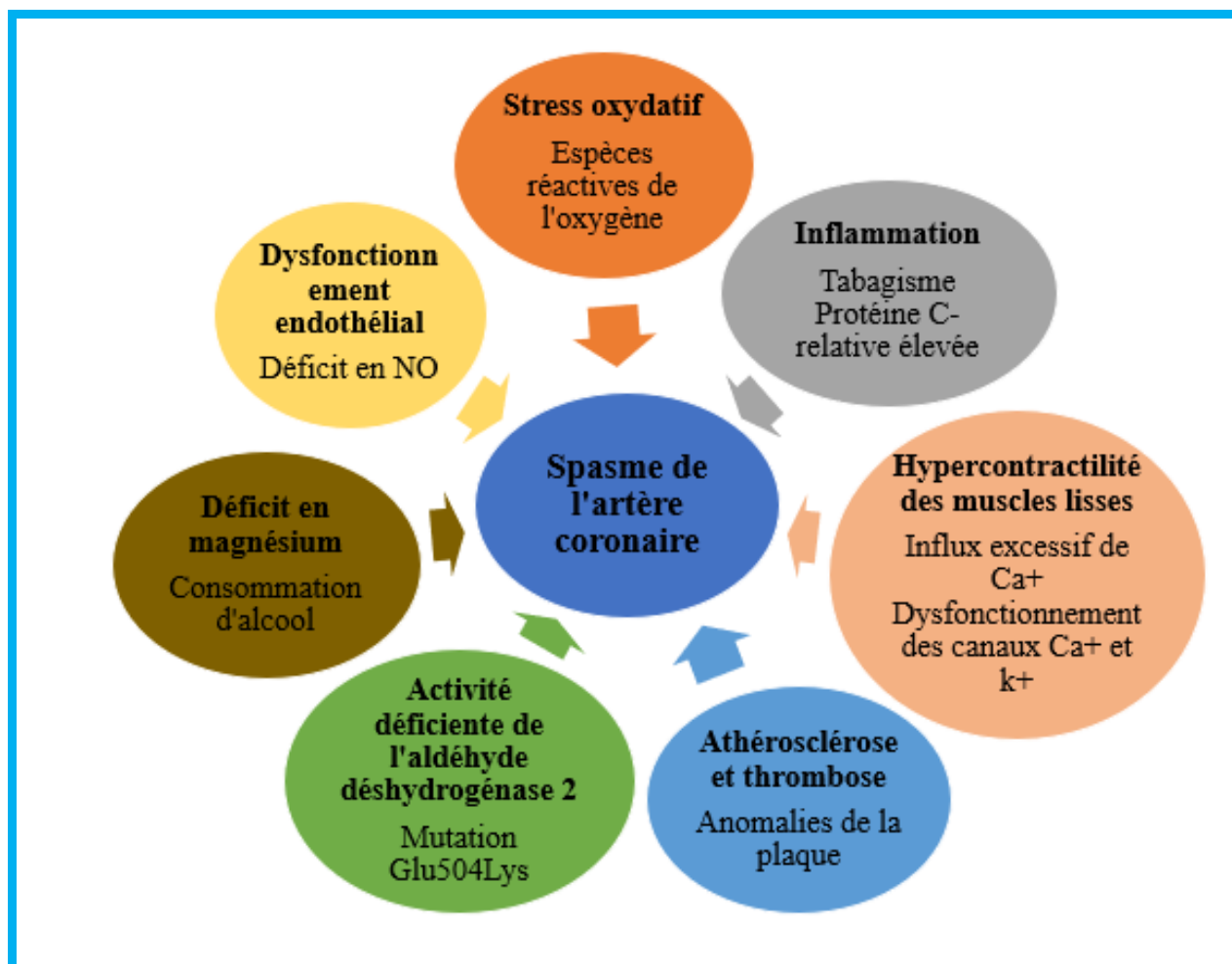


Figure 8: Schéma représentant le mécanisme d'action du tabac sur les artères coronaires : Spasme et Thrombose [87].

4.4.1.4. L'alcool

La consommation chronique d'éthanol à haute dose entraîne fréquemment un dysfonctionnement physiologique dû à des dommages au foie, au tractus gastro-intestinal, aux nerfs et au système cardiovasculaire [88]. Dans un premier temps, un lien de cause à effet a été proposé entre la prise régulière d'alcool et l'hypertension artérielle. Des recherches épidémiologiques et cliniques récentes ont montré que la consommation chronique d'éthanol est associée à un risque accru de maladie cardiovasculaire et à une incidence accrue de

l'hypertension [89]. **La figure 9** montre que l'alcool peut augmenter la pression artérielle par plusieurs mécanismes.

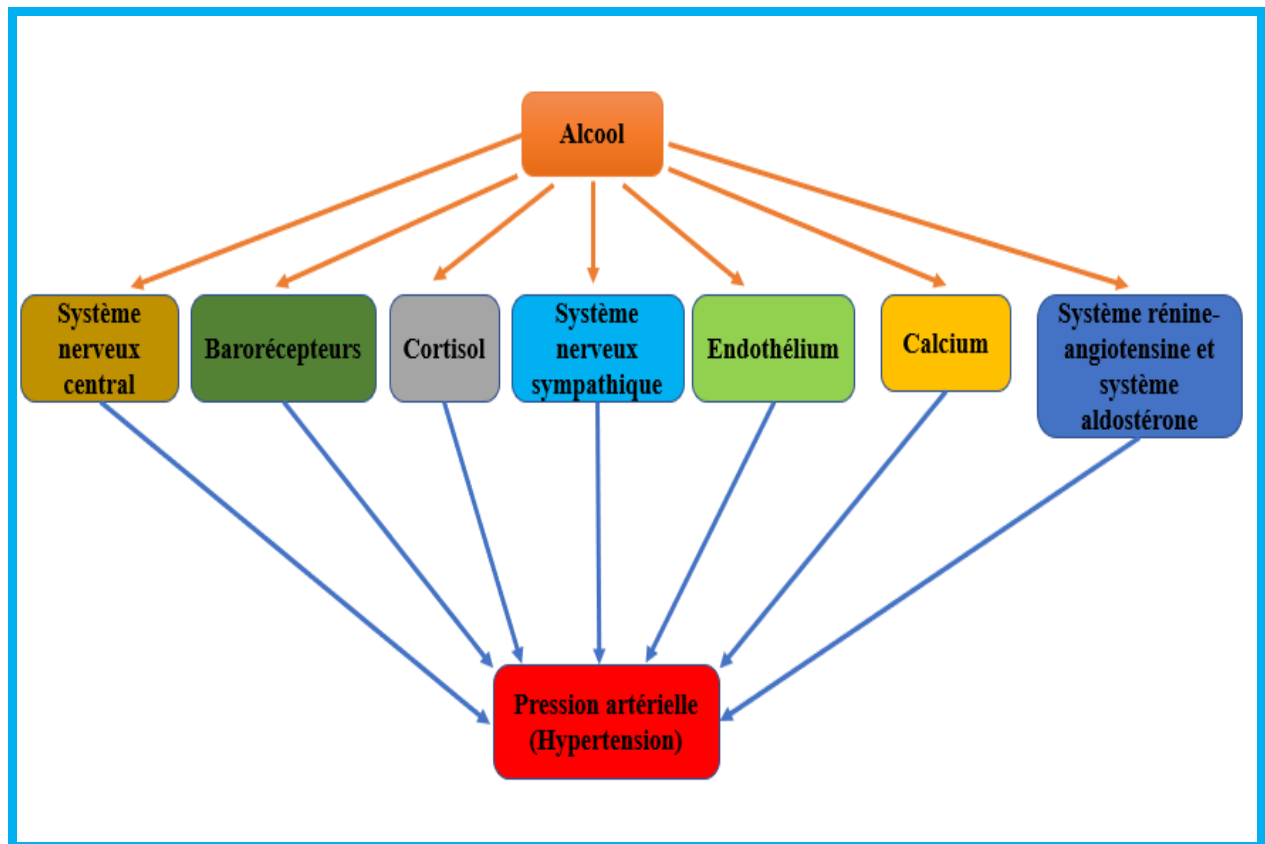


Figure 9: Schéma représentant le mécanismes de l'hypertension induite par l'alcool [90].

4.4.1.5. La prise de pilules contraceptives

Les femmes utilisant des contraceptifs oraux ont un risque 2 à 3 fois plus élevé de développer une hypertension que les femmes du même âge qui n'utilisent pas ces médicaments [91]. L'âge, la fréquence d'utilisation et l'augmentation de la masse corporelle sont autant de facteurs qui augmentent le risque d'hypertension. Le dosage de l'éthinylestradiol dans les contraceptifs oraux est aujourd'hui plus faible (20-35 g) que par le passé. Les données actuellement disponibles indiquent un lien entre la pression artérielle et le dosage des œstrogènes et des progestatifs [92].

Les contraceptifs oraux dont la teneur en œstrogènes est supérieure à 50 µg, tels qu'ils étaient utilisés dans les années 1960 et 1970, ont été fortement liés à un risque accru d'accident vasculaire cérébral [93]. Par conséquent, il se peut que la prévalence de l'hypertension induite par les contraceptifs oraux soit aujourd'hui plus faible que ce que la recherche a précédemment documenté. Cependant, des données récemment publiées dans le cadre de la *Nurses' Health*

Study indiquent que le risque d'hypertension est accru par les contraceptifs oraux œstrogéniques, même à faible dose, et que ce risque n'est pas négligeable [91].

4.4.1.6. Une mauvaise alimentation

Les habitudes alimentaires individuelles sont influencées par un ensemble complexe de facteurs [94]. Par exemple, un excès de consommation de sodium est un facteur de risque majeur. Une étude chinoise a découvert que la diminution de la consommation de sel pendant quatre ans entraînait une chute de 3 mmHg de la tension artérielle. La consommation de potassium, en revanche, a des effets bénéfiques [95].

Par ailleurs, une alimentation riche en graisses saturées et pauvre en graisses polyinsaturées accroît le risque de développer une hypertension. En fait, une consommation accrue d'acides gras polyinsaturés empêche l'augmentation de la tension artérielle [96]. D'autre part, une quantité suffisante de sodium dans l'alimentation peut être cruciale pour soutenir le volume d'expansion plasmatique nécessaire à une perfusion adéquate de l'unité utéroplacentaire au cours de la grossesse [97].

Il est conseillé de prendre trois repas par jour et de suivre un régime équilibré qui évite la consommation excessive de sucres, d'amidon, de viande rouge et de graisses.

4.4.1.7. Le diabète

Selon l'enquête nationale Stepwise 2017-2018, 10,6% des adultes marocains sont diabétiques [98]. En outre, selon l'étude de Ghannem *et al.*, [87], le diabète est responsable de complications microangiopathiques à savoir:

- ✓ Rétinopathie,
- ✓ Néphropathie,
- ✓ Neuropathie,
- et de complications macroangiopathiques tels que:
- ✓ Coronaropathie,
- ✓ Accidents vasculaires cérébraux,
- ✓ Artérite oblitérante des membres inférieurs.

4.4.1.8. Le stress

Le stress peut provoquer l'hypertension en augmentant la pression artérielle de façon répétée et en stimulant le système nerveux pour qu'il produise de grandes quantités d'hormones vasoconstrictrices, qui augmentent la pression artérielle. L'hypertension de la blouse blanche, le

stress professionnel, la race, l'environnement social et la détresse émotionnelle représentent des sources de stress qui influencent la tension artérielle. De plus, lorsqu'un facteur de risque est combiné à un autre, l'effet sur la tension artérielle est amplifié. Dans l'ensemble, les recherches indiquent que si le stress ne cause pas directement l'hypertension, il peut influencer son développement [99]. Il a été démontré que le stress augmente indirectement la pression artérielle en augmentant la fréquence cardiaque et la déviation cardiaque sans affecter la résistance périphérique totale. Il a été découvert que le stress lié à l'anxiété augmente les niveaux de catécholamines, de cortisol, de vasopressine et d'aldostérone, ce qui peut expliquer en partie l'augmentation de la pression artérielle. Mais des recherches récentes ont indiqué que l'activation du système nerveux sympathique pourrait jouer un rôle crucial [100].

4.4.1.9. La sédentarité

La sédentarité est responsable de 6 % de la mortalité dans le monde [71]. La sédentarité est associée à d'autres facteurs de risque qui peuvent contribuer à l'élévation des niveaux de pression artérielle, ce qui peut conduire au développement d'une hypertension systémique à long terme. Elle est identifiée comme un facteur de risque essentiel des maladies cardiovasculaires selon la littérature [101]. Il est conseillé de pratiquer régulièrement un exercice physique de longue durée et d'intensité faible à modérée afin de réguler et de réduire la pression artérielle. Pour cela, il faut choisir un sport d'aérobie et d'endurance, notamment la marche rapide, le footing, le vélo et la natation. À l'inverse, les sports qui demandent beaucoup d'efforts, comme le squash ou le tennis, sont à éviter car ils font augmenter la tension artérielle [102].

4.4.2. Facteurs de risque non modifiables

Les facteurs non modifiables comportent l'âge, le sexe et la génétique.

4.4.2.1. L'âge

Il s'accompagne d'une augmentation de la rigidité artérielle due à un processus de fibrose de la paroi des artères et de dépôt athéromateux [103]. Selon une étude de Miah *et al.* [104], sur les facteurs de risque, l'âge s'est révélé être un facteur de risque non modifiable d'accident vasculaire cérébral (AVC). Le facteur de risque d'AVC le plus important est l'âge. Après l'âge de 55 ans, le taux d'AVC fait plus que doubler pour chaque période de 10 ans suivante, tant chez les hommes que chez les femmes. En outre, l'âge est un facteur de risque indépendant pour l'apparition de l'athérosclérose intracrânienne. À chaque décennie d'âge, la prévalence du site de l'athérosclérose intracrânienne augmente [105].

4.4.2.2. Le genre

Les hommes ont souvent une tension artérielle plus élevée que les femmes au même âge. Toutefois, cette proportion est inversée dans le cas de la ménopause, qui s'accompagne d'une pression artérielle plus élevée [106].

4.4.2.3. La génétique

De nombreuses études ont confirmé la présence d'une influence génétique au niveau de la tension artérielle. Selon les études, 30 % du changement de pression artérielle peut être attribué à des facteurs génétiques [107].

4.5. Symptomatologie associée à l'hypertension

Les symptômes de l'hypertension artérielle varient d'une personne à l'autre, et la majorité des gens n'en ont aucun. Les plus fréquents de ces symptômes sont [108]:

- ✓ Vertiges
- ✓ Acouphènes
- ✓ Asthénie
- ✓ Céphalées
- ✓ Phosphènes
- ✓ Épistaxis
- ✓ Hématurie
- ✓ Palpitations
- ✓ Sueurs
- ✓ Asthénie
- ✓ Dyspnée

5. Prévention et traitement de l'hypertension

La réduction de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaires et rénales à long terme est l'objectif fondamental de la prise en charge des patients hypertendus. En effet, la morbidité et la mortalité à long terme sont liées aux systèmes cardiovasculaire et rénal. En cas d'hypertension non compliquée, sans diabète ni insuffisance rénale, la PAS doit être inférieure à 140 mmHg et la PAD inférieure à 90 mmHg [109].

Le traitement de l'hypertension secondaire consiste à corriger les facteurs de risque et/ou les facteurs métaboliques, à dilater les artères ou à traiter la néphropathie, à opérer pour enlever une tumeur endocrine ou pour réparer une coarctation aortique, à corriger une coarctation

aortique par voie chirurgicale ou par cathétérisme interventionnel sans arrêter au préalable toute substance hypertensive [110].

En fonction de la pathophysiologie et des types d'hypertension, on peut choisir le type de traitement.

5.1. Modalités de traitement non pharmacologique dites « hygiéno-diététiques ».

La première étape pour faire baisser la tension artérielle consiste à modifier le mode de vie, en particulier pour les personnes souffrant de préhypertension et d'hypertension de stade 1.

Les directives suivantes en matière d'alimentation et d'hygiène sont à conseiller à tout patient hypertendu [111] :

- ✓ Ne pas consommer plus de 5 à 6 grammes de sel par jour.
- ✓ Limiter les glucides à 55 % des calories quotidiennes et le cholestérol alimentaire à 150 mg/j.
- ✓ Suggérer la consommation de fruits, de légumes et de produits laitiers avec peu ou pas de graisses saturées.
- ✓ Réduire l'indice de masse corporelle (IMC) à un maximum de 25 kg/m², avec un tour de taille de 88 cm ou moins pour les femmes et de 102 cm ou moins pour les hommes.
- ✓ Faire de l'exercice régulièrement pendant au moins 30 minutes, trois à cinq jours par semaine.
- ✓ Consommer des aliments riches en potassium et en fibres (30 g par jour) et des sources de protéines (18 % du total des calories quotidiennes).
- ✓ Arrêter de fumer.
- ✓ Ne pas boire d'alcool.

Ces règles hygiéno-diététiques ont prouvé leur efficacité pour réduire la pression artérielle chez les patients hypertendus (**Tableau 3**).

Tableau 3: Réduction de la PAS lors des modifications du style de vie selon l'AHA/ACC/CDC [112].

Modification du mode de vie	Recommandations	Réduction approximative de la pression artérielle systolique (mmHg)
Perte de poids	Maintien de l'indice de masse corporelle dans la tranche normal (18,5-24,9 Kg/m ²)	5-20 par 10 Kg de poids
Adopter l'approche diététique pour arrêter l'Hypertension	Alimentation riche en fruits et légumes et produits laitiers pauvres en graisses saturés	8-14
Réduction de l'apport de Sodium	Diminution de la soduine en dessous de 2,4 g/jour	2-8
Activité physique régulière	Pratique régulière d'une activité physique telle que la marche rapide pendant au moins 30 minutes par jour, plusieurs jours par semaine	4-9
Réduction de la consommation d'alcool	Chez l'homme et surtout chez la femme	2-4

5.2. Approches thérapeutiques médicamenteuses

Le traitement pharmacologique doit être ajusté à la situation clinique pour chaque patient, en prenant en considération les pathologies associées et les polymédications fréquentes chez les personnes âgées. Il est possible d'utiliser tous les médicaments des familles suivantes : diurétiques thiazidiques, antagonistes du calcium, inhibiteurs de l'ECA, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine 2 (ARA2) et bêta-bloquants [113].

Il est conseillé d'instaurer un diurétique thiazidique ou un diurétique bloquant les canaux calciques chez les patients de plus de 60 ans souffrant d'hypertension systolique, en raison des données de morbidité et de mortalité encourageantes avec ces classes de traitement (par rapport au placebo) et de l'efficacité supérieure en termes de réduction de la pression artérielle systolique [114].

D'après Merle *et al.* [115], environ 22% de la population recevait des médicaments antihypertenseurs. On retrouvait cette proportion dans toutes les tranches d'âge qui était nettement plus élevée chez les femmes (25,7% contre chez les hommes 15,8%). Les trois types de thérapie pour les patients hypertendus étaient également répartis comme suit:

- ✓ 36,7 % recevaient une monothérapie ;
- ✓ 30,3 % une bithérapie ;
- ✓ 30,0 % une trithérapie.

Les diurétiques étaient la classe de médicaments antihypertenseurs la plus fréquemment utilisée, étant prescrits à 52,6 % des patients hypertendus. Les inhibiteurs calciques sont la deuxième classe la plus fréquemment prescrite (44,7 %), suivis des inhibiteurs des récepteurs de l'angiotensine II (32,3 %), des bêta-bloquants (31,6 %) et des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (18,1 %). L'utilisation des antihypertenseurs vasodilatateurs et des antihypertenseurs centraux est encore limitée [115].

Les médicaments antihypertenseurs peuvent être divisés en deux catégories :

- ✓ Les bêta-bloquants, les alpha-bloquants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine font partie de la première catégorie agissant sur le système rénine-angiotensine.
- ✓ Les diurétiques et les inhibiteurs calciques font partie de la deuxième catégorie [116]. Et ils interfèrent avec les mécanismes sodium-dépendants.

Les quatre classes thérapeutiques qui devraient être utilisées en monothérapie en première intention sont les thiazides, les inhibiteurs calciques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II.

Lorsque la monothérapie est inefficace pour la baisse de l'hypertension artérielle, l'association de médicaments antihypertenseurs tels que les β -bloquants peut être utilisée en combinant les médicaments appropriés (synergiques/additifs) (**Figure 10**).

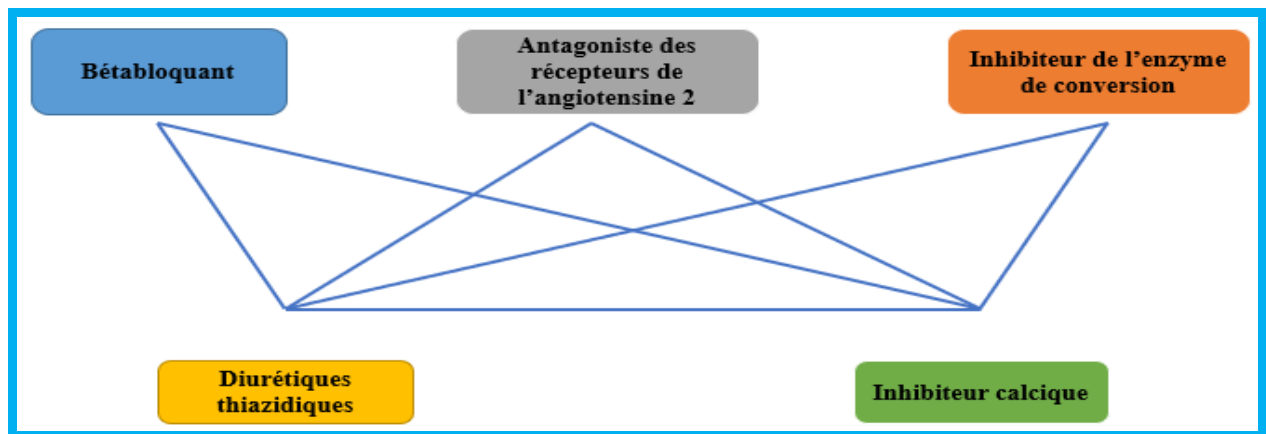


Figure 10: Schéma représentant l'association des classes thérapeutiques favorisant la baisse tensionnelle [117]. Les traits indiquent un effet additif sur la baisse tensionnelle. Panier 1 : bêta-bloquant, ARA2, IEC. Panier 2 : diurétique thiazidique, IC.

Egalement, la **Figure 11** montre les médicaments les plus importants utilisés pour régler les problèmes de l'hypertension, on note :

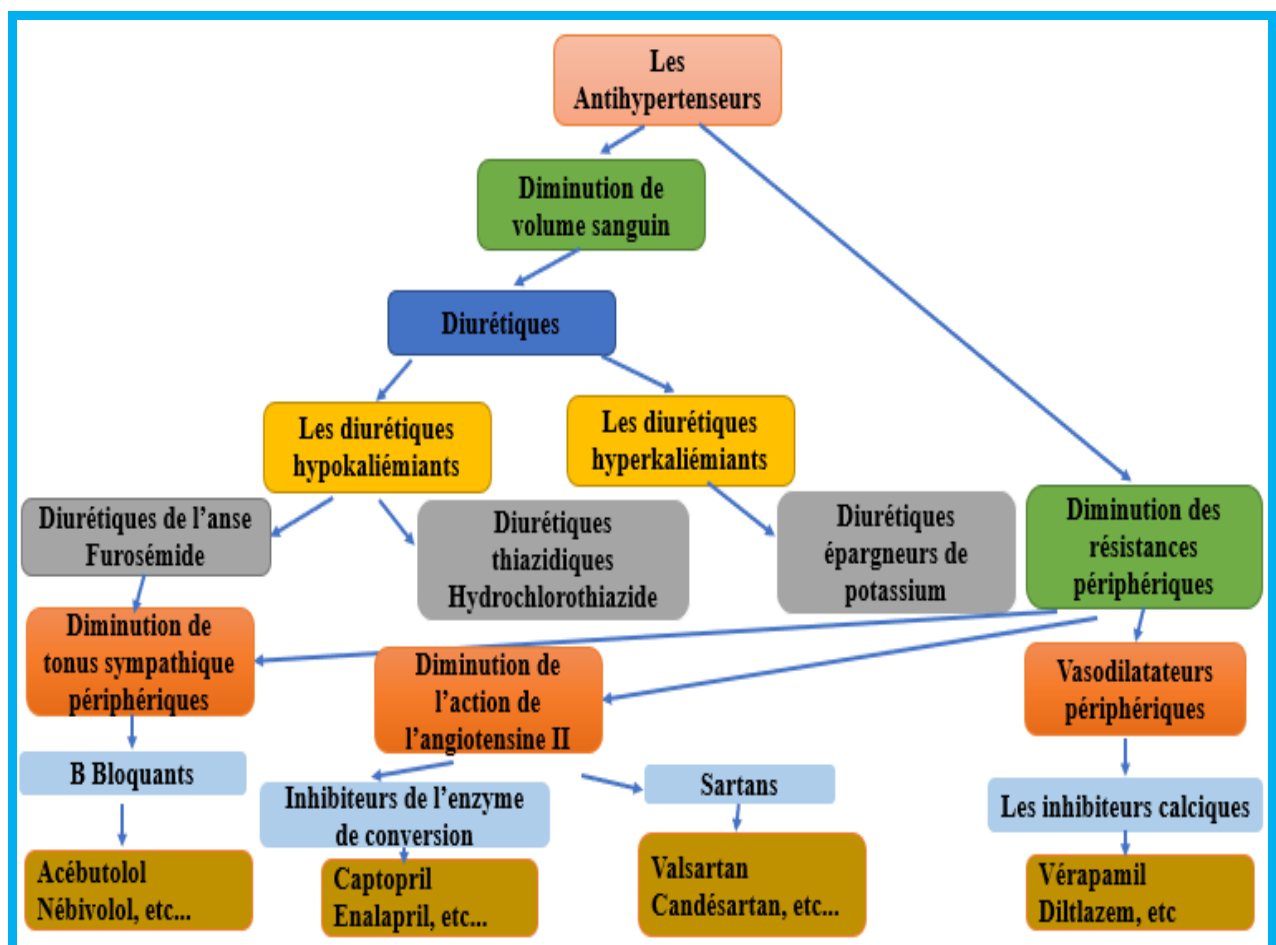


Figure 11: Schéma de présentation générale des médicaments antihypertenseurs [118].

5.2.1. Les diurétiques

Les diurétiques ont un effet natriurétique, c'est à dire qu'ils augmentent l'élimination urinaire par le rein de l'eau et du sodium, diminuant ainsi la volémie et donc la PA. Ils aident les reins à excréter l'excès de sel et d'eau. Ils constituent la première ligne de traitement antihypertenseur et sont souvent le médicament de choix pour la plupart des personnes souffrant d'hypertension. Ils sont également particulièrement bénéfiques dans le traitement des patients souffrant d'insuffisance cardiaque, d'hypertension systolique isolée, des personnes âgées et des diabétiques. Les diurétiques sont souvent prescrits en association avec d'autres médicaments antihypertenseurs. Les trois principaux types de diurétiques utilisés pour contrôler l'hypertension sont les suivants [111]:

- ✓ Les diurétiques thiazidiques (comme l'hydrochlorothiazide).
- ✓ Les diurétiques de l'anse (comme le furosémide), qui agissent plus rapidement et sont plus puissants que les autres diurétiques. Par conséquent, il est essentiel d'éviter la déshydratation et la perte de potassium.
- ✓ les diurétiques qui abaissent le taux de potassium (comme la spironolactone).

5.2.2. Les bêta-bloquants

Les bêta-bloquants agissent comme des médicaments antagonistes des récepteurs bêta-adrénergiques du système nerveux autonome sympathique. Ce sont des inhibiteurs compétitifs des catécholamines. Les récepteurs β se situent en particulier au niveau du cœur (β 1), des bronches (β 2) et des vaisseaux (β 2). Ce sont des médicaments de première intention qui sont utilisés pour le traitement de l'hypertension artérielle systémique, seuls ou en association avec d'autres agents antihypertenseurs. La propriété commune des médicaments de la classe des β -bloquants est qu'ils bloquent la liaison des catécholamines aux sites des récepteurs β -adrénergiques [119].

Parmi les mécanismes d'action expliquant l'action antihypertensive des bêta-bloquants [120] on cite:

- ✓ La réduction du débit cardiaque, en réponse à la bradycardie, est l'un des facteurs les plus importants pour abaisser la PA moyenne.
- ✓ La réduction du débit cardiaque.

5.2.3. Les alpha-bloquants

Bien que les alpha-bloquants agissent en bloquant les récepteurs alpha-adrénergiques, les recherches ont révélé qu'ils sont inefficaces pour traiter l'hypertension et ont des effets néfastes sur le système neurologique des patients hypertendus [121].

Les récepteurs alpha-adrénergiques sont classés en deux types: alpha-1 et alpha-2. La majorité des récepteurs alpha-1 adrénergiques se trouvent sur le muscle lisse vasculaire (dans la peau, les sphincters gastro-intestinaux, les reins et le cerveau) et provoquent une vasoconstriction lorsqu'ils sont activés par des catécholamines comme l'épinéphrine et la norépinéphrine (NE). Cette vasoconstriction entraîne une augmentation de la pression artérielle systémique et de la résistance périphérique. La norépinéphrine se lie à ce récepteur plus fortement que l'épinéphrine. Lorsqu'ils sont activés, les récepteurs alpha-2 adrénergiques situés sur les terminaisons nerveuses périphériques inhibent la libération de NE, fournissant ainsi un mécanisme de rétroaction à la NE pour inhiber sa libération [122].

5.2.4. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) joue un rôle dans le système rénine-angiotensine-aldostérone et dans le système kallikréine-kinine. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) sont présents dans les cellules endothéliales pulmonaires, les capillaires, les veinules et les cellules endothéliales des petites et grandes artères. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ciblent une zinc-métalloprotéinase pluripotente qui catalyse la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. L'inhibition de la production d'angiotensine II entraîne la dilatation des petites artères de résistance, une diminution de la résistance périphérique globale et une baisse de la pression artérielle car l'angiotensine II est un puissant peptide vasoconstricteur. Le débit cardiaque reste le même. La fréquence cardiaque ne change pas malgré la réduction de la pression artérielle, et il n'y a pas d'hypotension posturale. Ceci est probablement dû au fait que les IEC restaurent la fonction baroréceptrice. En outre, en cas d'hypertension non contrôlée, les inhibiteurs de l'ECA abaissent efficacement la pression artérielle et les paramètres cardiovasculaires [120, 123].

D'autres mécanismes ont été proposés, comme une augmentation des concentrations de bradykinine (un vasodilatateur peptidique) en réponse à l'inhibition de la kininase II (une enzyme semblable à l'ECA), qui participe à la transformation de la bradykinine sous forme de peptides inactifs. En outre, l'ECA est responsable de la dégradation de l'angiotensine (1-7). Ainsi, les IEC peuvent augmenter la concentration plasmatique d'angiotensine (1-7) qui est formée dans la

couche endothéliale des vaisseaux sanguins humains et agit comme un agent vasodilatateur et antiprolifératif [124].

5.2.5. Les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II

Tous les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II sont des antagonistes non peptidiques, ils sont tous des antagonistes AT1 et sont spécifiques des récepteurs AT1. La majorité des antagonistes AT1 sont non compétitifs. L'administration d'un antagoniste AT1 provoque une augmentation dose-dépendante de la rénine plasmatique, qui est liée à l'interruption du rétrocontrôle négatif de l'angiotensine II sur la sécrétion de rénine par le blocage des récepteurs AT1. Il est devenu évident que l'inhibition du système rénine-angiotensine n'était pas maximale après le succès des inhibiteurs de l'ECA dans les années 1980, en particulier dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et de la néphropathie diabétique, en raison notamment du rétrocontrôle exercé par la rénine et l'angiotensine I. En conséquence, une option thérapeutique de l'hypertension est le blocage compétitif des récepteurs AT1 de l'angiotensine II par des inhibiteurs peptidiques puis non peptidiques [125].

5.2.6. Les vasodilatateurs directs

Les vasodilatateurs directs abaissent la pression artérielle par dilatation des vaisseaux périphériques. Ils ont la capacité d'agir sur les vaisseaux de résistance, les grosses artères et les vaisseaux de capacité (veines). Une forte action sur les vaisseaux de résistance peut entraîner une diminution immédiate de la pression artérielle. La relaxation des vaisseaux de capacité, en revanche, entraîne une diminution du retour veineux vers le cœur et une baisse du débit cardiaque associée à la pression [126]. Le seul membre de cette classe qui est fréquemment utilisé comme traitement de deuxième ou troisième intention est l'hydralazine.

5.2.7. Les agents à action centrale

Les médicaments antihypertenseurs à action centrale les plus couramment utilisés sont la clonidine, un agoniste alpha2-adrénergique, la rilménidine, qui agit sur les récepteurs non adrénergiques de l'imidazoline et la méthyldopa.

Les agonistes alpha2-adrénergiques, tels que la clonidine, stimulent les récepteurs alpha2-adrénergiques dans le tronc cérébral, entraînant une baisse de la production sympathique dans le système nerveux central. L'effet hypotenseur est directement lié à une diminution des concentrations plasmatiques de norépinéphrine. La clonidine abaisse la pression artérielle en affectant à la fois le débit cardiaque et la résistance périphérique totale. Une sédation, une

fatigue, une sécheresse buccale, une diminution de la libido, des troubles du sommeil avec des rêves vifs, une bradycardie symptomatique et des blocs auriculo-ventriculaires ont été rapportés chez des patients prédisposés [127].

La rilménidine est le premier exemple d'un médicament hypotenseur qui privilégie les récepteurs de l'imidazoline par rapport aux traditionnels récepteurs alpha-2-adrénergiques. En comparant la rilménidine à la clonidine, la rilménidine présente une sélectivité deux à trois fois supérieure pour les récepteurs non adrénergiques de l'imidazoline dans le noyau réticulaire latéral [128].

La rilménidine abaisse la pression artérielle de manière dose-dépendante, en agissant comme un vasodilatateur par diminution de la résistance vasculaire via l'inhibition du système nerveux adrénergique, bien que la pression artérielle varie avec la station debout et l'exercice physique [129].

5.2.8. Les antagonistes du calcium

Les inhibiteurs calciques (IC) constituent une classe de médicaments diversifiée qui comprend le vérapamil (une benzothiazépine), le diltiazem (une phénylalkylamine) et les dihydropyridines (DHP) comme la nifédipine et l'amlodipine [130].

Les inhibiteurs calciques agissent en empêchant le calcium de pénétrer dans l'espace intracellulaire. Cette action est plus prononcée sur les muscles lisses cardiaques et vasculaires. Ils ont un fort effet vasodilatateur et antispasmodique, diminuant la consommation d'oxygène du myocarde et inhibant le couplage contraction-relaxation des fibres myocardiques ou du muscle lisse vasculaire [131].

5.3. Un modèle animal expérimental d'hypertension: rat hypertendu au L-NAME

Les animaux, en particulier les rats, peuvent être soit génétiquement ou expérimentalement induits à avoir une hypertension artérielle. Par exemple, un rat peut génétiquement être hypertendu. Cependant, il existe également des rats hypertendus expérimentalement comme les rats Wistar. Le modèle choisi est déterminé par la molécule étudiée dans le développement de l'hypertension. Par exemple, les rats hypertendus au NGnitro L-arginine méthyl ester (L-NAME). Ceux-ci développent une hypertension lorsque le L-NAME bloque la production d'oxyde nitrique. Comme le L-NAME bloque la NO synthase, il sera difficile pour le NO d'être biodisponible. Le NO est impliqué dans le contrôle de la pression sanguine selon ce modèle d'hypertension. Ce sujet sera abordé en profondeur ci-dessous.

5.4. Phytothérapie

Compte tenu des effets secondaires des médicaments utilisés et des coûts élevés de certaines classes thérapeutiques. De ce fait, les solutions thérapeutiques alternatives, dont la phytothérapie, sont parfois souhaitables pour certaines populations.

L'approche ethnopharmacologique a permis de recenser des centaines de plantes médicinales utilisées historiquement dans le traitement de l'hypertension. Un nombre important d'études expérimentales ont également permis de mettre en évidence des caractéristiques pharmacologiques justifiant certains usages traditionnels. À cet égard, des chercheurs universitaires ont mené des essais cliniques dans le monde entier. Plusieurs espèces ont développé un intérêt particulier pour les capacités de dépistage pharmacologique et biologique des plantes médicinales pour le traitement de l'hypertension. L'une des plantes les plus étudiées pour le traitement de la tension artérielle et des symptômes cardiovasculaires est l'ail (*Allium sativum*), qui contient un composé bioactif clé, l'allicine [19]. Selon les rapports, l'ail est un traitement naturel efficace contre les maladies cardiovasculaires car il réduit le cholestérol, possède des caractéristiques antiplaquettaires, réduit l'athérosclérose, réduit l'inflammation vasculaire chronique et le stress oxydatif et contrôle la vasorelaxation. Les effets antidiabétiques et pro-rénaux de l'ail sont particulièrement remarquables [132]. Le céleri (*Apium graveolens*) est une autre plante antihypertensive importante qui a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. Les graines de céleri sont utilisées pour traiter l'hypertension, les maladies épileptiques, comme diurétique, le diabète, et il a été prouvé qu'elles ont une activité antiplaquettaire [133]. Les graines de céleri se sont révélées plus hypotensives et cardiodépressives. L'apigénine, l'un des principaux phytocomposants du céleri, est un flavonoïde présent dans un certain nombre de fruits, de légumes, d'aliments fonctionnels et de plantes médicinales [134].

Divers composés biologiquement actifs, notamment les polyphénols, les flavonoïdes, les catéchines, les tanins, les terpénoïdes, les alcaloïdes, les quinones, etc., sont présents dans les espèces de plantes médicinales à des concentrations variées et peuvent réduire l'augmentation de la tension artérielle. Selon les données actuelles, les polyphénols ayant des structures spécifiques sont responsables des caractéristiques thérapeutiques des phénols en termes de protection contre les maladies cardiovasculaires. Même si les besoins structurels particuliers diffèrent, ils contribuent tous aux actions vasoprotectrices, antiangiogéniques, antiathérogéniques, vasorelaxantes et antihypertensives des polyphénols rapportées *in vivo* chez l'animal et chez l'homme. Les avantages cardiovasculaires des produits végétaux naturels ne sont généralement pas confirmés par les données des grands essais cliniques. Cependant, un nombre important de

recherches cliniques ont été menées récemment pour démontrer la valeur thérapeutique des plantes médicinales. De nombreuses études biologiques et pharmacologiques ont été réalisées sur divers extraits bruts obtenus à partir de différentes plantes médicinales. *Matricaria chamomilla* L., *Apium graveolens*, *Coriandrum sativum*, *Allium sativum*, *Inula viscosa* L., *Urtica dioica* L. et d'autres espèces font partie de ces espèces [135].

Au Maroc, les connaissances sur les plantes médicinales sont culturellement importantes et pourraient un jour contribuer à la mise au point de nouveaux traitements. Selon des recherches ethnobotaniques menées dans plusieurs régions du Maroc, un certain nombre d'espèces végétales sont employées dans le traitement conventionnel de l'hypertension [136]. Parmi toutes les espèces végétales utilisées dans la médecine marocaine pour traiter l'hypertension, on peut citer les plantes suivantes: *Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis*, *Haloxylon scoparium*, *Ruta Montana*, *Warionia sahare*, *Tanacetum vulgare*, *Artemisia herba-alba*, *Artemisia campestris*, *Asteriscus graveolens*. De nombreux extraits de plantes se sont révélés prometteurs pour le traitement de l'hypertension et des maladies concomitantes associées, telles que les maladies coronariennes, l'angine de poitrine, l'arythmie et l'insuffisance cardiaque congestive [137].

L'objectif de cette thèse était d'apporter un soutien empirique à l'utilisation médicale traditionnelle marocaine de nombreuses plantes antihypertensives. Notre recherche visait d'une part à identifier les propriétés pharmacologiques et les mécanismes d'action des extraits aqueux de plantes médicinales marocaines. Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'effet vasodilatateur des extraits sur le modèle de rat Wistar des anneaux aortiques isolés car la régulation du tonus vasculaire joue un rôle crucial dans l'efficacité des thérapies antihypertensives. En outre, des recherches sont effectuées pour découvrir des plantes médicinales qui inhibent ou stimulent l'enzyme de conversion de l'angiotensine-2. En général, ces plantes ont été choisies sur la base des études ethnobotaniques réalisées dans notre laboratoire, puis rassemblées et analysées pharmacologiquement afin d'identifier celles qui ont des effets antihypertenseurs.

Chapitre II.

Matériels et méthodes

I. Matériel et Méthodes

1. Choix des plantes médicinales étudiées

Les plantes médicinales et aromatiques de la région de Draa-Tafilalet représentent un véritable arsenal des ressources de la région. En effet, la population locale et les herboristes conseillent les plantes suivantes : *Hibiscus rosa-sinensis*, *Euphorbia cheiradenia*, *Haloxylon scoparium*, *Ammodaucus leucotrichus*, *Ammi visnaga* pour leurs utilisations contre les maladies cardiovasculaires, notamment l'hypertension. Cependant, l'activité hypertensive de ces plantes n'a pas été étudiée. C'est pourquoi nous avons choisi ces plantes comme sujet d'étude dans ce travail.

1.1. Données bibliographiques de l'*Hibiscus rosa-sinensis*

Hibiscus rosa-sinensis (*H. rosa-sinensis*) appartient à la famille des Malvacées, elle est traditionnellement utilisée pour traiter l'asthme bronchique, la toux, la fièvre, la dysenterie, les maladies vénériennes et les gonflements cancéreux [138, 139]. Elle est également utilisée pour traiter l'hypertension, la production de cholestérol et la progression du cancer [140]. Les feuilles de cette plante sont laxatives et apéritives. L'écorce de la tige peut être utilisée comme abortif. Les racines sont utilisées pour traiter les problèmes d'estomac, la gonorrhée, les vomissements de sang et les maladies vénériennes [141, 142]. Elle est également utilisée comme antitussif et pour traiter certaines maladies du bétail. Les racines et les feuilles peuvent être utilisées pour stimuler la circulation sanguine et aider à réguler les menstruations. Les extraits de fleurs sont utilisés pour traiter les ulcères, les maux des yeux, ainsi que pour lutter contre les troubles cardiaques et les infections pulmonaires [141, 142]. Les données suggèrent que les groupes de flavonoïdes, d'alcaloïdes, de triterpénoïdes, de tanins, de composés phénoliques et d'alcaloïdes sont présents dans *H. rosa-sinensis*. Cette espèce possède une grande variété d'applications pharmacologiques, telles que des activités antimicrobienne, antioxydante, antidiabétique, anti-inflammatoire, antifertilité, antifongique, anticancéreuse, stimulante pour la croissance des cheveux, antihyperlipidémique, antidépressive et antipyrétique [143].

1.2. Données bibliographiques de l'*Euphorbia cheiradenia*

Euphorbia cheiradenia Boiss. & Hohen. appartient à la famille des Euphorbiaceae, également connue sous le nom de *Labania*. La plante est utilisée en ethnopharmacologie pour le traitement de la syphilis et de l'hypertension. De plus, des études pharmacologiques ont démontré ses effets anti-inflammatoire, cytotoxique, antimicrobienne, et immunostimulant [144]. Elle est utilisée contre les maladies respiratoires, les maladies infectieuses, les irritations du corps et de la peau, les troubles de la digestion, les infections inflammatoires, les douleurs corporelles, les

maladies microbiennes, les morsures de serpent ou de scorpion et contre les troubles sensoriels [145].

1.3. Données bibliographiques de l'*Haloxylon scoparium*

Haloxylon scoparium Pomel (Chenopodiaceae), est également connue sous le nom de *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin, ou *Remth* en arabe. Elle est largement répandue dans les régions désertiques et semi-désertiques, notamment dans le sud-est du Maroc (région du Drâa-Tafilalet), sur des sols riches en sel. C'est un arbuste nain, glabre, gris-brun, ligneux, qui devient généralement plus foncé ou noirâtre lorsqu'il est séché. La plante se présente sous forme d'herbes, d'arbustes, de sous-arbrisseaux et rarement de petits arbres [146]. *H. scoparium* est utilisée pour traiter les morsures de serpents, les scorpions, les maux d'estomac, le diabète et plusieurs autres maladies [147]. Cette plante est utilisée traditionnellement au Maroc comme agent antihypertenseur [5], et elle est souvent utilisée dans le traitement des néoplasmes cutanés, de la dermatite, des intoxications alimentaires, de l'arthrite rhumatoïde, de l'arthrose, de la gale, de la cicatrisation des plaies, de l'indigestion, des maux d'estomac, de la gastro-entérite, comme antidote aux piqûres de scorpions et aux morsures de serpents, ainsi que du rhume [148]. Il contient plusieurs alcaloïdes, tanins condensés et hydrolysables, saponines, stéroïdes, triterpénoïdes, coumarines, composés réducteurs et glycosides [149]. Elle possède plusieurs propriétés, notamment antibiotiques, antivirales et antifongiques [150], des effets antimicrobiens, antioxydants, larvicides, cytotoxiques antipaludiques, molluscicides, anticancéreux, réno-protecteurs et hépatoprotecteurs [147].

1.4. Données bibliographiques de l'*Ammodaucus leucotrichus*

Ammodaucus leucotrichus, une espèce appartenant à la famille des Apiaceae, également connue sous le nom de *Kamoun soufi*, elle possède un large éventail d'usages médicaux traditionnels, tels que la diarrhée, la toux, les maladies pulmonaires, l'anorexie, l'allergie, la tachycardie, l'helminthiase, les douleurs d'estomac, la gastralgie, l'otite, l'indigestion, le rhume, la fièvre, l'anorexie et les maladies cardiovasculaires. Des études phytochimiques ont démontré que cette plante possède de nombreux constituants chimiques bioactifs, notamment des monoterpènes et leurs dérivés, des sesquiterpènes et leurs dérivés, des tanins, des composés anthracéniques, des stérols, des triterpènes, des composés réducteurs, des alcaloïdes, des acides phénoliques, des saponines, des flavonoïdes et des coumarines. Les activités pharmacologiques les plus importantes sont antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, antidiabétiques, anti-inflammatoires, anticholinestérasiques et cytotoxiques [151].

1.5. Données bibliographiques de l'*Ammi visnaga*

Ammi visnaga L. (famille des Apiacées), également connue sous le nom de *Khella* ou *Bachnikha*, est une plante annuelle ou bisannuelle originaire de la région méditerranéenne d'Afrique du Nord, d'Asie et d'Europe. La plante est connue depuis longtemps comme étant utilisée en médecine traditionnelle. Aujourd'hui, elle est utilisée en médecine moderne pour traiter de nombreuses affections telles que les coliques néphrétiques et l'insuffisance coronarienne, elle est utilisée également comme antioxydant, antifongique et antibactérien. Selon des études, ces activités pharmacologiques sont dues à ses composants chimiques intéressants, qui comprennent principalement l'huile essentielle, les composés polyphénoliques, dont les flavonoïdes, et les γ -pyrones, représentés principalement par la khelline et la visnagin [152]. Son huile essentielle aurait des effets antiviraux, antibactériens et larvicides, tandis que sa teneur en flavonoïdes est responsable de son activité antioxydante. Sa teneur en γ -pyrone a un effet puissant pour faciliter le passage des calculs rénaux et soulager les coliques néphrétiques, ainsi qu'un effet relaxant sur les muscles lisses, dont ceux des artères coronaires. Il a également un effet relaxant sur les muscles lisses, notamment ceux des artères coronaires [152].

2. Matériel végétal et préparation de l'extrait aqueux

Les plantes utilisées dans cette étude ont été collectées dans la région de Darâa-Tafilalet (région semi-aride) du Maroc et séchées à l'abri du soleil. Les plantes ont déjà été identifiées taxonomiquement et authentifiées comme étant *Hibiscus rosa-sinensis* (L.), *Euphorbia cheiradenia* (L.), *Haloxylon scoparium* (L.), *Ammodaucus leucotrichus* (L.) et *Ammi visnaga* (L.). Un spécimen de référence a été déposé pour chaque plante dans l'herbier du laboratoire de l'Equipe Ethnopharmacologie & Pharmacognosie à la Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia. **La figure 12** présente la taxonomie des différentes plantes étudiées.

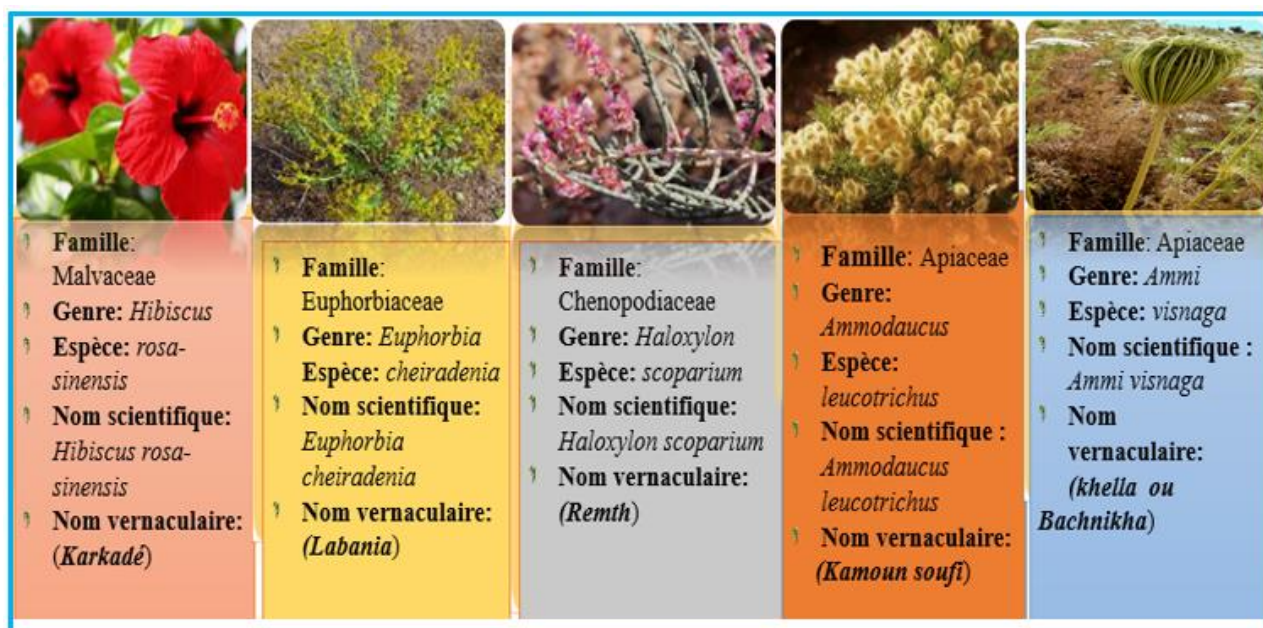


Figure 12: Caractéristiques botaniques des plantes médicinales étudiées.

La préparation de l'extrait a été réalisée selon la méthode traditionnelle utilisée au Maroc (Soxhlet) de la manière suivante : 5 g de la partie végétale en poudre, mélangés à 500 ml d'eau distillée, ont été bouillis pendant 15 min, puis refroidis à température ambiante pendant 15 min. Dans un deuxième temps, l'extrait aqueux a été filtré à travers un filtre Millipore (Millipore 0,2 mm, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) pour éliminer les particules. Le filtrat a ensuite été séché dans un four à 45°C et enfin l'extrait a été récupéré sous forme de poudre. Les extraits aqueux lyophilisés ont ensuite été préparés et reconstitués quotidiennement dans 1,5 ml d'eau distillée dans un tube Eppendorf, avant leur administration orale [153] (**Figure 13**).

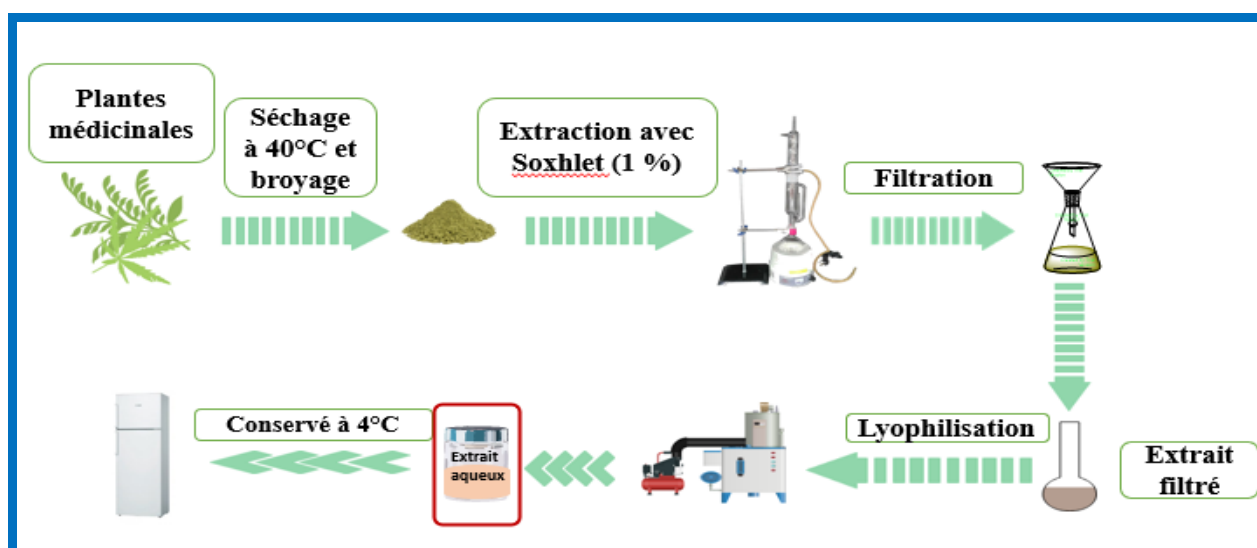


Figure 13: Préparation de l'extrait aqueux des plantes étudiées.

3. Animaux expérimentaux

Des rats albinos mâles adultes en bonne santé (souche Wistar) pesant environ 170-280 g ont été obtenus auprès d'un fournisseur commercial. Ils ont ensuite été maintenus dans des cages individuelles en polyéthylène à l'animalerie de la Faculté des Sciences et Technologies d'Errachidia. Ils ont été maintenus dans des conditions normales avec de la nourriture (régime normal de granulés de chow) et de l'eau *ad libitum* pendant cette étude. Les animaux ont été subdivisés en différents lots selon le type de protocole expérimental considéré. Les rats ont eu 3 semaines pour une meilleure acclimatation au stress de l'expédition [154] (**Figure 14**).



Figure 14: Rats albinos Wistar utilisés pour l'étude.

4. Les réactifs chimiques et médicaments

Le chlorure d'acétylcholine, la norépinéphrine (sel de bitartrate), l'ester méthylique de nitro-L-arginine (L-NAME), l'indométacine et MLN-4760 ont été achetés chez Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Les autres réactifs : furosémide (lasilix), nifédipine, propranolol, glibenclamide, bleu de méthylène et éther diéthylique étaient de qualité analytique et ont été obtenus auprès de sources locales. Tous les médicaments mentionnés ont été dissous dans de l'eau distillée.

4.1. N ω -nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME)

L-NAME, N ω -nitro-L-arginine méthyl ester a pour effet d'inhiber l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS) à la fois *in vitro* et *in vivo*. En outre, le traitement aigu et chronique par

le L-NAME entraîne des modifications de la pression artérielle et de la réactivité vasculaire en raison d'une diminution de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO). Cependant, des doses plus faibles de L-NAME peuvent également activer la production de NO par des mécanismes de régulation en retour si elles sont administrées pendant de longues périodes. De plus, l'activation par rétroaction de la production de NO par le L-NAME semble être diversement régulée dans des conditions hypertensives [155].

4.2. Furosémide

Le furosémide (Lasilix) est un diurétique de l'anse de type sulfamide, structurellement apparenté au bumétanide, utilisé pour traiter l'hypertension et les œdèmes associés à l'insuffisance cardiaque congestive, à la cirrhose et à l'insuffisance rénale, y compris le syndrome néphrotique. Le mécanisme d'action du furosémide consiste à inhiber la réabsorption d'eau dans le néphron en bloquant le cotransporteur sodium-chlorure de potassium (NKCC2) dans la branche ascendante épaisse de l'anse de Henle. Ceci est obtenu par une inhibition compétitive au niveau du site de liaison du chlorure sur le cotransporteur, empêchant ainsi le transport du sodium de la lumière de l'anse de Henle vers l'interstitium basolatéral. En conséquence, la lumière devient plus hypertonique que l'interstitium, qui devient moins hypertonique, diminuant ainsi le gradient osmotique pour la réabsorption d'eau dans le néphron. Comme la branche ascendante épaisse est responsable de 25 % de la réabsorption du sodium dans le néphron, le furosémide est un diurétique très puissant [156].

4.3. Noradrénaline

La norépinéphrine, ou norépinéphrine, est un composé qui agit comme une hormone adrénergique et un neurotransmetteur. C'est une catécholamine comme la dopamine ou l'adrénaline, sécrétée par la médullaire surrénale, un neurotransmetteur central et autonome très utilisé. C'est le principal transmetteur de la plupart des fibres sympathiques postganglionnaires et du système de projection diffus dans le cerveau provenant du locus coeruleus. On la trouve également dans les plantes et elle est utilisée pharmacologiquement comme sympathomimétique pour traiter les patients en choc vasodilatateur comme le choc septique et le choc neurogène. Elle est également utilisée comme médicament vasopresseur chez les patients souffrant d'hypotension critique. Elle agit sur les récepteurs adrénergiques alpha-1 et alpha-2 pour provoquer une vasoconstriction, entraînant une augmentation de la résistance vasculaire systémique et, par conséquent, une augmentation de la pression artérielle. Elle est également un stimulateur

inotrope du cœur et un dilateur des artères coronaires en raison de son activité sur les récepteurs bêta-adrénergiques [157].

4.4. Indométacine

L'indométacine est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) ayant des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques. C'est un inhibiteur non spécifique et réversible de l'enzyme cyclo-oxygénase (COX), ou prostaglandine G/H synthase. Il existe deux isoformes identifiées de la COX : la COX-1 est universellement présente dans la plupart des tissus de l'organisme et participe à la synthèse des prostaglandines et du thromboxane A₂, tandis que la COX-2 est exprimée en réponse à une blessure ou une inflammation. La COX1 catalyse la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine (PG) G₂ et de la PGG₂ en PGH₂. La COX-2 catalyse également la conversion de l'acide arachidonique en PGG₂ et de la PGG₂ en PGH₂. Dans la voie médiée par la COX-2, le PGH₂ est ensuite converti en PGE₂ et PGI₂ (également appelé prostacycline) [158].

4.5. Bleu de Méthylène

Le chlorure de méthylthioninium (MTC), ou bleu de méthylène, est un médicament ayant de nombreuses utilisations en médecine, comme l'amélioration transitoire et reproductible de la pression artérielle et de la fonction cardiaque dans le choc septique, comme le développement ou la persistance de l'hypotension artérielle. Son principal mécanisme d'action est impliqué dans l'inhibition de l'oxyde nitrique synthase et de la guanylate cyclase [159].

4.6. Glibenclamide

Le glibenclamide est un agent antihyperglycémiant oral utilisé dans le traitement du diabète non insulino-dépendant. Il appartient à la classe des sulfonylurées de deuxième génération, sécrétagogues de l'insuline, il abaisse de façon aiguë la glycémie en stimulant la libération d'insuline par les cellules β pancréatiques. Les sulfonylurées augmentent également l'utilisation périphérique du glucose, diminuent la gluconéogenèse hépatique et peuvent augmenter le nombre et la sensibilité des récepteurs de l'insuline.

Les sulfonylurées, telles que le glibenclamide, se lient aux canaux potassiques sensibles à l'ATP à la surface des cellules pancréatiques, ce qui réduit la conductance du potassium et provoque une dépolarisation de la membrane. La dépolarisation stimule l'afflux d'ions calcium par les canaux calciques sensibles au voltage, augmentant les concentrations d'ions calcium intracellulaires, ce qui induit la sécrétion ou l'exocytose d'insuline [160].

4.7. Propranolol

Le propranolol est un prototype des antagonistes des récepteurs bêta-adrénergiques et est un bêta-bloquant non cardiosélectif. Il entre en compétition avec les neurotransmetteurs sympathomimétiques tels que les catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine) pour se lier aux récepteurs bêta(1)-adrénergiques cardiaques et non cardiaques (vasculaires, bronchiques), inhibant ainsi la stimulation sympathique. Il en résulte une réduction de la fréquence cardiaque au repos, du débit cardiaque, de la pression artérielle systolique et diastolique et une hypotension orthostatique réflexe. Il est utilisé dans le traitement ou la prévention de nombreux troubles, notamment l'infarctus du myocarde aigu, les arythmies, l'angine de poitrine, l'hypertension, les urgences hypertensives, etc. Le propranolol, un β -bloquant β -adrénergique non sélectif, est capable d'inhiber l'action de l'adrénaline et de la noradrénaline via les récepteurs β 1- et β 2-adrénergiques [161].

4.8. Nifedipine

La nifédipine est un inhibiteur des canaux calciques de type 1,4-dihydropyridine à action longue et courte, ce médicament agit principalement sur les cellules musculaires lisses vasculaires en stabilisant les canaux calciques de type L dépendants du voltage dans leur conformation inactive [162].

4.9. MLN-4760

Le MLN-4760 est un inhibiteur spécifique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (ECA-2) [154].

5. Protocole expérimental

5.1. Activité hypotensive

L'hypertension a été induite chez des rats albinos wistar mâles par une administration orale répétée (par gavage à la seringue, une fois par jour pendant 20 jours) de L-NAME (60 mg/kg de poids corporel) dissous dans de l'eau distillée. Les rats témoins normaux ont reçu de l'eau distillée comme véhicule. Après 20 jours, une induction de l'hypertension a été déclenchée et confirmée par une élévation de la pression artérielle systolique ≥ 150 mmHg. Les rats sont devenus hypertendus et ils ont été utilisés pour les manipulations.

Des rats normotendus et hypertendus ont été répartis au hasard dans trois groupes différents composés de cinq rats chacun (n=5). Le premier groupe a reçu de l'eau distillée et a servi de groupe témoin, le deuxième groupe traité a reçu l'extrait aqueux des plantes étudiées à des doses

de choix en mg/kg de poids corporel, et le troisième groupe a reçu un médicament de référence (Lasilix à une dose de 20 mg/kg).

La pression sanguine systolique (PAS), la pression artérielle moyenne (PAM) et la fréquence cardiaque (FC) des animaux ont été mesurées avant le début des expériences et considérées comme des données de prétest (J0). Pour une administration orale unique, de l'eau distillée (contrôle), du Lasilix ou un extrait aqueux ont été administrés, les différents paramètres ont été mesurés 6 heures après le gavage et considérés comme un test aigu (T6h).

Pour l'administration orale répétée (chronique), les rats ont été traités une fois par jour avec le même temps de gavage pendant 7 jours et les mêmes paramètres de pression sanguine systolique (PAS), de pression artérielle moyenne (PAM) et de fréquence cardiaque (FC) ont été surveillés pendant cette période à J2, J4 et J7. Toutes les expériences ont été réalisées après anesthésie légère des animaux avec de l'éther diéthylique pour éviter l'induction du stress et l'immobilisation. Pour estimer la pression artérielle, des rats ont été placés dans les dispositifs de contention NIBP et un brassard approprié avec capteur a ensuite été fixé sur la queue puis les animaux ont été chauffés à environ 35 °C pendant 15 à 20 min pour permettre des mesures reproductibles de la pression artérielle (trois mesures par animal par session) à l'aide d'un manchon de queue et d'un appareil de surveillance assisté par ordinateur (Harvard, Boyer, Casablanca, Maroc). Le brassard de queue a été gonflé à une pression supérieure à la pression artérielle systolique attendue (200 mmHg) et libéré lentement pendant une période au cours de laquelle les impulsions ont été enregistrées en utilisant le système d'acquisition de données Power Lab et le logiciel Lab chart 5.0 (Harvard, Boyer, Casablanca, Maroc). La pression artérielle systolique (PAS), la pression artérielle moyenne (PAM) et la fréquence cardiaque (FC) ont été mesurées directement en utilisant le suivi du pouls tandis que la pression artérielle diastolique (PAD) a été calculée à partir de PAS et PAM en utilisant la formule : **PAD = (3PAM-PAS) / 2**. Après avoir atteint la pression artérielle de 200 mmHg, l'amplitude des impulsions était relativement constante et très faible. Lorsque l'amplitude du pouls commence à augmenter, cela correspond à la valeur de la PAS. Ensuite, l'amplitude du pouls continue à augmenter progressivement. Lorsque cette amplitude atteint son maximum, elle correspond à la pression artérielle moyenne (PAM) [163]. Toutes les mesures de la pression artérielle ont été effectuées au même moment de la journée pour le test subchronique (**Figure 15**).



Figure 15 : Appareil de mesure de la pression artérielle : Moniteur de pression artérielle à queue de rat.

5.2. Activité vasorelaxante

Des rats mâles de la souche Wistar (250–300 g) ont été élevés et hébergés ($n = 6$ par cage) dans des pièces avec un cycle lumière/obscurité contrôlé avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Les animaux ont été sacrifiés par étourdissement et exsanguination après anesthésie au pentobarbital sodique. Les aortes ont été immédiatement excisées et placées dans un tampon froid, puis rapidement retirées et soigneusement nettoyées de la graisse adhérente et du tissu conjonctif.

Les aortes isolées ont été coupées transversalement en anneaux de 2 à 3 mm de long et suspendues à une force de repos de 2 g dans un bain de tissu oxygéné et contenant 40 ml de la solution de Krebs-Henseleit (KH), maintenues à 37 °C et à pH=7,4 et contenant (mM) : NaCl (118), KCl (4,50), NaHCO₃ (25), MgSO₄ (1,2), CaCl₂ (1,8), NaHPO₄ (1,2) et glucose (11). Les changements de longueur ont été enregistrés isométriquement à l'aide d'un transducteur à levier (Erma, Tokyo). Les anneaux aortiques étaient montés sur deux crochets en acier inoxydable, l'un fixé au bas de la chambre et l'autre à un transducteur de force UF1 (LCM Systems Ltd) connecté à un système d'acquisition de données PowerLab/400 ADInstrument (Harvard, Boyer, Casablanca, Maroc) afin d'enregistrer le signal correspondant à la tension isométrique. L'étude a été réalisée sur des aortes à endothélium intact.

La tension optimale, choisie à partir d'expériences préliminaires, était la tension qui donnait la plus grande réponse à 10^{-5} de norépinéphrine. Les anneaux ont reçu 2 g (100 %) de tension initiale et ont été laissés à l'équilibre pendant au moins 1 heure. Trente minutes après la mise en place des aortes en bain de tissu, les anneaux ont été contractés avec une solution de norépinéphrine (NE) 10^{-5} M ou une solution de chlorure de potassium (KCl) 80 mM pour tester leurs réponses contractiles. Après l'exposition à 10^{-5} M de norépinéphrine, les tissus ont été lavés trois fois avec la solution Krebs pour rétablir la tension basale et cette solution a été renouvelée toutes les 40 min. Afin de déterminer les courbes cumulatives dépendant de la dose pour la relaxation induite par les extraits des plantes étudiées et après équilibrage, les anneaux ont été contractés par NE (10 μ M) et KCl (80 mM). Après que le plateau a été atteint, l'extrait analysé a été ajouté cumulativement aux différentes doses choisies en μ g /ml, à chaque dose d'extrait aqueux de plante, la courbe a pu atteindre un plateau avant l'ajout de la dose suivante. Pour déterminer la voie mécanistique impliquée dans l'effet relaxant induit par l'extrait sur les anneaux aortiques de rat précontractés avec la NE, l'expérience suivante a été réalisée : vingt minutes avant l'ajout de NE, les anneaux aortiques ont été préincubés pendant 20 min avec l'un des différents médicaments standards. Les médicaments utilisés pour la préincubation étaient : 1) 10^{-4} M L-NAME, un inhibiteur direct de l'oxyde nitrique (NO) synthase. 2) 10 μ M de glibenclamide, un bloqueur des canaux K^{+} sensible à l'ATP. 3) 10 μ M d'indométhacine, un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines. 4) 10 μ M de propranolol, un bêta-bloquant. 5) 10 μ M de bleu de méthylène (MB), un bloqueur de NO-guanosine monophosphate (cGMP). 6) 10 μ M de nifédipine, un bloqueur des canaux calciques. 7) MLN-4760 est un inhibiteur spécifique de l'ECA-2. Après l'ajout de NE (10^{-5} M), la relaxation aortique a été réalisée par addition cumulative de l'extrait aqueux en additionnant les différentes doses choisies en μ g /ml.

L'effet vasorelaxant sur les anneaux aortiques a été calculé en pourcentage de contraction en réponse à la norépinéphrine. Avant de changer l'un des agents pharmacologiques utilisés dans cette expérience, l'anneau de l'aorte a été lavé trois fois (l'anneau de l'aorte doit être incubé pendant 5 min dans chaque bain de lavage). Le contrôle a été effectué par addition cumulative de véhicule (eau distillée) (différentes doses choisies en μ g /ml) aux anneaux aortiques précontractés par la NE (10^{-5} M) et KCl (80 mM) [164] (**Figure 16**).

Chapitre III

Étude d'*Hibiscus rosa-sinensis* L.

Ce chapitre se compose de la publication 1:

Publication 1: Amtaghri, S., Amssayef, A., Slaoui, M., and Eddouks, M. (2022). Antihypertensive and Vasorelaxant Effects of *Hibiscus rosa-sinensis* through Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2), and Ca^{2+} Channels Pathways. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*, 22(1), 27-37.

Article 1:

Antihypertensive and Vasorelaxant Effects of *Hibiscus rosa-sinensis* through Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2), and Ca²⁺ Channels Pathways

Résumé de l'article 1 :

Des investigations pharmacologiques ont été entreprises au cours de ce travail afin de compléter le manque de données scientifiques relatives à l'utilisation antihypertensive de la plante *Hibiscus rosa-sinensis*. A cet effet, l'extrait aqueux d'*Hibiscus rosa-sinensis* a été préparé par la méthode traditionnelle marocaine (décoction) afin de valider expérimentalement et scientifiquement l'effet antihypertenseur et vasorelaxant de cette plante ornementale.

L'activité antihypertensive *in vivo* a été mesurée et les résultats obtenus montrent que l'administration orale aiguë de cette plante n'a pas modifié les paramètres de la pression sanguine (pression artérielle systolique (SBP), pression artérielle moyenne (MAP), pression artérielle diastolique (DBP) et la fréquence cardiaque (HR)) chez des rats normotendus et hypertendus. En revanche, l'administration orale répétée d'*Hibiscus rosa-sinensis* pendant 7 jours a diminué les paramètres de la pression artérielle (SBP, MAP et DBP) chez les rats hypertendus au L-NAME sans entraîner de diminution de ces paramètres chez les rats normotendus.

En outre, les effets vasorelaxants de l'extrait aqueux ont été étudiés *in vitro*. Les mécanismes qui sont impliqués dans l'action vasodilatatrice de la plante sont significativement plus efficaces. En effet, l'extrait a induit un effet vasorelaxant dans les anneaux aortiques isolés de rat qui a été médié au moins par la stimulation de l'ACE-2 et le blocage de l'entrée de Ca²⁺. De plus, l'extrait aqueux d'*Hibiscus rosa-sinensis* a induit une vasorelaxation par une voie indépendante de l'endothélium. L'effet vasorelaxant de l'extrait n'a pas été médié par la voie NO-cGMP, la voie de la cyclooxygénase vasculaire, les récepteurs β -adrénergiques, les canaux K⁺ ou la voie directe du NO.

Antihypertensive and Vasorelaxant Effects of *Hibiscus rosa-sinensis* through Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2), and Ca²⁺ Channels Pathways

Smail Amtaghri^{1,2}, Ayoub Amssayef¹, Miloudia Slaoui², Mohamed Eddouks^{1*}

Cardiovasc. Hematol. Disord. - Drug Targets, (2022), DOI:

<https://doi.org/10.2174/1871529X22666220329190331>

¹*Team of Ethnopharmacology and Pharmacognosy, Faculty of Sciences and Techniques Errachidia, Moulay Ismail University of Meknes, Errachidia, Morocco. BP 509 Errachidia, Morocco.*

²*Team EMDD, Center of CERNE2D, Ecole Supérieure de Technologie, Boulevard Mohamed VI Salé, Université Mohammed V in Rabat, Morocco.*

**Corresponding author:*

Address of Correspondence: Faculty of Sciences and Techniques Errachidia, Moulay Ismail University of Meknes, Errachidia, Morocco. BP 509 Errachidia, Morocco. Phone: +212535574497. Fax: +212535574485. E.mail: mohamed.eddouks@laposte.net

Abstract

Aims: The aim of the study was to assess the antihypertensive activity of *Hibiscus rosa-sinensis*.

Background: *Hibiscus rosa-sinensis* is used traditionally to treat hypertension.

Objective: The goal of the study was to investigate the effect of the aqueous extract of *Hibiscus rosa-sinensis* flowers (AEHRS) on resting blood pressure in rats.

Material and Methods: In the present study, AEHRS was prepared and its antihypertensive activity was evaluated using *in vivo* and *in vitro* studies. In the *in vivo* study, hypertensive and normotensive rats were treated by AEHRS (100 mg/kg) orally for 6 hours in the acute treatment and for 7 days in the subchronic treatment. Systolic, diastolic, and mean arterial blood pressure values and heart rate were then recorded using a tail cuff and a computer-assisted monitoring device. To assess the vasorelaxant activity of AEHRS, isolated thoracic aortic rings were suspended in a tissue bath and changes in tension were recorded using a data acquisition system. Potential pathways involved in the vasorelaxant activity were evaluated using several standard pharmacological agents.

Results: The results indicated that repeated oral administration of AEHRS during 7 days lowered systolic, diastolic, and mean arterial blood pressure in hypertensive rats without affecting normotensive rats. Furthermore, the data revealed that AEHRS exerts vasorelaxant properties via an endothelium-independent pathway. More interestingly, the study demonstrates that the vasorelaxant capacity of AEHRS seems to be exerted through the stimulation of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2) and the inhibition of Ca^{2+} channels pathway.

Conclusion: The present study revealed that aqueous extract of *Hibiscus rosa-sinensis* has a significant antihypertensive activity and that its vasorelaxant effect may be mediated through stimulation of ACE-2, and inhibition of the Ca^{2+} channels.

KEYWORDS: *Hibiscus rosa-sinensis*; Hypertension; L-NAME; Vasorelaxant; Angiotensin-converting enzyme-2(ACE2); Calcium channels.

1. Introduction

High blood pressure is an insidious "silent killer" that causes an increased risk of other cardiovascular diseases such as stroke, coronary heart disease, and heart failure. Peripheral vascular resistance is a determinant of blood pressure (BP) and is determined by the contractile state of vascular smooth muscle, particularly in arterioles [1]. Hypertension is responsible for around 16.5% of annual deaths worldwide [2], and it is indeed the main cause of morbidity and mortality associated with CVDs [3]. By 2030, the annual death is estimated to reach 23.5 million people [2]. Hypertension is defined as having a systolic blood pressure (SBP) of 140 mmHg and a diastolic blood pressure (DBP) of 90 mmHg [4]. Every 20/10 (SBP/DBP) mmHg increase indicates a higher risk stage of hypertension [5, 6]. Importantly, the American Society of Hypertension recommends that individuals with blood pressure of 120–139/80–89 mmHg should be considered as pre-hypertensive [6]. Many conventional antihypertensive agents are used to treat hypertension, such as thiazide, loop and potassium-sparing diuretics, central α_2 -adrenergic agonists, central/peripheral adrenergic neuronal blockers, direct-acting vasodilators, etc. Nevertheless, these drugs have some side effects such as muscle cramps, extreme fatigue, dizziness, blurred vision, dehydration, abnormal heart rate, skin rashes, etc [7]. Herbal medicines and their derivatives are considered as a potential source for discovering new natural antihypertensive compounds with few side effects and good efficacy.

Hibiscus rosa-sinensis L. (*H. rosa-sinensis*) is an ornamental plant belonging to the Malvaceae family [8]. Ethnopharmacological studies have shown that *H. rosa-sinensis* is used for the treatment of cough, fever, dysentery, venereal disease and cancer [9, 10]. Flowers of the plant were used in the treatment of epilepsy, diabetes, leprosy, and pulmonary disorders [11, 12]. Petals were used to stimulate thicker hair growth and to prevent premature graying, hair loss and scalp disorders [13, 14]. The flowers of *H. rosa-sinensis* have been shown to contain several activities including, antibacterial [15], antidepressant [16, 17], antioxidant, anti-diabetic [18], and cardiactonic activities [19-23].

H. rosa-sinensis contains several phytochemicals such as, cyclopropanoids, methyl sterulate, methyl-2-hydroxy sterulate, 2-hydroxysterulate, malvalate and beta-sitosterol [24]. The major anthocyanin present in the flower is cyanidin 3-sophoroside [24].

Until now, no pharmacological studies have been performed to demonstrate the antihypertensive effect of *H. rosa-sinensis*. Accordingly, the objective of this study was to demonstrate the antihypertensive effect of *H. rosa-sinensis* in N-nitro-L-arginine methyl ester (L-

NAME)-induced hypertensive rats, and to evaluate its vasorelaxant activity in isolated thoracic aorta.

2. Material and methods

2.1. Plant material and preparation of the aqueous extract

H. rosa-sinensis flowers were purchased from a local market in Tafilalet region (semi arid area) of Morocco in December 2020 and air-dried at 40 °C. The plant was taxonomically identified and authenticated and a voucher specimen was deposited at the herbarium of the Laboratory of Ethnopharmacology and Pharmacognosy, Faculty of Sciences and Techniques Errachidia (HRS2004). Plant material was prepared as we have previously described [25]. The dose administered was 100 mg/kg. The dose of 100 mg/kg of HRSE was selected after a preliminary dose screening and the minimal dose inducing a significant antihypertensive activity (100 mg/kg in this case) was chosen.

2.2. Experimental animals

Healthy albino adult male rats (Wistar strain) weighing about 140-230 g were obtained from Experimental Center (Missour, Morocco) and kept in individual polyethylene cages and under standard laboratory conditions. Experiments were conducted according to the guidelines of the local committee FSTE/2015.

2.3. Chemical reagents and drugs

Acetylcholine chloride, norepinephrine, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), indomethacin and MLN-4760 were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). All other reagents were of analytical grade from local sources. All cited drugs were dissolved in distilled water.

2.4. Experimental protocol

Hypotensive and vasorelaxant activities were measured as we have previously described [26-28].

2.5. Statistical analysis

All the values were expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was tested between more than two groups using two-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple

comparisons test. Relaxations induced by AEHRS were expressed as a percentage decrease of the EP and KCl contraction.

3. Results

3.1. Effect of AEHRS on body weight

Repeated oral administration of AEHRS for one week did not induce any significant change of body weight in all groups (Fig. 1). The same result was observed in the lasilix-treated control group compared with the untreated control group (data not shown).

3.2. Single oral administration

Acute treatment (6 hours after the first oral administration) of AEHRS showed that the blood pressure parameters were not significantly changed in both normal and hypertensive rats (Table 1). In addition, in hypertensive rats, lasilix after 6 hours of treatment showed a significant reduction in systolic blood pressure ($p < 0.01$), mean and diastolic blood pressure values.

3.3. Repeated oral administration

Table 2 elucidates the effect of repeated oral administration of AEHRS at a dose of 100 mg/kg in normotensive and hypertensive rats. The results illustrate that this aqueous extract produced a significant decrease of systolic blood pressure in the hypertensive group on the fourth and seventh day of administration ($p < 0.0001$). Lasilix induced a decrease in SABP in the normotensive group on the seventh day of daily administration ($p < 0.05$) and in the hypertensive group on the fourth and seventh day of treatment ($p < 0.0001$).

AEHRS administration caused a decrease of the mean arterial pressure in hypertensive rats at the second, fourth and seventh days of administration ($p < 0.01$, $p < 0.0001$, and $p < 0.0001$ respectively). The standard drug lasilix induced a significant decrease in MAP on days 4 and 7 of treatment in hypertensive rats ($p < 0.0001$), whereas no effect was recorded in normotensive groups. Similarly, the diastolic blood pressure in hypertensive rats was shown to decrease on the second, fourth and seventh day of administration ($p < 0.01$, $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$ respectively). In contrast, no significant effect was noticed in normotensive rats for the subchronic treatment with AEHRS when compared with the starting baseline values.

3.4. Vasorelaxant activity

3.4.1. The vasorelaxant effect of AEHRS on pre-contracted aortic rings

First, we determined the vasorelaxant effect of AEHRS (125-1000 $\mu\text{g/ml}$) on endothelium-intact rat aortic rings. The vasorelaxant effect of AEHRS was tested in a set of experiments using rat aortic rings. As revealed in Figure 2, AEHRS induced relaxation in isolated aortic rings pre-contracted with EP when compared with vehicle (Fig. 2) ($p<0.0001$); R_{max} was equal to $141.6\pm16.54\%$ ($p<0.0001$). In addition, in aortic rings pre-contracted by KCl, AEHRS induced also a vasorelaxant effect in comparison to the vehicle ($p<0.001$) (Figure 2). R_{max} was equal to $25.79\pm8.28\%$ ($p<0.001$). These results indicate that AEHRS induced vasodilatation of vascular smooth muscle.

3.4.2. Role of the endothelium in AEHRS-induced relaxation

The vasorelaxant activity of AEHS was tested also in endothelium-denuded aorta in which addition of acetylcholine did not induce relaxation confirming then the absence of the endothelium (Figures 3 and 4). The results show that AEHS induced vasorelaxation in both intact and denuded aortic rings. R_{max} was equal to $141.6\pm16.54\%$ for endothelium-dependent relaxation and $112.1 \pm 3.39\%$ for endothelium-independent relaxation. This suggests that the effect of AEHRS could be endothelium-independent.

3.4.2.1. Effect of MLN-4760, a specific angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2) inhibitor

To investigate the mechanisms involved in AEHRS-induced vasorelaxation, the effect of many drugs on AEHRS-induced vasodilation was tested. In this experiment, the effect of pre-incubation of aortic rings with MLN-4760, a specific angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2) inhibitor, on AEHRS-induced vasorelaxation was tested (Figure 5). The results show that MLN-4760 altered the vasorelaxant effect of AEHRS in rat aortic rings in response to the the third and fourth doses of AEHRS ($p<0.05$, and $p<0.01$ respectively). These results indicate that the drug MLN-4760, a specific angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2) inhibitor, inhibited AEHRS-induced vasorelaxation, suggesting that this effect seems to be mediated partially through ACE-2 stimulation.

3.4.2.2. Aortic responses to AEHRS in the absence and presence of L-NAME or indomethacin

Aortic rings with intact endothelium were pre-incubated with L-NAME to inhibit nitric oxide (NO), and indomethacin to inhibit prostaglandin synthesis (Figure 6). No significant difference was observed between control and treated vessels ($p>0.05$) (Fig. 6A). Indeed, the result obtained on vehicle-treated rings was $141.6\pm16.54\%$ for R_{max} ; whereas for L-NAME-

treated aortas, R_{max} value was equal to $116.6 \pm 20.77\%$. Similarly, aortic rings were pre-incubated with indomethacin ($1 \mu\text{M}$) for 20 min before NE pre-contraction ($10 \mu\text{M}$). The results were similar to those of L-NAME-incubated rings; R_{max} was equal to $103.3 \pm 28.63\%$ (Fig. 6B). These results demonstrate that the vasorelaxant capacity of AEHRS is not mediated through nitric oxide and prostaglandin synthesis pathways.

3.4.2.3. Role of potassium channels and β -adrenergic receptors

Interestingly, prior inhibition of ATP-dependent by glibenclamide or calcium-activated potassium channels by propranolol caused no effect on relaxant responses to AEHRS (Fig. 7). The following results were obtained with the same rings pre-treated with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channels blocker, where R_{max} was equal to $116.23 \pm 23.66\%$ for inhibitor-independent relaxation and $141.6 \pm 16.54\%$ relaxation in the presence of glibenclamide ($p > 0.05$) (Fig. 7A). The results showed also that the effect of propranolol did not affect the AEHRS activity (Fig. 7B). R_{max} was equal to $114.1 \pm 24.59\%$ for inhibitor-independent relaxation and $141.6 \pm 16.54\%$ of relaxation in the presence of propranolol. These results show clearly that the vasorelaxant ability of AEHRS has not been affected by the presence of glibenclamide or propranolol showing that the mechanism of action of this extract is independent of potassium channels and β -adrenergic receptors pathways.

3.4.2.4. Role of NO-cyclic guanosine monophosphate and Ca^{2+} Channel blocker

In this experiment, rat aortic rings were pre-incubated with methylene blue (MB), a NO-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) blocker, and nifedipine, a Ca^{2+} channel blocker (Figure 8). The results show that MB had not altered the vasorelaxant effect of rat aortic rings in response to the different AEHRS doses (Fig. 8A). However, nifedipine decreased the vasorelaxant effect of AEHRS at the fourth dose ($1000 \mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$) (Fig. 8B). These results suggest that NO-cGMP blocker did not inhibit vasodilatation induced by AEHRS suggesting that the vasorelaxant effect of AEHRS may be independent of the NO-cGMP pathway. However, this effect seems to be mediated partially through calcium channel blockade pathway as it is supported by the effect of nifedipine on the vasorelaxant effect of AEHRS.

4. Discussion

The present study was performed to evaluate the antihypertensive effect of aqueous extract of *Hibiscus rosa-sinensis* flowers in normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats as well as the vasorelaxant activity of this aqueous extract. Oral administration of N ω -nitro-

L-arginine methyl ester (L-NAME), an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) activity, for two weeks at a dose of 60 mg/kg led to the induction of hypertension in rats. Firstly, acute and chronic treatments with L-NAME caused changes in blood pressure and vascular reactivity due to decreased bioavailability of nitric oxide (NO) [29]. L-NAME-induced hypertensive rat was chosen as an animal model to study the effect of AEHRS on blood pressure parameters. Treatment with L-NAME induces vascular remodeling and dysfunction. A recent study demonstrated that L-NAME-treated rats had elevated biomarkers of oxidative stress and decreased expression of NO metabolites, eNOS, erythroid 2-related factor 2, and heme oxygenase-1 [30]. Reduced basal NO synthesis or action leads to vasoconstriction, elevated blood pressure, and thrombus formation. In contrast, overproduction of NO leads to vasodilation, hypotension, vascular leakage, and disruption of cellular metabolism [31]. High blood pressure is induced by L-NAME acting on the NO system and induction of oxidative stress. Several previous studies have used this model to evaluate the antihypertensive activity of medicinal plants [32] or purified molecules [30] and the protective effect against hypertension [33]. Lasilix was used in this study as a standard drug. This synthetic drug is commonly used to treat hypertension. It is known to inhibit the luminal Na-K-Cl cotransporter at the thick ascending branch of Henle's loop by connecting to the chloride transport channel, resulting in loss of sodium, chloride, and potassium in the urine [34-36].

Hibiscus rosa-sinensis L. is an aromatic and medicinal plant that has been used since ancient times for therapeutic purposes. This plant is used to treat a wide range of diseases, including hypertension. Aqueous extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* flowers have been shown to have several biological properties in preliminary studies. However, until now, no study had evaluated their antihypertensive effects. The current study, evaluated the effect of AEHRS on blood pressure in normal and hypertensive rats. AEHRS treatment did not modify body weight both in normal and L-NAME-induced hypertensive rats.

The acute oral AEHRS administration did not change the arterial blood pressure parameters (SABP, MABP and DABP) and heart rate in both normotensive and hypertensive rats. In contrast, repeated oral AEHRS administration for 7 days was able to decrease blood pressure parameters (SBP, MBP and DBP) in L-NAME-hypertensive rats, without causing any decrease of these parameters in normotensive rats. These results are in accordance with previous studies performed in other species of the genus *Hibiscus*, such as *Hibiscus sabdariffa* and *Hibiscus sabdariffa* [37, 38]. Similar studies have also revealed that secondary metabolites of medicinal plants are able to treat hypertension through different pathways [39, 40].

In the present study, the vasorelaxant effect of AEHRS at cumulative doses between 125 µg/ml and 1000 µg/ml was demonstrated in isolated rat aortic rings. Therefore, the results revealed that AEHRS produced complete vasorelaxation in norepinephrine (NE)-and KCl-precontracted aortic rings. The experimental study of AEHRS demonstrated its ability to decrease tension in both endothelium-intact and endothelium-denuded aortic rings pre-contracted by NE, suggesting that the vasorelaxant effect of AEHRS is endothelium- independent. In this experiment, seven reference drugs were used in order to determine the pathways involved in the vasorelaxant activity of AEHRS: MLN-4760, an angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) specific inhibitor; L-NAME, a direct inhibitor of nitric oxide (NO) synthase; indomethacin, a prostaglandin synthesis inhibitor; propranolol, a nonselective β -adrenergic blocking agent, which is able to inhibit the action of adrenaline and norepinephrine via β - and β_2 -adrenergic receptors [41]; glibenclamide, a blocker of ATP-sensitive K^+ channels; methylene blue, a blocker of cyclic guanosine monophosphate (cGMP); and nifedipine, a long- and short-acting 1,4-dihydropyridine calcium channel blocker, this drug acts primarily on vascular smooth muscle cells by stabilizing voltage-dependent L-type calcium channels in their inactive conformation [42]. The results show that pretreatment with L-NAME, indomethacin, propranolol, glibenclamide, and methylene blue did not significantly affect the vasorelaxant effect of AEHRS. This finding shows that the vasorelaxant effect of AEHRS was not mediated through the direct NO, the prostaglandin synthesis, the K^+ channel, or the L-type calcium channel, the β -adrenergic receptor, and the NO-cyclic guanosine monophosphate pathways. In addition, AEHRS-induced relaxation was partially attenuated in the presence of MLN-4760 and nifedipine, respectively, indicating the ability of AEHRS to stimulate ACE-2, and to block the extracellular Ca^{2+} entry via L-type calcium channels. Similar studies have also reported the involvement of Ca^{2+} channels in antihypertensive activity [43]. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) is a key enzyme of the renin-angiotensin-system which breaks down angiotensin II and forms angiotensin-(1–7) leading to vasorelaxation of vessels by an endothelium-dependent release of nitric oxide [44]. ACE-2 acts as a receptor for SARS-COV-2 virus, allowing it to enter target cells [45, 46]. ACE-2 protein is present in alveolar epithelial cells, cardiac cells, lung cells, arterial smooth muscle cells, and gastrointestinal cells, as well as in small intestinal enterocytes and renal tubules [47]. ACE-2 is involved in the regulation of blood pressure and the establishment of its homeostasis. MLN-4760 is a specific ACE-2 inhibitor [48]. Activation of ACE-2 is known to reduce the severity of hyperoxic lung injury by inhibiting the inflammatory response and oxidative stress [49, 50]. The ACE2 system plays a pivotal role against cardiovascular diseases and diabetes mellitus. In addition, the regulatory effects on the Ang II/AT1R and Ang1–7/Mas Receptor axes

make ACE2 an important target in the prevention and management of chronic inflammatory diseases, as it has been highlighted by COVID-19 pandemic [51]. This fact was supported by recent studies showing that recombinant ACE2, gene-delivery of Ace2, Ang 1–7 analogs, and Mas receptor agonists enhance ACE2 action and serve as beneficial treatment against inflammation [51].

5. Conclusion

The present study reveals for the first time the antihypertensive effect of AEHRS in L-NAME-induced hypertensive rats. AEHRS decreased the blood pressure parameters (SBP, DBP, and MBP) in hypertensive rats without affecting heart rate. In addition, the extract induced a vasorelaxant effect in isolated aortic rings which is mediated at least through stimulation of ACE-2 and blockade of Ca^{2+} entry. In addition, AEHRS induces vasorelaxation through an endothelium-independent pathway. The vasorelaxant effect of AEHRS was not mediated by the NO-cGMP pathway, the vascular cyclooxygenase pathway, β -adrenergic receptors, K^+ channels, or the direct NO pathway.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

No human was used in this study. All applicable guidelines for the care and use of animals were followed according to the local ethical committee, Faculty of Science and Techniques Errachidia, Errachidia, Morocco, number FSTE/2015.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

FUNDING

This work was carried out with the assistance of Hassan II Academy of Science and Technology, Morocco.

6. References

- [1] Touyz, R.M.; Alves-Lopes, R.; Rios, F.J.; Camargo, L.L.; Anagnostopoulou, A.; Arner, A.; Montezano, A.C. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 2018, 114(4), 529-539. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvy023> PMID: 29394331
- [2] Al Disi, S.S.; Anwar, M.A.; Eid, A.H. Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: Part I. *Front. Pharmacol.*, 2016, 6, 323. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2015.00323> PMID: 26834637
- [3] Kizhakekuttu, T.J.; Widlansky, M.E. Natural antioxidants and hypertension: Promise and challenges. *Cardiovasc. Ther.*, 2010, 28(4), e20-e32. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00137.x> PMID: 20370791
- [4] Tabassum, N.; Ahmad, F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacogn. Rev.*, 2011, 5(9), 30-40. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.79097> PMID: 22096316
- [5] Archer, J.S. Evaluation and treatment of hypertension, 2000, 7, 6.
- [6] Weber, M.A.; Schiffrin, E.L.; White, W.B.; Mann, S.; Lindholm, L.H.; Kenerson, J.G.; Flack, J.M.; Carter, B.L.; Materson, B.J.; Ram, C.V.; Cohen, D.L.; Cadet, J.C.; Jean-Charles, R.R.; Taler, S.; Kountz, D.; Townsend, R.; Chalmers, J.; Ramirez, A.J.; Bakris, G.L.; Wang, J.; Schutte, A.E.; Bisognano, J.D.; Touyz, R.M.; Sica, D.; Harrap, S.B. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *J. Hypertens.*, 2014, 32(1), 3-15. <http://dx.doi.org/10.1097/HJH.000000000000065> PMID: 24270181
- [7] Singh, P.; Mishra, A.; Singh, P.; Goswami, S.; Singh, A.; Tiwari, K. D. Hypertension and herbal plant for its treatment: A review. 2015.
- [8] Adhirajan, N.; Ravi Kumar, T.; Shanmugasundaram, N.; Babu, M. In vivo and in vitro evaluation of hair growth potential of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. *J. Ethnopharmacol.*, 2003, 88(2-3), 235-239. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00231-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00231-9) PMID: 12963149
- [9] Chadha, Y.R. The wealth of India: A dictionary of Indian raw materials and industrial products. Publication Information Directorate, CSIR, New Delhi, 1976, 10, 522-524.
- [10] Mhaskar, K.S.; Blatter, E.; Caius, J.F.; Ram, V.A. Kirtikar and Basu's illustrated Indian medicinal plants: Their usage in Ayurveda and Unani medicines; Sri Satguru Publications: Delhi, 2000, Vol. 1, .
- [11] Pekamwar, S.; Kalyankar, T.M.; Jadhav, A.C. *Hibiscus rosa sinensis*: A review on ornamental plant. *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2013, 4719-4727.
- [12] Sharma, K.; Shukla, S.; Chauhan, E.S. Evaluation of aegle marmelos (Bael) as hyperglycemic and hyperlipidemic diminuting agent in type ii diabetes mellitus subjects. *Pharma Innov.*, 2016, 5(5), 43-46.
- [13] Kalpesh, G.; Kori, M.L.; Nema, R.K. Investigation of immunomodulatory potential of hydro-alcoholic extracts of *Euphorbia neriifolia* Linn. and *Hibiscus rosa sinensis* Linn. *Int J Med Sci (India)*, 2009, 2, 61-65.
- [14] Upadhyay, S.M.; Upadhyay, P.; Ghosh, A.K.; Singh, V.; Dixit, V.K. Effect of ethanolic extract of *Hibiscus rosa sinensis* L. flowers on hair growth in female wistar rats. *Pharm. Lett.*, 2011, 3, 258- 263.
- [15] Nayak, D.; Ashe, S.; Rauta, P.R.; Nayak, B. Biosynthesis, characterisation and antimicrobial activity of silver nanoparticles using *Hibiscus rosa-sinensis* petals extracts. *IET Nanobiotechnol.*, 2015, 9(5), 288-293. <http://dx.doi.org/10.1049/iet-nbt.2014.0047> PMID: 26435282
- [16] Khalid, L.; Rizwani, G.H.; Sultana, V.; Zahid, H.; Khursheed, R.; Shareef, H. Antidepressant activity of ethanolic extract of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2014, 27(5), 1327-1331. PMID: 25176367
- [17] Shewale, P.B.; Patil, R.A.; Hiray, Y.A. Antidepressant-like activity of anthocyanidins from *Hibiscus rosa-sinensis* flowers in tail suspension test and forced swim test. *Indian J. Pharmacol.*, 2011, 5. <http://dx.doi.org/10.4103/0253-7613.99303> PMID: 23087504
- [18] Afiune, L.A.F.; Leal-Silva, T.; Sinzato, Y.K.; Moraes-Souza, R.Q.; Soares, T.S.; Campos, K.E.; Fujiwara, R.T.; Herrera, E.; Damasceno, D.C.; Volpato, G.T. Beneficial effects of *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower aqueous extract in pregnant rats with diabetes. *PLoS One*, 2017, 12(6), e0179785. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0179785> PMID: 28644857

- [19] Bhaskar, A.; Nithya, V. Evaluation of the wound-healing activity of *Hibiscus rosa sinensis* L (Malvaceae) in Wistar albino rats. *Indian J. Pharmacol.*, 2012, 44(6), 694-698. <http://dx.doi.org/10.4103/0253-7613.103252> PMID: 23248396
- [20] Shivananda Nayak, B.; Sivachandra Raju, S.; Orette, F.A.; Chalapathi Rao, A.V. Effects of *Hibiscus rosa sinensis* L (Malvaceae) on wound healing activity: A preclinical study in a Sprague Dawley rat. *Int. J. Low. Extrem. Wounds*, 2007, 6(2), 76- 81. <http://dx.doi.org/10.1177/1534734607302840> PMID: 17558005
- [21] Gauthaman, K.K.; Saleem, M.T.; Thanislas, P.T.; Prabhu, V.V.; Krishnamoorthy, K.K.; Devaraj, N.S.; Somasundaram, J.S. Cardioprotective effect of the *Hibiscus rosa sinensis* flowers in an oxidative stress model of myocardial ischemic reperfusion injury in rat. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2006, 6(1), 32. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-6-32> PMID: 16987414
- [22] Dwivedi, R.N.; Pandey, S.P.; Tripathi, V.J. Role of Japapushpa in the treatment of arterial hypertension. A trial study. *J Res Ind Med, Yoga Homeopathy*, 1977, 12, 13-36.
- [23] Kate, I.E.; Lucky, O.O. The effects of aqueous extracts of the leaves of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. on renal function in hypertensive rats. *Afr. J. Biochem. Res.*, 2010, 4(2), 43-46.
- [24] Khare, C.P. *Indian medicinal plants: An illustrated dictionary*; Springer Science & Business Media, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-70638-2>
- [25] Ajebli, M.; Eddouks, M. *Buxus sempervirens* L improves streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2017, 17(2), 142-152. <http://dx.doi.org/10.2174/1871529X17666170918140817>
- [26] Ajebli, M.; Eddouks, M. Antihypertensive activity of *Petroselinum crispum* through inhibition of vascular calcium channels in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 2019, 242, 112039. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2019.112039> PMID: 31252093
- [27] de Carvalho, E.F.; Nunes, A.F.; Silva, N.C.B.; da Silva Gomes, J.P.; de Sousa, R.P.; Silva, V.G.; Nunes, P.H.M.; Santos, R.F.; Chaves, M.H.; Oliveira, A.P.; Oliveira, R.C.M. *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. elicits vasorelaxation of rat thoracic aorta through nitric oxide and K⁺ channels dependent mechanism. *Biol. Open*, 2019, 8(2), bio035238. <http://dx.doi.org/10.1242/bio.035238> PMID: 30683674
- [28] Anwar, M.A.; Samaha, A.A.; Ballan, S.; Saleh, A.I.; Iratni, R.; Eid, A.H. *Salvia fruticosa* induces vasorelaxation in rat isolated thoracic aorta: Role of the PI3K/Akt/eNOS/NO/cGMP signaling pathway. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1), 686. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00790-9> PMID: 28386068
- [29] Kopincová, J.; Púžserová, A.; Bernátová, I. L-NAME in the cardiovascular system - nitric oxide synthase activator? *Pharmacol. Rep.*, 2012, 64(3), 511-520. [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70846-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70846-0) PMID: 22814004
- [30] Potue, P.; Wunpathe, C.; Manesai, P.; Kukongviriyapan, U.; Prachaney, P.; Pakdeechote, P. Nobiletin alleviates vascular alterations through modulation of Nrf-2/HO-1 and MMP pathways in L-NAME induced hypertensive rats. *Food Funct.*, 2019, 10(4), 1880-1892. <http://dx.doi.org/10.1039/C8FO02408A> PMID: 30864566
- [31] Moncada, S.; Higgs, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 147(S1)(Suppl. 1), S193-S201. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706458> PMID: 16402104
- [32] Aekthammarat, D.; Pannangpetch, P.; Tangsucharit, P. *Moringa oleifera* leaf extract lowers high blood pressure by alleviating vascular dysfunction and decreasing oxidative stress in L-NAME hypertensive rats. *Phytomedicine*, 2019, 54, 9-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2018.10.023>
- [33] Bilanda, D.C.; Dzeufiet, P.D.D.; Kouakep, L.; Aboubakar, B.F.O.; Tedong, L.; Kamtchouing, P.; Dimo, T. *Bidens pilosa* ethylene acetate extract can protect against L-NAME-induced hypertension on rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2017, 17(1), 479. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-017-1972-0> PMID: 29017485
- [34] James, P.A.; Oparil, S.; Carter, B.L.; Cushman, W.C.; Dennison Himmelfarb, C.; Handler, J.; Lackland, D.T.; LeFevre, M.L.; MacKenzie, T.D.; Ogedegbe, O.; Smith, S.C., Jr; Svetkey, L.P.; Taler, S.J.; Townsend, R.R.; Wright, J.T., Jr; Narva, A.S.; Ortiz, E. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: Report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*, 2014, 311(5), 507-520. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.284427> PMID: 24352797

- [35] Kiriya, A.; Honbo, A.; Nishimura, A.; Shibata, N.; Iga, K. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses of antihypertensive drugs, nifedipine and propranolol, in spontaneously hypertensive rats to investigate characteristics of effect and side effects. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2016, 76, 21-29.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.01.003> PMID: 26773344
- [36] Stenmark, K.R.; Rabinovitch, M. Emerging therapies for the treatment of pulmonary hypertension. *Pediatr. Crit. Care Med.*, 2010, 11(2)(Suppl.), S85-S90. <http://dx.doi.org/10.1097/PCC.0b013e3181c76db3> PMID: 20216170
- [37] Herrera-Arellano, A.; Flores-Romero, S.; Chávez-Soto, M.A.; Tortoriello, J. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: A controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine*, 2004, 11(5), 375-382.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2004.04.001> PMID: 15330492
- [38] Mojiminiyi, F.B.O.; Dikko, M.; Muhammad, B.Y.; Ojobor, P.D.; Ajagbonna, O.P.; Okolo, R.U.; Igbokwe, U.V.; Mojiminiyi, U.E.; Fagbemi, M.A.; Bello, S.O.; Anga, T.J. Antihypertensive effect of an aqueous extract of the calyx of *Hibiscus sabdariffa*. *Fitoterapia*, 2007, 78(4), 292-297.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2007.02.011> PMID: 17482378
- [39] Amssayef, A.; Eddouks, M. Aqueous extract of *matricaria pubescens* exhibits antihypertensive activity in L-NAME-induced hypertensive rats through its vasorelaxant effect. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2019, 17, 135-143. <http://dx.doi.org/10.2174/1871525717666191007151413>
- [40] EL-Ouady, F.; Eddouks, M. *Warionia saharae* induces antihypertensive and vasorelaxant activities through nitric oxide and KATP channels pathways in rats. *J. Complement. Integr. Med.*, 2019, 17(1) <http://dx.doi.org/10.1515/jcim-2019-0024>
- [41] Chinnadurai, S.; Fonnesbeck, C.; Snyder, K.M.; Sathe, N.A.; Morad, A.; Likis, F.E.; McPheeters, M.L. Pharmacologic interventions for infantile hemangioma: A meta-analysis. *Pediatrics*, 2016, 137(2), e20153896-e20153896.
<http://dx.doi.org/10.1542/peds.2015-3896> PMID: 26772662
- [42] Baratam, S.R.; Janjanam, K.C. Determination of nifedipine in human plasma by high- performance liquid chromatography– tandem mass spectrometry and its validation. *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2018, 7, 15.
- [43] Gorzalczany, S.; Moscatelli, V.; Ferraro, G. *Artemisia copa* aqueous extract as vasorelaxant and hypotensive agent. *J. Ethnopharmacol.*, 2013, 148(1), 56-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.061> PMID: 23588093
- [44] Fraga-Silva, R.A.; Costa-Fraga, F.P.; Montecucco, F.; Sturny, M.; Faye, Y.; Mach, F.; Pelli, G.; Shenoy, V.; da Silva, R.F.; Raizada, M.K.; Santos, R.A.; Stergiopulos, N. Diminazene protects corpus cavernosum against hypercholesterolemia-induced injury. *J. Sex. Med.*, 2015, 12(2), 289-302.
<http://dx.doi.org/10.1111/jsm.12757> PMID: 25411084
- [45] Bavishi, C.; Maddox, T.M.; Messerli, F.H. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection and renin angiotensin system blockers. *JAMA Cardiol.*, 2020, 5(7), 745-747.
<http://dx.doi.org/10.1001/jamacardio.2020.1282> PMID: 32242890
- [46] Gosain, R.; Abdou, Y.; Singh, A.; Rana, N.; Puzanov, I.; Ernstoff, M.S. COVID-19 and cancer: A comprehensive review. *Curr. Oncol. Rep.*, 2020, 22(5), 53.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11912-020-00934-7> PMID: 32385672
- [47] Zou, X.; Chen, K.; Zou, J.; Han, P.; Hao, J.; Han, Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019- nCoV infection. *Front. Med.*, 2020, 14(2), 185-192.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0> PMID: 32170560
- [48] Bosso, M.; Thanaraj, T.A.; Abu-Farha, M.; Alanbaei, M.; Abubaker, J.; Al-Mulla, F. The two faces of ACE2: The Role of ACE2 receptor and its polymorphisms in hypertension and COVID-19. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2020, 18, 321-327.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.omtm.2020.06.017> PMID: 32665962
- [49] Fang, Y.; Gao, F.; Liu, Z. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates inflammatory response and oxidative stress in hyperoxic lung injury by regulating NF- κ B and Nrf2 pathways. *QJM*, 2019, 112(12), 914-924.
<http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/hcz206> PMID: 31393582
- [50] Raduan, S.; Aziz, M.A.; Roslida, A.; Zakaria, Z.; Zuraini, A.; Hakim, M. Anti- inflammatory effects of *hibiscus rosa-sinensis* l. and *hibiscus rosa-sinensis* var. *alba* ethanol extracts. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2013, 5(4), 10.

- [51] Gheblawi, M.; Wang, K.; Viveiros, A.; Nguyen, Q.; Zhong, J-C.; Turner, A.J.; Raizada, M.K.; Grant, M.B.; Oudit, G.Y. Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: Celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2. *Circ. Res.*, 2020, 126(10), 1456-1474. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317015> PMID: 32264791.

Table 1: Effect of a single oral administration of aqueous *Hibiscus rosa-sinensis* extract (100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n = 6. *p<0.05, **p<0.01.

		Systolic blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEHRS	Lasilix
Normotensive	T0	132.00 $\pm$ 6.00	110.58 $\pm$ 3.81	120.00 $\pm$ 7.00
	T6	138.00 $\pm$ 8.00	106.27 $\pm$ 5.77	111.00 $\pm$ 7.00
L-NAME	T0	180.00 $\pm$ 5.00	182.08 $\pm$ 1.46	169.00 $\pm$ 7.00
	T6	175.00 $\pm$ 7.00	173.65 $\pm$ 0.97	142.00 $\pm$ 6.00**

		Diastolic blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEHRS	Lasilix
Normotensive	T0	106.00 $\pm$ 5.00	58.56 $\pm$ 8.26	103.00 $\pm$ 5.00
	T6	101.00 $\pm$ 6.00	58.41 $\pm$ 8.16	91.00 $\pm$ 4.00
L-NAME	T0	144.00 $\pm$ 7.00	121.14 $\pm$ 7.32	152.00 $\pm$ 5.00
	T6	148.00 $\pm$ 10.00	110.77 $\pm$ 4.91	129.00 $\pm$ 4.00*

		Mean blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEHRS	Lasilix
Normotensive	T0	115.00 $\pm$ 7.00	75.90 $\pm$ 5.37	108.00 $\pm$ 6.00
	T6	113.00 $\pm$ 6.00	74.36 $\pm$ 6.52	97.00 $\pm$ 2.00
L-NAME	T0	156.00 $\pm$ 6.00	141.45 $\pm$ 5.03	150.00 $\pm$ 3.00
	T6	157.00 $\pm$ 6.00	131.73 $\pm$ 3.53	125.00 $\pm$ 6.00*

		Heart rate (bpm)		
		Control	AEHRS	Lasilix
Normotensive	T0	320.00 $\pm$ 10.00	305.00 $\pm$ 1.84	349.00 $\pm$ 19.00
	T6	306.00 $\pm$ 8.00	306.00 $\pm$ 1.55	321.00 $\pm$ 9.00
L-NAME	T0	312.00 $\pm$ 15.00	302.00 $\pm$ 1.26	348.00 $\pm$ 22.00
	T6	318.00 $\pm$ 12.00	304.00 $\pm$ 1.26	311.00 $\pm$ 17.00

Table 2: Effect of repeated oral administration of aqueous *Hibiscus rosa-sinensis* extract (100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n = 6, **p<0.01, ****p<0.0001.

		Systolic blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEHRS	Lasilix
Normotensive	D0	134.00 $\pm$ 7.00	110.58 $\pm$ 3.81	120.00 $\pm$ 7.00
	D2	136.00 $\pm$ 5.00	115.40 $\pm$ 4.89	115.00 $\pm$ 5.00
	D4	140.00 $\pm$ 3.00	107.41 $\pm$ 4.68	108.00 $\pm$ 3.00
	D7	135.00 $\pm$ 6.00	111.52 $\pm$ 4.21	99.00 $\pm$ 4.00*
L-NAME	D0	180.00 $\pm$ 5.00	182.08 $\pm$ 1.46	169.00 $\pm$ 6.00
	D2	176.00 $\pm$ 5.00	168.13 $\pm$ 1.94	122.00 $\pm$ 2.00****
	D4	173.00 $\pm$ 9.00	122.09 $\pm$ 4.63****	120.00 $\pm$ 4.00****
	D7	172.00 $\pm$ 6.00	111.80 $\pm$ 4.10****	109.00 $\pm$ 3.00****

		Diastolic blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEHRS	Lasilix
Normotensive	D0	100.00 $\pm$ 3.00	58.56 $\pm$ 8.26	103.00 $\pm$ 6.00
	D2	101.00 $\pm$ 5.00	71.29 $\pm$ 1.95	98.00 $\pm$ 5.00
	D4	106.00 $\pm$ 3.00	55.01 $\pm$ 5.52	97.00 $\pm$ 6.00
	D7	102.00 $\pm$ 8.00	65.28 $\pm$ 6.21	95.00 $\pm$ 4.00
L-NAME	D0	144.00 $\pm$ 7.00	121.14 $\pm$ 7.32	152.00 $\pm$ 5.00
	D2	135.00 $\pm$ 7.00	94.82 $\pm$ 2.85**	103.00 $\pm$ 4.00
	D4	135.00 $\pm$ 6.00	81.55 $\pm$ 6.61****	100.00 $\pm$ 4.00****
	D7	136.00 $\pm$ 6.00	79.43 $\pm$ 4.10****	98.00 $\pm$ 3.00****

		Mean blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEHRS	Lasilix
Normotensive	D0	111.00 $\pm$ 4.00	75.90 $\pm$ 5.37	109.00 $\pm$ 7.00
	D2	112.00 $\pm$ 5.00	86.00 $\pm$ 2.84	107.00 $\pm$ 5.00
	D4	117.00 $\pm$ 6.00	72.47 $\pm$ 5.01	101.00 $\pm$ 3.00
	D7	112.00 $\pm$ 4.00	80.69 $\pm$ 5.13	96.00 $\pm$ 2.00
L-NAME	D0	156.00 $\pm$ 6.00	141.45 $\pm$ 5.03	150.00 $\pm$ 3.00
	D2	149.00 $\pm$ 6.00	119.25 $\pm$ 2.30**	148.00 $\pm$ 5.00
	D4	148.00 $\pm$ 9.00	95.07 $\pm$ 4.96****	103.00 $\pm$ 5.00****
	D7	147.00 $\pm$ 6.00	90.22 $\pm$ 2.82****	95.00 $\pm$ 4.00****

		Heart rate (bpm)		
		Control	AEHRS	Lasilix
Normotensive	D0	312.00 $\pm$ 15.00	305.00 $\pm$ 1.84	348.00 $\pm$ 22.00
	D2	320.00 $\pm$ 14.00	302.00 $\pm$ 1.26	341.00 $\pm$ 16.00
	D4	312.00 $\pm$ 16.00	307.00 $\pm$ 2.86	341.00 $\pm$ 17.00
	D7	319.00 $\pm$ 8.00	307.00 $\pm$ 1.00	305.00 $\pm$ 8.00*
L-NAME	D0	308.00 $\pm$ 12.00	302.00 $\pm$ 1.26	348.00 $\pm$ 15.00
	D2	310.00 $\pm$ 15.00	303.00 $\pm$ 2.05	343.00 $\pm$ 13.00
	D4	307.00 $\pm$ 13.00	303.00 $\pm$ 2.05	315.00 $\pm$ 11.00
	D7	318.00 $\pm$ 18.00	303.00 $\pm$ 2.05	311.00 $\pm$ 10.00

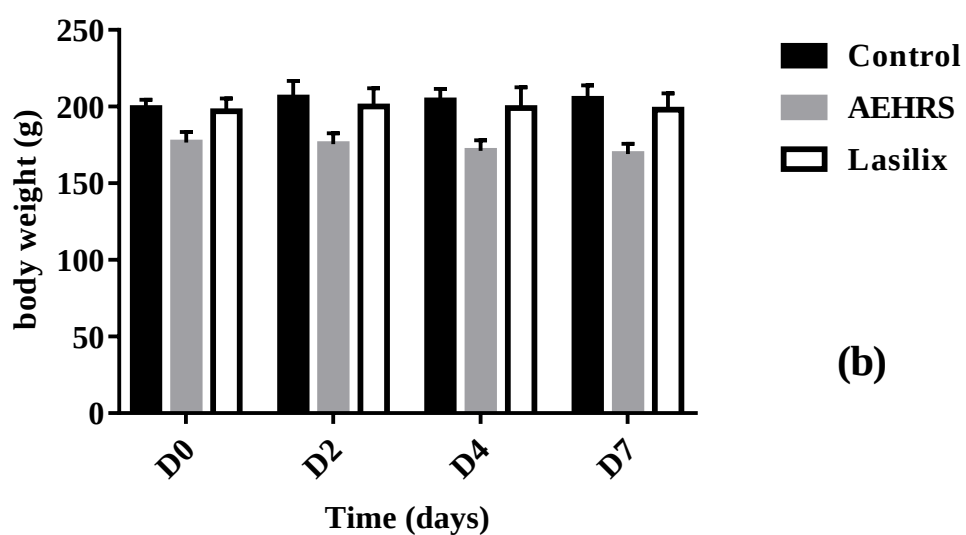
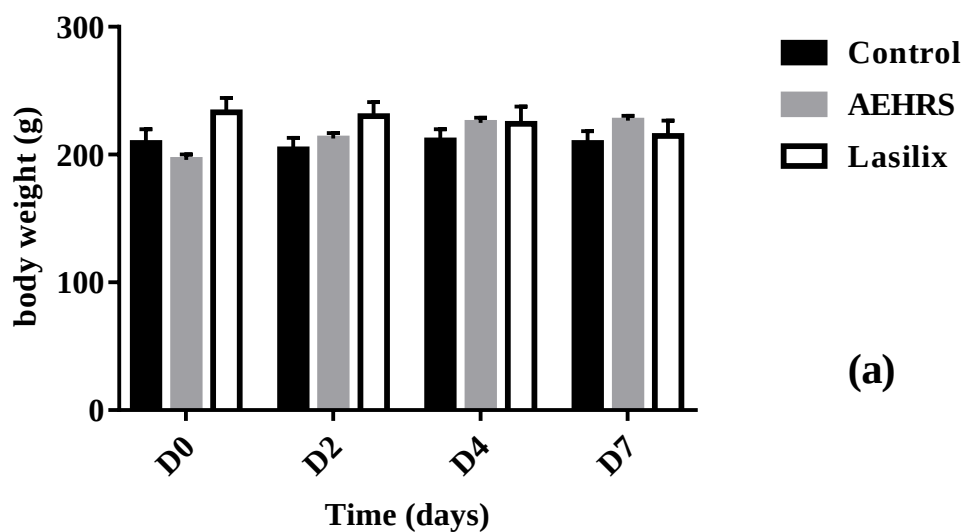


Fig. 1. Effect of repeated oral administration of AEHRS (100 mg/kg) on body weight (g) in anesthetized normal (A) and L-NAME-induced hypertensive (B) rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=6. Comparison was assessed with baseline values.

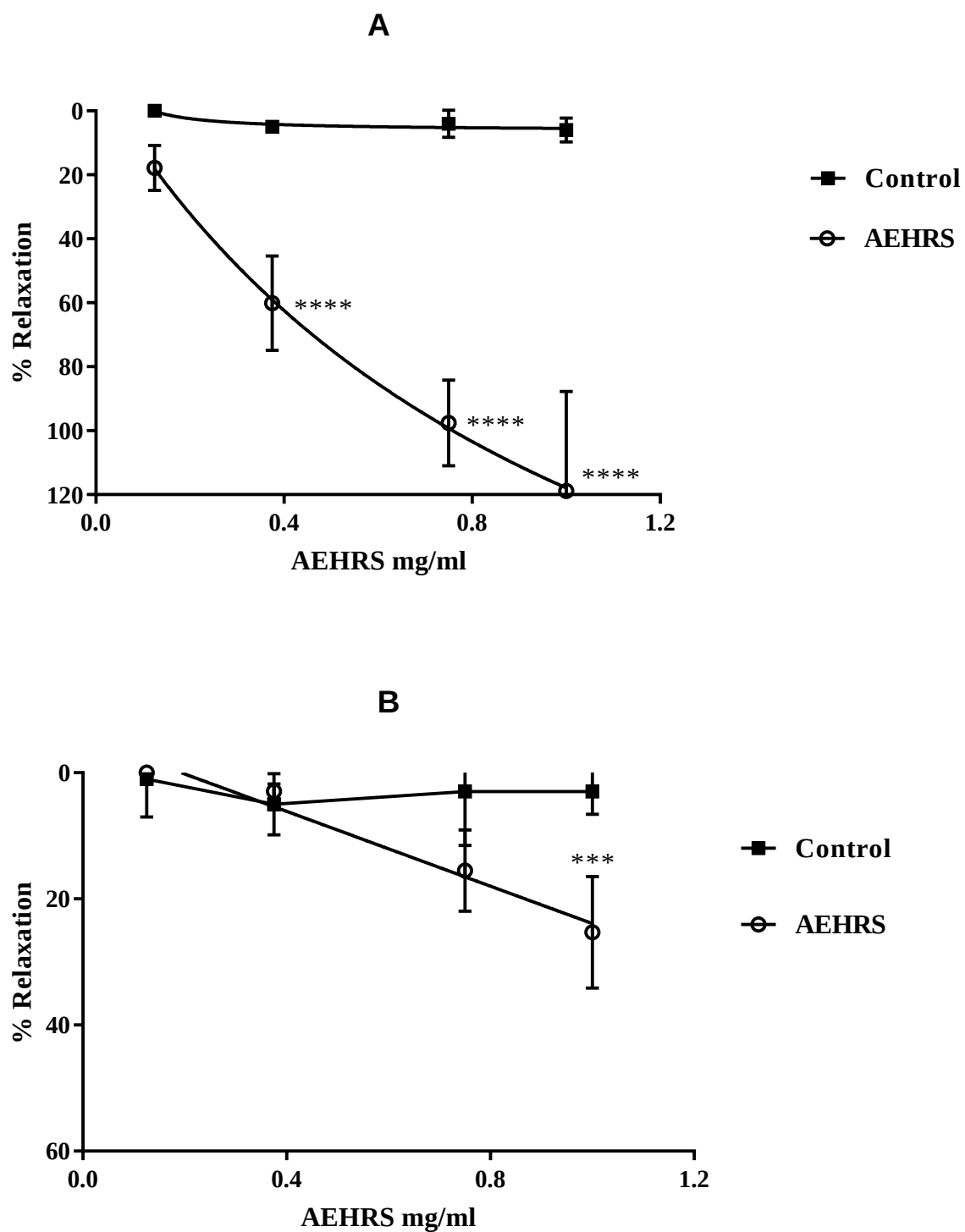


Fig. 2. Effect of AEHRS on EP or KCl-induced contraction in aortic rings. Cumulative dose-dependent curves for AEHRS-induced relaxation and of the vehicle (distillated water) in rat aortic rings. $n = 6$. A: pre-contraction with epinephrine ($10 \mu\text{M}$); B: pre-contraction KCl (80 mM). *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

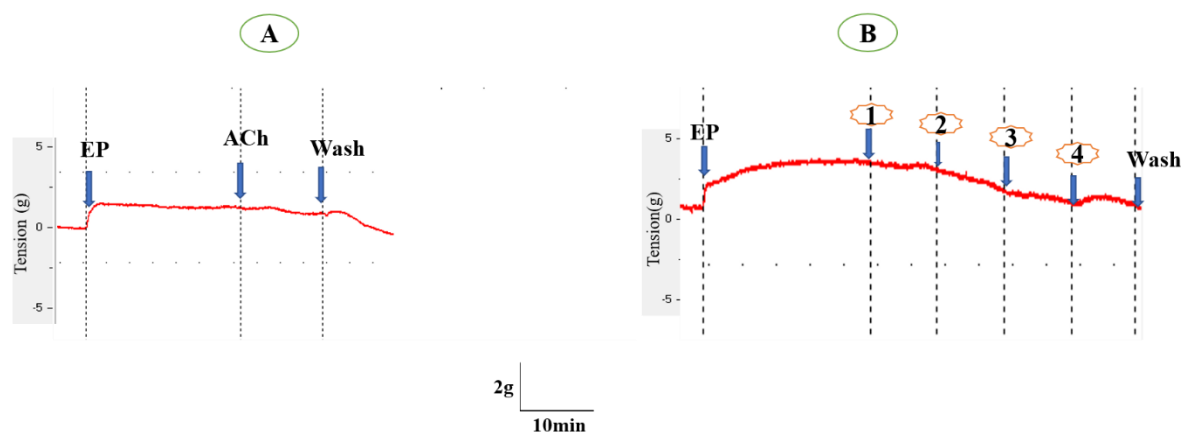


Fig. 3. Representative tracings illustrating the vasorelaxant effect of AEHRS and acetylcholine (ACh) (10^{-5} M) on rat aortic rings, pre-contracted with EP (10^{-5} M). (A): vasorelaxation effect induced by Ach (10^{-5} M) (30% of relaxation), (B): vasorelaxant effect induced by AEHRS. EP 10^{-5} M (87.5% of relaxation): addition of epinephrine, ACh: addition of acetylcholine, 1 to 4: addition of different doses of AEHRS (125, 300, 600, and 1000 μ g/ml respectively).

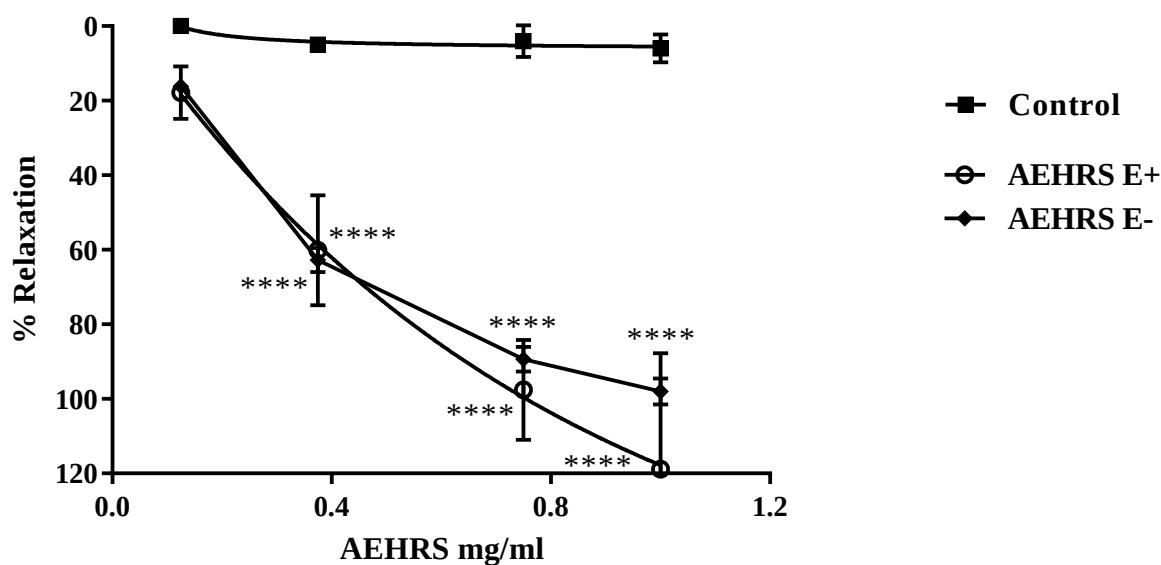


Fig. 4. Effect of AEHRS on tension in EP (10 μ M) pre-contracted aortic rings with endothelium (E+) or without endothelium (E-). Tension (%) indicates the percentage of EP-induced contraction. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM.

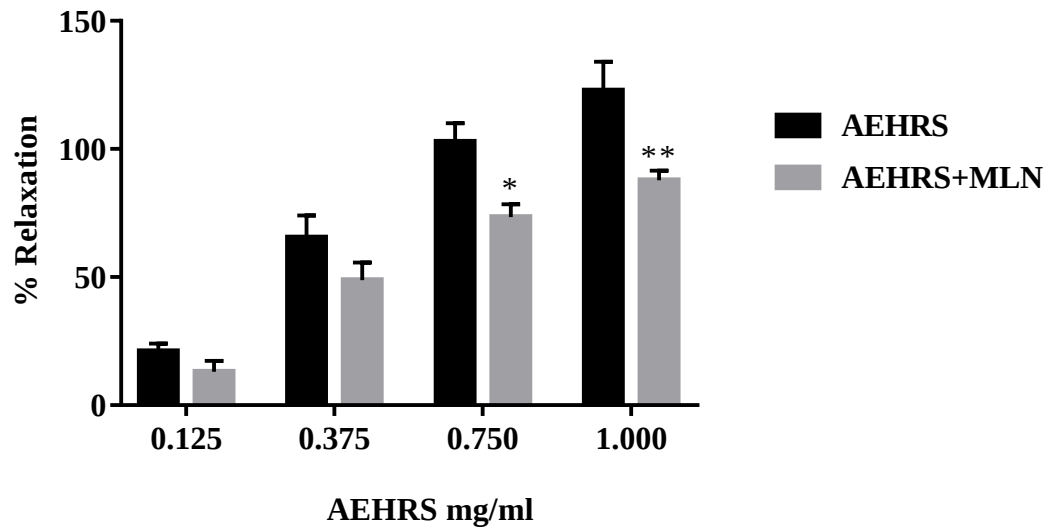


Fig. 5. Effect of MLN-4760 (specific inhibitor of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2)) drug incubation on AEHRS-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHRS in the absence (black) or presence (gray) of standard drugs. Data represent mean±SEM (n=6; for AEHRS *versus* drug plus AEHRS).

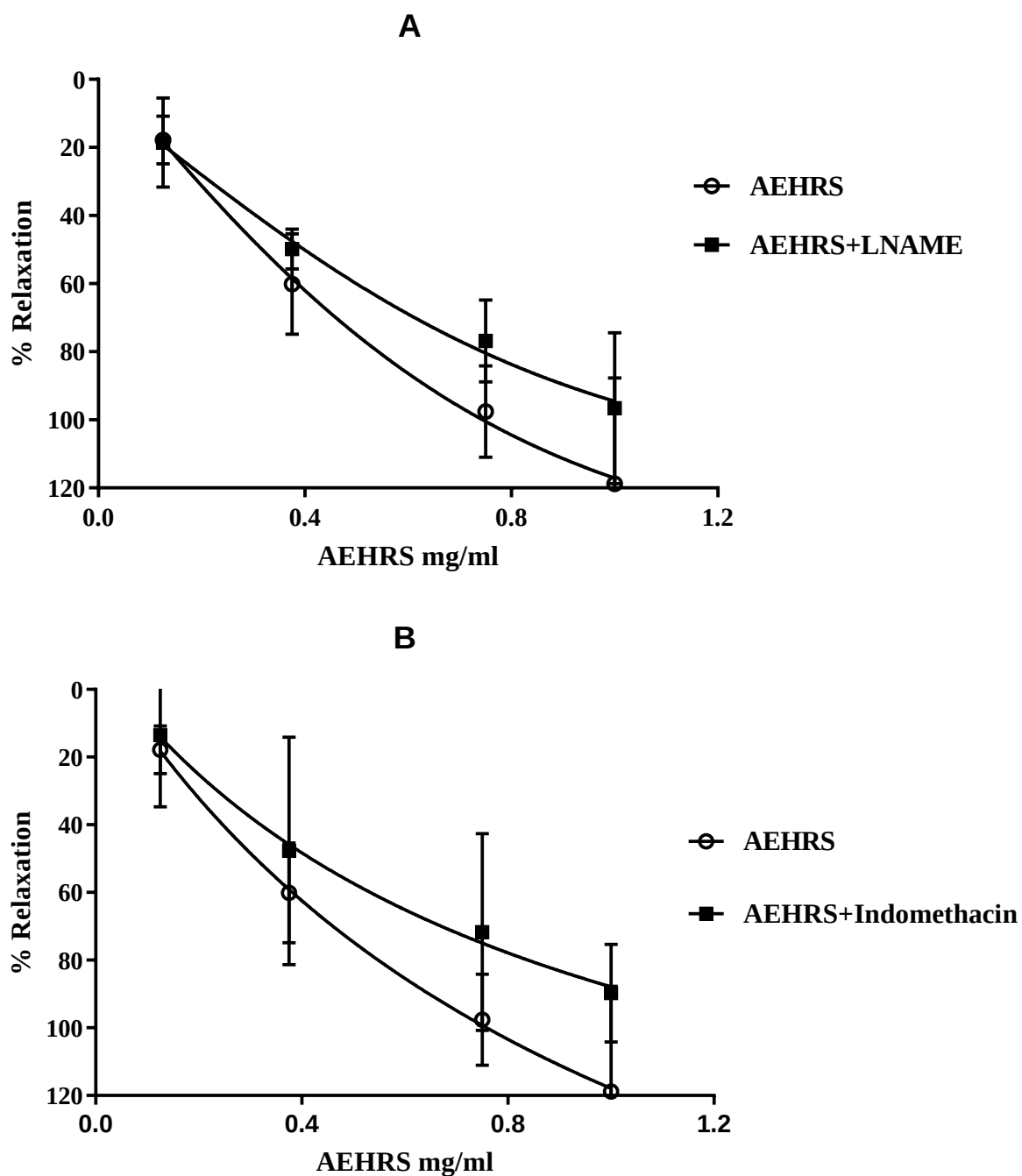


Fig. 6. Effect of different drugs incubation on AEHRS- relaxation of EP-induced contraction in aortic rings. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHRS in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) L-NAME, (B) Indomethacin, Data represent mean $\pm$ SEM (n=6) for AEHRS *versus* drug plus AEHRS.

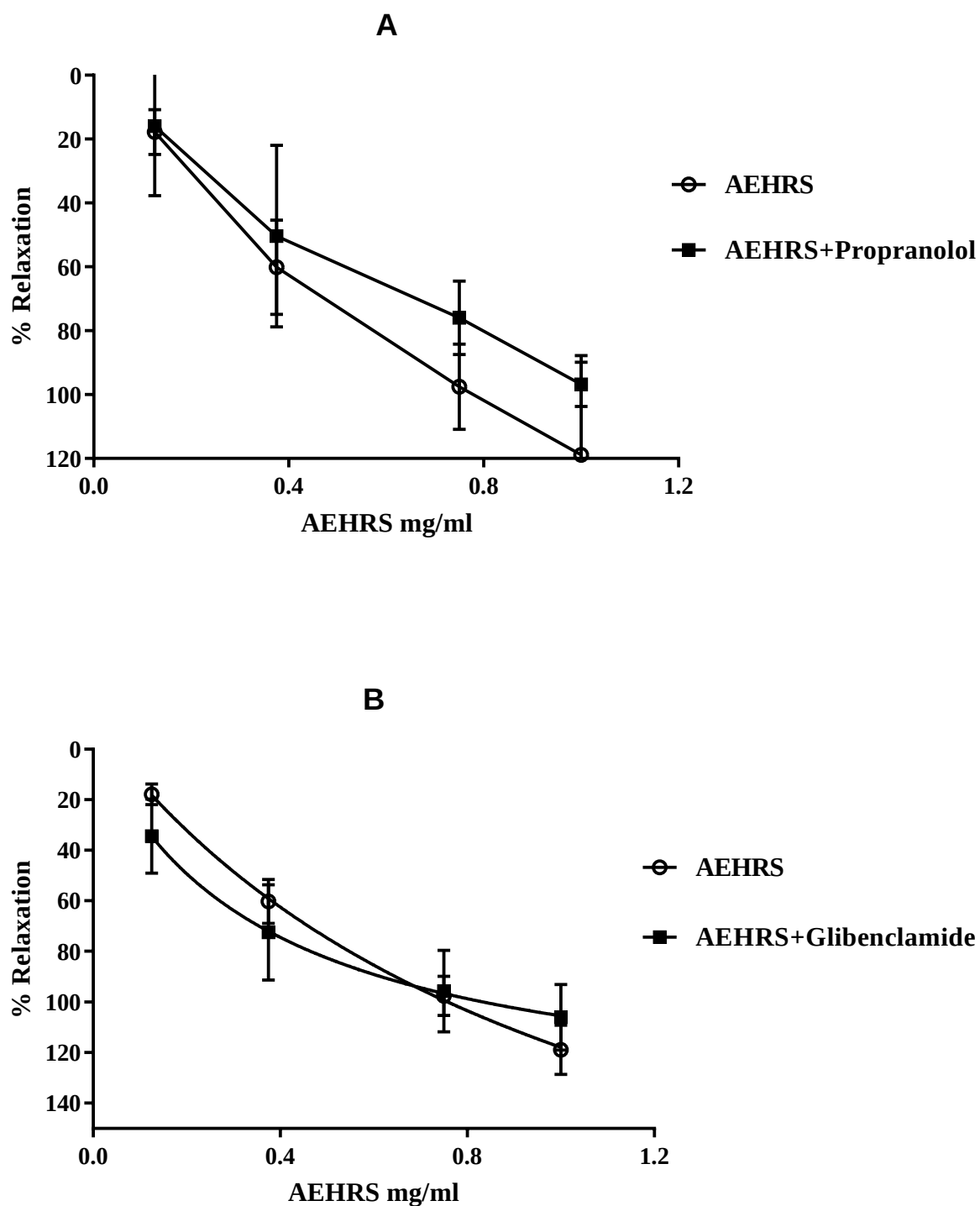


Fig. 7. Effect of propranolol (A) and glibenclamide (B) incubation on AEHRS-induced vasorelaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHRS in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs. Data represent mean $\pm$ SEM (n = 6; for AEHRS versus drug plus AEHRS).

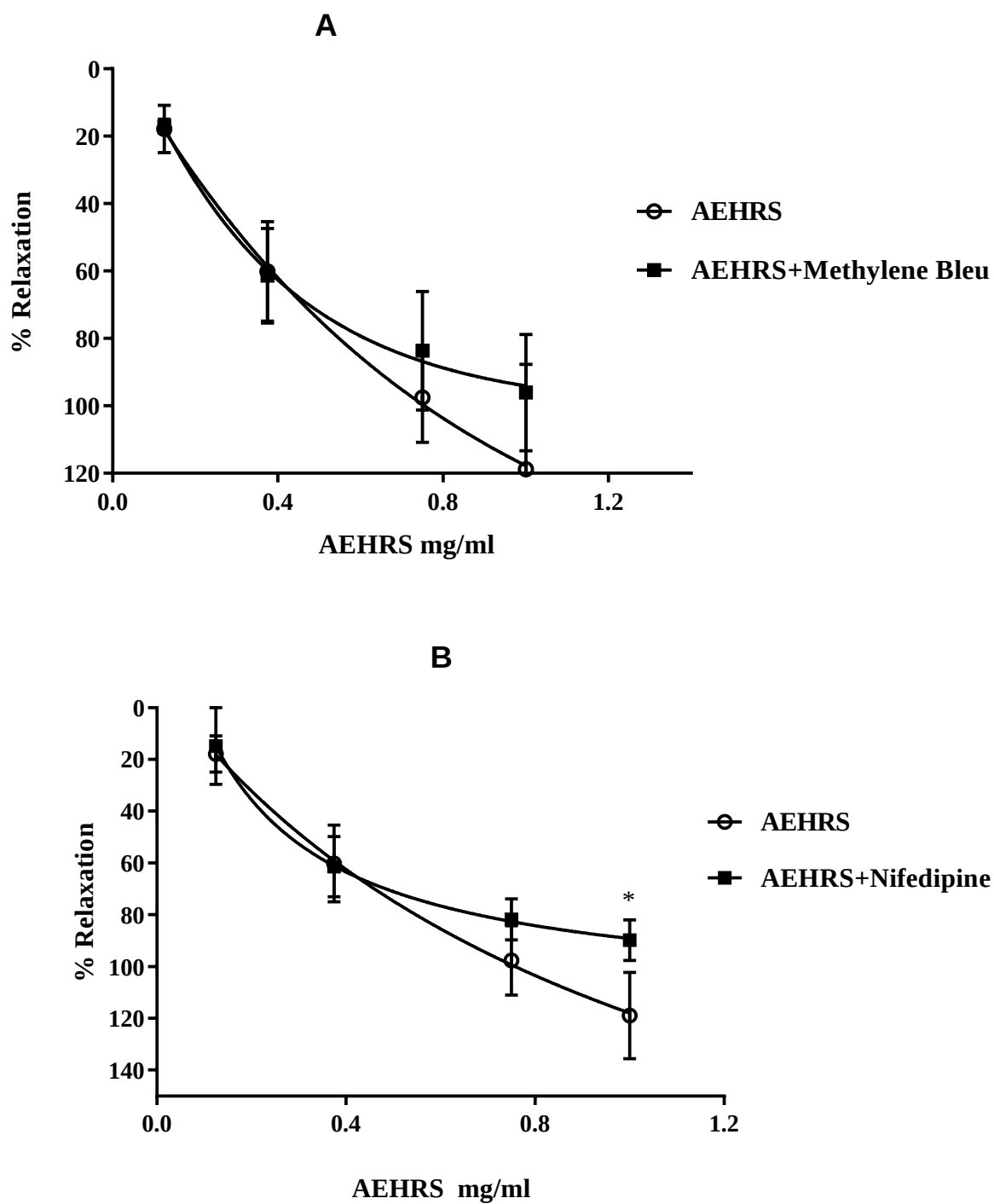


Fig. 8. Effect of methylene blue (A) and nifedipine (B) drugs incubation on AEHRS-induced vasorelaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHRS in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs. Data represent mean $\pm$ SEM ($n = 6$; for AEHRS versus drug plus AEHRS).

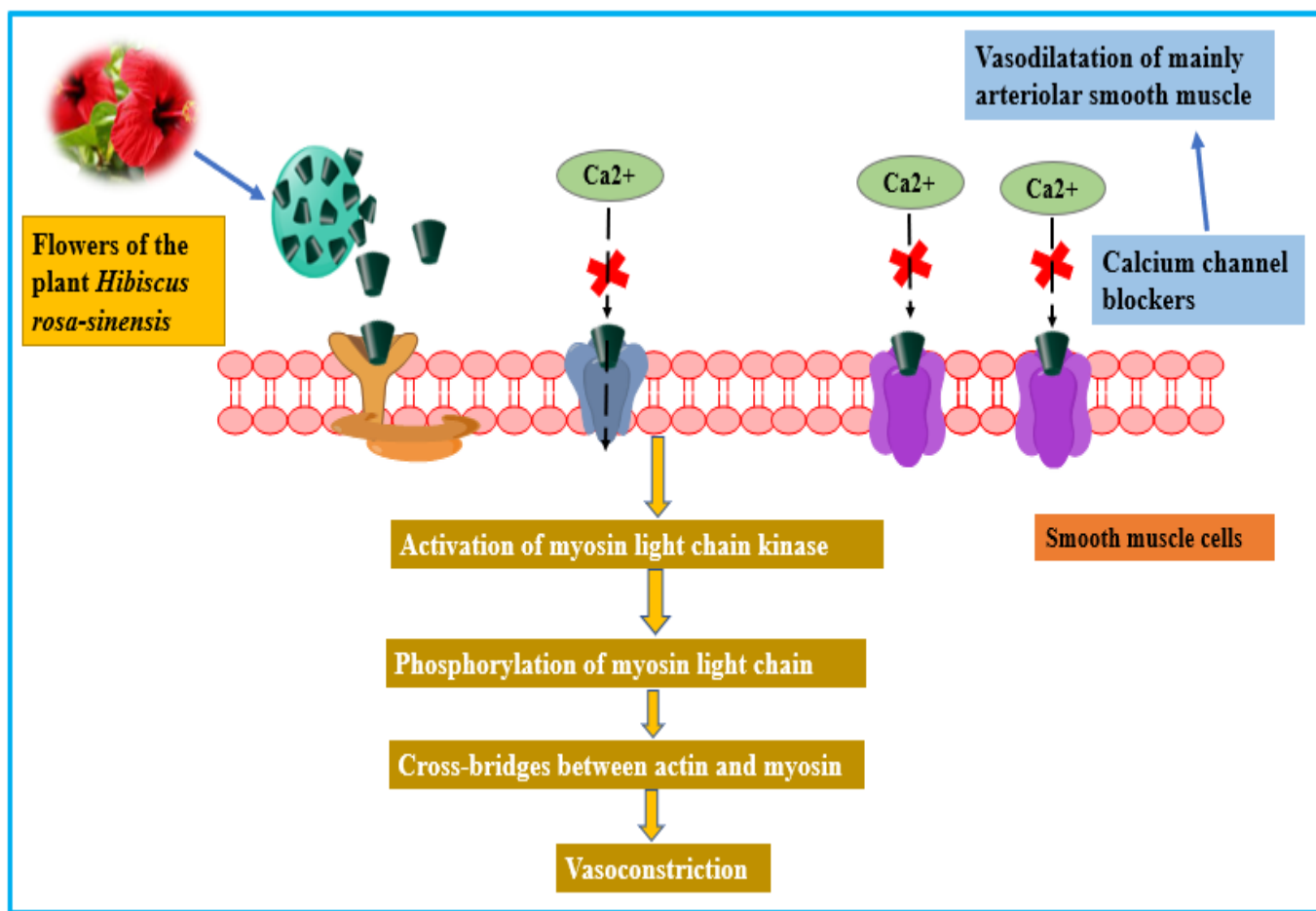


Fig. 9. Graphical abstract illustrating the simplified representation of the mechanical process of bioactive compounds of AEHRS through the blockade of Ca²⁺ calcium channels in rat aortic smooth muscle.

Chapitre IV

Étude d'*Euphorbia cheiradenia* L.

Ce chapitre se compose de la publication 2:

Publication 2: Amtaghri, S., Amssayef, A., Slaoui, M., and Eddouks, M. (2023). Antihypertensive Effect of *Euphorbia cheiradenia* in Rats. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. 21(3):213-222.

Article 2 :

Antihypertensive Effect of *Euphorbia cheiradenia* in Rats

Résumé :

L'objectif de cette étude était d'examiner les propriétés antihypertensives et vasorelaxantes potentielles des parties aériennes de l'extrait aqueux d'*Euphorbia cheiradenia* chez des rats hypertendus induits par le L-NAME (N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester), ainsi que l'effet vasorelaxant sur l'aorte thoracique isolée de rat. De plus, l'effet inhibiteur possible de l'extrait aqueux sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) a été étudié.

L'étude a montré qu'après une administration orale répétée pendant 7 jours à des rats hypertendus induits par le L-NAME, l'extrait a réduit les mesures de la pression artérielle (pression systolique, moyenne et diastolique). En ce qui concerne l'activité vasorelaxante, l'extrait de la plante a partiellement relaxé les anneaux aortiques en activant le canal KATP et en inhibant la voie des récepteurs β -adrénergiques. Le prétraitement des anneaux aortiques avec de la nifédipine, de l'indométacine, du L-NAME et du bleu de méthylène n'a eu aucun effet sur la vasorelaxation induite par l'extrait végétal. Cependant, l'extrait n'a montré aucun effet sur l'ACE2 dans les aortes isolées de rat.

Enfin, cette étude a révélé que l'extrait aqueux d'*Euphorbia cheiradenia* est un agent fonctionnel potentiel pour la promotion et le traitement de l'hypertension, bien qu'il n'ait aucun effet sur l'ACE2.

Antihypertensive Effect of *Euphorbia cheiradenia* in Rats

Smail Amtaghri^{1,2}, Ayoub Amssayef¹, Miloudia Slaoui, Mohamed Eddouks^{1*}

Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, 2023, 21(3):213-222.

¹*Team of Ethnopharmacology and Pharmacognosy, Faculty of Sciences and Techniques Errachidia, Moulay Ismail University of Meknes, Errachidia, Morocco. BP 509 Errachidia, Morocco.*

²*Team EMDD, Center of CERNE2D, Ecole Supérieure de Technologie, Boulevard Mohamed VI Salé, Université Mohammed V, Rabat, Morocco.*

**Corresponding author:*

Address of Correspondence: Faculty of Sciences and Techniques Errachidia, Moulay Ismail University of Meknes, Errachidia, Morocco. BP 509 Errachidia, Morocco. Phone: +212535574497. Fax: +212535574485. E.mail: mohamed.eddouks@laposte.net

Abstract

Aims: The study aimed to investigate the effect of *Euphorbia cheiradenia* on blood pressure.

Background: *Euphorbia cheiradenia* is a medicinal plant with several medicinal properties.

Objective: This study aimed to study the vasorelaxant and antihypertensive capacity of the aqueous extract of *Euphorbia cheiradenia* (E. cheiradenia), and to evaluate its effect on angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2).

Methods: The antihypertensive ability of aerial parts of the aqueous extract of E. cheiradenia (AEEC) was investigated in L-NAME-induced hypertensive rats, and its vasorelaxant effect was performed on the isolated thoracic rat aorta. In addition, the possible inhibitory effect of AEEC on ACE2 was also studied.

Results: AEEC lowered blood pressure parameters in hypertensive rats. The study of the vasorelaxant activity revealed that AEEC partially relaxed the aortic rings through activation of the KATP channel and inhibition of the β -adrenergic pathway. Whereas pretreatment of aortic rings with nifedipine, indomethacin, L-NAME, and methylene blue did not attenuate AEEC-induced vasorelaxation. However, AEEC had no effect on ACE2 in isolated rat aortas.

Conclusion: The study showed that aqueous E. cheiradenia extract exhibits a significant antihypertensive activity in hypertensive rats.

KEYWORDS: Hypertension; *Euphorbia cheiradenia*; L-NAME; vasorelaxant ; KATP channels; adrenergic receptors β ; ACE2.

1. Introduction

Hypertension is a chronic disease which contributes to mortality and leads to many complications [1]. It is an asymptomatic disease which is manifested through screening programs and blood pressure measurement [2]. Drug therapy focuses on antihypertensive drugs. However, many such drugs cause parallel side effects on human health, including heart rhythm abnormalities and medicinal plants could represent an important complementary or alternative approach in the management of hypertension [3].

Euphorbia cheiradenia Boiss. & Hohen. belongs to the Euphorbiaceae family. Ethnopharmacological use of this plant includes the treatment of syphilis, hypertension [4] and pharmacological studies have demonstrated its anti-inflammatory, cytotoxic, and immunostimulant effects [4]. The main objective of this study was to evaluate the antihypertensive and vasorelaxant activities of the aqueous extract of *E. cheiradenia* in hypertensive rats and isolated aortic rings respectively. The underlying mechanisms of vasorelaxant activity were determined using the standards drugs. In addition, the possible inhibitory effect of the aqueous extract of *E. cheiradenia* on angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), as a component of renin-angiotensin system and a known route of SARS coronavirus-2 (SARS-COV-2) entry in endothelial aortic cells, was studied based on the diminazine-induced vasorelaxant activity in isolated aortic rings.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Euphorbia cheiradenia was collected from Imilchil (Draâ-Tafilalet region, Morocco) in December 2020 and dried in the open air at room temperature. The plant was identified and a voucher specimen was deposited at the Faculty of Science and Technology Errachidia (N°EC2020). The aqueous extract of the plant was prepared according to the traditional method used in Morocco (decoction): 5 g of powdered aerial parts, mixed and boiled with 500 ml of distilled water for 10 min and then cooled for 20 min [5]. The crude extract had a yield of 20%. The administered dose was 100 mg of crude aqueous extract per kg of body weight.

2.2. Experimental animals

The wistar male rats weighing 100-150 g were supplied from the Experimental Center (Missour, Morocco) and kept in individual polyethylene cages and standard laboratory conditions *ad libitum*. The rats were acclimated for at least two weeks. The experiments were

carried out according to the guidelines of the local committee, Faculty of Sciences and Techniques Errachidia (FSTE/2015).

2.3. Antihypertensive activity

Hypertension was induced in male albino Wistar rats by repeated (once per day during a three weeks) oral administration of L-N^G-Nitro arginine methyl ester (L-NAME) (60 mg/kg body weight) dissolved in distilled water. L-NAME is an antihypertensive agent classified among the diuretics family. Normal control rats received distilled water as vehicle. The rats were confirmed to be hypertensive and then used in this study when systolic blood pressure was more than 150 mm Hg. Normotensive and hypertensive rats were randomly assigned to three different groups consisting of six rats each. One control group received distilled water, a second treated group received the aqueous extract of aerial parts of AEEC at a dose of 100 mg/kg, and the third group received a reference drug (lasilix at a dose of 20 mg/kg). For single oral administration, distilled water (control), lasilix or the aqueous extract were administered orally and systolic blood pressure (SBP), mean blood pressure (MBP), and heart rate (HR) were measured. For repeated oral administration, rats were treated orally once daily for 7 days and the last three parameters were followed during this period. The rats (n=6 in each group) were treated orally. Animals were anesthetized via the respiratory route by exposing them to ether (50%) for approximately 2 min in order to avoid immobilization stress induction. Estimation of blood pressure was performed, as it has been previously described [5, 6].

2.5. Vasorelaxant activity

Male Wistar rats (260–280 g) were raised and housed (n=6 per cage) in rooms with a controlled light/dark cycle at 25 °C with food and water *ad libitum*. Animals were sacrificed by stunning and exsanguination after anesthesia by pentobarbital sodium. Aortas were immediately excised and placed in cold buffer, quickly removed and carefully cleaned of adhering fat and connective tissue. The isolated arteries were transversally cut into rings 2–3 mm length and suspended at a resting force of 2 g in an tissue bath oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) and containing 40 ml Krebs-Henseleit solution (KH), maintained at 37 °C and pH 7.4 and containing (mM): NaCl (118), KCl (4.50), NaHCO₃ (25), MgSO₄ (1.2), CaCl₂ (1.8), NaHPO₄ (1.2) and glucose (11). Changes in force were recorded isometrically using force transducer (LCM Systems Ltd, Erma, Tokyo). Aortic rings were mounted on two stainless steel hooks, one fixed to the bottom of the chamber and the other to a UF1 force transducer connected to a PowerLab/400 ADInstrument data acquisition system (Harvard, Boyer, Casablanca, Morocco) in order to record

signal corresponding to the isometric tension. The study was performed in endothelium intact aorta. All studies were performed on endothelium intact aorta which was confirmed by 40 or 60% relaxation of epinephrine (EP) (10^{-5} M) induced contractions by acetylcholine (10^{-5} M) [5].

Optimal tension selected from preliminary experiments was the tension which gave the greatest response to 10^{-5} M EP. The rings were given 2 g (100%) of initial tension and allowed to equilibrate for one hour. Thirty minutes after setting up the tissue bath aortas rings were contracted with 10^{-5} M EP or 80 mM potassium chloride (KCl) solution to test their contractile responses. After exposure to 10^{-5} M EP tissues were washed three times with Krebs solution to restore basal tension and this solution was renewed every 40 min.

In order to determine the cumulative dose-dependent curves for AEEC-induced relaxation and after equilibration rings were contracted by EP (10 μ M) and KCl (80 mM). After the plateau was reached AEEC was added cumulatively (500 to 1250 μ g/ml) at each dose of AEEC the curve was allowed to reach a plateau before the addition of subsequent dose. To determine the mechanistic route involved in the vasorelaxant effect induced by AEEC on EP pre-contracted rat aortic rings, the following experiment was carried out: aortic rings were pre-incubated in the presence of a standard antagonist drug during twenty minutes, and EP was added. After the plateau was reached the vasorelaxant effect of AEEC was then tested. Drugs used for pre-incubation were: 1) 10^{-4} M L-NAME, a direct inhibitor of nitric oxide (NO) synthase. 2) 10 μ M glibenclamide an ATP-sensitive K^{+} channel blocker. 3) 10 μ M indomethacin a prostaglandin synthesis inhibitor. 4) 10 μ M propranolol a beta-blocker. 5) 10 μ M methylene blue (MB), a NO-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) blocker. 6) 10 μ M nifedipine a calcium channel blocker. After the addition of EP (10^{-5} M), aortic relaxation was carried out by cumulative addition of AEEC (150, 400, 600, 800 and 900 μ g/ml). Distilled water (150 to 900 μ g/ml) was used in the control experiment. The vasorelaxant effect on the aortic rings was calculated as a percentage of contraction in response to EP. Before changing any of the standard drugs used in this experiment, the aorta ring was washed three times (aorta ring should be incubated 5 min intervals in each bath). For endothelium-independent experiment, the endothelium was removed mechanically by gently rubbing the luminal surface with a wood piece before immersing it in the tissue bath chamber. Endothelial functional integrity was tested by addition of acetylcholine (10 μ M) which induced relaxation [5, 6].

2.6. ACE2 inhibition

In order to determine the cumulative dose-dependent curves for diminazine-induced relaxation and after equilibration rings were contracted by EP (10 μ M). After the plateau was reached, diminazine acetate was added at different doses ($2 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, and 10^{-4} M). The vasorelaxant effect was calculated as a percentage of contraction in response to EP. The control was performed by cumulative addition of vehicle (distilled water) to aortic rings pre-contracted by EP (10^{-5} M). To determine the *ex-vivo* inhibition of ACE2 by AEEC, the following experiment was carried out: EP aortic rings were pre-incubated during 15 min with AEEC (10 μ g/ml). After the addition of EP (10^{-5} M) aortic relaxation was carried out by the second dose of diminazine acetate ($6 \cdot 10^{-5}$ M).

2.7. Chemical reagents and drugs used

Acetylcholine chloride, norepinephrine, diminazine acetate were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). All cited drugs were dissolved in distilled water.

2.8. Statistical analysis

All the values are expressed in average $\pm$ SEM. Statistical significance was tested between more than two groups using ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparison test. The relaxations caused by the AEEC were expressed as a percentage decrease in the contraction of EP and KCl. Each cumulative dose-response curve for AEEC-induced relaxation was plotted as a function of sigmoid fitting curves and non-linear regression using Prism version 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA., U.S.A.) to generate the parameters R_{max} (maximum relaxing response) and IC_{50} (the concentration of AEEC dose required to deliver 50% of the maximum aortic relaxant response dose). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of AEEC on blood pressure parameters

Daily administration of L-NAME caused an increase of arterial pressure in rats. Table 1 shows the effect of a single oral administration of AEEC 100 mg/kg (during 6 hours) on blood pressure parameters in normal and hypertensive rats. The results show that the blood pressure parameters have not been changed in AEEC and distilled water-treated groups during the single oral AEEC administration. However, Lasilix caused a significant reduction of systolic blood

pressure ($p<0.01$), mean arterial and diastolic blood pressure in hypertensive rats after 6 hours of oral administration of the standard drug ($p<0.05$) compared to reference values (T0).

In the subchronic experiment, AEEC was administered orally for seven successive days at a dose of 100 mg/kg body weight to normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats (Table 2). The results show that the extract produced a significant decrease of systolic arterial pressure (SABP) in hypertensive rats at the second, fourth, and seventh day of administration ($p<0.001$, $p<0.0001$ and $p<0.0001$ respectively). Lasilix induced a decrease in SABP in the normotensive group at day 7 of administration ($p<0.5$) and in the hypertensive group at days 4 and 7 of treatment ($p<0.0001$).

AEEC decreased mean arterial pressure in a concomitant manner after one week of oral administration in hypertensive rats at days 4 and 7 of administration ($p<0.0001$ and $p<0.0001$ respectively). In addition, lasilix induced a significant decrease in mean arterial pressure on days 4 and 7 ($p<0.0001$) in hypertensive rats, whereas no effects were noticed in the normotensive groups. Similarly, in hypertensive rats, AEEC produced a decrease of diastolic pressure at days 4 and 7 of administration ($p<0.0001$ and $p<0.0001$ respectively). Lasilix induced a decrease of diastolic pressure at the fourth and seventh days of administration ($p<0.0001$) in hypertensive rats. However, no change of blood pressure parameters has been observed in normotensive rats during both acute and subchronic treatments with AEEC. Finally, no change of heart rate was noticed in all groups treated with AEEC or Lasilix.

3.2. Vasorelaxant effect of AEEC in isolated rat aortic rings

AEEC (190 to 1130 $\mu\text{g/ml}$) caused a dose-response vasorelaxant effect in aortic rings precontracted with norepinephrine (NE) ($p<0.01$ to $p<0.0001$) (Fig. 1); the IC_{50} value was equal to 13.98 ± 4.14 $\mu\text{g/ml}$ with 95% confidence interval: 0.75-1.00 $\mu\text{g/ml}$, and a percentage of relaxation of $99.25 \pm 13.93\%$ ($p<0.0001$). The vasorelaxant effect of AEEC (190 to 1130 $\mu\text{g/ml}$) on endothelium-denuded aortic rings showed an IC_{50} value of 1.10 ± 5.89 $\mu\text{g/ml}$, with a 95% confidence interval: 1.00-1.13 $\mu\text{g/ml}$, and a percentage of relaxation of $105.71 \pm 28.61\%$ showing that the relaxation of the aorta by AEEC is endothelium independent (Fig. 2).

3.3. Aortic response to AEEC in the presence of several inhibitors

To determine the mechanism of action involved in the vasorelaxant effect of AEEC, aortic rings were pre-incubated with several inhibitors. Preincubation with propranolol, a beta-adrenergic blocker, has inhibited the vasorelaxant effect of AEEC; the IC_{50} of propranolol was

equal to 0.61 ± 1.07 with 95% confidence interval: 0.50-0.75 $\mu\text{g/ml}$ and a percentage of relaxation of $118 \pm 4.48\%$ (Fig. 3A). In addition, pre-incubation of aortic rings with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, caused a decrease of the vasorelaxant activity of AEEC; $\text{IC}_{50} = 0.62 \pm 1.08$ $\mu\text{g/ml}$, with a 95% confidence interval: 0.50-0.75 $\mu\text{g/ml}$, and the percentage of relaxation was equal to $114.71 \pm 2.32\%$ (Fig. 3B).

To verify whether nitric oxide (NO) participates in AEEC-induced relaxation, aortic rings were pre-incubated with L-NAME (1 μM) for 15 min before PE precontraction (10 μM). No significant change of the vasorelaxant effect of AEEC was observed after L-Name pre-incubation; IC_{50} was equal to 1.69 ± 2.64 (Fig. 4A). Similarly, the percentage of relaxation was equal to $117.18 \pm 9.75\%$. These results indicate that L-NAME, an NO inhibitor, has not significantly altered the vasorelaxant responses of rat aortic rings to AEEC.

Indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis, had no effect on the vasorelaxant effect of AEEC; $\text{IC}_{50} = 0.80 \pm 1.17$ $\mu\text{g/ml}$ with a 95% confidence interval: 0.75-1.00 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 4B). Similarly, the percentage of relaxation was equal to $102.85 \pm 4.79\%$.

Methylene blue (MB), a guanosine monophosphate NO-cyclic (GMPc) blocker, did not cause any significant change of the vasorelaxant activity of AEEC; $\text{IC}_{50} = 0.8 \pm 1.35$ $\mu\text{g/ml}$ with a 95% confidence interval: 0.75-1.00 $\mu\text{g/ml}$, and the percentage of relaxation was equal to $90.99 \pm 11.55\%$ (Fig. 5A). Furthermore, nifedipine, a calcium channel blocker, has not inhibited the vasorelaxant activity of AEEC; $\text{IC}_{50} = 0.70 \pm 1.12$ $\mu\text{g/ml}$ with a 95% confidence interval: 0.50-0.75 $\mu\text{g/ml}$, and the percentage of relaxation was equal to $81.23 \pm 10.63\%$ (Fig. 5B).

3.4. ACE2-receptor inhibitor

Increasing concentrations of diminazine (DIZE) ($2 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$ and 10^{-6} M) caused relaxation of aortic rings in a dose-dependent manner (data not shown). A significant vasorelaxation effect was observed at the three concentrations ($2 \cdot 10^{-5}$ M: $32 \pm 3\%$, $6 \cdot 10^{-5}$ M: $52 \pm 3\%$, 10^{-6} M: $66 \pm 2\%$ ($p < 0.0001$) when compared with distilled water-treated group: $2.8 \pm 0.1\%$). In addition, the experiments showed that the effect of diminazine-induced vasorelaxation was attenuated after endothelium denudation (data not shown). Pre-incubation of aortic rings with *E. cheiradenia* (10 $\mu\text{g/ml}$) has not induced any inhibitory effect on diminazine-induced vasorelaxation after precontraction with EP (Fig. 6).

4. Discussion

L-NAME is a nitric oxide synthase (NSO) inhibitor inducing hypertension [7]. L-Name-induced hypertension in rodents is a valuable animal model to assess the antihypertensive activity of several drugs including medicinal plants. In this study, this animal model has been used to assess the antihypertensive and vasorelaxant effects of *E. cheradenia*. Despite *E. cheradenia* has demonstrated to exhibit several pharmacological activities, however, until now, no study has evaluated its antihypertensive and vasorelaxant effects. The results show clearly the *in vivo* antihypertensive and vasorelaxant activities of the aqueous extract of *E. cheradenia* in isolated aortic rings. Acute AEEC treatment did not produce any change of blood pressure parameters in normotensive and hypertensive rats. Contrarily, the subchronic treatment with AEEC during seven days showed a decrease of SBP, MBP, DBP, and HR. This finding shows clearly the antihypertensive ability of AEEC in L-induced hypertensive rats. Vasorelaxation is correlated with hypertension because structural and functional changes in the vascular endothelium contribute to hypertension. The results show clearly that AEEC possesses a strong vasorelaxant activity in isolated aortic rings and this effect was endothelium independent because vasorelaxation has not been attenuated in endothelium-denuded aortic rings when compared with endothelium-intact aortic rings treated with AEEC. To determine the mechanism involved in the vasorelaxant effect of AEEC, aortic rings were pre-incubated in the presence of various drugs, including indomethacin, nifedipine, methylene blue, propranolol, glibenclamide, and L-NAME. The results revealed that pre-incubation with glibenclamide, a selective K⁺ channel blocker (KATP) sensitive to ATP, showed an inhibitory effect on AEEC-induced vasorelaxation in EP precontracted aortic rings ($p < 0.05$). In addition, propranolol, a nonselective β -adrenergic receptor, caused a decrease of the vasorelaxant activity induced by AEEC after the second and third dose of AEEC ($p < 0.05$, $p < 0.01$ respectively). However, indomethacin, nifedipine, methylene blue, and L-NAME had no effect on the vasorelaxant activity of AEEC. These results show that stimulation of ATP-sensitive K⁺ channels and adrenergic receptor β is the main mechanism involved in the vasorelaxant activity of AEEC (Figure 7). Furthermore, the vasorelaxant activity of AEEC is not mediated through inhibition of nitric oxide (NO) synthase, prostaglandin synthesis, NO-cyclic guanosine monophosphate (cGMP), or calcium channels. KATP channels and adrenergic receptors (ARs) are known regulators of vascular smooth muscle tonus and then cardiovascular system [8]. Similarly, we have previously demonstrated the intervention of the β -adrenergic pathway in the vasorelaxant effect of the

aqueous extract of *Micromeria graeca* [9] and the involvement of the KATP channel pathway in the vasorelaxant effect of *Warionia saharae* and *Matricaria pubescens* [10, 11].

Angiotensin- converting enzyme 2 (ACE-2) is an integral membrane protein localized in the lung, renal, small intestine, epithelial cells, and arterial and venous endothelial cells [12-14]. ACE2 is a critical controller of the regulation of cardiovascular function [15]. Therefore, ACE2 is a potential therapeutic target for the treatment of hypertension and cardiac dysfunction [16]. It regulates blood pressure and helps to maintain blood pressure homeostasis by negatively regulating the renin-angiotensin system [16]. Furthermore, ACE 2 is considered as a promising pharmacological target in developing new anti-Covid-19 drugs. SARS-COV-2 has the ability to interact with ACE 2 as a receptor for cell entry [17]. Diminazine aceturate (DIZE) is known as a specific stimulator of ACE2 [18]. The activation of ACE2 by DIZE was found to induce vasorelaxation in arteries [19]. Therefore, the inhibition of diminazine-induced vasorelaxation means ACE-2 blockade activity. In this study, the *ex vivo* efficacy of aqueous *E. cheiradenia* extract on ACE2 inhibition using diminazine-induced vasorelaxation in isolated aortic rings was also assessed. The results show that AEEC had no inhibitory effect on ACE 2.

5. Conclusion

The study demonstrates for the first time the antihypertensive effect of AEEC in L-Name-induced hypertensive rats. This antihypertensive activity seems to be linked to the vasorelaxant activity of this plant extract in aortic rings. The mechanistic study shows clearly that this vasorelaxant activity seems to be mediated through the stimulation of ATP-sensitive K⁺ channels and β adrenergic receptors. In addition, the aqueous extract of *Euphorbia cheiradenia* has no inhibitory effect on ACE 2. These results support experimentally the use of *Euphorbia cheiradenia* in the management of hypertension. However, further phytochemical and toxicological studies are needed to determine the active(s) principle(s) along with their safety.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No humans were used for studies that are the basis of this research. The reported experiments on animals are in accordance with the US National Research Council's "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

CONFLICTS OF INTEREST

Mohamed Eddouks is the Regional Editor of Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets. However, the other authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

FUNDING

This work was carried out with the assistance of CNRST (grant N° 2015/35) and Hassan II Academy of Science and Technology, Morocco.

ETHICS APPROVAL

All applicable guidelines for the care and use of animals were followed according to the local ethical committee, Faculty of Sciences & Techniques, Errachidia, Errachida, Morocco, number FSTE/2015.

AVAILABILITY OF DATAS AND MATERIALS

The data supporting the findings of the article are available within the article.

6. References

- [1] Lewington S. Prospective studies collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002;360 :1903–1913.
- [2] Chow CK. Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension in Rural and Urban Communities in High-, Middle-, and Low-Income Countries. *JAMA* 2013;310 : 959.
- [3] Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi M-L, Jouad H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J Ethnopharmacol* 2002;82:97–103.
- [4] Amirghofran Z, Malek-hosseini S, Gholmoghaddam H, Kalalinia F. Inhibition of tumor cells growth and stimulation of lymphocytes by *Euphorbia* species. *Immunopharm Immunotoxicol* 2011;33:34–42.
- [5] Ajebli M, Eddouks M. Antihypertensive activity of *Petroselinum crispum* through inhibition of vascular calcium channels in rats. *J Ethnopharmacol* 2019;242:112039.
- [6] Ajebli M, Eddouks M. *Eucalyptus globulus* possesses antihypertensive activity in L-NAME-induced hypertensive rats and relaxes isolated rat thoracic aorta through nitric oxide pathway. *Nat Prod Res* 2019;1–3.
- [7] Potue P, Wunpathe C, Maneesai P, Kukongviriyapan U, Prachaney P, Pakdeechote P. Nobiletin alleviates vascular alterations through modulation of Nrf-2/HO-1 and MMP pathways in l-NAME induced hypertensive rats. *Food Funct* 2019;10:1880–1892.
- [8] Iaccarino G, Cipolletta E, Fiorillo A, Anecchiarico M, Ciccarelli M, Cimini V, et al. Beta(2)-adrenergic receptor gene delivery to the endothelium corrects impaired adrenergic vasorelaxation in hypertension. *Circulation* 2002;106(3):349-55.
- [9] Akdad M, Eddouks M. Cardiovascular Effects of *Micromeria graeca* (L.) Benth. ex Rchb in Normotensive and Hypertensive Rats. *Endocr. Metab. Immune Disord Drug Targets* 2020;20:1253–1261.
- [10] Amssayef A, Eddouks M. Aqueous Extract of *Matricaria pubescens* Exhibits Antihypertensive Activity in L-NAME-induced Hypertensive Rats through its Vasorelaxant Effect. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2019;17:135–143.
- [11] EL-Ouady F, Eddouks M. *Warionia saharae* induces antihypertensive and vasorelaxant activities through nitric oxide and KATP channels pathways in rats. *J Complement Integr Med* 2019.
- [12] Chen L, Li X, Chen M, Feng Y, Xiong C. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. *Cardiovasc Res* 2020;116:1097–1100.
- [13] Liu F, Long X, Zhang B, Zhang W, Chen X, Zhang Z. ACE2 Expression in Pancreas May Cause Pancreatic Damage After SARS-CoV-2 Infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020;18:2128-2130.e2.
- [14] Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al.. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579:270–273.
- [15] De Maria L.A.M, Araújo L, A. Fraga-Silva R, Pereira L, Ribeiro H, Menezes G, et al. Anti-hypertensive Effects of Diminazene Aceturate: An Angiotensin- Converting Enzyme 2 Activator in Rats. *PPL* 2015;23:9–16.
- [16] Bosso M, Thanaraj TA, Abu-Farha M, Alanbaei M, Abubaker J, Al-Mulla F. The Two Faces of ACE2: The Role of ACE2 Receptor and Its Polymorphisms in Hypertension and COVID-19. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2020;18:321–327.
- [17] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020;181:271-280.e8.
- [18] Behl T, Kaur I, Bungau S, Kumar A, Uddin MS, Kumar C, et al. The dual impact of ACE2 in COVID-19 and ironical actions in geriatrics and pediatrics With possible therapeutic solutions. *Life Sci* 2020;10:118075.
- [19] Sartório CL, Pimentel EB, Dos Santos RL, Rouver WN, Mill JG. Acute hypotensive effect of diminazene acetate in spontaneously hypertensive rats: role of NO and Mas receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2020;47(10):1723-30.

Table 1: Effect of a single oral administration of *Euphorbia cheradina* (100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in anesthetized normal and L-NAME-induced hypertensive rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=6. *p<0.05; **p<0.01.

		Systolic blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEEC	Lasilix
Normal	T0	132.00 $\pm$ 6.00	113.05 $\pm$ 3.45	120.00 $\pm$ 7.00
	T6	138.00 $\pm$ 8.00	101.55 $\pm$ 3.46	111.00 $\pm$ 7.00
L-NAME	T0	180.00 $\pm$ 5.00	192.89 $\pm$ 2.19	169.00 $\pm$ 7.00
	T6	175.00 $\pm$ 7.00	189.05 $\pm$ 2.02	142.00 $\pm$ 6.00**

		Mean blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEEC	Lasilix
Normal	T0	115.00 $\pm$ 7.00	92.87 $\pm$ 3.83	108.00 $\pm$ 6.00
	T6	113.00 $\pm$ 6.00	82.70 $\pm$ 4.24	97.00 $\pm$ 2.00
L-NAME	T0	156.00 $\pm$ 6.00	156.27 $\pm$ 5.07	150.00 $\pm$ 3.00
	T6	157.00 $\pm$ 6.00	160 $\pm$ 2.27	125.00 $\pm$ 6.00*

		Diastolic blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEEC	Lasilix
Normal	T0	106.00 $\pm$ 5.00	83.67 $\pm$ 6.35	103.00 $\pm$ 5.00
	T6	101.00 $\pm$ 6.00	73.28 $\pm$ 4.87	91.00 $\pm$ 4.00
L-NAME	T0	144.00 $\pm$ 7.00	137.96 $\pm$ 6.96	152.00 $\pm$ 5.00
	T6	148.00 $\pm$ 10.00	145.47 $\pm$ 7.63	129.00 $\pm$ 4.00*

		Heart rate (bpm)		
		Control	AEEC	Lasilix
Normal	T0	320.00 $\pm$ 10.00	303.33 $\pm$ 1.91	349.00 $\pm$ 19.00
	T6	306.00 $\pm$ 8.00	302.67 $\pm$ 0.84	321.00 $\pm$ 9.00
L-NAME	T0	312.00 $\pm$ 15.00	306 $\pm$ 4.38	348.00 $\pm$ 22.00
	T6	318.00 $\pm$ 12.00	300 $\pm$ 2.68	311.00 $\pm$ 17.00

Table 2: Effect of repeated oral administration of *Euphorbia cheiradenia* (100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in anesthetized normal and L-NAME-induced hypertensive rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n = 6. *p<0.05, ****p<0.0001.

		Systolic blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEEC	Lasilix
Normal	D0	134.00 $\pm$ 7.00	113.05 $\pm$ 3.45	120.00 $\pm$ 7.00
	D2	136.00 $\pm$ 5.00	113.60 $\pm$ 4.51	115.00 $\pm$ 5.00
	D4	140.00 $\pm$ 3.00	111.87 $\pm$ 3.61	108.00 $\pm$ 3.00
	D7	135.00 $\pm$ 6.00	108.99 $\pm$ 4.77	99.00 $\pm$ 4.00*
L-NAME	D0	180.00 $\pm$ 5.00	192.89 $\pm$ 2.19	169.00 $\pm$ 6.00
	D2	176.00 $\pm$ 5.00	165.72 $\pm$ 3.82****	122.00 $\pm$ 2.00****
	D4	173.00 $\pm$ 9.00	130.51 $\pm$ 3.91****	120.00 $\pm$ 4.00****
	D7	172.00 $\pm$ 6.00	115.59 $\pm$ 4.21****	109.00 $\pm$ 3.00****

		Mean blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEEC	Lasilix
Normal	D0	111.00 $\pm$ 4.00	92.87 $\pm$ 3.83	109.00 $\pm$ 7.00
	D2	112.00 $\pm$ 5.00	82.84 $\pm$ 8.32	107.00 $\pm$ 5.00
	D4	117.00 $\pm$ 6.00	81.17 $\pm$ 4.11	101.00 $\pm$ 3.00
	D7	112.00 $\pm$ 4.00	83.65 $\pm$ 5.34	96.00 $\pm$ 2.00
L-NAME	D0	156.00 $\pm$ 6.00	156.27 $\pm$ 5.07	150.00 $\pm$ 3.00
	D2	149.00 $\pm$ 6.00	143.94 $\pm$ 4.12	148.00 $\pm$ 5.00
	D4	148.00 $\pm$ 9.00	107.46 $\pm$ 3.86****	103.00 $\pm$ 5.00****
	D7	147.00 $\pm$ 6.00	92.66 $\pm$ 5.24****	95.00 $\pm$ 4.00****

		Diastolic blood pressure (mm Hg)		
		Control	AEEC	Lasilix
Normal	D0	100.00 $\pm$ 3.00	83.66 $\pm$ 6.35	103.00 $\pm$ 6.00
	D2	101.00 $\pm$ 5.00	67.46 $\pm$ 10.94	98.00 $\pm$ 5.00
	D4	106.00 $\pm$ 3.00	65.82 $\pm$ 5.44	97.00 $\pm$ 6.00
	D7	102.00 $\pm$ 8.00	70.98 $\pm$ 5.66	95.00 $\pm$ 4.00
L-NAME	D0	144.00 $\pm$ 7.00	137.96 $\pm$ 6.96	152.00 $\pm$ 5.00
	D2	135.00 $\pm$ 7.00	133.05 $\pm$ 4.99	103.00 $\pm$ 4.00
	D4	135.00 $\pm$ 6.00	95.93 $\pm$ 4.69****	100.00 $\pm$ 4.00****
	D7	136.00 $\pm$ 6.00	81.18 $\pm$ 5.94****	98.00 $\pm$ 3.00****

		Heart rate (bpm)		
		Control	AEEC	Lasilix
Normal	D0	312.00 ± 15.00	303.33±1.91	348.00 ± 22.00
	D2	320.00 ± 14.00	302.67±0.84	341.00 ± 16.00
	D4	312.00 ± 16.00	303.33±0.67	341.00 ± 17.00
	D7	319.00 ± 8.00	303.33±0.67	305.00 ± 8.00*
L-NAME	D0	308.00 ± 12.00	306±4.38	348.00 ± 15.00
	D2	310.00 ±15.00	305.67±2.22	343.00 ± 13.00
	D4	307.00 ± 13.00	305.67±2.55	315.00 ± 11.00
	D7	318.00 ± 18.00	307.33±2.17	311.00 ± 10.00

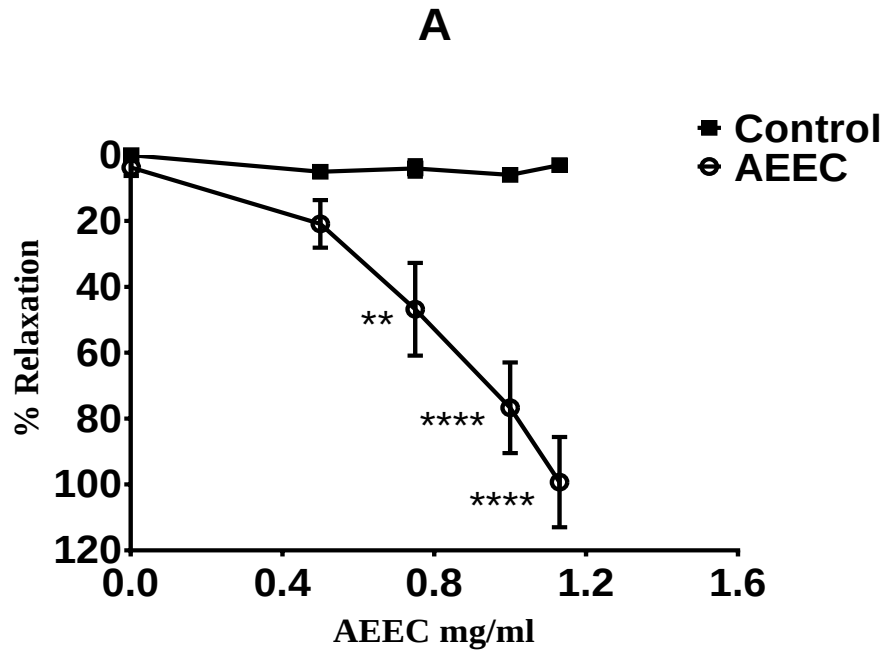


Figure 1: Effect of AEEC extract (190 to 1330 $\mu\text{g/mL}$) on vasorelaxation of aortic rings. Cumulative dose-dependent curves for AEEC-induced relaxation and of the vehicle (distillated water) in rat aortic rings pre-contracted with Norepinephrine (10 μM). $n=6$. ** $p<0.01$; **** $p<0.0001$.

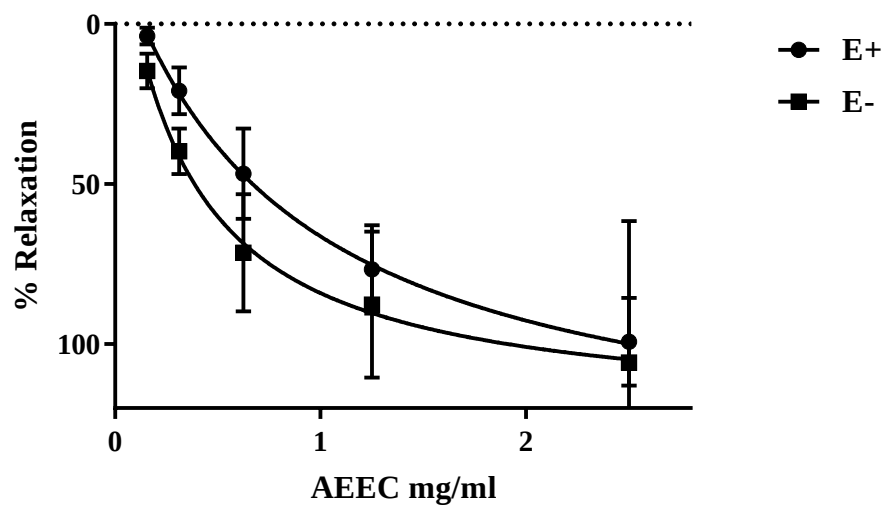


Figure 2. Effect of AEEC on vasorelaxation in EP (10 μ M) pre-contracted aortic rings with endothelium (E+) or without endothelium (E-). Tension (%) indicates the percentage of EP-induced contraction. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM.

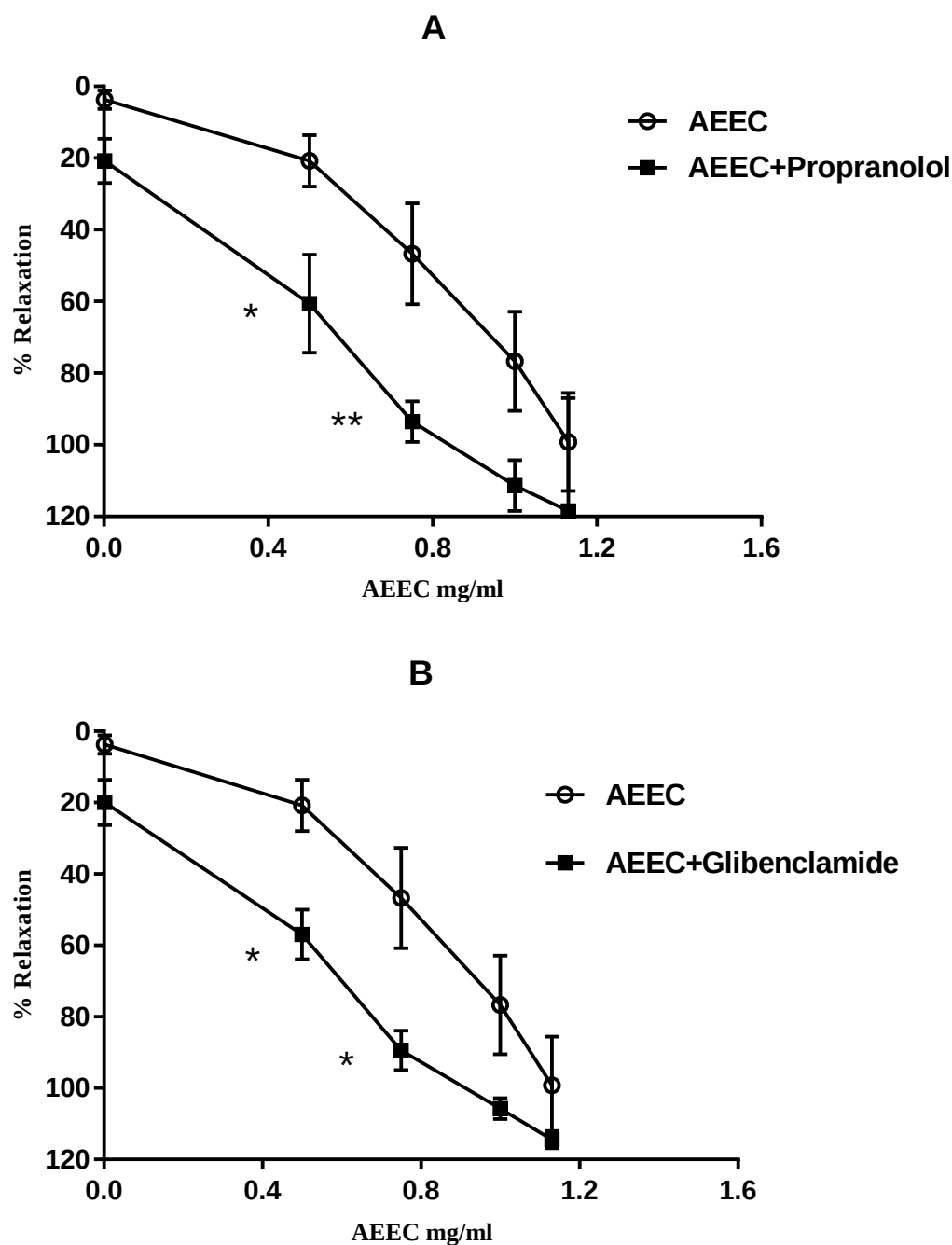


Figure 3: Effect of pre-incubation of aortic ring in the presence of propranolol and glibenclamide on AEEC-induced relaxation. The aortic rings were incubated with cumulative doses of AEEC in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) propranolol, (B) glibenclamide. Data represent mean $\pm$ SEM (n=6; for AEEC versus drug plus AEEC). *p<0.05; **p<0.01.

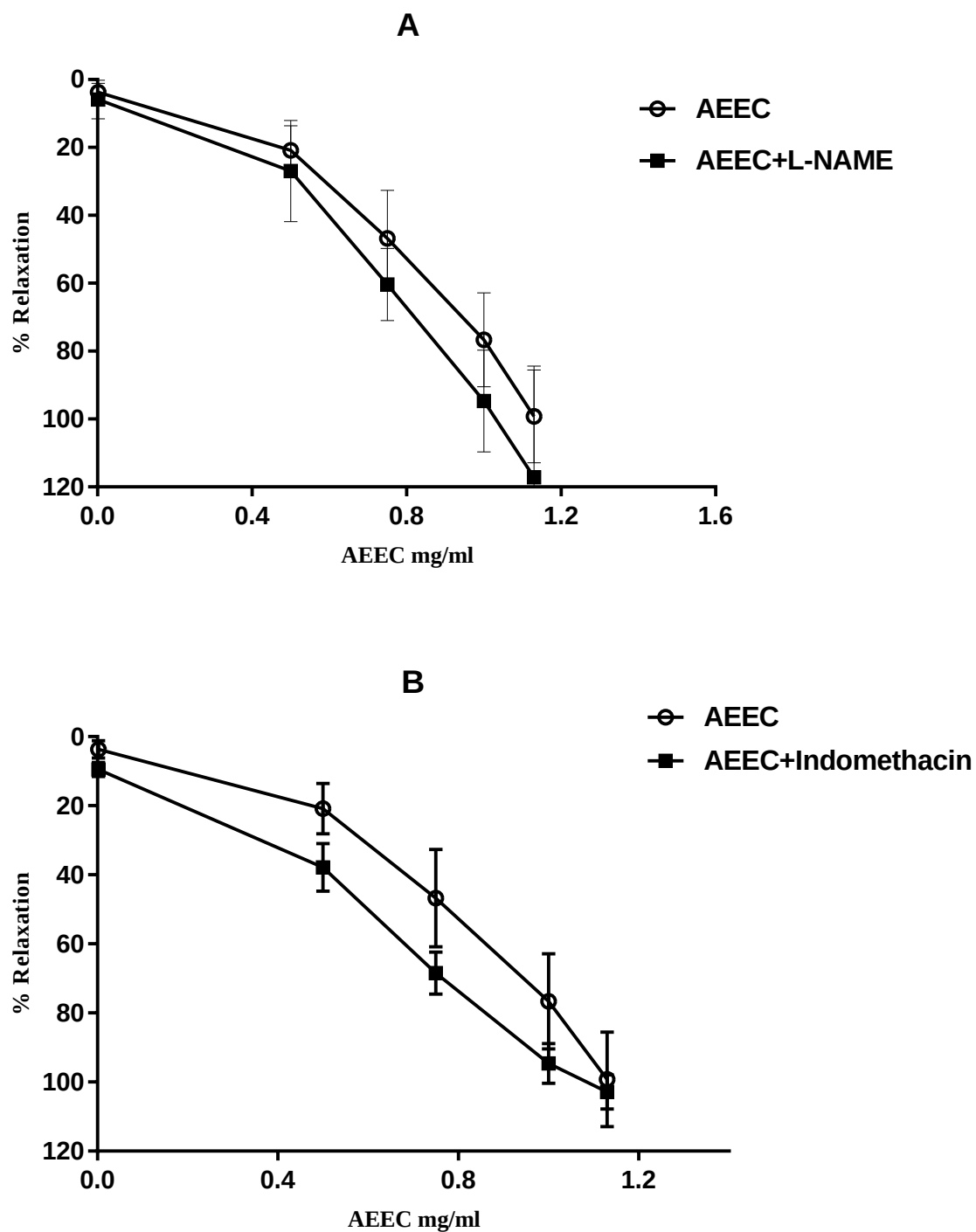


Figure 4: Effect of pre-incubation of aortic ring in the presence of L-Name and indomethacin on AEEC-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEEC in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) L-NAME, (B) indomethacin, Data represent mean $\pm$ SEM (n=6) for AEEC versus drug plus AEEC.

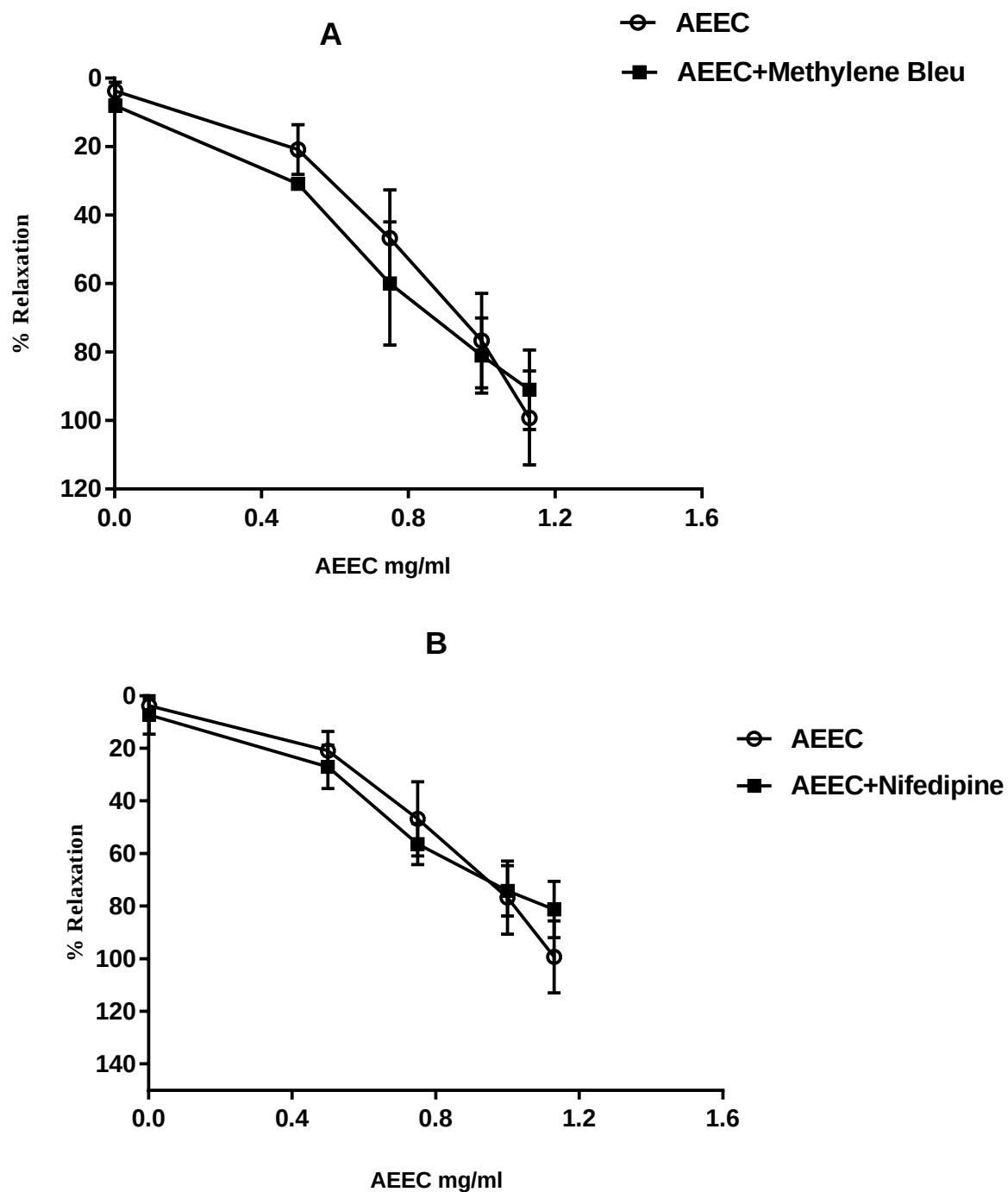


Figure 5: Effect of pre-incubation of aortic ring in the presence of methylene blue and nifedipine on AEEC-induced relaxation. The aortic rings were incubated with cumulative doses of AEEC in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) methylene blue, (B) nifedipine. Data represent mean $\pm$ SEM (n=6; for AEEC versus drug plus AEEC).

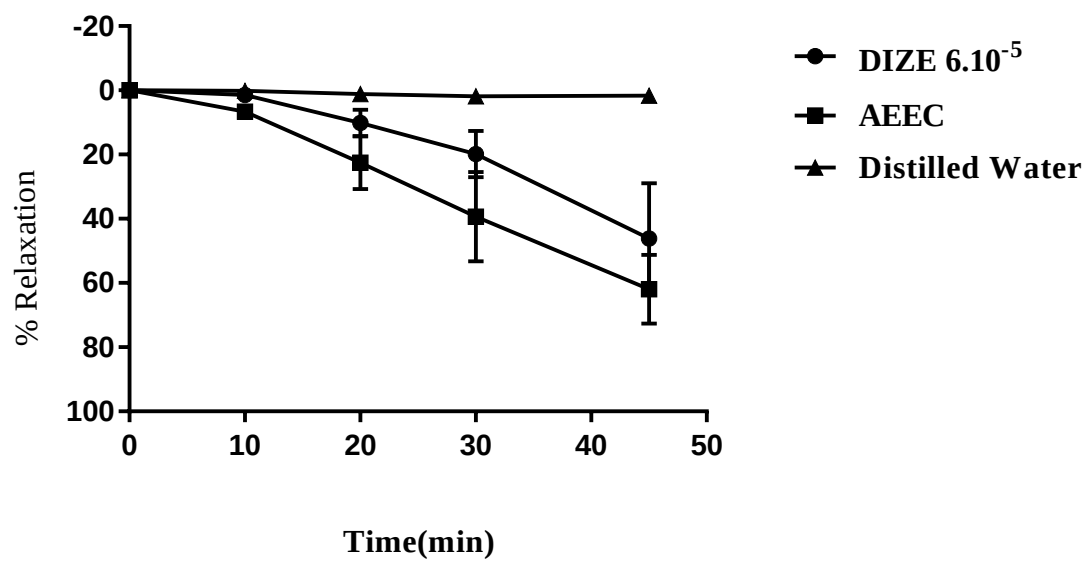


Figure 6: Effect of pre-incubation with AEEC (10 µg/ml) on diminazene-induced relaxation in aortic rings. DIZE: Represents the vasorelaxation effect induced by DIZE 6.10^{-5} M in aortic rings pre-contracted with EP (10^{-5} M).

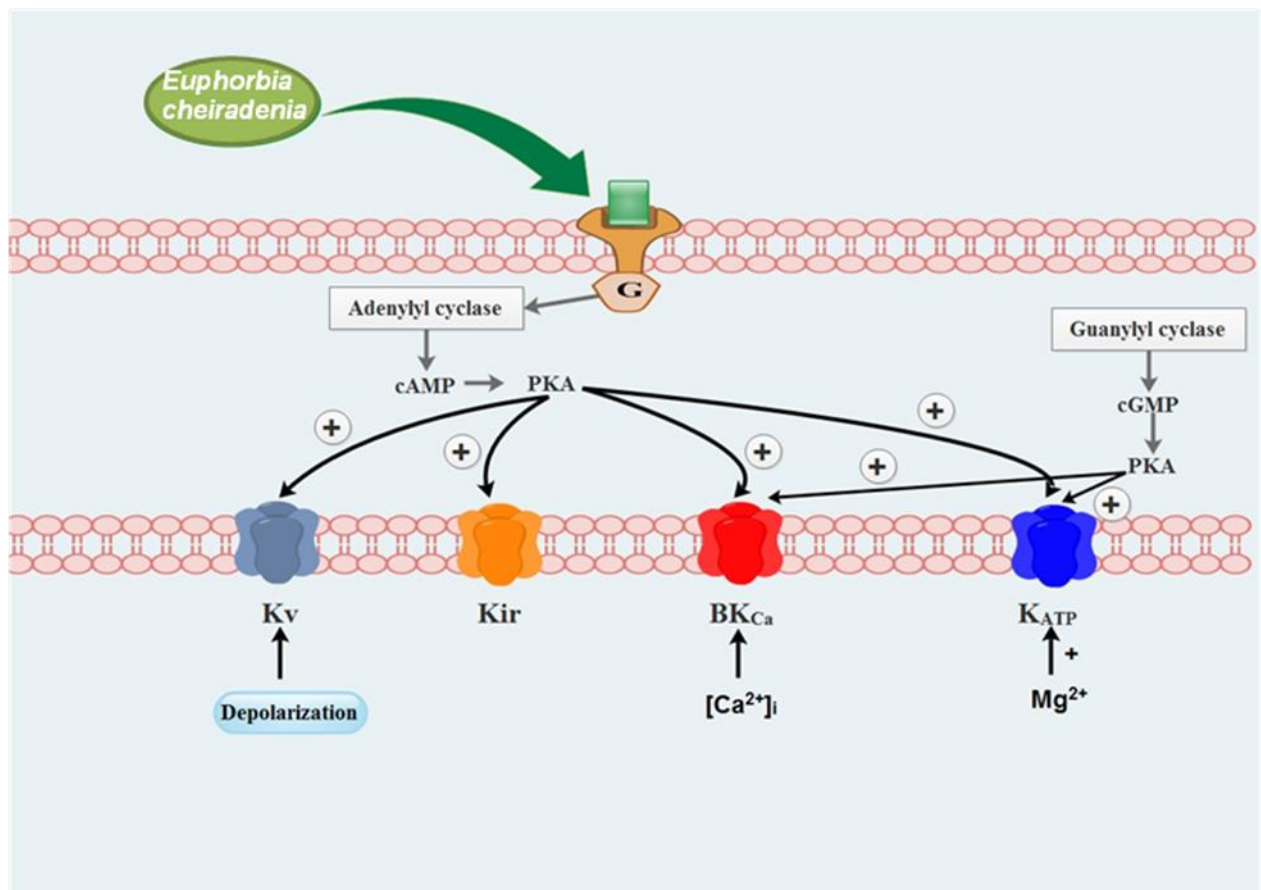


Figure 7: Schematic illustration of the mechanisms of action involved in the vasorelaxant effect of *Euphorbia cheiradenia*. BK_{Ca}: Ca²⁺-activated K⁺ channels ; Kv : voltage-dependent K⁺ channels ; K_{ATP}: ATP-sensitive K⁺ channels ; Kir : inward rectifier K⁺ channels ; PKA : protein kinase A ; PKG : protein kinase G.

Chapitre V

Étude d'*Haloxylon scoparium* L.

Ce chapitre se compose de la publication 3:

Publication 3: Amtaghri, S.; Eddouks, M. Study of the Antihypertensive and Vasorelaxant Activities of *Haloxylon scoparium* in Rats. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* **2023**, 21(2):139-153.

Article 3 :

Study of the antihypertensive and vasorelaxant activities of *Haloxylon scoparium* in rats

Résumé :

L'objectif de cette étude était d'évaluer les propriétés antihypertensives des parties aériennes de l'extrait aqueux d'*Haloxylon scoparium* chez des rats hypertendus induits par le L-NAME, ainsi que son éventuelle activité vasorelaxante sur l'aorte thoracique isolée de rat. Les effets aigus et subchroniques de l'extrait aqueux sur les paramètres de la pression artérielle ont été mesurés après administration orale de la plante (60 et 100 mg/kg de poids corporel) pendant 6 heures dans l'expérience aiguë et 7 jours dans le test subchronique.

D'après les résultats, l'extrait a réduit les paramètres de la pression sanguine chez les rats hypertendus lors d'un traitement oral répété, mais n'a eu aucun effet sur les rats normaux (pression sanguine systolique, moyenne et diastolique). De plus, la norépinéphrine (NE) ou le KCl ont précontracté les anneaux aortiques thoraciques, qui ont ensuite été traités avec l'extrait aqueux d'*Haloxylon scoparium* (375-1250 µg/mL), qui a démontré un effet vasorelaxant. Cet effet a été partiellement diminué en présence de nifédipine par l'inhibition de la voie du canal calcique vasculaire dans l'aorte thoracique isolée de rat.

Enfin, l'étude a démontré l'efficacité de l'extrait aqueux d'*Haloxylon scoparium* en tant qu'agent antihypertenseur. De plus, cette plante possède des propriétés vasorelaxantes via le blocage des canaux Ca^{2+} .

Study of the antihypertensive and vasorelaxant activities of *Haloxylon scoparium* in rats

Smail Amtaghri, and Mohamed Eddouks*

Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. **2023**, 21(2):139-153.

doi: [10.2174/1871525720666220823163542](https://doi.org/10.2174/1871525720666220823163542).

*Team of Ethnopharmacology and Pharmacognosy, Faculty of Sciences and Techniques Errachidia,
Moulay Ismail University of Meknes, BP 509, Boutalamine, Errachidia, 52000, Morocco.*

**: Corresponding author. Prof Mohamed Eddouks, Faculty of Sciences and Techniques Errachidia,
Moulay Ismail University of Meknes, BP 509, Boutalamine, Errachidia, 52000, Morocco. Phone: +212
35 57 44 97; Fax: +212 35 57 44 85; E-mail: mohamed.eddouks@laposte.net*

Abstract

Aims: The work aimed to study the antihypertensive ability of *Haloxylon Scoparium*.

Background: *Haloxylon Scoparium* Pomel is used to treat various diseases including hypertension.

Objective: This study aimed to evaluate the antihypertensive effect of *Haloxylon scoparium* (*H. scoparium*) in hypertensive rats, and to evaluate its probable vasorelaxant activity.

Material and Methods: The aqueous extract of *Haloxylon scoparium* (AEHS) was prepared and used to investigate its antihypertensive ability in L-NAME($N\omega$ -L-arginine methyl ester)-induced hypertensive rats, and its vasorelaxant activity was studied on the isolated thoracic aorta of rats. The acute and subchronic effects of (AEHS) on blood pressure parameters were evaluated after oral administration of AEHS (60 and 100 mg/kg body weight) for 6 h for the acute experiment and for 7 days for the subchronic test.

Results: The results indicated that AEHS decreased blood pressure parameters (systolic, mean, and diastolic blood pressure) after repeated oral administration in hypertensive rats without affecting normal rats. In addition, AEHS (375-1250 μ g/mL) revealed a vasorelaxant effect in thoracic aortic rings precontracted with norepinephrine (NE) (10 μ M) or KCl (80 mM). This effect was partially decreased in the presence of nifedipine, by inhibition of the vascular calcium channel pathway in isolated rat thoracic aorta.

Conclusion: The study demonstrates the beneficial effect of *Haloxylon scoparium* as an antihypertensive agent. Moreover, this plant exerts vasorelaxant activity via blockade of Ca^{2+} channels.

KEYWORDS: *Haloxylon Scoparium* Pomel ; Hypertension ; L-NAME; vasorelaxant ; MLN-4760 ; Angiotensin converting enzyme-2(ACE2); Ca^{2+} Channels.

1. Introduction

Hypertension remains one of the most prevalent and important health problems in the world. It is estimated that 29% of the world's adult population, or 1.56 billion people, will have hypertension by 2025 [1, 2]. The management of hypertension includes many drugs and research of new efficacious herbal-derived drugs is under investigation [3, 4].

Haloxylon scoparium Pomel (*H. scoparium*), also known as *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin, is a dominant species, belonging to the Chenopodiaceae family, it is widely distributed in southeastern Morocco (Drâa-Tafilalet region), in desert areas. *H. scoparium* is used to treat snakebites, scorpions, stomach aches, diabetes, and several other diseases [5]. This plant is used traditionally in Morocco as antihypertensive agent [6], and it is often used in the treatment of skin neoplasms, dermatitis, food poisoning, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, scabies, wound healing, indigestion, stomach ache, gastroenteritis, antidote to scorpion stings and snake bites, and cold [7–9]. The leaves, infused or decocted, are used as a mouthwash to treat mouth diseases and toothache [10].

H. scoparium has been reported to have a low acute toxicity [5]. It has been described to possess antibiotic, antiviral, and antifungal activities [11], antimicrobial, antioxidant, larvicidal, antimalarial cytotoxic, molluscicidal, anticancer, reno-protective, and hepatoprotective effects [5]. Preliminary phytochemical studies clearly indicate the presence of different secondary metabolites in this plant, including alkaloids, condensed and hydrolyzable tannins, saponins, steroids, triterpenoids, coumarins, reducing compounds and glycosides [12, 13]. The objective of this study was to demonstrate the antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous *H. scoparium* extract in L-NAME-induced hypertensive rats.

2. Material and Methods

2.1. Aqueous extract

Haloxylon Scoparium Pomel was collected from Tadighoust desert, a small village located in the Drâa-Tafilalet region, Morocco in September 2020 and air dried at room temperature. The plant was identified and a voucher specimen was deposited at the Faculty of Science and Technology Errachidia (HS 2020). Plant material was prepared according as it has been previously described [14].

2.2. Experimental animals

Healthy albino adult male rats (Wistar strain) weighing about 180-240 g were obtained from the Experimental Center (Missour, Morocco) and kept in individual polyethylene cages and under standard laboratory conditions. All animals were maintained at standard conditions. Experiments were conducted according to the guidelines of the local committee FSTE/2015.

2.3. Experimental protocol

2.3.1. Hypotensive activity

Hypertension was induced in male albino Wistar rats by repeated (once per day during 2 weeks) oral administration of L-NAME (60 mg/kg body weight) dissolved in distilled water; normotensive control rats received distilled water as vehicle. The rats were confirmed to be hypertensive and then used in this study when systolic blood pressure was more than 140 mmHg. Normotensive and hypertensive rats were randomly assigned to four different groups consisting of six rats each. One control group received distilled water, a second treated group received the aqueous extract of aerial parts of *H. Scoparium* (AEHS) at a dose of 60 mg/kg, a third received the aqueous extract of aerial parts of *H. Scoparium* (AEHS) at a dose of 100 mg/kg body weight, and the fourth group received a reference drug (lasilix at a dose of 20 mg/kg). For single oral administration, distilled water (control), lasilix or the aqueous extract were administered and systolic blood pressure (SBP), mean blood pressure (MBP) and heart rate (HR) of animals were measured. For the repeated oral administration, rats were treated once daily for 7 days and the three last parameters were followed during this period. The rats (n = 6 in each group) were treated orally. All experiments were performed after slight anesthesia of rats using ether in order to avoid immobilization stress induction. For estimation of blood pressure, rats were placed in the NIBP restrainers and appropriate cuff with sensor was then attached on its tail and warmed to about 35°C for 15–20 min to allow reproducible blood pressure measurements (three measurements per animal per session) using a tail cuff and a computer-assisted monitoring device. The tail cuff was inflated to a pressure well above the expected systolic blood pressure (200 mmHg) and slowly released during which the pulses were recorded by using Power Lab data acquisition system and Lab chart 5.0 software. Systolic blood pressure (SBP), mean blood pressure (MBP) and heart rate (HR) were measured directly using pulse tracing while diastolic blood pressure (DBP) was calculated from SBP and MBP using formula: $DBP = (3MBP - SBP)/2$ [4]. All blood pressure measurements were carried out at the same time of day for the sub-chronic test [15].

2.3.2. Vasorelaxant activity

Male Wistar rats (180-240 g) were raised and housed (n=6 per cage) in rooms with a controlled light/dark cycle at 25 °C with food and water *ad libitum*. Animals were sacrificed by stunning and exsanguination after anesthesia by pentobarbital sodium. Aortas were immediately excised and placed in cold buffer, then, quickly removed and carefully cleaned of adhering fat and connective tissue. The isolated arteries were transversally cut into rings 2–3mm length and suspended at a resting force of 2 g in an tissue bath oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) and containing 40 ml Krebs-Henseleit solution (KH), maintained at 37 °C and pH 7.4 and containing (mM): NaCl (118), KCl (4.50), NaHCO₃ (25), MgSO₄ (1.2), CaCl₂ (1.8), NaHPO₄ (1.2) and glucose (11). Changes in force were recorded isometrically using force transducer (LCM Systems Ltd, Erma, Tokyo). Aortic rings were mounted on two stainless steel hooks, one fixed to the bottom of the chamber and the other to a UF1 force transducer connected to a PowerLab/400 ADInstrument data acquisition system (Harvard, Boyer, Casablanca, Morocco) in order to record signal corresponding to the isometric tension. The study was performed in endothelium intact aorta. In experiment with endothelium intact aorta the integrity of endothelium was confirmed if acetylcholine (10 µM) could cause relaxation (40 or 60%) of aorta precontracted with epinephrine (EP; 10⁻⁵ M) [16]. Optimal tension selected from preliminary experiments was the tension which gave the greatest response to 10⁻⁵ MEP. The rings were given 2 g (100%) of initial tension and allowed to equilibrate for 1 h. Thirty minutes after setting up the tissue bath aortas rings were contracted with 10⁻⁵ M NE or 80 mM potassium chloride (KCl) solution to test their contractile responses. After exposure to 10⁻⁵ M NE tissues were washed three times with Krebs solution to restore basal tension and this solution was renewed every 40 min. In order to determine the cumulative dose-dependent curves for AEHS-induced relaxation and after equilibration rings were contracted with EP (10 µM) and KCl (80 mM). After the plateau was reached AEHS was added cumulatively (375–1250 µg/ml) at each dose of AEHS the curve was allowed to reach a plateau before the addition of subsequent dose. To determine the mechanistic route involved in the relaxant effect induced by AEHS on EP pre-contracted rat aortic rings, the following experiment was carried out: 20 min before adding EP, aortic rings were pre-incubated for 20 min with one of various standard drugs. Drugs used for pre-incubation were: 1) 10⁻⁴ M L-NAME, a direct inhibitor of nitric oxide (NO) synthase. 2) 10 µM glibenclamide an ATP-sensitive K⁺ channel blocker. 3) 10 µM indomethacin a prostaglandin synthesis inhibitor. 4) 10 µM propranolol a beta-blocker. 5) 10 µM methylene blue (MB), a NO-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) blocker. 6) 10 µM nifedipine a calcium channel blocker, 7) 6 nM MLN-

4760 a specific angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) inhibitor. After the addition of NE (10^{-5} M) aortic relaxation was carried out by cumulative addition of AEHS (375–1250 $\mu\text{g/ml}$). The vasorelaxant effect on the aortic rings was calculated as a percentage of contraction in response to EP. Before changing any of the compounds used in this experiment, the aorta ring was washed three times (aorta ring should be incubated 5 min intervals in each bath). The control was performed by cumulative addition of vehicle (distillated water) (375–1250 $\mu\text{g/ml}$) to aortic rings pre-contracted by EP (10^{-5} M) and KCl (80 mM) [17].

2.4. Statistical analysis

All values were expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was tested between more than two groups using two-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparisons test. Relaxations induced by AEHS were expressed as a percentage decrease of the EP and KCl contraction. Each cumulative dose-effect curve for AEHS-induced relaxation was plotted contingent on the application of sigmoidal curve fitting and non-linear regression using Prism version 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA., U.S.A.) to generate the parameters Rmax (maximal relaxant response) and EC50 (the concentration of AEHS dose required to give 50% of the maximum aortic-relaxant response). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of AEHS on body weight

Repeated oral administration of an aqueous extract of *H. Scoparium* at the doses of 60 and 100 mg/kg for one week did not elicit any significant change in body weight in either normal or hypertensive rats (Figs. 1 and 2).

3.2. Single oral administration

Table 1 represents the effect of AEHS on blood pressure levels in normotensive and hypertensive rats after a single oral administration (6 hours of treatment) of the extract at the doses of 60 and 100 mg/kg. In normal rats, no changes were observed in blood pressure levels (systolic mean and diastolic pressure) at the end of the acute experiment (6 hours after a single oral administration of AEHS) for both doses, the same effect was observed for the standard drug lasilix in normotensive rats. Similarly, in hypertensive rats, no significant changes of systolic, mean, and diastolic blood pressure were observed at the end of the experiment in AEHS-treated rats when compared with the starting values (T0). While, lasilix induced a significant reduction

of systolic blood pressure ($p<0.01$), mean and diastolic blood pressure after 6 hours of oral administration of the standard drug ($p<0.05$). The heart rate remained unchanged after AEHS treatment in both normal and hypertensive rats.

3.3. Repeated oral administration

Table 2 shows the subchronic effect of the following aqueous extract of AEHS during seven days of oral administration in the normotensive and hypertensive groups. The results show that AEHS did not induce a significant effect during acute treatment (6 hours of treatment) in normotensive and hypertensive rats. However, the extract produced a significant decrease of systolic blood pressure in the hypertensive group at the second, fourth, and seventh day of administration ($p<0.05$, $p<0.0001$ and $p<0.0001$, respectively at a dose of 100 mg/kg body weight). AEHS concomitantly decreased mean arterial pressure after one week of oral administration in hypertensive rats at days 2, 4, and 7 of treatment ($p<0.05$, $p<0.0001$, and $p<0.0001$, respectively). Lasilix induced a significant decrease of MBP on days 2, 4, and 7 ($p<0.05$, $p<0.0001$, and $p<0.0001$ respectively) in hypertensive rats at a dose of 100 mg/kg, whereas no effect was observed in the normotensive groups. Similarly, the diastolic pressure was decreased in hypertensive rats at days 2, 4, and 7 of administration ($p<0.05$, $p<0.0001$, and $p<0.0001$ respectively). Conversely, no significant effects were observed in normotensive rats during acute and subchronic treatment with aqueous extract of *H. Scoparium*. Heart rate showed no significant change in subchronic treatment during seven days of once-daily oral administration of AEHS. Lasilix had no effect on HR in both hypertensive and normotensive rats.

3.4. Vasorelaxant activity

3.4.1. The vasorelaxant effect of AEHS on precontracted aortic rings by NE and KCl

Firstly, we established the vasorelaxant effect of AEHS (375 to 1250 $\mu\text{g/mL}$) on intact rat aortic rings. The vasorelaxant effect of AEHS on vascular smooth muscle was evaluated in a series of experiments using rat aortic rings. As shown in Figures 3 and 4, AEHS induced a potent relaxation of vessels. EP-precontracted aortic rings indicated a significant vasorelaxation ($p<0.0001$) produced by AEHS from at cumulative doses of 875-1250 $\mu\text{g/ml}$ compared with vehicle (Fig. 4A). The corresponding R_{max} was equal to $96.79 \pm 3.95\%$ ($p<0.0001$). Whereas in KCl-precontracted aortic rings (Fig. 4B), a significant decrease was observed ($p<0.001$) compared with vehicle; the R_{max} was equal to $90.64 \pm 3.3\%$ ($p<0.001$). These results indicate that AEHS induced a vasorelaxant effect.

3.4.2. Effect of AEHS on vascular angiotensin converting enzyme 2 (ACE-2).

MLN-4760, a specific ACE2 inhibitor, was used to verify if ACE2 is involved in the AEHS vasorelaxant activity. The results were analyzed and presented in Figure 5, which shows that MLN-4760 (6 nM) did not alter the vasomotricity of the rat aortic rings ($R_{max}=79\pm7.14\%$ vs $96.79\pm3.95\%$ in AEHS-treated aortic rings). These results illustrate that the vasorelaxant response to AEHS was not affected by the presence of MLN-4760.

3.4.3. Aortic responses to AEHS in the presence of L-NAME or indomethacin

To investigate the mechanisms involved in AEHS-induced vasorelaxation, the effect of many drugs on AEHS-produced vasorelaxation was examined. The results are shown in Figure 6. Aortic rings with intact endothelium were preincubated with L-NAME to inhibit nitric oxide (NO), and indomethacin to inhibit prostaglandin synthesis. To confirm whether nitric oxide (NO) participates in AEHS-induced relaxation, we exposed aortic rings to L-NAME. No significant difference was observed between control and treated vessels ($p>0.05$) (Fig. 6A) ($R_{max}=96.79\pm3.95\%$ vs $100.15\pm5.73\%$ in control vessels). These results illustrate that the vasorelaxant response to AEHS was not affected by the presence of L-NAME or indomethacin.

3.4.4. Role of potassium channels and β -adrenergic receptors

In the rings pretreated with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, R_{max} was equal to $96.79 \pm 3.95\%$ vs $100.15\pm5.73\%$ in control vessels ($p>0.05$) (Fig. 7A). The results also indicated that propranolol did not affect AEHS activity ($R_{max}=93.99\pm20.08\%$ vs $100.15\pm5.73\%$ in control vessels) (Fig. 7B). These results show that the vasorelaxant potency of AEHS was not influenced by the presence of glibenclamide or propranolol.

3.4.5. Role of NO-cyclic guanosine monophosphate and Ca^{2+} Channel blockers

In this experiment, a prior incubation of rat aortic rings with methylene blue (MB), a NO-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) blocker, and nifedipine, a Ca^{2+} channel blocker was realized. The results show that methylene blue did not alter the vasorelaxation of aortic rings in response to different doses of AEHS (Fig. 8A). However, nifedipine has altered the vasorelaxant activity of AEHS at the fourth dose (1250 μ g/ml), the R_{max} value was equal to $73.87 \pm 2.76\%$ vs $100.15\pm5.73\%$ in control vessels; $p<0.05$) (Fig. 8B). These results suggest that the calcium channel pathway is involved in the vasorelaxant effect of AEHS.

4. Discussion

This study investigated the antihypertensive effect of *Haloxylon scoparium* aqueous extract in L-Name-induced hypertensive rats and its vasorelaxant activity. Oral administration of N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-Name) for two weeks at a dose of 60 mg/kg led to the induction of hypertension in rats. This drug is an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) activity both *in vitro* and *in vivo*. Acute and chronic treatment with L-Name resulted in changes in blood pressure and vascular reactivity due to decreased nitric oxide (NO) bioavailability [18, 19]. A recent study demonstrated that NO deficiencies are associated with endothelial dysfunction and increased total peripheral resistance that contributes to hypertension [20-22].

A large group of people use traditional methods to manage high blood pressure (HBP). To solve the problems associated with modern drugs, medicinal plants are considered as new approaches to target the management of essential hypertension [23-28].

The current study shows that AEHS treatment did not change body weight in both normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats. This confirms the relative nontoxicity of the AEHS extract at the dose of 100 mg/kg. Therefore, to determine the antihypertensive effect, *in vivo* studies were performed on L-NAME-induced hypertensive rats. Acute AEHS treatment (6 hours) caused no apparent effects in normotensive and hypertensive rats. Whereas subchronic treatment during 7 days significantly illustrated the decrease of SBP, MBP, and DBP without causing any change in normotensive rats. This explains the beneficial effect of this plant against hypertension. Furthermore, the results show that AEHS exerts a potent vasorelaxant activity in isolated rat aortas and this extract was able to decrease tension in EP-precontracted aortic rings in both intact and endothelium-denuded aortas, suggesting that the vasorelaxant effect of AEHS is endothelium independent. To determine the mechanism of action involved in the vasorelaxant activity of AEHS, seven reference drugs were tested. Among these drugs, only nifedipine was able to inhibit the vasorelaxant activity of AEHS, indicating that this aqueous extract exerts its vasorelaxant activity through inhibition of the vascular calcium channel pathway as it has been demonstrated for other medicinal plants [21].

Regarding the toxicity of AEHS, an extensive study on rats was performed by Kharchoufa *et al* [5], the results obtained in the acute treatment showed that the oral LD₅₀ value of AEHS was less than 5000 mg/kg, and this extract was considered slightly toxic. However, the results of 30 days of subchronic oral toxicity indicated that AEHS exhibited liver toxicity in rats.

5. Conclusion

In conclusion, the present work reveals for the first time the antihypertensive effect of AEHS in L-Name-induced hypertensive rats. AEHS decreased blood pressure parameters (SBP, DBP, and MBP) in hypertensive rats without affecting heart rate. In addition, the aqueous extract of *H. scoparium* possesses antihypertensive and vasorelaxant effects through calcium channel pathway. The present study supports the folkloric reputation of *H. scoparium* as an antihypertensive agent. Further studies are also needed to determine the role of other signaling pathways in the vasorelaxant effect of AEHS.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All animal procedures were performed in accordance with the local ethical committee, Faculty of Sciences & Techniques Errachidia, Morocco, number FSTE/2015.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No humans were used for studies that are the basis of this research. The reported experiments on animals are in accordance with the US National Research Council's "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The data supporting the findings of the article is available within the article.

FUNDING

This study was supported by the CNBRST (N°PPR/2015/35) and Hassan II Academy of Science and Technology, Morocco (N° 2021).

CONFLICT OF INTEREST

Mohamed Eddouks is the Regional Editor of of Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets.

ACKNOWLEDGEMENTS

Not applicable

6. References

- [1] Kearney, P.M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P.; Whelton, P.K.; He, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, 2005, 365(9455):217-23.
- [2] He, J.; Whelton, P.K. Epidemiology and prevention of hypertension. *Med Clin North Am*, 1997, 81(5):1077-97.
- [3] Chobanian, A.V.; Bakris, G.L.; Black, H.R.; Cushman, W.C.; Green, L.A.; Izzo, J.L.Jr.; Jones, D.W.; Materson, B.J.; Oparil, S.; Wright, J.T.Jr.; Roccella, E.J.; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*, 2003, 289(19):2560-72.
- [4] Mendis, S.; Puska, P.; Norrving, B.; World Health Organization. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization. 2011.
- [5] Kharchoufa, L.; Bouhrim, M.; Bencheikh, N.; El Assri, S.; Amirou, A.; Yamani, A.; Choukri, M.; Mekhfi, H.; Elachouri, M. Acute and Subacute Toxicity Studies of the Aqueous Extract from *Haloxylon scoparium* Pomel (*Hammada scoparia* (Pomel)) by Oral Administration in Rodents. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:4020647.
- [6] Eddouks, M.; Maghrani, M.; Lemhadri, A.; Ouahidi, M.L.; Jouad, H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilaleet). *J Ethnopharmacol*, 2002, 82(2-3):97-103.
- [7] Abouri, M.; El Mousadik, A.; Msanda, F.; Boubaker, H.; Saadi, B.; Cherifi, K. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Tata Province, Morocco. *Int J Med Plants Res*, 2012, 1(7), 99-123.
- [8] Jamila, F.; Mostafa, E. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(1):76-87.
- [9] Kabbaj, F.; Meddah, B.; Cherrah, Y.; Faouzi, E. Ethnopharmacological profile of traditional plants used in Morocco by cancer patients as herbal therapeutics. *Phytopharmacology*, 2012, 2(2), 243-256.
- [10] Ghourri, M.; Zidane, L.; ROCHDI, A.; Fadli, M.; DOUÏRA, A. Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville d'El Ouatia (Maroc Saharien). *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 2012, 12(2), 218-235.
- [11] Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S.; Gontier, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant sci*, 2001, 161(5), 839-851.
- [12] Zerriouh, M. Contribution à l'étude phytochimique et activité antidiabétique de *Hammada scoparia* (Pomel), 'Remth'. PhD Thèse, Université Abou Bekr Belkaid. 2015.
- [13] Haida, S.; Kribii, A. Chemical composition, phenolic content and antioxidant capacity of *Haloxylon scoparium* extracts. *S Afr J Bot*, 2020, 131, 151-160.
- [14] Ajebli, M.; Eddouks, M. *Buxus sempervirens* L Improves Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus in Rats. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2017, 17(2):142-152.
- [15] Ajebli, M.; Eddouks, M. Antihypertensive activity of *Petroselinum crispum* through inhibition of vascular calcium channels in rats. *J Ethnopharmacol*, 2019, 242:112039.
- [16] Désiré, D.D.P.; D'Alex, T.T.C.; Danielle, B.; Claude, A.O.B.F.; Pierre, K.; Théophile, D. Endothelium-dependent and independent vasorelaxant effect of *Terminalia superba* (Combretaceae) on rat aorta. *J. Phytopharmacol*, 2013, 2, 21-27.
- [17] Anwar, M.A.; Samaha, A.A.; Ballan, S.; Saleh, A.I.; Iratni, R.; Eid, A.H. *Salvia fruticosa* Induces Vasorelaxation In Rat Isolated Thoracic Aorta: Role of the PI3K/Akt/eNOS/NO/cGMP Signaling Pathway. *Sci Rep*, 2017, 7(1):686.
- [18] Kopincová, J.; Púzerová, A.; Bernátová, I. L-NAME in the cardiovascular system - nitric oxide synthase activator? *Pharmacol Rep*, 2012, 64(3):511-20.
- [19] Kiriya, A.; Honbo, A.; Nishimura, A.; Shibata, N.; Iga, K. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses of antihypertensive drugs, nifedipine and propranolol, in spontaneously hypertensive rats to investigate characteristics of effect and side effects. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 76:21-9.

- [20] Potue, P.; Wunpathe, C.; Manesai, P.; Kukongviriyapan, U.; Prachaney, P.; Pakdeechote, P . Nobiletin alleviates vascular alterations through modulation of Nrf-2/HO-1 and MMP pathways in l-NAME induced hypertensive rats. *Food Funct*, 2019, 10(4):1880-1892.
- [21] Aekthammarat, D.; Pannangpetch, P.; Tangsucharit, P. Moringa oleifera leaf extract lowers high blood pressure by alleviating vascular dysfunction and decreasing oxidative stress in L-NAME hypertensive rats. *Phytomedicine*, 2019, 54:9-16.
- [22] Bilanda, D.C.; Dzeufiet, P.D.D.; Kouakep, L.; Aboubakar, B.F.O.; Tedong, L.; Kamtchouing, P.; Dimo, T. Bidens pilosa Ethylene acetate extract can protect against L-NAME-induced hypertension on rats. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1):479.
- [23] Ajebli, M.; Eddouks, M. Phytotherapy of Hypertension: An Updated Overview. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2020, 20(6):812-839.
- [24] Stenmark, K.R.; Rabinovitch, M. Emerging therapies for the treatment of pulmonary hypertension. *Pediatr Crit Care Med*, 2010, 11(2 Suppl):S85-90.
- [25] El-Ouady, F.; Eddouks, M. Warionia saharae induces antihypertensive and vasorelaxant activities through nitric oxide and KATP channels pathways in rats. *J Complement Integr Med*, 2019, 17(1):/j/jcim.2019.17.
- [26] Akdad, M.; Ajebli, M.; Breuer, A.; Khallouki, F.; Owen, R.W.; Eddouks, M. Study of Antihypertensive Activity of Anvillea radiata in L-Name-Induced Hypertensive Rats and HPLC-ESI-MS Analysis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2020, 20(7):1059-1072.
- [27] Rawat, P.; Singh, P.K.; Kumar, V. Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. *J Herb Med*, 2016, 6(3), 107-118.
- [28] El-Ouady, F.; Eddouks, M. Ruta Montana Evokes Antihypertensive Activity Through an Increase of Prostaglandins Release in L-NAME-Induced Hypertensive Rats. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2021, 21(2):305-314.

Table 1 : Effect of a single oral administration of AEHS (60 and 100 mg/kg b.w) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in anesthetized normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n = 6. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

		Systolic blood pressure (mmHg)			
		Control	AEHS (mg/kg BW)		Lasilix
			60	100	
Normotensive	T0	132.00 ± 6.00	129.22 ± 2.99	133.26±2.57	120.00 ± 7.00
	T6	138.00 ± 8.00	128.65 ± 2.58	135.31±1.55	111.00 ± 7.00
L-NAME	T0	180.00 ± 5.00	167.45 ± 5.08	194.25±2.60	169.00 ± 7.00
	T6	175.00 ± 7.00	164.63 ± 4.62	185.59±4.95	142.00 ± 6.00**

		Mean blood pressure (mmHg)			
		Control	AEHS (mg/kg BW)		Lasilix
			60	100	
Normotensive	T0	115.00 ± 7.00	112.58 ± 3.33	113.30±4.90	108.00 ± 6.00
	T6	113.00 ± 6.00	112.01 ± 1.59	118.86±4.38	97.00 ± 2.00
L-NAME	T0	156.00 ± 6.00	146.25±2.75	181.31±4.77	150.00 ± 3.00
	T6	157.00 ± 6.00	145.50 ±3.68	174.14±5.08	125.00 ± 6.00*

		Diastolic blood pressure (mmHg)			
		Control	AEHS (mg/kg BW)		Lasilix
			60	100	
Normotensive	T0	106.00 ± 5.00	103.92±3.80	86.65±14.87	103.00 ± 5.00
	T6	101.00 ± 6.00	103.68± 1.34	110.66±6.02	91.00 ± 4.00
L-NAME	T0	144.00 ± 7.00	135.64± 2.55	174.85 ±6.00	152.00 ± 5.00
	T6	148.00±10.00	135.94± 3.57	168.42 ± 5.82	129.00 ± 4.00*

		Heart rate (bpm)			
		Control	AEHS (mg/kg BW)		Lasilix
			60	100	
Normotensive	T0	320.00 ± 10.00	302.00± 1.26	303.00 ± 1.34	349.00 ± 19.00
	T6	306.00 ± 8.00	304.00± 2.00	302.00 ± 1.26	321.00 ± 9.00
L-NAME	T0	312.00 ± 15.00	308.00± 1.26	305.00 ± 1.84	348.00 ± 22.00
	T6	318.00 ± 12.00	305.00± 3.92	304.00 ± 1.26	311.00 ± 17.00

Table 2 : Effect of repeated oral administration of AEHS (60 and 100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in anesthetized normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n = 6. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

		Systolic blood pressure (mmHg)			
		Control	AEHS (mg/kg BW)		Lasilix
			60	100	
Normotensive	D0	134.00±7.00	129.92±2.99	133.26 ± 2.57	120.00 ± 7.00
	D2	136.00± 5.00	126.28± 2.47	131.18 ± 1.60	115.00 ± 5.00
	D4	140.00± 3.00	122.58± 1.66	130.77 ± 1.70	108.00 ± 3.00
	D7	135.00± 6.00	120.69± 1.58	126.15 ± 1.66	99.00 ± 4.00*
L-NAME	D0	180.00± 5.00	167.45± 5.08	194.25 ± 2.60	169.00 ± 6.00
	D2	176.00 ±5.00	161.90± 4.14	171.94 ± 7.95*	122.00±2.00****
	D4	173.00 ±9.00	156.62± 3.82	150.43±4.65*****	120.00±4.00****
	D7	172.00± 6.00	146.6± 2.17*	135.58±5.89*****	109.00±3.00****

		Mean blood pressure (mm Hg)			
		Control	AEHS (mg/kg BW)		Lasilix
			60	100	
Normotensive	D0	111.00±4.00	112.58±3.33	113.26 ± 4.90	109.00 ± 7.00
	D2	112.00±5.00	108.31± 1.12	115.04 ± 2.95	107.00 ± 5.00
	D4	117.00± 6.00	102.74± 1.48	116.34 ± 1.26	101.00 ± 3.00
	D7	112.00± 4.00	100.41± 1.51	116.80 ± 1.58	96.00 ± 2.00
L-NAME	D0	156.00± 6.00	146.25±2.75	181.31 ± 4.77	150.00 ± 3.00
	D2	149.00± 6.00	145.62 ±2.71	157.86 ± 8.81*	148.00 ±5.00
	D4	148.00± 9.00	143.50 ±2.04	138.73±7.44****	103.00±5.00****
	D7	147.00 ±6.00	132.72 ±1.38	121.58±4.35****	95.00 ± 4.00****

		Diastolic blood pressure (mm Hg)			
		Control	AEHS (mg/kg BW)		Lasilix
			60	100	
Normotensive	D0	100.00±3.00	103.92±3.80	86.65 ± 14.89	103.00 ± 6.00
	D2	101.00±5.00	99.33 ± 1.48	106.97 ± 3.72	98.00 ± 5.00
	D4	106.00±3.00	92.83 ± 2.17	109.13 ± 1.81	97.00 ±6.00
	D7	102.00±8.00	90.27 ± 1.88	112.12 ± 1.89	95.00 ± 4.00
L-NAME	D0	144.00±7.00	135.64± 2.55	174.85 ± 6.00	152.00 ± 5.00
	D2	135.00±7.00	137.48± 2.30	150.82 ± 9.39*	103.00 ± 4.00
	D4	135.00±6.00	136.93± 1.90	132.89±9.68****	100.00±4.00****
	D7	136.00±6.00	128.37± 1.64	114.58± 4.74****	98.00±3.00****

		Heart rate (bpm)			
		Control	AEHS (mg/kg BW)		Lasilix
			60	100	
Normotensive	D0	312.00± 15.00	302.00± 1.26	303.00 ± 1.34	348.00 ± 22.00
	D2	320.00± 14.00	303.00± 1.34	305.00 ± 3.92	341.00 ± 16.00
	D4	312.00± 16.00	302.00± 1.26	302.00 ± 1.26	341.00 ± 17.00
	D7	319.00 ± 8.00	305.00± 1.00	301.00 ± 1.00	305.00 ± 8.00*
L-NAME	D0	308.00± 12.00	305.00± 1.84	305.00 ± 1.84	348.00 ± 15.00
	D2	310.00 ±15.00	303.00± 1.34	303.00± 1.34	343.00 ± 13.00
	D4	307.00± 13.00	302.00± 1.26	302.00 ± 1.26	315.00 ± 11.00
	D7	318.00± 18.00	301.00± 1.00	301.00± 1.00	311.00 ± 10.00

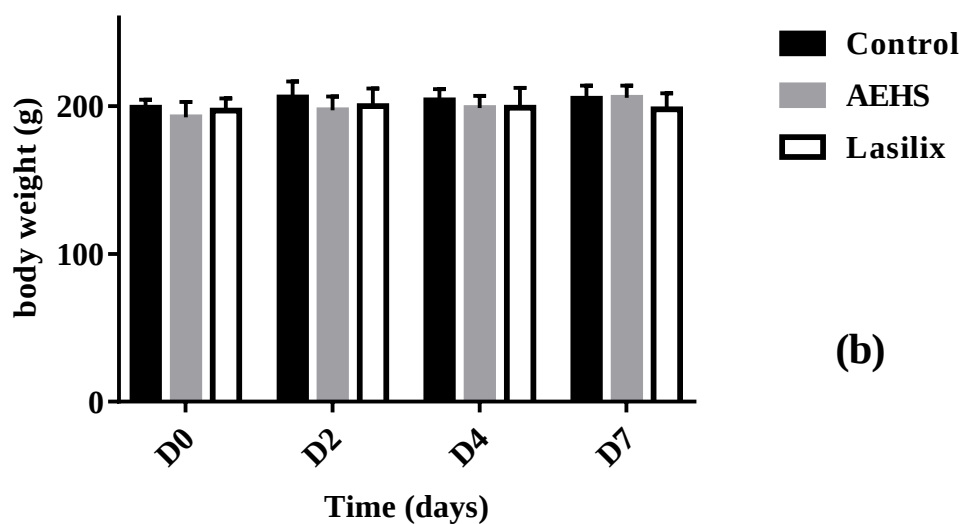
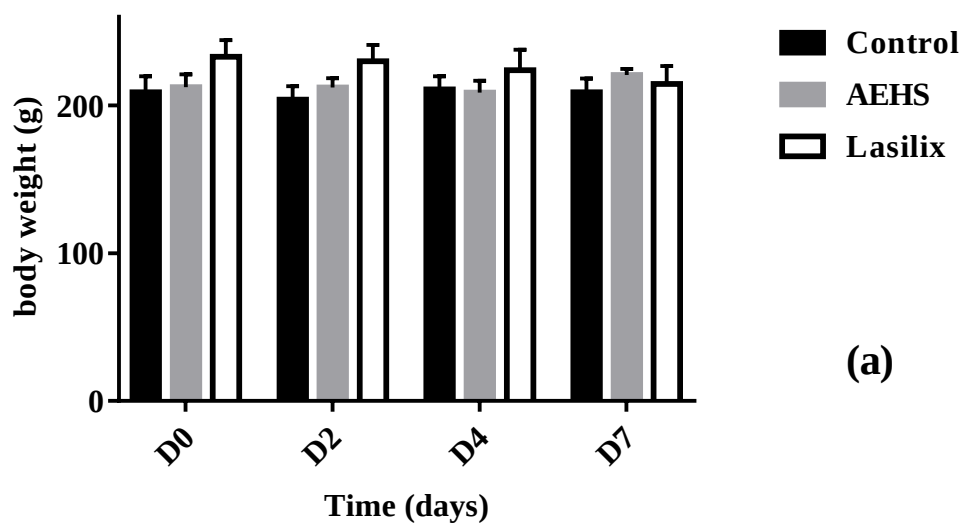
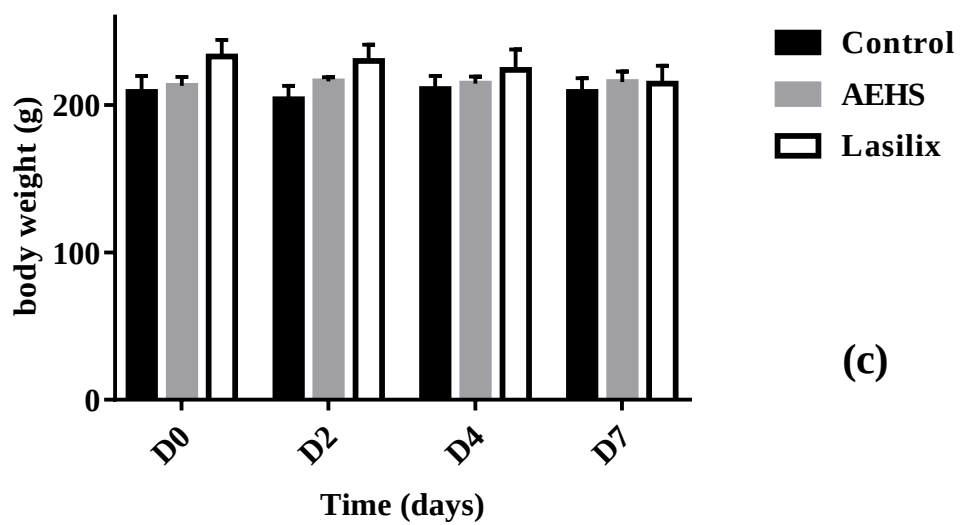
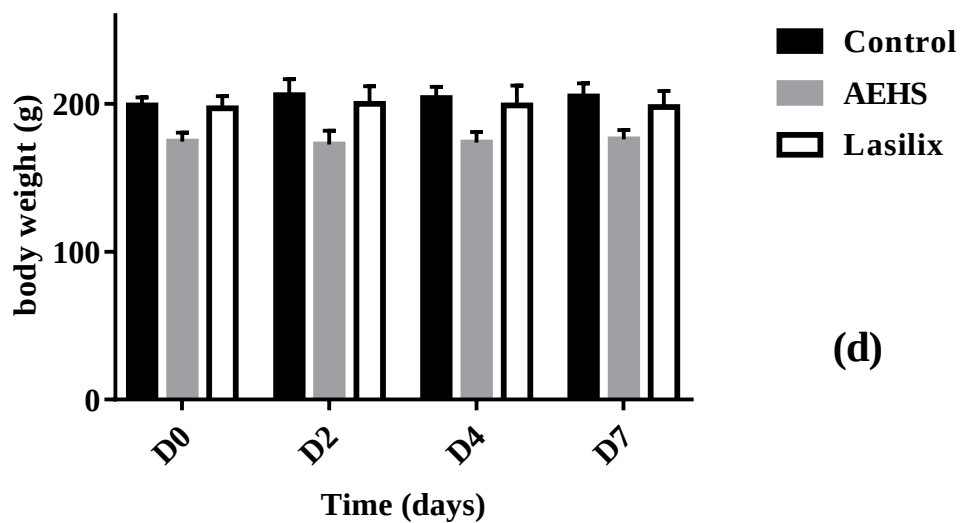


Fig. 1. Effect of repeated oral administration of AEHS (60 mg/kg) on body weight (g) in anesthetized normal (a) and L-NAME-induced hypertensive (b) rats. Data are expressed means $\pm$ SEM, n=6.



(c)



(d)

Fig. 2. Effect of repeated oral administration of AEHS (100 mg/kg) on body weight (g) in anesthetized normal (c) and L-NAME-induced hypertensive (d) rats. Data are expressed means $\pm$ SEM, n=6.

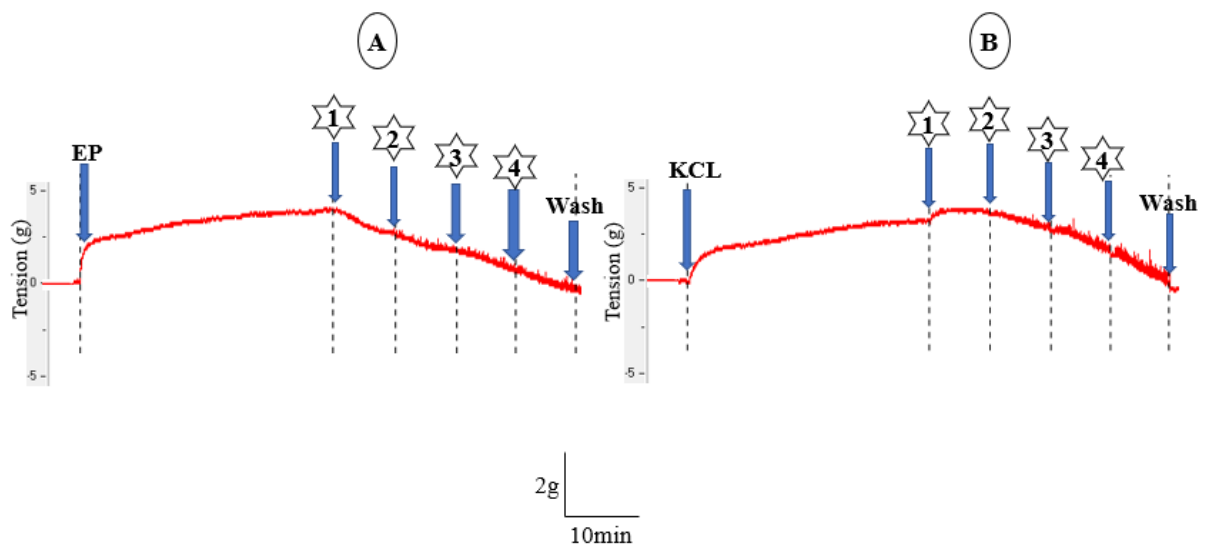


Fig. 3. Representative tracings illustrating the relaxation response produced by the application of AEHS on epinephrine and KCl-precontracted rat aortic rings. AEHS produced a dose-dependent vasorelaxant response in epinephrine-precontracted rat aortic rings (A); EP: addition of epinephrine, 1 to 4: addition to different doses of AEHS (375-1250 $\mu\text{g/ml}$), Wash and KCl precontracted rat aortic rings (B); 1: addition of KCl, 1 to 4: addition to different doses of AEHS (375-1250 $\mu\text{g/ml}$) and Wash .

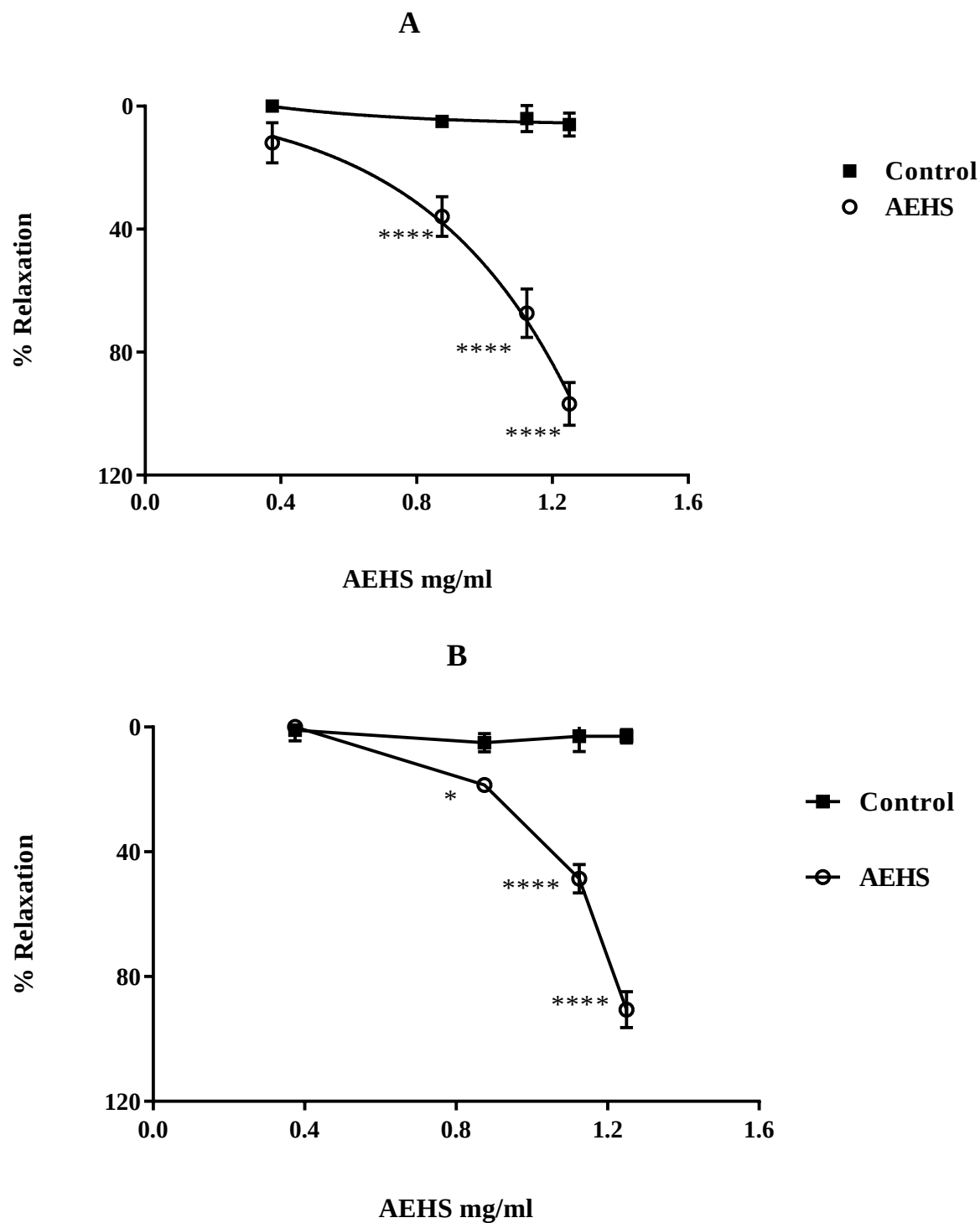


Fig. 4. Effect of AEHS extract on EP or KCl-induced contraction in aortic rings. Cumulative dose-dependent curves for AEHS-induced relaxation and of the vehicle (distillated water) in rat aortic rings. $n = 6$. A: pre-contraction with epinephrine ($10 \mu\text{M}$); B: pre-contraction KCl (80 mM). $*p < 0.05$, $****p < 0.0001$.

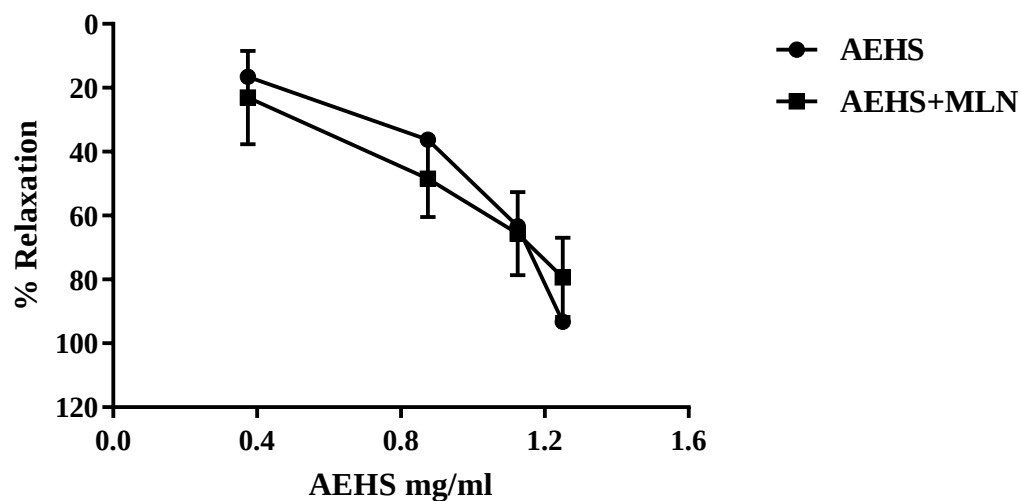


Fig. 5. Effect of MLN-4760 (inhibitor specific of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2)) drug incubation on AEHS-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHS in the absence (circles) or presence (squares) of standard drugs. Data represent mean $\pm$ SEM (n=6; for AEHS versus drug plus AEHS).

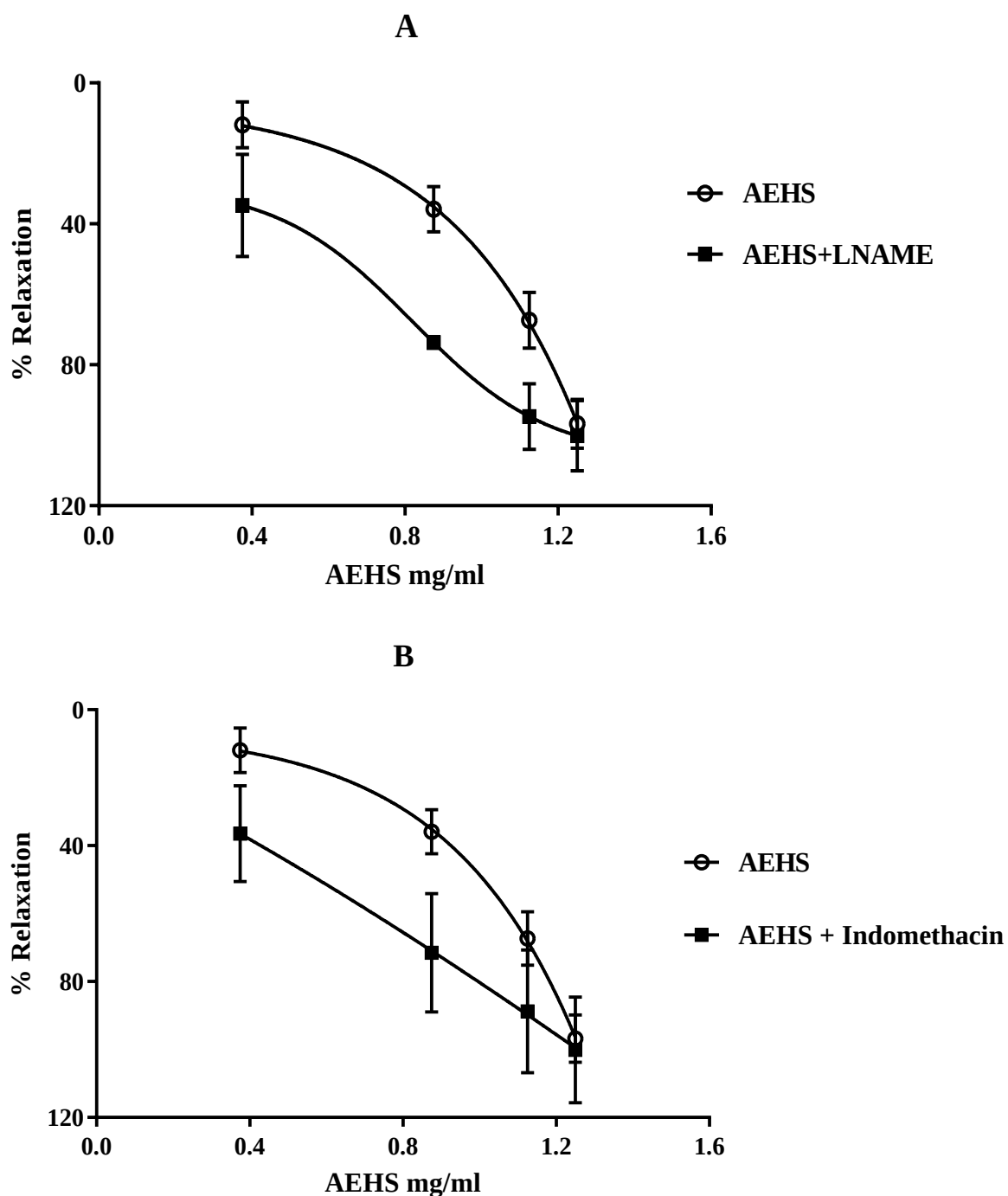


Fig. 6. Effect of different drugs incubation on AEHS- relaxation of EP-induced contraction in aortic rings. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHS in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) L-NAME, (B) indomethacin, Data represent mean $\pm$ SEM (n=6) for AEHS versus drug plus AEHS.

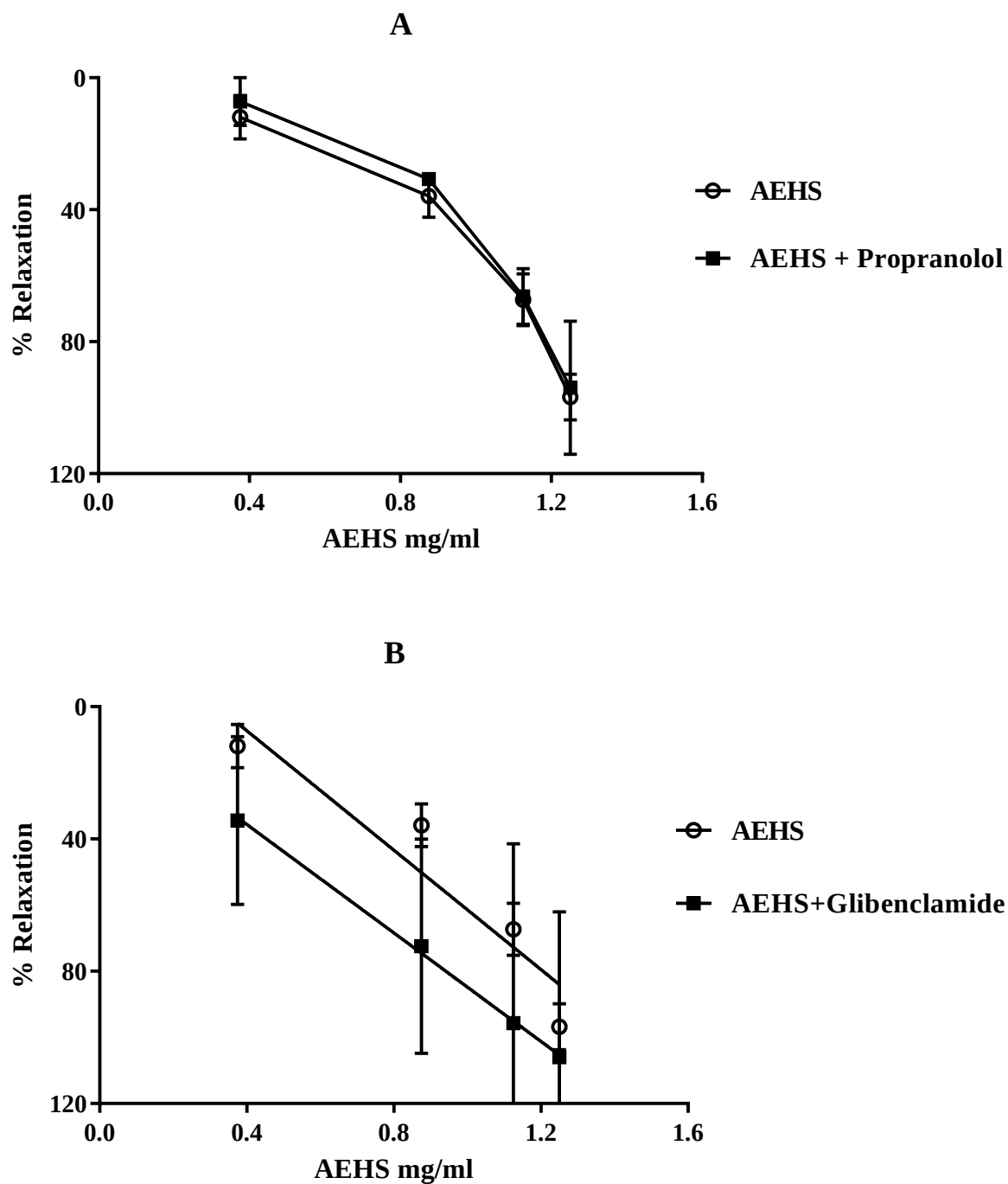


Fig. 7. Effect of propranolol (A) and glibenclamide (B) drugs incubation on AEHS-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHS in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs. Data represent mean $\pm$ SEM ($n = 6$; for AEHS versus drug plus AEHS).

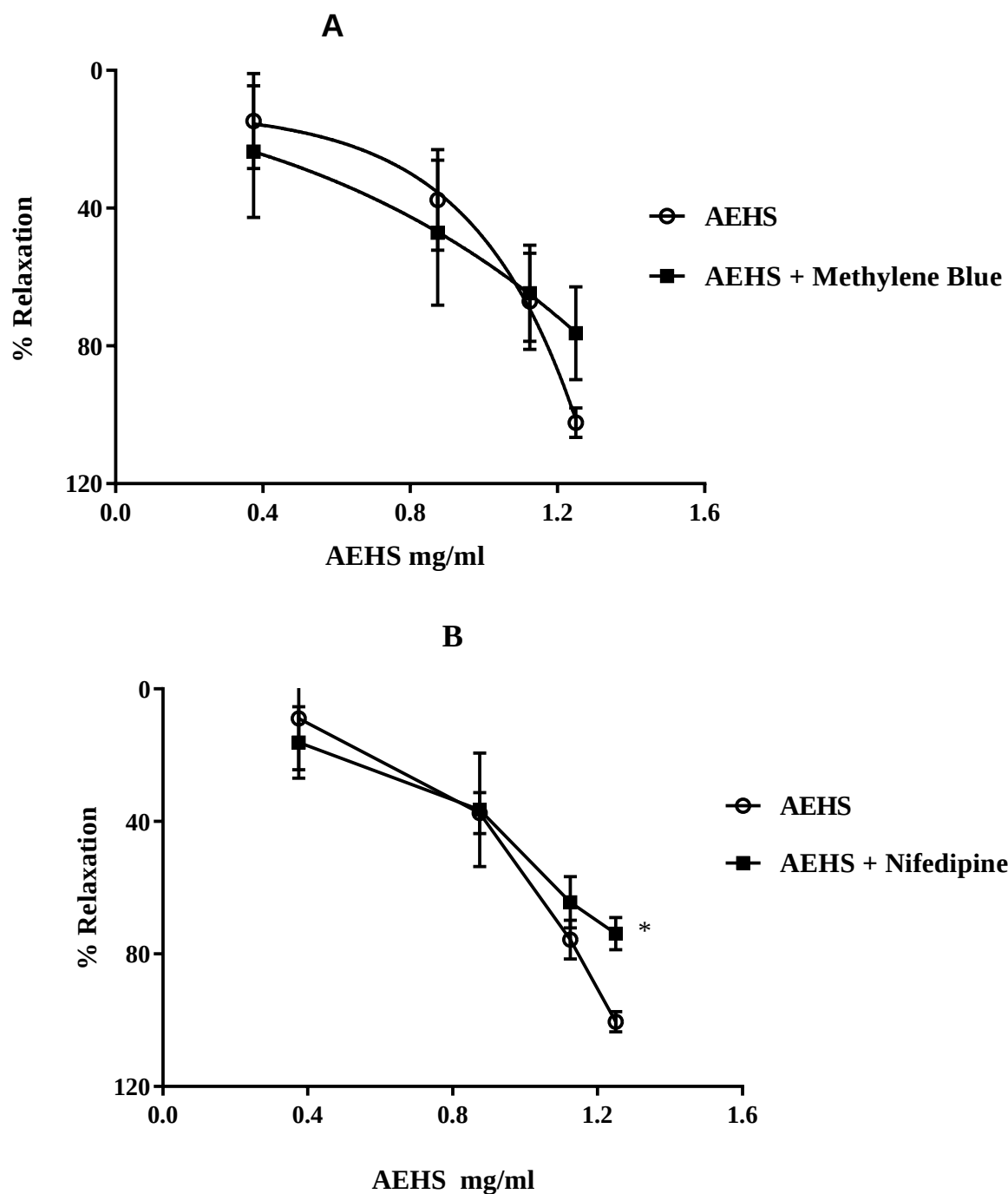


Fig. 8. Effect of methylene blue (A) and nifedipine (B) drugs incubation on AEHS-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of AEHS in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs. Data represent mean $\pm$ SEM ($n = 6$; for AEHS versus drug plus AEHS). * $p < 0.05$.

Chapitre VI

Étude d'*Ammodaucus leucotrichus*

Ce chapitre se compose de la publication 4:

Publication 4: Amtaghri, S., Slaoui, M., & Eddouks, M. *Ammodaucus leucotrichus* acts as an antihypertensive and vasorelaxant agent through sGC and prostaglandin synthesis pathways. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. 2023;21(3):177-192. doi: 10.2174/1871525721666221209161605.

Article 4

***Ammodaucus leucotrichus* acts as an antihypertensive and vasorelaxant agent through sGC and prostaglandin synthesis pathways**

Résumé :

L'objectif de l'étude était d'examiner les propriétés antihypertensives de l'extrait aqueux des fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* chez les rats hypertendus induits par le L-NAME, ainsi que son action vasorelaxante dans des aortes thoraciques isolées de rat. Par ailleurs, les effets aigus et subchroniques de l'extrait aqueux sur la pression artérielle systolique, diastolique et moyenne, ainsi que sur la fréquence cardiaque (FC) ont été évalués après administration orale de l'extrait (60 et 100 mg/kg de poids corporel) pendant 6 heures dans l'expérience aiguë et pendant 7 jours dans le test subchronique. Afin d'étudier l'activité vasorelaxante de la plante, des anneaux aortiques thoraciques isolés ont été préparés. De nombreux médicaments pharmacologiques ont été utilisés pour explorer les voies d'action vasorelaxantes possibles.

Les résultats ont montré que l'extrait aqueux d'*Ammodaucus leucotrichus* réduisait les paramètres de la pression artérielle (pression artérielle systolique, moyenne et diastolique) chez les rats hypertendus induits par le L-NAME après un traitement oral répété pendant sept jours sans affecter les rats normotendus. De plus, dans les anneaux aortiques thoraciques précontractés avec la NE (10 μ M) ou KCl (80 mM), l'extrait aqueux (0,250-1,625 mg/mL) a montré un effet vasorelaxant. Dans les aortes thoraciques isolées de rat, le blocage du NO-guanosine monophosphate (GMPc) cyclique par le bleu de méthylène aux troisième et quatrième concentrations (1,250 et 1,625 mg/ml) ($p < 0,01$) a partiellement diminué cet effet vasorelaxant. En outre, le blocage de la voie de synthèse des prostaglandines par l'indométacine à la quatrième dose de 1,625 mg/ml ($p < 0,05$) a également réduit l'activité vasorelaxante de l'extrait. Le prétraitement des anneaux aortiques avec le glibenclamide, le propranolol, le L-NAME, le MLN-4760 ou la nifédipine n'a eu aucun effet sur la vasorelaxation induite par la plante.

Ammodaucus leucotrichus est une plante médicinale ancienne, capable d'agir comme un agent antihypertenseur. De plus, cette plante présente une vasodilatation des vaisseaux sanguins via les voies de synthèse du NO-guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et des prostaglandines.

***Ammodaucus leucotrichus* acts as an antihypertensive and vasorelaxant agent through sGC and prostaglandin synthesis pathways**

Smail Amtaghri^{1,2}, Miloudia Slaoui² and Mohamed Eddouks^{1*}

Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2023;21(3):177-192.

DOI: [10.2174/1871525721666221209161605](https://doi.org/10.2174/1871525721666221209161605)

¹*Team of Ethnopharmacology and Pharmacognosy, Faculty of Sciences and Techniques Errachidia, Moulay Ismail University of Meknes, BP 509, Boutalamine, Errachidia, 52000, Morocco.*

²*Energy, materials and sustainable development (EMDD) Team- Higher School of Technology-SALE, Center for Water, Natural Resources Environment and Sustainable Development (CERNE2D), Mohammed V University in Rabat, Avenue Ibn Battouta, B.P. 1014, Rabat10000, Morocco.*

**: Corresponding author. Prof Mohamed Eddouks, Faculty of Sciences and Techniques Errachidia, Moulay Ismail University of Meknes, BP 509, Boutalamine, Errachidia, 52000, Morocco. Phone: +212 35 57 44 97; Fax: +212 35 57 44 85; E-mail: mohamed.eddouks@laposte.net*

ABSTRACT

Background: *Ammodaucus leucotrichus* is a medicinal plant used in traditional medicine to treat a variety of ailments, including hypertension.

Aims: The aim of the study was to determine the antihypertensive activity of *Ammodaucus leucotrichus*.

Objective: The purpose of the study was to investigate the antihypertensive and vasorelaxant activities of the aqueous extract of *Ammodaucus leucotrichus* fruits (ALAE) in rats.

Material and Methods: ALAE was prepared to study its antihypertensive effect in L-NAME (Nω-L-arginine methyl ester)-induced hypertensive rats, as well as its vasorelaxant activity in isolated thoracic aortas of rats. The acute and subchronic effects of ALAE on systolic, diastolic, mean arterial pressure and heart rate (HR) were evaluated after oral administration of ALAE (60 and 100 mg/kg body weight) for 6 h for the acute experiment and over 7 days for the subchronic test. Isolated thoracic aortic rings were prepared to examine the vasorelaxant action of ALAE. Several common pharmacological agents were used to test potential pathways implicated in the vasorelaxant action.

Results: The results showed that ALAE reduced blood pressure parameters (systolic, mean, and diastolic blood pressure) in L-NAME-induced hypertension rats after repeated oral treatment over seven days without affecting normotensive rats. Furthermore, in thoracic aortic rings pre-contracted with epinephrine (EP) (10 μM) or KCl (80 mM), ALAE (0.250-1.625 mg/ml) showed a vasorelaxant effect. In isolated rat thoracic aortas, blockage of soluble guanylyl cyclase with blue methylene at the third and fourth dosages (1.250 and 1.625 mg/ml) ($p < 0.01$) partially decreased this vasorelaxant effect. In addition, blockage of the prostaglandin synthesis pathway with indomethacin at the fourth dose (1.625 mg/ml) ($p < 0.05$) reduced also the vasorelaxant activity of ALAE. Pretreatment of aortic rings with glibenclamide, propranolol, L-NAME, MLN-4760, or nifedipine had no effect on ALAE-induced vasorelaxation.

Conclusion: *Ammodaucus leucotrichus* is a prescient medicinal plant, able to act as an antihypertensive agent. Moreover, the results suggest that the extract increased cGMP in NO-independent manner.

KEYWORDS: *Ammodaucus leucotrichus*; hypertension; L-NAME; vasorelaxant; angiotensin-converting enzyme-2(ACE2); sGC-cGMP; vascular cyclooxygenase.

1. INTRODUCTION

Hypertension is one of the most common chronic diseases, and a major cause of morbidity and mortality worldwide[1]. It is a primary, but adjustable, problem that contributes to cardiovascular (CV) diseases[2]. According to the World Health Organization (WHO), hypertension, also known as arterial hypertension, is a disease that primarily affects population in low-income countries and middle-income countries where health systems are weak. It causes a range of heart disease, stroke, kidney failure and mortality and disability [3].Hypertension continues significant health problems worldwide. It has been estimated that 29% of the world's adult population, or 1.56 billion people will suffer from hypertension by 2025 [2].

Ammodaucus leucotrichus (Apiaceae family) is the only one species of the genus *Ammodaucus* [4]. It is a small annual plant (10–12 cm high) with erect, finely striated stems. The leaves are finely dissected and slightly fleshy. The flowers with 5 free petals are grouped in umbels of 2–4 branches. The fruit (8–10 mm) is covered with dense silky white hairs. The plant has a strong smell of anise [4]. It is known in Morocco as "*Kammoun soft*" and it grows on sandy coasts of Morocco[5].It is used as a treatment for rheumatism, asthma and stomach diseases [6].In Morocco, the traditional use of *Ammodaucus leucotrichus* (*A.leucotrichus*) is for the treatment of gastric intestinal pain and indigestion, nausea, regurgitation, vomiting, dehydration, chills and urine secretion[7]. In addition, the seeds of this plant are used as substitutes for ordinary cumin [8].Studies of the pharmacological activities of *A. leucotrichus* have shown that it possesses numerous properties including antidiabetic, anti-inflammatory [9, 10], antibacterial, and antioxidant effects [11].The essential oils of this species have demonstrated antimicrobial activities against *Escherichia coli* [12], and as cytotoxic [13], anticholinesterase [14],antifungal [15], and anticancer agent [16]. Previous research on aqueous extracts of *A. leucotrichus* showed that it inhibited the formation of calcium oxalate monohydrate crystals and also inhibited the nucleation, growth and aggregation phases of calcium oxalate crystallization [17].The principal components of the volatile compounds found in the fruits of *A.leucotrichus* are perillaldehyde and limonene [5]. However, to date, no pharmacological studies have been performed on the antihypertensive activity of *A. leucotrichus*. Therefore, the objective of this study was to prove the antihypertensive effect of the aqueous extract of *A. leucotrichus* in L-NAME-induced hypertensive rats as well as to assess its vasorelaxant activity in isolated rat thoracic aortas.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material and preparation of the aqueous extract

A. leucotrichus fruits were purchased from a local market in Tafilalet region (semi-arid zone) of Morocco in March 2021 and air-dried at 40 °C. The plant was identified and a good specimen was deposited at the herbarium of the Laboratory of Ethnopharmacology and Pharmacognosy, Faculty of Science and Technology Errachidia (AL 2021). The plant material was as it has been previously described [18]. The doses used were 60 and 100 mg/kg of lyophilized aqueous extract per kg of body weight. These doses were chosen after preliminary experiments because they showed optimal responses.

2.2. Experimental animals

Healthy albino adult male rats (Wistar strain) weighing about 130-230 g were obtained from Experimental Center (Missour, Morocco) and kept in individual polyethylene cages and under standard laboratory conditions. All animals were maintained at standard conditions. Experiments were conducted according to the guidelines of the local committee FSTE/2015.

2.3. Chemical reagents and drugs

Acetylcholine chloride, norepinephrine, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), indomethacin and MLN-4760 were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). All other reagents were of analytical grade from local sources. All cited drugs were dissolved in distilled water.

2.4. Induction of hypertension

Hypertension was induced in male Wistar albino rats by repeated oral administration (once daily for 2 weeks) of L-NAME (60 mg/ kg body weight) dissolved in distilled water; normal control rats received distilled water as vehicle. Rats were confirmed hypertensive and then used in this study when systolic blood pressure was greater than 140 mmHg.

Normotensive and hypertensive rats were randomly assigned to four different groups consisting of six rats each. One control group received distilled water, a second treated group received the aqueous extract of aerial parts of *Ammodaucus leucotrichus* (ALAE) at a dose of 60, a third received the aqueous extract of aerial parts of *Ammodaucus leucotrichus* (ALAE) at a dose of 100 mg/ kg body weight, and the fourth group received a reference drug (lasilix at a dose of 20 mg/kg). For single oral administration, distilled water (control), lasilix, or the aqueous extract were administered and the systolic blood pressure (SBP), mean blood pressure (MBP), and heart rate (HR) of the animals were measured. For repeated oral administration, rats were treated once a day for 7 days and the latter three parameters were monitored during this period.

The rats ($n = 6$ in each group) were treated orally. All experiments were performed after anesthetizing the animals with ether to avoid induction of immobilization stress. For blood pressure estimation, the rats were placed in the NIBP restraints and a suitable cuff with sensor was then attached to its tail and warmed to approximately 35°C for 15-20 min to allow reproducible blood pressure measurements (three measurements per animal per session) using a tail cuff and a computer-assisted monitoring device. The tail cuff was inflated to a pressure well above the expected systolic blood pressure (200 mmHg) and slowly released while pulses were recorded using the Power Lab data acquisition system and Lab chart 5.0 software. Systolic blood pressure (SBP), mean blood pressure (MBP), and heart rate (HR) were measured directly using pulse tracing, whereas diastolic blood pressure (DBP) was calculated from SBP and MBP using the following formula: $\text{DBP} = (3\text{MBP} - \text{SBP})/2$ [3]. All blood pressure measurements were performed at the same time of day for the subchronic test [19].

2.5. Vasorelaxant activity

Male Wistar rats (130-230 g) were raised and housed ($n=6$ per cage) in rooms with a controlled light/dark cycle at 25°C with food and water *ad libitum*. Animals were sacrificed by stunning and exsanguination after anesthesia with sodium pentobarbital. The aortas were immediately excised and placed in a cold pad, then quickly removed and carefully cleaned of adhering fat and connective tissue. Isolated arteries were cut transversely into 2-3-mm-long rings and suspended at a resting force of 2 g in an oxygenated tissue bath (95% O_2 , 5% CO_2) and containing 40 mL of Krebs-Henseleit (KH) solution, maintained at 37°C and pH 7.4 and containing (mM): NaCl (118), KCl (4.50), NaHCO_3 (25), MgSO_4 (1.2), CaCl_2 (1.8), NaHPO_4 (1.2) and glucose (11). Force changes were recorded isometrically using a force transducer (LCM Systems Ltd, Erma, Tokyo). The aortic rings were mounted on two stainless steel hooks, one attached to the bottom of the chamber and the other to a UF1 force transducer connected to a PowerLab/400 ADInstrument data acquisition system (Harvard, Boyer, Casablanca, Morocco) to record the signal corresponding to the isometric tension. The study was performed in an endothelium-intact aorta. In the experiment with an intact aorta, the integrity of the endothelium was confirmed if acetylcholine ($10\text{ }\mu\text{M}$) could induce relaxation (40 or 60%) of the precontracted aorta with epinephrine (EP; 10^{-5} M) [20].

The optimal voltage selected from preliminary experiments was the voltage that gave the greatest response to 10^{-5} M EP. Rings were given 2 g (100%) of initial tension and allowed to equilibrate for 1 h. Thirty minutes after tissue bath placement, the aortic rings were contracted with 10^{-5} M EP or 80 mM potassium chloride (KCl) solution to test their contractile responses.

After exposure to 10^{-5} M EP, the tissues were washed three times with Krebs solution to restore basal tension and this solution was renewed every 40 minutes. To determine cumulative dose-dependent curves for ALAE-induced relaxation and after equilibration, the rings were contracted with EP (10 μ M) and KCl (80 mM). Once plateau was reached, ALAE was added cumulatively (0,250-1,625 mg/ml) with each dose of ALAE, the curve was allowed to reach a plateau before the next dose was added. To determine the mechanistic pathway involved in the relaxing effect induced by ALAE on EP-precontracted rat aortic rings, the following experiment was performed: 20 minutes before the addition of EP, the aortic rings were preincubated for 20 minutes with one of several standard drugs. The drugs used for preincubation were 1) 10^{-4} M L-NAME, a direct inhibitor of nitric oxide (NO) synthase. 2) 10 μ M glibenclamide, a blocker of ATP-sensitive K⁺ channels. 3) 10 μ M of indomethacin a prostaglandin synthesis inhibitor. 4) 10 μ M of propranolol a beta-blocker. 5) 10 μ M of methylene blue (MB), a cyclic guanylyl cyclase blocker. 6) 10 μ M nifedipine, a calcium channel blocker, 7) 6 nM MLN-4760, a specific ACE2 inhibitor. After addition of PE (10^{-5} M), aortic relaxation was achieved by cumulative addition of ALAE (0,250, 0,750, 1,250 and 1,625 mg/ml). The vasorelaxant effect on the aortic rings was calculated as percentage contraction in response to PE. Before changing any of the compounds used in this experiment, the aortic ring was washed three times (the aortic ring should be incubated at 5-min intervals in each bath). Control was performed by cumulative addition of vehicle (distilled water) (0,250, 0,750, 1,250 and 1,625 mg/ml) to the aortic rings precontracted with EP (10^{-5} M) and KCl (80 mM) [20].

2.6. Statistical analysis

All the values were expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was tested between more than two groups using two-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparisons test. Relaxations induced by ALAE were expressed as a percentage decrease of the EP and KCl contraction. Each cumulative dose-effect curve for ALAE-induced relaxation was plotted contingent on application of sigmoidal curve fitting and non-linear regression using Prism version 7 (GraphPadSoftware Inc., San Diego, CA., U.S.A.) to generate the parameters R_{max} (maximal relaxant response) and EC₅₀ (the concentration of ALAE dose required to give 50% of the maximum aortic-relaxant response). Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of ALAE on body weight

Repeated oral administration of ALAE at a dose of 60 mg/kg for one week did not elicit any significant change of body weight in both normal and hypertensive rats (Fig. 1). However, repeated oral administration of ALAE at a dose of 100 mg/kg resulted in a significant reduction of body weight in normal and hypertensive rats ($p<0.05$ respectively) (Fig. 2). The same result was observed in the lasilix-treated control group compared with the untreated control group (data not shown).

3.2. Single oral administration

Table 1 shows the effects of ALAE on blood pressure levels in normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats after a single oral administration (6 hours of treatment) of the extract at doses of 60 and 100 mg/kg body weight. ALAE administration has not affected blood pressure parameters in both normal and hypertensive rats at doses of 60 and 100 mg/kg body weight. In addition, in hypertensive rats, lasilix showed a significant reduction in systolic blood pressure ($p<0.01$), mean ($p<0.05$) and diastolic ($p<0.05$) blood pressure values after 6 hours of treatment.

3.3 .Repeated oral administration

Table 2 elucidates the effect of repeated oral administration of ALAE at the doses of 60 and 100 mg/kg in normotensive and hypertensive rats. The extract produced a significant reduction in systolic blood pressure in the hypertensive group at the seventh day of administration ($p<0.05$) at the dose of 60 mg/kg BW, and at the second, fourth, and seventh days ($p<0.001$, $p<0.0001$, and $p<0.0001$) at the dose of 100 mg/kg BW. Lasilix induced a decrease in SABP in the normotensive group at the seventh day of daily administration ($p<0.05$) and in the hypertensive group at the second, fourth and seventh day of treatment ($p<0.0001$).

At a dose of 60 mg/kg, ALAE administration caused a decrease of the mean arterial pressure in hypertensive rats at the seventh days of administration ($p<0.01$), and at the second, fourth, and seventh days ($p<0.01$, $p<0.0001$ and $p<0.0001$, respectively) at a dose of 100 mg/kg. However, Lasilix induced a significant decrease in MBP at the seventh day ($p<0.0001$) in hypertensive rats, whereas no effect was recorded in normotensive groups. Similarly, in hypertensive rats, the diastolic blood pressure was shown to decrease at the seventh day of administration (60 mg/kg; $p<0.01$), and at the second, fourth, and seventh days ($p<0.01$, $p<0.0001$ and $p<0.0001$ respectively) for the dose of 100 mg/kg. In contrast, no significant effect was observed in normotensive rats. In addition, heart rate values remained unchanged over the subchronic treatment. In both hypertensive and normotensive rats, lasilix had no effect on HR.

3.4. Vasorelaxant activity

3.4.1. The vasorelaxant effect of ALAE on pre-contracted aortic rings by both NE and KCl

First, we determined the vasorelaxant effect of ALAE (0.250-1.625 mg/ml) on endothelium-intact rat aortic rings. The vasorelaxant effect of ALAE was tested in a set of experiments using rat aortic rings. ALAE caused a dose-dependent relaxation of vessels, as illustrated in Figures 3 and 4. When ALAE was administered at concentrations of 0.750-1.625 mg/mL, epinephrine pre-contracted aortic rings showed considerable vasorelaxation ($p < 0.5$, $p < 0.0001$) when compared to vehicle (Fig. 4A); $EC_{50} = 1.35 \pm 0.07$ mg/ml with a 95% confidence interval. Similarly, the R_{max} was 75.85 ± 5.77 % ($p < 0.5$, $p < 0.0001$, respectively). In KCl pre-contracted aortic rings (Fig. 4B), a significant vasorelaxant effect of ALAE has been noticed ($p < 0.001$); $EC_{50} = 0.63 \pm 0.09$ mg/ml and $R_{max} = 35.08 \pm 10.57$ % ($p < 0.5$, $p < 0.001$). These findings suggest that ALAE induced vasodilatation of vascular smooth muscle.

3.4.2. Effect of MLN-4760, a specific angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2) inhibitor

MLN-4760, a specific ACE2 inhibitor, was used to verify if ACE2 is involved in the ALAE vasorelaxant activity. The results were examined and shown in Figure 5 and reveal that MLN-4760 (6nM) had no effect on the vasorelaxant effect of ALAE. In MLN-4760 treated rings, the EC_{50} was 1.20 ± 0.15 mg/ml with a 95% confidence interval of 0.750-1.250 mg/ml and $R_{max} = 78.02 \pm 16.39$ %. These results clearly show that the presence of MLN-4760 had no effect on the vasorelaxant response to ALAE.

3.4.2. Aortic responses to ALAE in the absence and presence of L-NAME or indomethacin

Aortic rings with intact endothelium were pre-incubated with L-NAME to inhibit nitric oxide (NO), and indomethacin to inhibit prostaglandin synthesis (Figure 6). No significant difference was observed between control and treated vessels ($p > 0.05$) (Fig. 6A). Indeed, the results obtained on vehicle-treated rings ($EC_{50} = 1.35 \pm 0.07$ mg/ml and 75.85 ± 5.77 % for R_{max} ; whereas for L-NAME-treated aortas, we obtained the following data: $EC_{50} = 0.45 \pm 0.12$ mg/ml with a 95% confidence interval: 0.250-0.750 mg/ml and $R_{max} = 97.34 \pm 9.78$ %. These results demonstrate that the vasorelaxant effect of ALAE is not mediated through nitric oxide. Similarly, aortic rings were pre-incubated with indomethacin (1 μ M) for 20 min before EP pre-contraction (10 μ M). The following data were obtained: $EC_{50} = 1.59 \pm 0.10$ mg/mL with a 95%

confidence interval: 1.250-1.625 mg/mL with an Rmax of 50.19±8.21% (Fig. 6B). These results suggest that the prostaglandin synthesis pathway seems to be involved in the vasorelaxant effect of ALAE.

3.4.3. Role of potassium channels and β -adrenergic receptors

In contrast, it is interesting to note that prior inhibition of ATP-dependent or calcium-activated potassium channels had no effect on the relaxation responses to ALAE. Indeed, in vehicle-treated rings, the values were: EC50 = 1.35±0.07 mg/ml, with a 95% confidence interval of 1.250-1.625 mg/ml. The EC50 of the same rings pretreated with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, was equal to 1.26±0.10 mg/ml, with a 95% confidence interval of 1.250-1.625 mg/ml, whereas the Rmax was equal to 73.69±14.57% (Fig. 7A). The findings also revealed that propranolol had no effect on ALAE-induced vasorelaxation (Fig. 7B). The EC50 value for the vehicle-treated rings was equal to 1.35±0.07 mg/ml with a 95% confidence interval of 1.250-1.625 mg/ml, whereas the ALAE-pretreated rings had an EC50 value of 1.28±0.11 mg/ml with a 95% confidence interval of 1.250-1.625 mg/ml. In the presence of propranolol, the Rmax was equal to 83.43±31.14%. All of these findings suggest that the presence of glibenclamide or propranolol had no effect on the vasorelaxant potency of ALAE.

3.4.4. Role of Soluble Guanylyl Cyclase and Ca²⁺ Channel blocker

The effect of pre-incubation with methylene blue (MB), the inhibitor of soluble guanylyl cyclase, and nifedipine, a Ca²⁺ channel blocker, on ALAE-induced vasorelaxation was tested. At the third and fourth doses (1.250 and 1.625 mg/ml, respectively), methylene blue has inhibited ALAE-induced vasorelaxation when compared to vehicle-treated rings by NE alone ($p < 0.01$) (Fig. 8A). However, nifedipine did not alter the vasorelaxant response to ALAE when compared with vehicle-treated rings (Fig. 8B). For aortic rings that have been treated with ALAE, EC50 = 1.35±0.07 mg/ml with a 95% confidence interval of 1.250-1.625 mg/ml and Rmax = 75.85±5.77%. While for methylene blue-treated aortic rings EC50 = 0.79±0.19 mg/ml, with a 95% confidence interval of 0.750-1.250 mg/ml and Rmax = 38.54 ±11.06%. In rings pre-incubated with nifedipine, Rmax = 84.21±10.02% and EC50 = 0.85±0.13 mg/ml. These results suggest that the blocker of soluble guanylyl cyclase inhibited ALAE-induced vasodilation, suggesting that the relaxant effect of ALAE may be related to the soluble guanylyl cyclase pathway. However, the relaxant effect of ALAE seems to be independent of calcium channel pathway.

4. DISCUSSION

In the present study, antihypertensive and vasorelaxant activities of *Ammodaucus leucotrichus* aqueous extract were assessed in normotensive and L-NAME-induced hypertensive rats. In rats, oral daily administration of N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) at a dose of 60 mg/kg for two weeks caused hypertension. L-NAME is a frequently utilized inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) activity *in vitro* and *in vivo*. On the one hand, decreased nitric oxide (NO) bioavailability causes changes in blood pressure and vascular reactivity in both acute and chronic L-NAME administration [21, 22]. Under many circumstances, NO has biological effects via activating sGC and boosting the synthesis of cGMP from GTP in a variety of situations [23]. GMPc activates cGMP-dependent protein kinase, which causes vasodilation [24]. Natural products and plant extracts elicit vasorelaxation through pathways that are strongly linked to the NO system, eicosanoid system, and K⁺ channel activities [25, 26]. Lasilix was utilized as a standard therapy in this study. This synthetic drug is often used to treat hypertension. It is known to inhibit the luminal Na-K-Cl cotransporter by coupling to the chloride transport channel at the thick ascending branch of Henle's loop, resulting in sodium, chloride, and potassium loss in the urine [19]. High blood pressure is routinely treated with this synthetic medication. Despite that antihypertensive drugs have proven to be effective, they also have multiple harms, such as disruption of renal function, dry cough, angioedema among other effects [27].

L-NAME-treated rats had higher oxidative stress indicators and lower expression of NO metabolites, eNOS, erythroid 2-related factor 2, and heme oxygenase-1, according to a recent study [28]. Vasoconstriction, increased blood pressure, and thrombus development result from reduced basal NO production or activity. Overproduction of NO, on the other hand, causes vasodilation, hypotension, vascular leakage, and cellular metabolic disturbance [29].

A. leucotrichus plays an important role in traditional therapy in North African countries. It is used as a treatment for heart diseases [30], including hypertension. ALAE contains diverse biological properties, according to preliminary research. However, until now, no research has investigated the antihypertensive properties of this plant. In this study, the body weight of normal and hypertensive rats did not change after treatment with ALAE at a dose of 60 mg/kg for one week. However, repeated oral administration of ALAE at a dose of 100 mg/kg exhibited a significant decrease of body weight at the 7th day in normal and hypertensive rats ($p < 0.05$ respectively). Essential oils of *A. leucotrichus* are slightly hazardous at a dose of 200 mg/kg according to the results of an acute toxicity experiment, and their LD₅₀ were equal to 520-570 mg/kg [31]. In addition, our previous findings have shown that in normal and diabetic rats

treated with aqueous extract of *A. leucotrichus* (10 mg/kg) for 15 days, a significant decrease of body weight was observed ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively).

Acute administration of ALAE had no impact on blood pressure parameters both in normotensive and hypertensive rats. However, subchronic treatment with ALAE for seven days resulted in a substantial drop of SBP, MBP, and DBP at the 7th day in hypertensive rats. However, the extract has not exerted hypotensive activity in normal rats due to the physiological regulating system. This finding shows clearly the antihypertensive activity of ALAE. Similar studies have found that secondary metabolites of medicinal plants can cure hypertension via a variety of pathways [19, 32].

The *in vitro* vasorelaxant effect of ALAE was studied using isolated rat aortic rings at cumulative doses ranging from 0.250 mg/ml to 1,625 mg/ml. The results showed that ALAE completely relaxed epinephrine (EP)- and KCl-precontracted aortic rings. The experimental research of ALAE proved its ability to reduce tension in endothelium-intact aortic rings precontracted with PE, implying that the vasorelaxant effect of ALAE is endothelium dependent. Seven reference medications were utilized in this experiment to determine the pathway involved in ALAE-induced vasorelaxation: MLN-4760, a specific inhibitor of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2); L-NAME, a direct inhibitor of nitric oxide (NO) synthase; Indomethacin, a prostaglandin synthesis inhibitor; propranolol, a nonselective β -adrenergic blocking agent, which is able to inhibit the action of EP (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) via β - and β 2-adrenergic receptors [33, 34]; glibenclamide, a blocker of ATP-sensitive K⁺ channels; methylene blue, a blocker of soluble guanylyl cyclase; nifedipine, a long- and short-acting 1,4-dihydropyridine calcium channel blocker, this drug acts primarily on vascular smooth muscle cells by stabilizing voltage-dependent L-type calcium channels in their inactive conformation. By preventing calcium influx into smooth muscle cells, it prevents calcium-dependent myocyte contraction and vasoconstriction. Preincubation with various drugs, including glibenclamide, propranolol, nifedipine, MLN-4760, and L-NAME has not changed ALAE-induced vasorelaxation of aortic rings. This indicates that the vasorelaxant effect of ALAE is not mediated through the specific pathways of these drugs. However, after pre-incubation with methylene blue, a substantial inhibition of the vasorelaxant effect of ALAE was observed indicating that this extract induces its vasorelaxant effect through the soluble guanylyl cyclase pathway. The vascular endothelium is widely recognized to have an important role in the regulation of the cardiovascular system, particularly in the modulation of vasomotor tone via the production or release of vasodilator chemicals such as NO and PGI₂ [35]. Certainly, soluble

guanylatecyclase (sGC) is thought to be the primary enzyme in generating relaxation produced by nitric oxide (NO) and NO-related chemicals by raising intracellular concentrations of guanosine 3-, 5-cyclic monophosphate (cyclic GMP), which leads to vascular dilatation[36]. However, methylene blue inhibits this signaling sGC mediated vasodilation pathway and results in vascular dysfunction[37]. With new sGC stimulating/activating chemicals as prospective clinical therapy options, sGC is quickly becoming an intriguing therapeutic target for the treatment of vascular dysfunction and hypertension[37]. Similar investigations have found that the sGC-cGMP pathway is involved in the treatment of hypertension [38, 39]. Furthermore, in the present study, indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis, inhibited the vasorelaxant activity of ALAE. This finding suggests that prostaglandin pathway is also involved in the vasorelaxant effect of [40]. Similar studies have revealed that the pathway of prostaglandin synthesis has a role in the treatment of hypertension[41].

5. CONCLUSION

The present study reveals for the first time the antihypertensive effect of *Ammodaucus leucotrichus*. In addition, it causes vasorelaxation through stimulation of sGC-cGMP and vascular cyclooxygenase pathways in aortic rings. Further studies are needed to determine the active(s) principle(s) involved in this pharmacological activity.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

This study was conducted according to the ethics committee of Faculty of Sciences & Techniques Errachidia, FSTE/2015.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No humans were used for studies that are basis of this research. The reported experiments on animals are in accordance with the US National Research Council's "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The data supporting the findings of the article is available within the article.

FUNDING

This work was carried out with the assistance of CNRST (PPR/2015/35) and Hassan II Academy of Science and Technology, Morocco.

CONFLICT OF INTEREST

Dr. Mohamed Eddouksis the Regional Editor of Cardiovascular&Hematological Agents in Medicinal Chemistry. However, the other authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none

6. REFERENCES

- [1] Angeli, F.; Reboldi, G.; Trapasso, M.; Gentile, G.; Pinzagli, M.G.; Aita, A.; Verdecchia, P. European and US guidelines for arterial hypertension: similarities and differences. *Eur J Intern Med*, **2019**, 63:3-8.
- [2] Kearney, P.M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P.; Whelton, P.K.; He, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, 2005, 365(9455):217-23.
- [3] Mendis, S.; Puska, P.; Norrving, B.; World Health Organization. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization, **2011**.
- [4] Ozenda, P. Flore et végétation du Sahara (3ème édition mise à jour et augmentée). Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, **1991**, 250-278.
- [5] Velasco-Negueruela, A.; Pérez-Alonso, M.J.; Pérez de Paz, P.L.; Palá-Paúl, J.; Sanz, J. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the volatiles from the fruits of *Ammodaucus leucotrichus* subsp. *leucotrichus* and subsp. *nanocarpus* grown in North Africa and the Canary Islands, respectively. *J Chromatogr A*, **2006**, 1108(2):273-5.
- [6] Hammiche, V.; Maiza, K. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of TassiliN'ajjer. *J Ethnopharmacol*. **2006**, 105(3):358-67.
- [7] El Mansouri, L.; Ennabili, A.; Boust, D. Socioeconomic interest and valorization of medicinal plants from the Rissani oasis (SE of Morocco). *Boletin Latinoamericano y del caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **2011**, 10(1), 30-45.
- [8] Nassif, F.; Tanji, A. 3. Gathered food plants in morocco the long-forgotten species in ethnobotanical research by fatimanassif and abbes tanji. *Life sciences leaflets*, **2013**, 37, 17-to.
- [9] El-Ouady, F.; Eddouks, M. Glucose Lowering Activity of Aqueous *Ammodaucus leucotrichus* Extract in Diabetic Rats. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, **2020**, 152-159.
- [10] Es-Safi, I.; Mechchate, H.; Amaghnoije, A.; Calarco, A.; Boukhira, S.; Noman, O.M.; Boust, D. Defatted Hydroethanolic Extract of *Ammodaucus leucotrichus* Cosson and Durieu Seeds: Antidiabetic and Anti-Inflammatory Activities. *Applied Sciences*, **2020**, 10(24), 9147.
- [11] Louail, Z.; Kameli, A.; Benabdelkader, T.; Bouti, K.; Hamza, K.; Krimat, S. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. seeds. *J. Mater. Environ. Sci*, **2016**, 7(7), 2328-2334.
- [12] Gherraf, N.; Zellagui, A.; Kabouche, A.; Lahouel, M.; Salhi, R.; Rhouati, S. Chemical constituents and antimicrobial activity of essential oils of *Ammodaucus leucotrichus*. *Arabian Journal of Chemistry*, **2017**, 10, S2476-S2478.
- [13] Ziani, B.E.; Rached, W.; Bachari, K.; Alves, M. J.; Calhelha, R.C.; Barros, L.; Ferreira, I.C. Detailed chemical composition and functional properties of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. And *Moringa oleifera* Lamarck. *Journal of Functional Foods*, **2019**, 53, 237-247.
- [14] Sadaoui, N.; Bec, N.; Barragan-Montero, V.; Kadri, N.; Cuisinier, F.; Larroque, C.; Arab, K.; Khetta, B. The essential oil of Algerian *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. and its effect on the cholinesterase and monoamine oxidase activities. *Fitoterapia*, **2018**, 130:1-5.
- [15] Manssouri, M.; Znini, M.; El Harrak, A.; Majidi, L. Antifungal activity of essential oil from the fruits of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., in liquid and vapour phase against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2016**, 6(5), 131-136.
- [16] Naima, B.; Abdelkrim, R.; Ouarda, B.; Salah, N.N.; Larbi, B.A.M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of essential oil from *Ammodaucus leucotrichus* Cosson & Durieu (Apiaceae) growing in South Algeria. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, **2019**, 33(3), 541-549.
- [17] Beghalia, M.2.; Ghalem, S.; Allali, H.; Belouatek, A.; Marouf, A. Screening for Anti-crystallisation Calcium Oxalate Urolithiasis Activity in Algerian Plants. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **2008**, 16(1).
- [18] Ajebli, M.; Eddouks, M. *Buxus sempervirens* L Improves Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus in Rats. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, **2017**, 142-152.
- [19] Ajebli, M.; Eddouks, M. Antihypertensive activity of *Petroselinum crispum* through inhibition of vascular calcium channels in rats. *J Ethnopharmacol*, **2019**, 242:112039.

- [20] Anwar, M.A.; Samaha, A.A.; Ballan, S.; Saleh, A.I.; Iratni, R.; Eid, A.H. Salvia fruticosa Induces Vasorelaxation In Rat Isolated Thoracic Aorta: Role of the PI3K/Akt/eNOS/NO/cGMP Signaling Pathway. *Sci Rep*, **2017**, 7(1):686.
- [21] Stenmark, K.R.; Rabinovitch, M. Emerging therapies for the treatment of pulmonary hypertension. *Pediatr Crit Care Med*, **2010**, 11(2 Suppl): S85-90.
- [22] Kopincová, J.; Púzserová, A.; Bernátová, I. L-NAME in the cardiovascular system - nitric oxide synthase activator? *Pharmacol Rep*, **2012**, 64(3):511-20.
- [23] Bian, K.; Doursout, M.F.; Murad, F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, **2008**, 10(4):304-10.
- [24] Bredt, D.S.; Ferris, C.D.; Snyder, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, **1992**, 267(16), 10976-10981.
- [25] McNeill, J.R.; Jurgens, T.M. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. *Can J Physiol Pharmacol*, **2006**, 84(8-9):803-21.
- [26] Schmitt, C.A.; Dirsch, V.M. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide*, **2009**, 21(2):77-91.
- [27] Kiriya, A.; Honbo, A.; Nishimura, A.; Shibata, N.; Iga, K. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses of antihypertensive drugs, nifedipine and propranolol, in spontaneously hypertensive rats to investigate characteristics of effect and side effects. *Regul Toxicol Pharmacol*, **2016**, 76:21-9.
- [28] Potue, P.; Wunpathe, C.; Maneesai, P.; Kukongviriyapan, U.; Prachaney, P.; Pakdeechote, P. Nobiletin alleviates vascular alterations through modulation of Nrf-2/HO-1 and MMP pathways in L-NAME induced hypertensive rats. *Food Funct*, **2019**, 10(4):1880-1892.
- [29] Moncada, S.; Higgs, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*, **2006**, 147 Suppl 1(Suppl 1):S193-201.
- [30] Jouad, H.; Haloui, M.; Rhiouani, H.; El Hilaly, J.; Eddouks, M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J Ethnopharmacol*, **2001**, 77(2-3):175-82.
- [31] Mohammadi, H.; Idjeri-Mecherara, S.; Menaceur, F.; Azine, K.; Hassani, A. Chemical compositions of extracted volatile oils of Ammodaucus leucotrichus L. fruit from different geographical regions of Algeria with evaluation of its toxicity, anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **2018**, 21(6), 1568-1584.
- [32] Ajebli, M.; Eddouks, M. Vasorelaxant and Antihypertensive Effects of Menthapulegium L. in Rats: An In vitro and In vivo Approach. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, **2021**, 21(7):1289-1299.
- [33] Chinnadurai, S.; Fonnesbeck, C.; Snyder, K.M.; Sathe, N.A.; Morad, A.; Likis, F.E.; McPheeters, M.L. Pharmacologic Interventions for Infantile Hemangioma: A Meta-analysis. *Pediatrics*, **2016**, 137(2):e20153896.
- [34] Baratam, S.R.; Janjanam, K.C.; VijayaRatna, J. Determination of nifedipine in human plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its validation. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2018**, 7, 678-91.
- [35] Vanhoutte, P.M. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*, **1989**, 13(6), 658-667.
- [36] Derbyshire, E.R.; Marletta, M.A. Structure and regulation of soluble guanylatecyclase. *Annu Rev Biochem*, **2012**, 81:533-59.
- [37] Buys, E.; Sips, P. New insights into the role of soluble guanylatecyclase in blood pressure regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **2014**, 23(2):135-42.
- [38] Zhu, X.M.; Fang, L.H.; Li, Y.J.; Du, G.H. Endothelium-dependent and -independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings. *Vascul Pharmacol*, **2007**, 46(3):160-5.
- [39] Tao, L.; Hu, H.S.; Shen, X.C. Endothelium-dependent vasodilatation effects of the essential oil from Fructus alpiniae zerumbet (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings in vitro. *Phytomedicine*, **2013**, 20(5):387-93.
- [40] Gorzalczy, S.; Moscatelli, V.; Ferraro, G. Artemisia copa aqueous extract as vasorelaxant and hypotensive agent. *J Ethnopharmacol*, **2013**, 148(1):56-61.

- [41] Qu, Z.; Zhang ,J.; Gao, W.; Chen, H.; Guo, H.; Wang, T.; Li, H.; Liu, C. Vasorelaxant effects of Cerebralcare Granule® are mediated by NO/cGMP pathway, potassium channel opening and calcium channel blockade in isolated rat thoracic aorta. *J Ethnopharmacol*, **2014**, 155(1):572-9.

Table 1: Effect of a single oral administration of ALAE (60 and 100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in normal and L-NAME-induced hypertensive rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n = 6. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. T: time (hour).

		Systolic blood pressure (mmHg)			
		Control	ALAE (mg/kg)		Lasilix
			60	100	
Normal	T0	132.00 ± 6.00	131.75± 2.01	133.26±2.57	120.00 ± 7.00
	T6	138.00 ± 8.00	130.32± 2.07	135.31±1.55	111.00 ± 7.00
L-NAME	T0	180.00 ± 5.00	181.68 ± 2.89	192.83 ± 2.14	169.00 ± 7.00
	T6	175.00 ± 7.00	178.26 ± 2.36	180.82 ± 2.33	142.00 ± 6.00**

		Mean blood pressure (mmHg)			
		Control	ALAE (mg/kg BW)		Lasilix
			60	100	
Normal	T0	115.00 ± 7.00	112.58 ± 3.33	113.30±4.90	108.00 ± 6.00
	T6	113.00 ± 6.00	111.71 ± 2.69	118.86±4.38	97.00 ± 2.00
L-NAME	T0	156.00 ± 6.00	170.60 ± 2.47	180.95 ± 1.75	150.00 ± 3.00
	T6	157.00± 6.00	164.22 ± 2.65	170.64 ± 3.11	125.00 ± 6.00*

		Diastolic blood pressure (mmHg)			
		Control	ALAE (mg/kg)		Lasilix
			60	100	
Normal	T0	106.00 ± 5.00	105.42 ± 2.95	86.65±14.87	103.00 ± 5.00
	T6	101.00 ± 6.00	104.18 ± 1.19	110.66±6.02	91.00 ± 4.00
L-NAME	T0	144.00 ± 7.00	165.06 ± 3.08	175.01 ±2.28	152.00 ± 5.00
	T6	148.00±10.00	157.21 ± 3.49	165.55 ± 3.95	129.00 ± 4.00*

		Heart rate (bpm)			
		Control	ALAE (mg/kg)		Lasilix
			60	100	
Normal	T0	320.00 ± 10.00	304.00 ± 2.00	303.00 ± 1.34	349.00 ± 19.00
	T6	306.00 ± 8.00	302.00 ± 1.26	302.00 ± 1.26	321.00 ± 9.00
L-NAME	T0	312.00 ± 15.00	308.00 ± 1.26	305.00 ± 1.84	348.00 ± 22.00
	T6	318.00 ± 12.00	305.00 ± 3.92	304.00 ± 1.26	311.00 ± 17.00

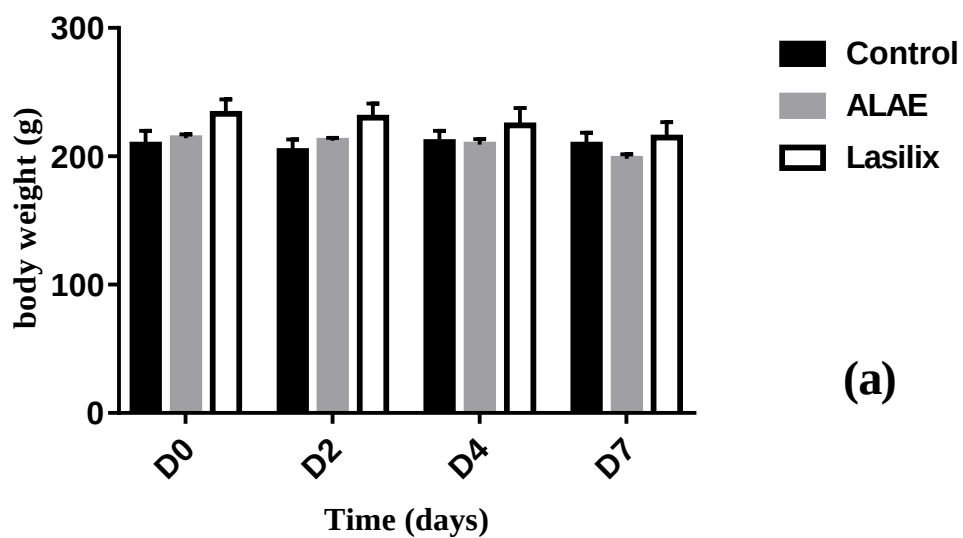
Table 2: Effect of repeated oral administration of ALAE (60 and 100 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) in normal and L-NAME-induced hypertensive rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n = 6. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. D: day.

		Systolic blood pressure (mmHg)			
		Control	ALAE (mg/kg)		Lasilix
			60	100	
Normal	D0	134.00± 7.00	131.75± 2,01	133.26 ± 2.57	120.00 ± 7.00
	D2	136.00± 5.00	127.61 ± 1,91	131.18 ± 1.60	115.00 ± 5.00
	D4	140.00± 3.00	124.42 ± 1,77	130.77 ± 1.70	108.00 ± 3.00
	D7	135.00± 6.00	122.02 ± 1,90	126.15 ± 1.66	99.00 ± 4.00*
L-NAME	D0	180.00± 5.00	181.68 ± 2.89	192.83 ± 2.14	169.00 ± 6.00
	D2	176.00 ±5.00	175.12 ± 3.09	167.64 ± 2.81***	122.00±2.00****
	D4	173.00 ±9.00	169.85 ± 3,15	153.84±2.44****	120.00±4.00****
	D7	172.00± 6.00	162.73± 1.25*	136.98±1.67****	109.00±3.00****

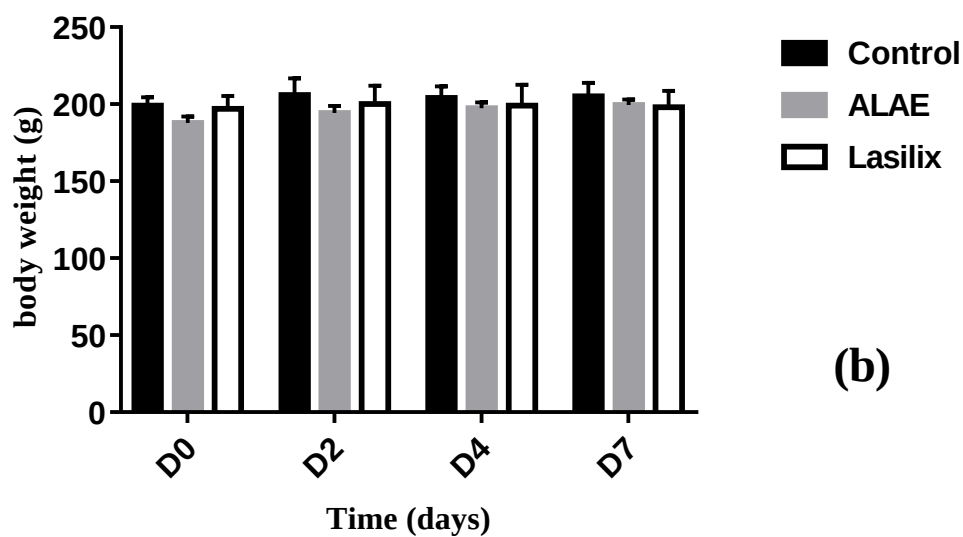
		Mean blood pressure (mmHg)			
		Control	ALAE (mg/kg)		Lasilix
			60	100	
Norm- al	D0	111.00±4.00	112.58 ± 3.33	115.58 ± 4.10	109.00 ± 7.00
	D2	112.00±5.00	108.31 ± 1.12	109.48 ± 1.09	107.00 ± 5.00
	D4	117.00± 6.00	102.74 ± 1.48	106.08 ± 2.89	101.00 ± 3.00
	D7	112.00± 4.00	100.41 ± 1.51	105.57 ± 2.37	96.00 ± 2.00
L- NAME	D0	156.00± 6.00	170.6 ± 2.47	180.95 ± 1.75	150.00 ± 3.00
	D2	149.00± 6.00	158.76 ± 0.68	156.74 ± 3.01**	148.00 ±5.00
	D4	148.00± 9.00	155.76 ± 0.56	145.78 ±1.79****	103.00±5.00****
	D7	147.00 ±6.00	150.12 ± 0.15**	135.14 ±2.67****	95.00 ± 4.00****

		Diastolic blood pressure (mmHg)			
		Control	ALAE (mg/kg)		Lasilix
			60	100	
Norm- al	D0	100.00±3.00	103.92 ± 3.80	107.09 ± 3.40	103.00 ± 6.00
	D2	101.00±5.00	99.33 ± 1.48	103.50 ± 2.59	98.00 ± 5.00
	D4	106.00±3.00	92.83 ± 2.17	100.33 ± 3.94	97.00 ±6.00
	D7	102.00±8.00	90.27 ± 1.88	96.93 ± 1.28	95.00 ± 4.00
L- NAME	D0	144.00±7.00	165.06 ± 3.08	175.01 ±2.28	152.00 ± 5.00
	D2	135.00±7.00	150.58 ± 1.65	151.30 ± 4.02**	103.00 ± 4.00
	D4	135.00±6.00	148.72 ± 0.74	141.76 ± 2.55****	100.00±4.00****
	D7	136.00±6.00	143.82±0.78**	134.23 ± 3.44****	98.00±3.00****

		Heart rate (bpm)			
		Control	ALAE (mg/kg)		Lasilix
			60	100	
Norm- al	D0	312.00 ± 15.00	302.00 ± 1.26	303.00 ± 1.34	348.00 ± 22.00
	D2	320.00 ± 14.00	303.00± 1.34	305.00 ± 3.92	341.00 ± 16.00
	D4	312.00 ± 16.00	302.00± 1.26	301.00 ± 1.00	341.00 ± 17.00
	D7	319.00 ± 8.00	305.00± 1.00	302.00 ± 1.26	305.00 ± 8.00*
L- NAME	D0	308.00 ± 12.00	301.00 ± 1.00	305.00 ± 1.84	348.00 ± 15.00
	D2	310.00 ±15.00	303.00 ± 1.34	302.00 ± 1.26	343.00 ± 13.00
	D4	307.00 ± 13.00	302.00± 1.26	303.00 ± 1.34	315.00 ± 11.00
	D7	318.00 ± 18.00	305.00 ± 1.84	301.00 ± 1.00	311.00 ± 10.00



(a)



(b)

Fig. 1. Effect of repeated oral administration of ALAE (60 mg/kg) on body weight (g) in normal (a) and L-NAME-induced hypertensive (b) rats. Data are expressed means $\pm$ SEM, n=6.

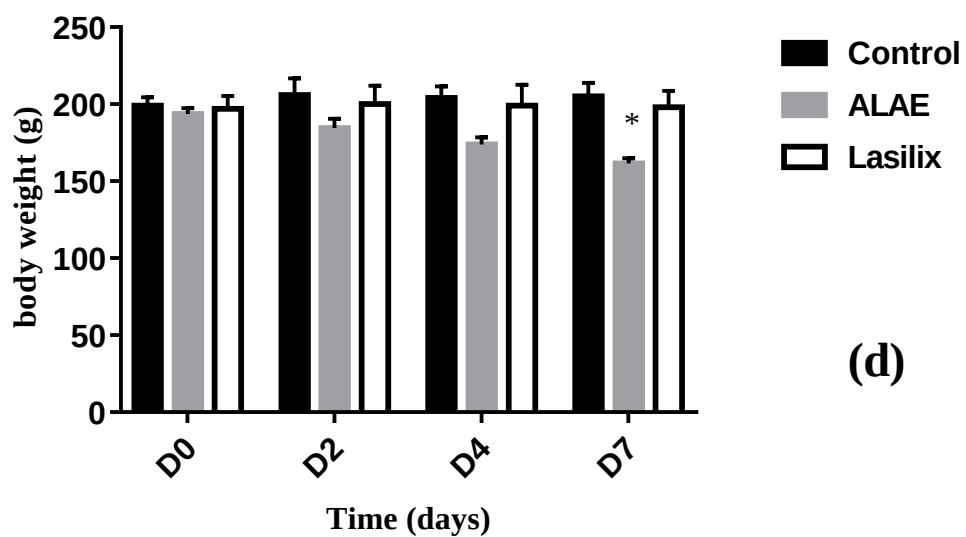
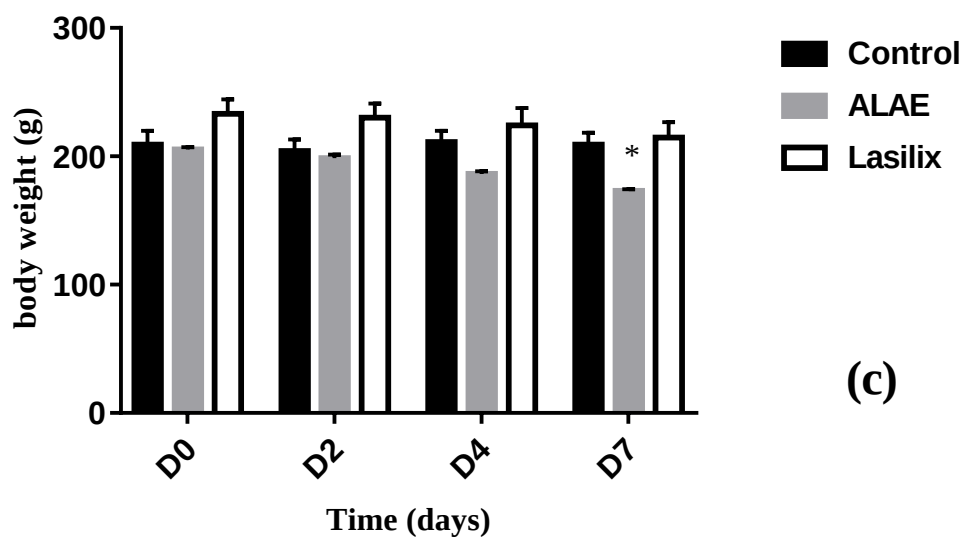


Fig. 2. Effect of repeated oral administration of ALAE (100 mg/kg) on body weight (g) in normal (c) and L-NAME-induced hypertensive (d) rats. Data are expressed means $\pm$ SEM, $n=6$. * $p<0.05$

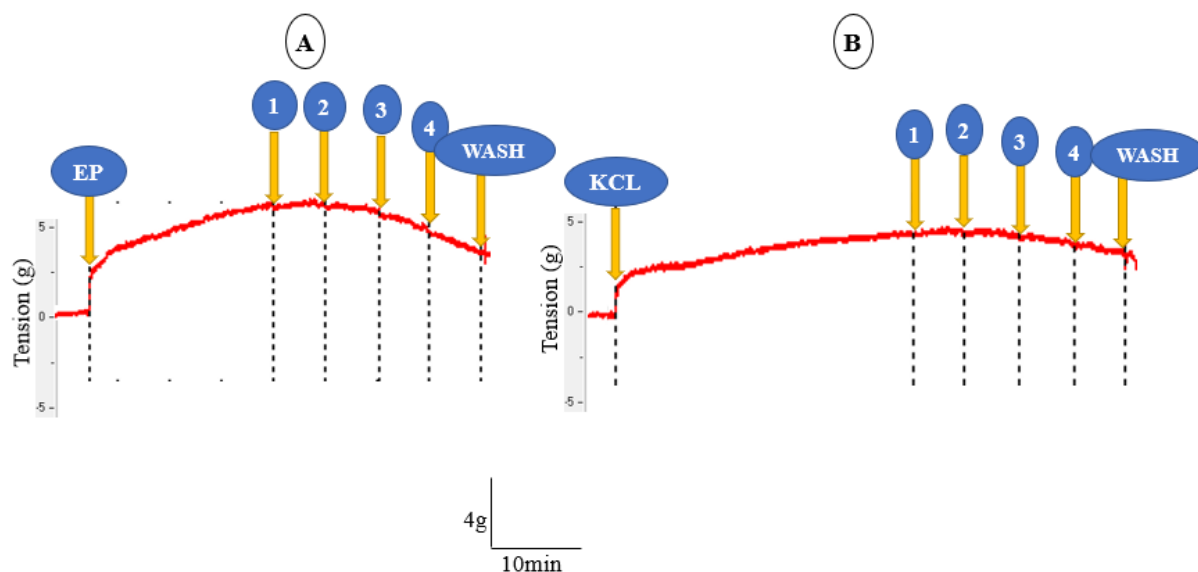


Fig. 3. Representative tracings illustrating the relaxation response produced by the application of ALAE on epinephrine and KCl-precontracted rat aortic rings. ALAE produced a dose-dependent vasorelaxant response in epinephrine-precontracted rat aortic rings (A); EP: addition of epinephrine, 1 to 4: addition to different doses of ALAE (0,250, 0,750, 1,250 and 1,625 mg/ml), Wash and KCl-precontracted rat aortic rings (B); addition of KCl, 1 to 4: addition to different doses of ALAE (0,250-1,625 mg/ml) and Wash.

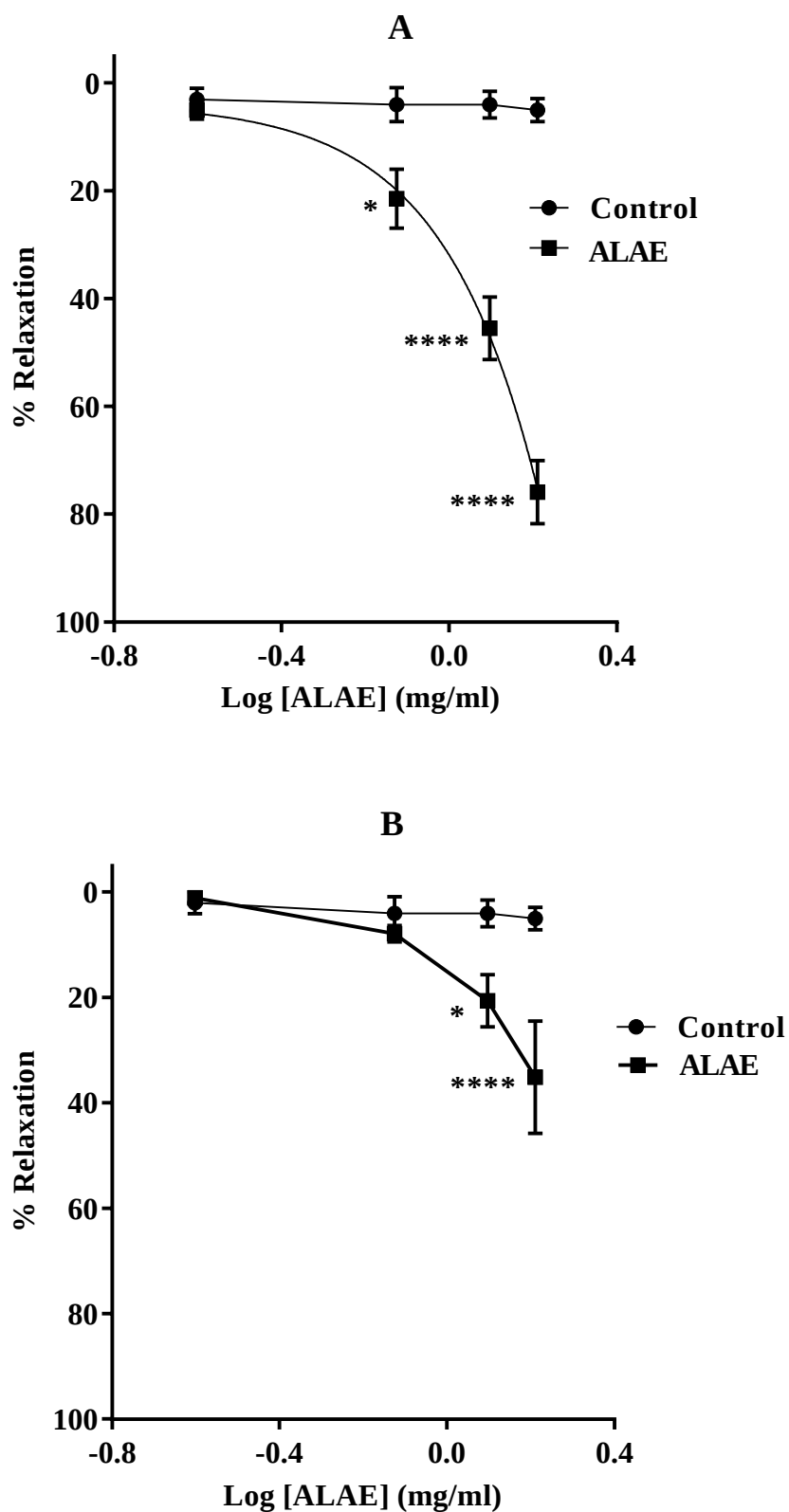


Fig. 4. Effect of ALAE fruits on EP or KCl-induced contraction in aortic rings. Cumulative dose-dependent curves for ALAE-induced relaxation and of the vehicle (distillated water) in rat aortic rings. $n = 6$. A: pre-contraction with epinephrine ($10 \mu\text{M}$); B: pre-contraction KCl (80 mM). * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

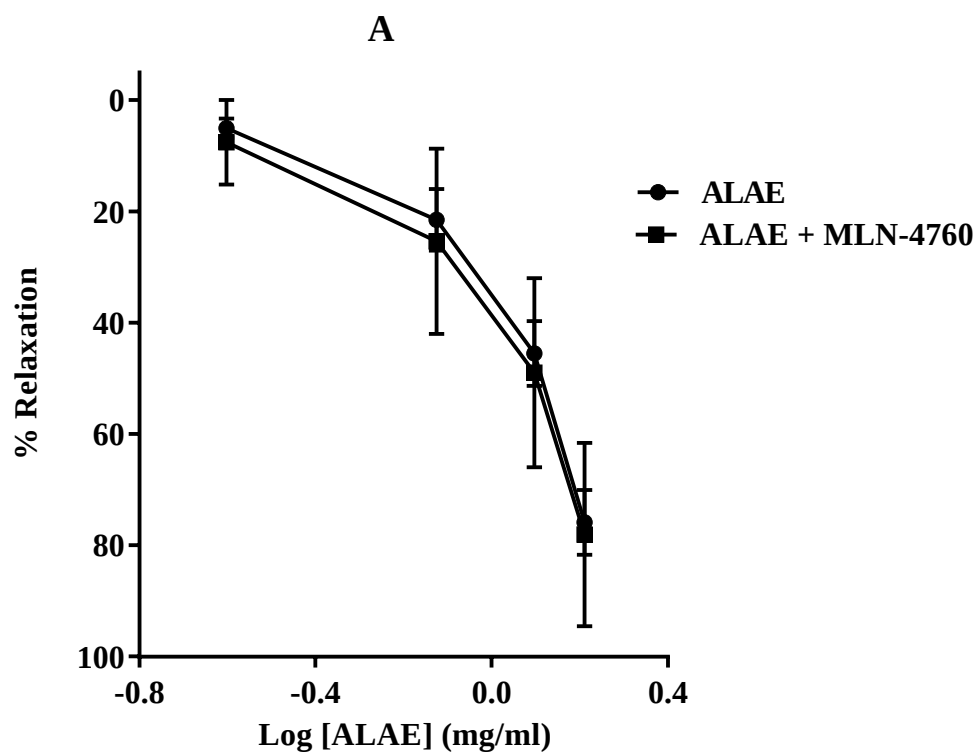


Fig. 5. Effect of MLN-4760 (specific inhibitor of Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2)) drug incubation on ALAE-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of ALAE in the absence (circles) or presence (squares) of standard drugs. Data represent mean $\pm$ SEM (n=6; for ALAE versus drug plus ALAE).

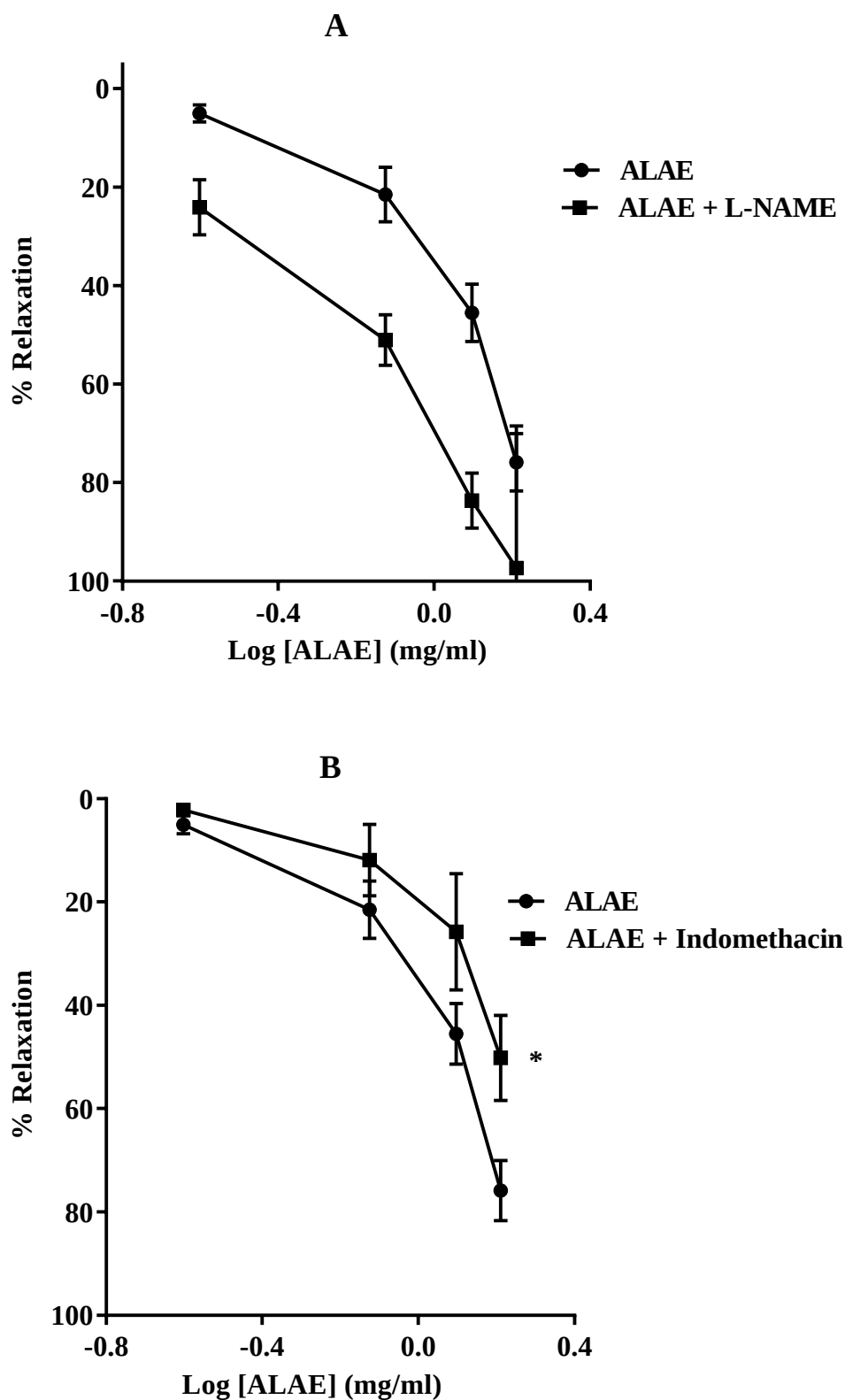


Fig. 6. Effect of different drugs incubation on ALAE- relaxation of EP-induced contraction in aortic rings. Aortic rings were incubated with cumulative doses of ALAE in the absence (circles) or presence (squares) of the following drugs: (A) L-NAME, (B) Indomethacin, Data represent mean $\pm$ SEM (n=6) for ALAE versus drug plus ALAE. *p<0.05

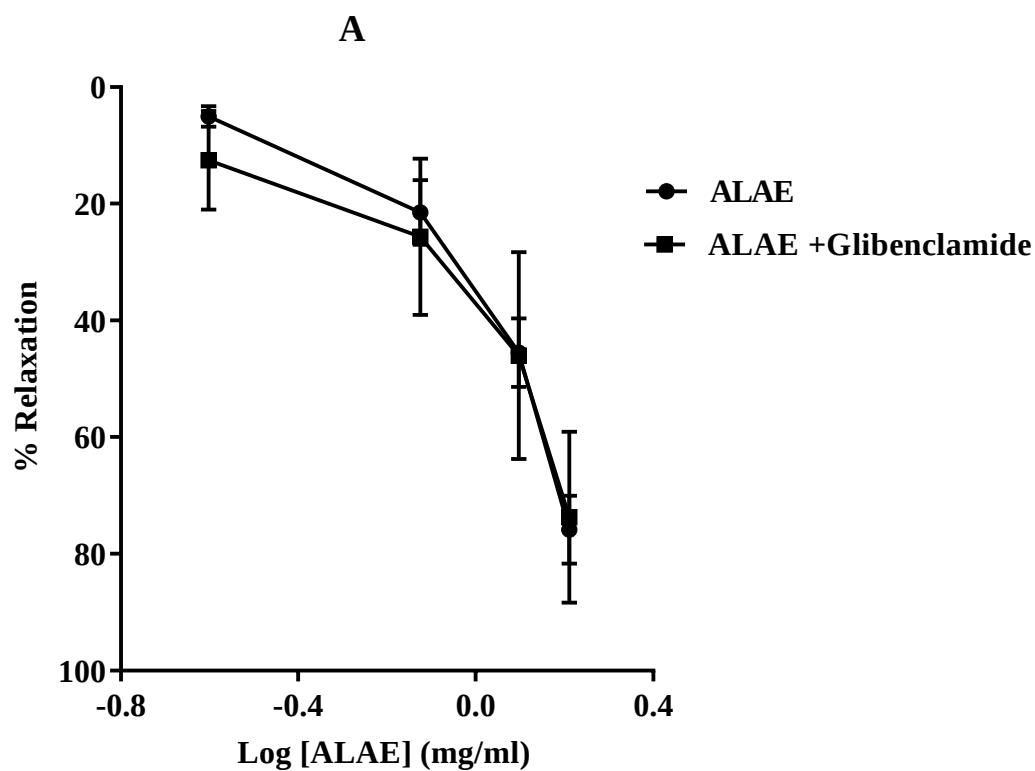


Fig. 7. Effect of Glibenclamide (A) and Propranolol (B) drugs incubation on ALAE-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of ALAE in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs. Data represent mean $\pm$ SEM ($n = 6$; for ALAE versus drug plus ALAE).

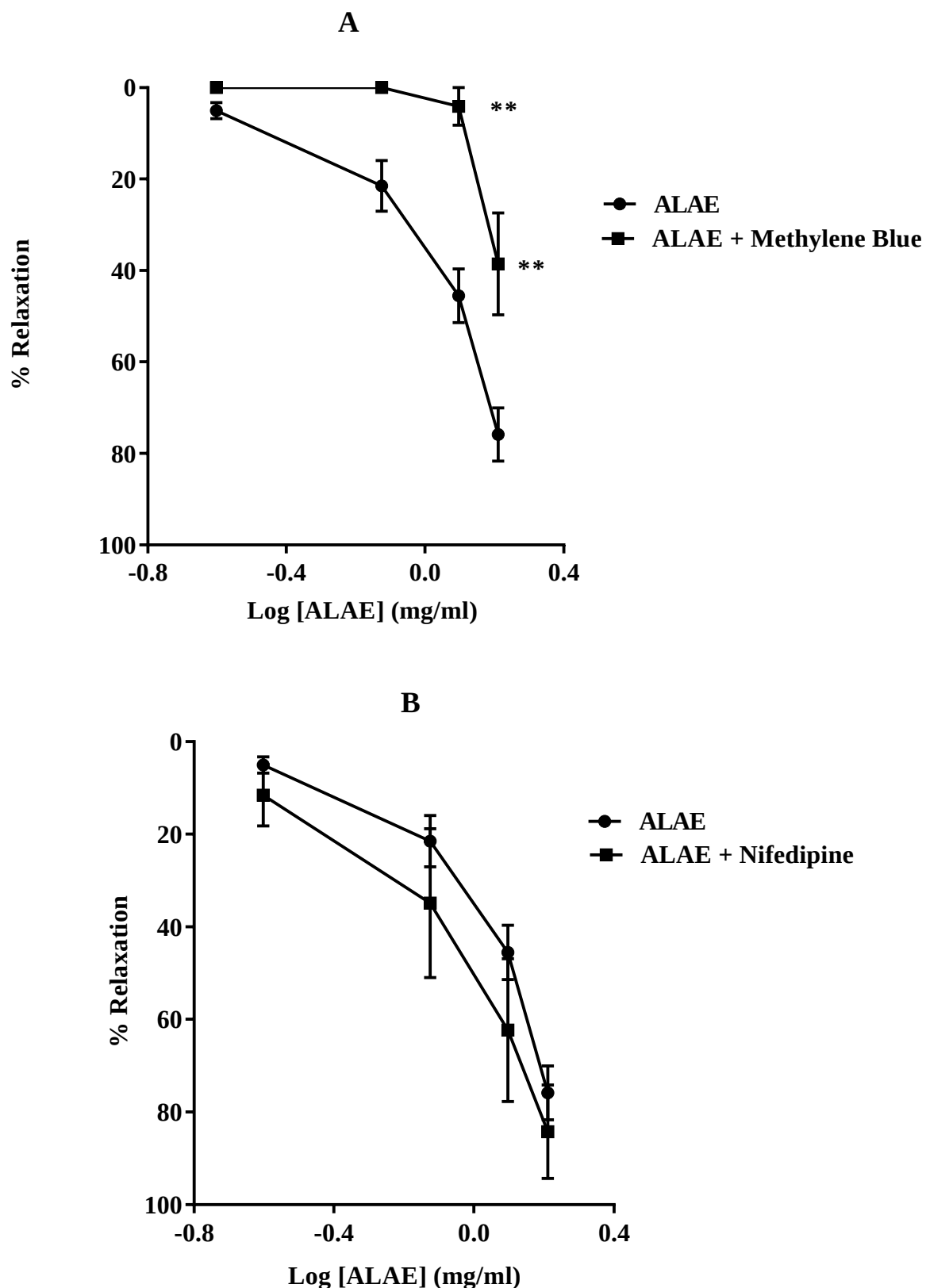


Fig. 8. Effect of Methylene blue (A) and Nifedipine (B) drugs incubation on ALAE-induced relaxation. Aortic rings were incubated with cumulative doses of ALAE in the absence (circles) or presence (squares) of the standard drugs. Data represent mean $\pm$ SEM ($n = 6$; for ALAE versus drug plus ALAE). ** $p < 0.01$.

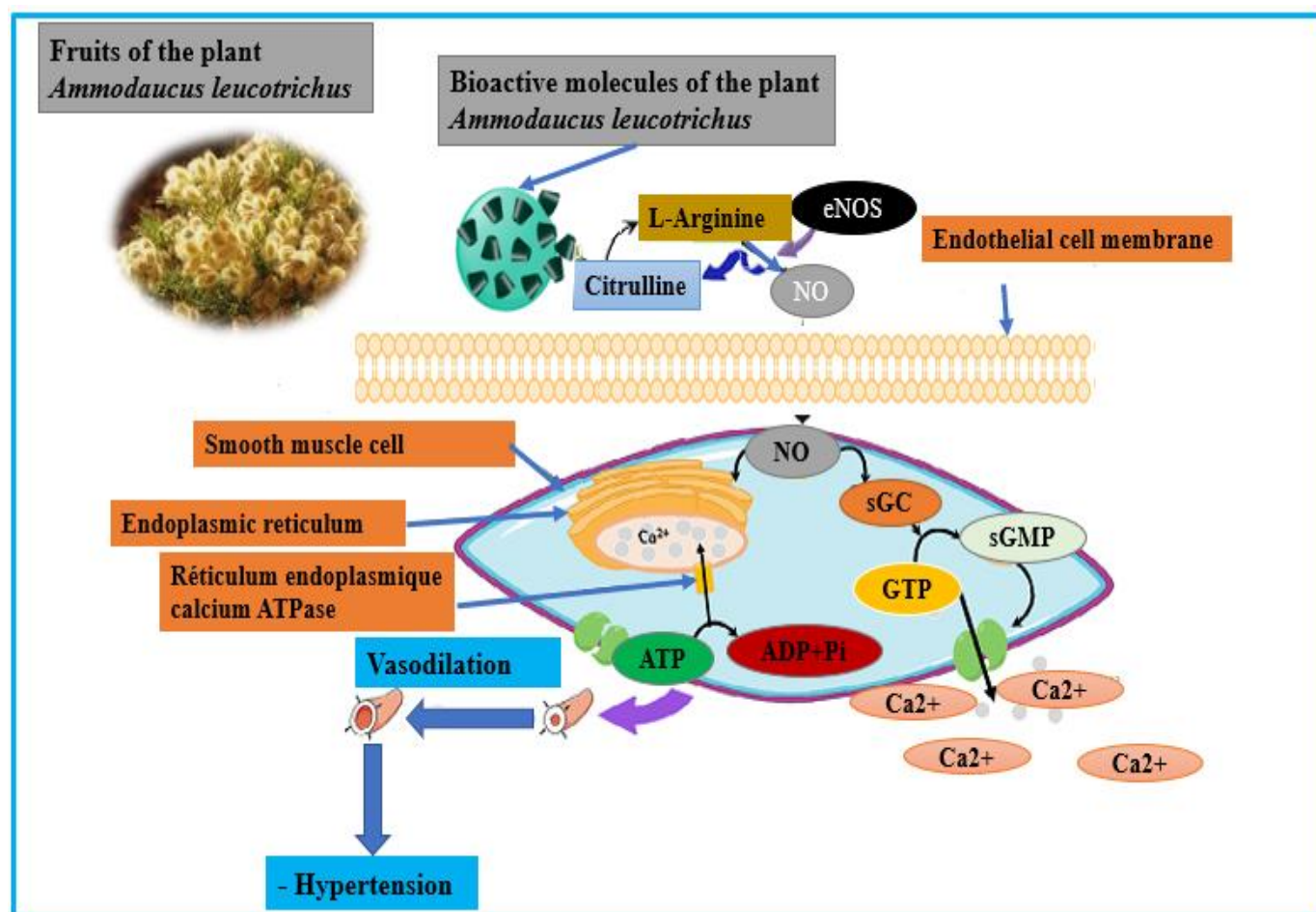


Fig. 9. Graphical abstract illustrating the simplified schematic representation of the mechanical process of AEAL bioactive compounds through the sGC and prostaglandin synthesis pathways in rat thoracic aortic smooth muscle.

Chapitre VII

Étude d'*Ammi visnaga*

Ce chapitre se compose de la publication 5:

Publication 5: Amtaghri, S., Qabouche, A., Slaoui, M., & Eddouks, M. (2023). Potential Antihypertensive Activity of the Aqueous Extract of *Ammi visnaga* and its Effect on ACE-2 in Rats. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. **Accepté**

Article 5

Potential Antihypertensive Activity of the Aqueous Extract of *Ammi visnaga* and its Effect on ACE-2 in Rats

Résumé :

Ce travail avait pour objectif d'étudier comment la pression sanguine au repos des rats était affectée par un extrait aqueux d'*Ammi visnaga*. Dans cette étude, les effets antihypertenseurs de l'extrait aqueux ont été examinés *in vivo* et l'activité vasodilatatrice a été réalisée *in vitro*.

Dans l'étude *in vivo*, l'extrait aqueux (70 et 140 mg/kg) a été administré par voie orale à des rats hypertendus et normotendus pendant 6 heures lors du traitement aigu et pendant 7 jours lors du traitement subchronique. Les résultats ont montré que l'extrait aqueux d'*Ammi visnaga* réduisait les paramètres de la pression artérielle (pression artérielle systolique, moyenne et diastolique) chez les rats hypertendus induits par le L-NAME après un traitement oral répété pendant 7 jours sans affecter les rats normotendus. En outre, dans les anneaux aortiques thoraciques précontractés avec la NE (10 μ M) ou KCl (80 mM), l'extrait aqueux d'*Ammi visnaga* (0,375-1,375 mg/ml) a montré un effet vasorelaxant. De plus, dans les aortes thoraciques isolées de rat, tous les médicaments utilisés dans cette étude à savoir ; le glibenclamide, le propranolol, l'indométacine, le L-NAME, le MLN-4760, le bleu de méthylène et la nifédipine n'ont eu aucun effet sur la vasorelaxation induite par l'extrait aqueux d'*Ammi visnaga*, et ils n'étaient pas responsables de la voie de signalisation. Par conséquent, d'autres médicaments standards sont nécessaires pour confirmer le mécanisme de cette voie de signalisation.

Potential Antihypertensive Activity of the Aqueous Extract of *Ammi visnaga* and its Effect on ACE-2 in Rats

Smail Amtaghri^{1,2}, Adil Qabouche, Miloudia Slaoui² and Mohamed Eddouks^{1*}

Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, (2023). Accepted

¹*Team of Ethnopharmacology and Pharmacognosy, Faculty of Sciences and Techniques Errachidia, Moulay Ismail University of Meknes, BP 509, Boutalamine, Errachidia, 52000, Morocco.*

²*Energy, materials and sustainable development (EMDD) Team- Higher School of Technology-SALE, Center for Water, Natural Resources Environment and Sustainable Development (CERNE2D), Mohammed V University in Rabat, Rabat, Morocco.*

**: Corresponding author. Prof Mohamed Eddouks, Faculty of Sciences and Techniques Errachidia, Moulay Ismail University of Meknes, BP 509, Boutalamine, Errachidia, 52000, Morocco. Phone: +212 35 57 44 97; Fax: +212 35 57 44 85; E-mail: mohamed.eddouks@laposte.net*

Abstract

Aims: This work aimed to investigate *Ammi visnaga*'s antihypertensive activity.

Background: *Ammi visnaga* has traditionally been used to treat hypertension.

Objective: The purpose was to examine the effect of *Ammi visnaga* aqueous extract (AVAE) on hypertension in rats.

Method: The antihypertensive effect of AVAE was tested in the current investigation. Wistar rats were given AVAE orally during the acute and subchronic treatments. The vasorelaxant activity of AVAE was also tested.

Results: AVAE lowered blood pressure only in hypertensive rats. Furthermore AVAE (0.375-1.375 mg/ml) showed a vasodilator effect. Furthermore, in isolated rat thoracic aortas, not all of the medications used in our study were responsible for the signaling pathway. As a result, additional pharmaceuticals are required to confirm the mechanism of this signaling pathway.

Conclusion: *Ammi visnaga* is an interesting medicinal plant against hypertension.

KEYWORDS: *Ammi visnaga*; Hypertension; L-NAME; Vasorelaxant; Angiotensin-converting enzyme-2(ACE2); Signaling pathway.

1. Introduction

Hypertension remains is a serious health issues in the globe. It is anticipated that by 2025, 1.56 billion persons would have high blood pressure [1-3]. The current directive trend is towards the use of medicinal plants as a primary source of human curative and preventive therapy often used for these important bioactive compounds [4].

Ammi visnaga (*A. visnaga*) (Apiaceae) has been used against several diseases including, diabetes [5-10], dental hygiene, as well as dizziness and headaches [5, 11, 12]. The studies of pharmacological activities have been revealed that the medicinal plant *A. visnaga* has hypoglycemic properties [13], antimicrobial [14], antioxidant [9, 15], cytotoxic [8, 16], anti-inflammatory [17, 18], antispasmodics and vasodilator activities [19]. Research conducted by Schimmer and Rauch (1998) [20] has revealed other effects such as the antimutagenic effect. However Daoudi *et al.* (2013) [21], have shown the immunostimulant effect of the plant *A. visnaga*.

Two coumarins were identified in *A. visnaga*; furanochromones and pyranocoumarins [22–24]. The assessment of antihypertensive and vasorelaxant properties of AVAE were targeted in this work.

2. Material and methods

2.1. Plant Material

Plant material was prepared according to the traditional method used in Morocco (decoction) as it has been previously described [25]. Two doses of 70 and 140 mg/kg were administered.

2.2. Antihypertensive activity

Hypertension was induced in male albino Wistar rats (150-250 g) by repeated (once per day during a three weeks) oral administration of L-NAME (60 mg/kg) dissolved in distilled water and blood pressure was followed as it has been previously described [25].

2.3. Vascular contractility

The Measurement of vascular relaxation and evaluation and involved mechanisms has been performed in isolated aortic rings as we have previously described [25].

2.4. Statistical analysis

Statistical significance was tested between more than two groups using two-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparisons test.

3. Results

3.1. Effect of AVAE on body weight

In the subchronic test, AVAE (70 and 140 mg/kg) produced no significant change in body weight (Figs. 1 and 2).

3.2. Single oral administration

Rats were given L-NAME over two weeks of daily oral administration. The blood pressure was high. Acute treatment of AVAE (70 and 140 mg/kg) did not alter blood pressure in all groups (Table 1).

3.3. Subchronic treatment

A. visnaga aqueous extract (70 and 140 mg/kg) was given orally for seven days in the experimental groups. After seven days of oral treatment, AVAE (70 and 140 mg/kg) had no effect in normotensive and hypertensive rats during acute treatment (6 hours) according to the findings (Table 2). The extract significantly reduced systolic blood pressure in the hypertensive group ($p < 0.0001$). On the other hand, lasilix lowered SBP in both the normotensive and hypertensive groups. After one week of oral administration, AVAE reduced the mean arterial pressure in hypertensive rats ($p < 0.001$). Similarly, after oral administration for one week in hypertensive rats, the diastolic pressure of the group showed a significant decrease ($p < 0.0001$). In contrast, upon acute and subchronic administration with *A. visnaga* aqueous extract, no change was seen in control group. Heart rate findings showed no significant change in subchronic treatment with AVAE.

3.4. Effect of AVAE on vascular contractility

In a series of experiments, the vasorelaxant effect of AVAE (0.375-1.375 mg/ml) was investigated using rat aortic rings. Figures 3 and 4 show how AVAE caused a dose-dependent vessel relaxation. When AVAE was administered at the doses ranging from 0.875 to 1.375 mg/mL, epinephrine pre-contracted aortic rings demonstrated significant vasorelaxation ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$) when compared to vehicle (Fig. 4A); $EC_{50} = 1.15 \pm 0.31$ mg/l with a 95% confidence interval. R_{max} was also $109.18 \pm 13.66\%$ ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, respectively). In KCl pre-contracted aortic rings (Fig. 4B), AVAE had a significant vasorelaxant

effect ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$); $EC_{50} = 0.42 \pm 0.07$ mg/ml and $R_{max} = 118.87 \pm 14.11\%$ ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$).

3.4.1. Effect of MLN-4760

To determine whether ACE2 is involved in the AVAE vasorelaxant activity, MLN-4760, a specific ACE2 inhibitor, was used. The results, as shown in Figure 5, show that MLN-4760 (6 nM) had no effect on the vasorelaxant effect of AVAE. The EC_{50} in MLN-4760-treated rings was 1.2 ± 0.14 mg/ml, with a 95% confidence interval of 0.875-1.250 mg/ml and $R_{max} = 111.15 \pm 23.52\%$.

3.4.2. Effect of L-NAME or indomethacin

The results on vehicle-treated rings showed that the EC_{50} was 1.15 ± 0.31 mg/ml and the R_{max} was $109.18 \pm 13.66\%$; nevertheless, for L-NAME-treated aortas, the corresponding values were: $R_{max} = 141.34 \pm 20.01\%$ and $EC_{50} = 0.73 \pm 0.04$ mg/ml with a 95% confidence interval of 0.375-0.875 mg/ml (Figure 6). These findings show that nitric oxide is not a mediator of the vasorelaxant effect of AVAE. Similarly, 20 min before to NE pre-contraction (10 M), aortic rings were pre-incubated with indomethacin (1 M). The following values were gathered: 95% confidence interval: 0.375-0.875 mg/mL with an R_{max} of $146.96 \pm 7.36\%$ (Fig. 6B). These results show that prostaglandin synthesis is not a mediator of the vasorelaxant effect of AVAE.

3.4.3. Effect of glibenclamide and propranolol

Prior inhibition of ATP-dependent or calcium-activated potassium channels, on the other hand, had no effect on the relaxation responses to AVAE. In fact, the values in vehicle-treated rings were: $EC_{50} = 1.15 \pm 0.31$ mg/ml, with a 95% confidence interval of 0.875-1.250 mg/ml. The EC_{50} of the same rings treated with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, was 0.41 ± 0.16 mg/ml, with a 95% confidence interval of 0.375-0.875 mg/ml, and the R_{max} was $104.88 \pm 11.87\%$ (Fig. 7A). Propranolol had no effect on AVAE-induced vasorelaxation, according to the findings (Fig. 7B). The EC_{50} value for the vehicle-treated rings was 1.15 ± 0.31 mg/ml with a 95% confidence interval of 0.875-1.250 mg/ml, whereas the AVAE-pretreated rings had an EC_{50} value of 0.53 ± 0.09 mg/ml with a 95% confidence interval of 0.875-1.250 mg/ml.

3.4.4. Effect of nifedipine and methylene blue

Methylene blue (MB), a NO-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) blocker, and Nifedipine, a Ca^{2+} channel blocker, were previously incubated with rat aortic rings. These

findings demonstrated that methylene blue had no effect on the relaxing effect of rat aortic rings in response to varying doses of AVAE (Fig. 8. A). Furthermore, nifedipine had no effect on the vasorelaxant response to AVAE (Fig. 8B). In AVAE-only treated aortic rings, the appropriate values were $EC_{50} = 1.15 \pm 0.31$ mg/ml with a 95% confidence interval of 0.875-1.250 mg/ml and $R_{max} = 109.18 \pm 13.66\%$. EC_{50} was 0.65 ± 0.05 mg/ml in MB-treated rings, with a 95% confidence interval of 0.375-0.875 mg/ml and $R_{max} = 96.52 \pm 10.63\%$. In rings preincubated with nifedipine, however, the values were lower. These findings indicate that methylene blue and nifedipine did not inhibit AVAE-induced vasodilation, implying that AVAE's relaxant effect is not related to the guanosine monophosphate NO-cyclic (GMPc) blocker and Ca^{2+} channel blocker.

3.4.5. Effect of Atropine

The results were examined and shown in Figure 9 and revealed that atropine did not alter the vasodilator property of AVAE. In atropine-treated rings, the EC_{50} was 1.20 ± 0.15 mg/ml with a 95% confidence interval of 0.750-1.250 mg/ml and $R_{max} = 78.02 \pm 16.39\%$.

4. Discussion

The present work demonstrates that the aqueous extract of *A. visnaga* has the ability to relax rat aortic rings and reduce blood pressure, which is the first attempt to describe the pharmacological evidence for the antihypertensive and vasodilatory effects of the extract. To determine the effect of AVAE on blood pressure parameters, L-NAME-induced hypertensive rats were used as a model. Oral administration for two weeks of N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) at a dose of 60 mg/kg caused hypertension in rats. L-NAME is a well-known *in vitro* and *in vivo* inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) activity. Nitric oxide is an underlying molecular messenger that accounts for an endothelial-derived relaxing activity in blood vessels in both acute and chronic L-NAME administration, it mediates macrophage cytotoxicity, and acts as a neurotransmitter in the brain and periphery [26-29]. The enzyme nitric oxide synthase produces NO from L-arginine and oxygen. Binding of NO to sGC results in a significant increase of cGMP levels. This second messenger then regulates physiological functions such as vasodilation, platelet aggregation and neurotransmission by directly modulating phosphodiesterases (PDEs), ion channels or cGMP-dependent protein kinases [30, 31]. The standard drug lasilix was used as the treatment in this study. Despite the fact that antihypertensive agents have proven to be effective, they also cause many adverse effects [32, 33]. *Ammi visnaga* is a medicinal and aromatic plant. It has been utilized to cure many diseases,

including hypertension. According to early studies, AVAE possesses a number of biological properties. However, no research has been conducted to date on the plant's antihypertensive properties. AVAE had no effect on body weight. This finding confirms the relative nontoxicity of AVAE extract at the doses used in our experiment. This result is consistent with other previous studies [34], which showed that treatment of normal and hypertensive rats with AVAE for 7 days at a dose of 100 mg/kg had no significant effect on body weight. Both normotensive and hypertensive rats that received acute AVAE treatment had no changes in blood pressure measurements. However, SBP, MBP, and DBP significantly decreased at day 7 after subchronic treatment with AVAE for seven days. This result shows the AVAE's antihypertensive activity.

In the current investigation, isolated rat aortic rings were used to demonstrate the vasorelaxant effect of AVAE at cumulative dosages between 0.375 mg/ml and 1.375 mg/ml. The outcomes demonstrated that aortic rings were totally relaxed by AVAE. The experimental study of AVAE demonstrated its capacity to lessen tension in endothelium-intact aortic rings pre-contracted with PE, suggesting that the endothelium is necessary for the vasorelaxant effect of AVAE. Eight reference drugs were used to identify the mechanism underlying AVAE-induced vasorelaxation. Pretreatment with indomethacin, glibenclamide, propranolol, nifedipine, methylene blue, MLN-4760, atropine, and L-NAME had no effect on the vasodilator property of AVAE. This suggests that the vasorelaxant effect of AVAE is not mediated by these drugs' specific pathways.

5. Conclusion

The findings of this preliminary screening support the therapeutic uses of the *A. visnaga* plant due to the observed antihypertensive and vasorelaxant effects and show that aqueous extracts of this plant contain active chemicals. In addition, not all pharmacological agents used in our study were able to block the corresponding pathway. Moreover, other pharmacological drugs must be used to approve the mechanism of the underlying mechanism of action involved in the vasorelaxant activity.

CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No human were involved in the study. All animal procedures were performed in accordance with UK: the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039).

AVIALABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

FUNDING

This study was supported by Hassan II Academy of Science and Technology and CNRST under grant number PPR/2015/35.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Not applicable

6. References

- [1] Kearney, P.M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P.; Whelton, P.K.; He, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, 2005, 365(9455):217-23.
- [2] He, J.; Whelton, P.K. Epidemiology and prevention of hypertension. *Medical Clinics of North America*, 1997, 81(5), 1077-1097.
- [3] Chobanian, A.V.; Bakris, G.L.; Black, H.R.; Cushman, W.C.; Green, L.A.; Izzo Jr, J.L.; and National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *hypertension*, 2003, 42(6), 1206-1252.
- [4] Es-Safi, I.; Mechchate, H.; Amaghnoouje, A.; El Moussaoui, A.; Cerruti, P.; Avella, M.; and Bousta, D. Marketing and legal status of phytomedicines and food supplements in Morocco. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 2021, 18(2), 279-285.
- [5] Bellakhdar, J.; Claisse, R.; Fleurentin, J.; and Younos, C. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J. Ethnopharmacol*, 1991, 35(2), 123-143.
- [6] Ziyat, A.; Legssyer, A.; Mekhfi, H.; Dassouli, A.; Serhrouchni, M.; and Benjelloun, W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol*, 1997, 58(1), 45-54.
- [7] Al-Douri, N.A.; and Al-Essa, L.Y. A survey of plants used in Iraqi traditional medicine. *Jordan J Pharm Sci*, 2010, 3(2), 100-108.
- [8] Beltagy, A.M.; and Beltagy, D.M. Chemical composition of Ammi visnaga L. and new cytotoxic activity of its constituents Khellin and Visnagin. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015, 7(6), 285.
- [9] Olufunke, M.D.; Kasali, A.A.; and Olusegun, E. Constituents of the Spondias mombin Linn and the comparison between its fruit and leaf essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2003, 6(3), 148-152.
- [10] Eddouks, M.; Maghrani, M.; Lemhadri, A.; Ouahidi, M.L.; and Jouad, H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilaleet). *J. Ethnopharmacol*, 2002, 82(2-3), 97-103.
- [11] Bellakhdar, J. Pharmacopée marocaine traditionnelle. *Ibis press*, 1997.
- [12] Meyer, U. From khellin to sodium cromoglycate--a tribute to the work of Dr. REC Altounyan (1922-1987). *Die Pharmazie*, 2002, 57(1), 62-69.
- [13] Jouad, H.; Maghrani, M.; and Eddouks, M. Hypoglycemic effect of aqueous extract of Ammi visnaga in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 2002, 2(4), 19-29.
- [14] Hudson, J.; and Towers, G.N. Phytomedicines as antivirals. *Drugs of the Future*, 1999, 24(3), 295.
- [15] Bencheraiet, R.; Kherrab, H.; Kabouche, A.; Kabouche, Z.; and Maurice, J. Flavonols and antioxidant activity of Ammi visnaga L.(Apiaceae). *Records of Natural Products*, 2011, 5(1), 52.
- [16] Pakfetrat, H.; Nemati, N.; and Shiravi, A. Cytotoxicity effects of ammi visnaga extract on hela and mcf7 cancer cell line, 2015.
- [17] Kwon, M.S.; Lee, J.K.; Park, S.H.; Sim, Y.B.; Jung, J.S.; Won, M.H.; and Suh, H.W. Neuroprotective effect of visnagin on kainic acid-induced neuronal cell death in the mice hippocampus. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2010, 14(5), 257-263.
- [18] Lee, J.K.; Jung, J.S.; Park, S.H.; Park, S.H.; Sim, Y.B.; Kim, S.M.; and Suh, H.W. Anti-inflammatory effect of visnagin in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *Archives of pharmacal research*, 2010, 33(11), 1843-1850.
- [19] Al-Snafi, A.E. A review of medicinal plants with broncho-dilatory effect-Part 1. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 2015, 5(7), 297-304.
- [20] Schimmer, O., and Rauch, P. Inhibition of metabolic activation of the promutagens, benzo [a] pyrene, 2-aminofluorene and 2-aminoanthracene by furanochromones hi Salmonella typhimurium. *Mutagenesis*, 1998, 13(4), 385-389.
- [21] Daoudi, A.; Aarab, L.; and Abdel-Sattar, E. Screening of immunomodulatory activity of total and protein extracts of some Moroccan medicinal plants. *Toxicology and industrial health*, 2013, 29(3), 245-253.
- [22] Zgórk, G.; Dragan, T.; Główniak, K.; and Basiura, E. Determination of furanochromones and pyranocoumarins in drugs and Ammi visnaga fruits by combined solid-phase extraction–high-performance

- liquid chromatography and thin-layer chromatography–high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998, 797(1-2), 305-309.
- [23] Winderl, B.; Schwaiger, S.; and Ganzera, M. Fast and improved separation of major coumarins in *Ammi visnaga* (L.) Lam. by supercritical fluid chromatography. *Journal of separation science*, 2016, 39(20), 4042-4048.
- [24] Abu-Hashem, A.A., and El-Shazly, M. Synthesis, Reactions and Biological Activities of Furochromones: A, 2014.
- [25] Ajebli, M., and Eddouks, M. Antihypertensive activity of *Petroselinum crispum* through inhibition of vascular calcium channels in rats. *J. Ethnopharmacol*, 2019, 242, 112039.
- [26] Mendis, S.; Puska, P.; Norrving, B.; and World Health Organization. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. *World Health Organization*, 2011.
- [27] Anwar, M.A.; Samaha, A.A.; Ballan, S.; Saleh, A. I.; Iratni, R.; Eid, A.H. *Salvia fruticosa* induces vasorelaxation in rat isolated thoracic aorta: role of the PI3K/Akt/eNOS/NO/cGMP signaling pathway. *Scientific reports*, 2017, 7(1), 1-14.
- [28] Bredt, D.S.; Ferris, C.D.; and Snyder, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(16), 10976-10981.
- [29] Kopincová, J.; Púzserová, A.; and Bernátová, I. L-NAME in the cardiovascular system–nitric oxide synthase activator? *Pharmacol Reports*, 2012, 64: 511–520.
- [30] Garbers, D.L. Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254(1), 240-243.
- [31] Schmitt, C.A.; Dirsch, V.M. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide*, 2009, 21(2), 77-91.
- [32] Kiriya, A.; Honbo, A.; Nishimura, A.; Shibata, N.; and Iga, K. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses of antihypertensive drugs, nifedipine and propranolol, in spontaneously hypertensive rats to investigate characteristics of effect and side effects. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2016, 76, 21-29.
- [33] Ajebli, M.; and Eddouks, M. Phytotherapy of hypertension: An updated overview. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 2020, 20(6), 812-839.
- [34] Amtaghri, S.; Amssayef, A.; Slaoui, M.; and Eddouks, M. Antihypertensive and Vasorelaxant Effects of *Hibiscus rosa-sinensis* through Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2), and Ca²⁺ channels Pathways. *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*, 2022.

Table 1: Effect of AVAE (70 and 140 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) over 6 hours.

		Systolic blood pressure (mmHg)			
		Control	AVAE (mg/kg BW)		Lasilix
			70	140	
Normal	T0	132.00 ± 6.00	133.00± 3.76	137.25±0.85	120.00 ± 7.00
	T6	138.00 ± 8.00	132.00± 1.47	131.50±1.71	111.00 ± 7.00
L-NAME	T0	180.00 ± 5.00	162.00 ± 2.68	187.50 ± 1.44	169.00 ± 7.00
	T6	175.00 ± 7.00	158.00 ± 2.58	180.75 ± 0.48	142.00 ± 6.00**

		Mean blood pressure (mmHg)			
		Control	AVAE (mg/kg BW)		Lasilix
			70	140	
Norma l	T0	115.00 ± 7.00	126.25 ± 1.75	131.75±2.29	108.00 ± 6.00
	T6	113.00 ± 6.00	121.00± 1.22	126.50±1.71	97.00 ± 2.00
L- NAME	T0	156.00 ± 6.00	147.25 ± 0.85	172.50 ± 2.25	150.00 ± 3.00
	T6	157.00 ± 6.00	142.00 ± 0.91	166.00 ± 2.45	125.00 ± 6.00*

		Diastolic blood pressure (mmHg)			
		Control	AVAe (mg/kg BW)		Lasilix
			70	140	
Normal	T0	106.00 ± 5.00	123.38± 1.99	129.00±3.03	103.00 ± 5.00
	T6	101.00 ± 6.00	115.00± 1.43	124.66±2.72	91.00 ± 4.00
L-NAME	T0	144.00 ± 7.00	139.88 ± 2.38	165.00 ±4.03	152.00 ± 5.00
	T6	148.00±10.00	134.00 ± 0.74	158.63 ± 3.68	129.00 ± 4.00*

		Heart rate (bpm)			
		Control	AVAE (mg/kg BW)		Lasilix
			70	140	
Normal	T0	320.00 ± 10.00	304.00 ± 2.00	303.00 ± 1.34	349.00 ± 19.00
	T6	306.00 ± 8.00	302.00 ± 1.26	302.00 ± 1.26	321.00 ± 9.00
L-NAME	T0	312.00 ± 15.00	308.00 ± 1.26	305.00 ± 1.84	348.00 ± 22.00
	T6	318.00 ± 12.00	305.00 ± 3.92	304.00 ± 1.26	311.00 ± 17.00

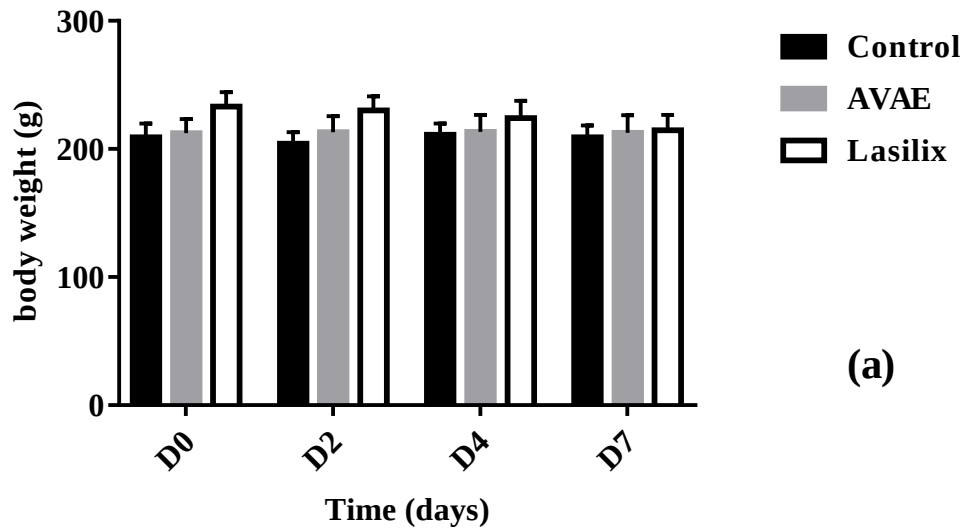
Table 2: Effect of AVAE (70 and 140 mg/kg) on systolic, mean, diastolic arterial blood pressure (mm Hg) and heart rate (bmp) over seven days.

		Systolic blood pressure (mmHg)			
		Control	AVAE (mg/kg BW)		Lasilix
			70	140	
Normal	D0	134.00± 7.00	133.00± 3.76	137.25 ± 0.85	120.00 ± 7.00
	D2	136.00± 5.00	129.50 ± 2.66	126.25 ± 1.55	115.00 ± 5.00
	D4	140.00± 3.00	126.50 ± 2.33	124.25 ± 1.25	108.00 ± 3.00
	D7	135.00± 6.00	125.25 ± 1.79	124.00 ± 2.61	99.00 ± 4.00*
L-NAME	D0	180.00± 5.00	162.00 ± 2.68	187.50 ± 1.44	169.00 ± 6.00
	D2	176.00 ±5.00	152.25 ± 3.35	162.00 ± 0.91***	122.00±2.00****
	D4	173.00 ±9.00	146.25 ± 4.88	136.25±1.38****	120.00±4.00****
	D7	172.00± 6.00	142.00± 1.08*	115.25±2.21****	109.00±3.00****

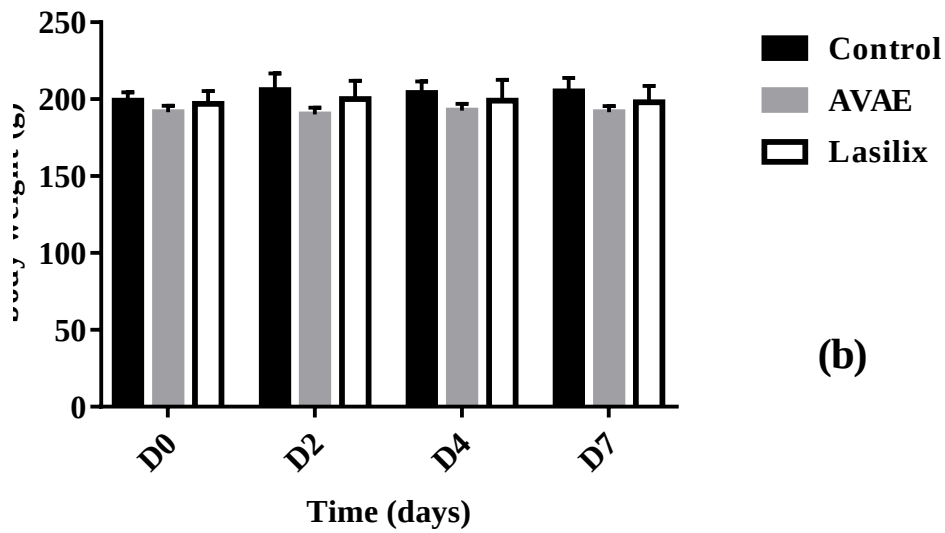
		Mean blood pressure (mmHg)			
		Control	AVAE (mg/kg BW)		Lasilix
			70	140	
Normal	D0	111.00±4.00	126.25 ± 1.75	131.75 ± 2.29	109.00 ± 7.00
	D2	112.00±5.00	118.50 ± 1.50	123.00 ± 1.08	107.00 ± 5.00
	D4	117.00± 6.00	116.25 ± 1.11	121.75 ± 2.46	101.00 ± 3.00
	D7	112.00± 4.00	112.25 ± 0.25	120.00 ± 2.42	96.00 ± 2.00
L-NAME	D0	156.00± 6.00	147.25 ± 0.85	172.50 ± 2.25	150.00 ± 3.00
	D2	149.00± 6.00	136.75 ± 1.31	145.25 ± 1.11***	148.00 ±5.00
	D4	148.00± 9.00	131.50 ± 1.19	125.75 ±1.11*****	103.00±5.00*****
	D7	147.00 ±6.00	128.00 ± 2.48*	107.00 ±2.68*****	95.00 ± 4.00*****

		Diastolic blood pressure (mmHg)			
		Control	AVAe (mg/kg BW)		Lasilix
			70	140	
Nor- mal	D0	100.00±3.00	123.38 ± 1.92	129.00 ± 3.03	103.00 ± 6.00
	D2	101.00±5.00	113.00 ± 1.65	121.38 ± 2.09	98.00 ± 5.00
	D4	106.00±3.00	111.13 ± 1.03	116.75 ± 1.30	97.00 ±6.00
	D7	102.00±8.00	019.50 ± 3.59	114.63 ± 1.07	95.00 ± 4.00
L- NAME	D0	144.00±7.00	139.88 ± 2.38	165.00 ±4.03	152.00 ± 5.00
	D2	135.00±7.00	128.75 ± 1.96	140.63 ± 2.00**	103.00 ± 4.00
	D4	135.00±6.00	124.13 ± 2.30	120.50 ± 0.98****	100.00±4.00****
	D7	136.00±6.00	117.25 ± 2.67**	102.88 ± 3.06****	98.00±3.00****

		Heart rate (bpm)			
		Control	AVAE (mg/kg BW)		Lasilix
			70	140	
Normal	D0	312.00 ± 15.00	302.00 ± 1.26	303.00 ± 1.34	348.00 ± 22.00
	D2	320.00 ± 14.00	303.00± 1.34	305.00 ± 3.92	341.00 ± 16.00
	D4	312.00 ± 16.00	302.00± 1.26	301.00 ± 1.00	341.00 ± 17.00
	D7	319.00 ± 8.00	305.00± 1.00	302.00 ± 1.26	305.00 ± 8.00*
L-NAME	D0	308.00 ± 12.00	301.00 ± 1.00	305.00 ± 1.84	348.00 ± 15.00
	D2	310.00 ±15.00	303.00 ± 1.34	302.00 ± 1.26	343.00 ± 13.00
	D4	307.00 ± 13.00	302.00± 1.26	303.00 ± 1.34	315.00 ± 11.00
	D7	318.00 ± 18.00	305.00 ± 1.84	301.00 ± 1.00	311.00 ± 10.00

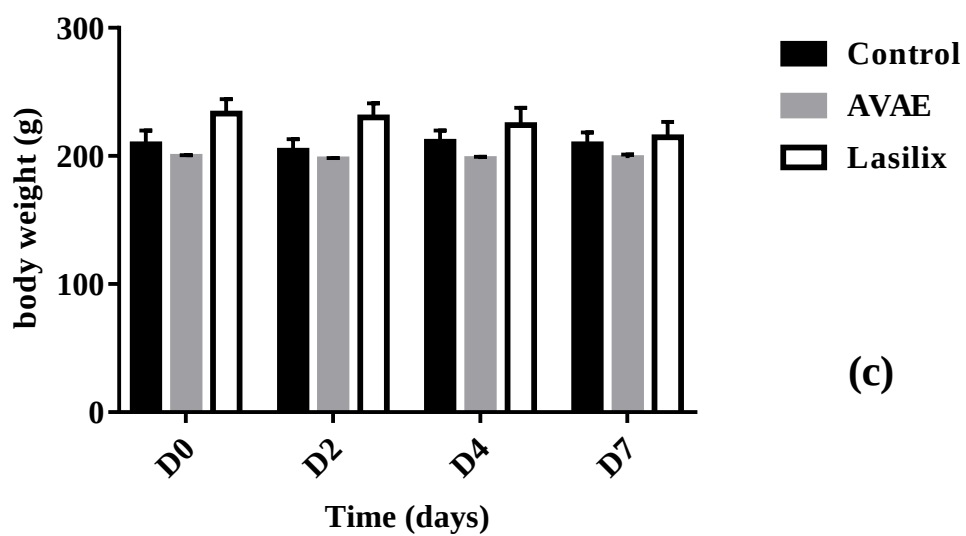


(a)

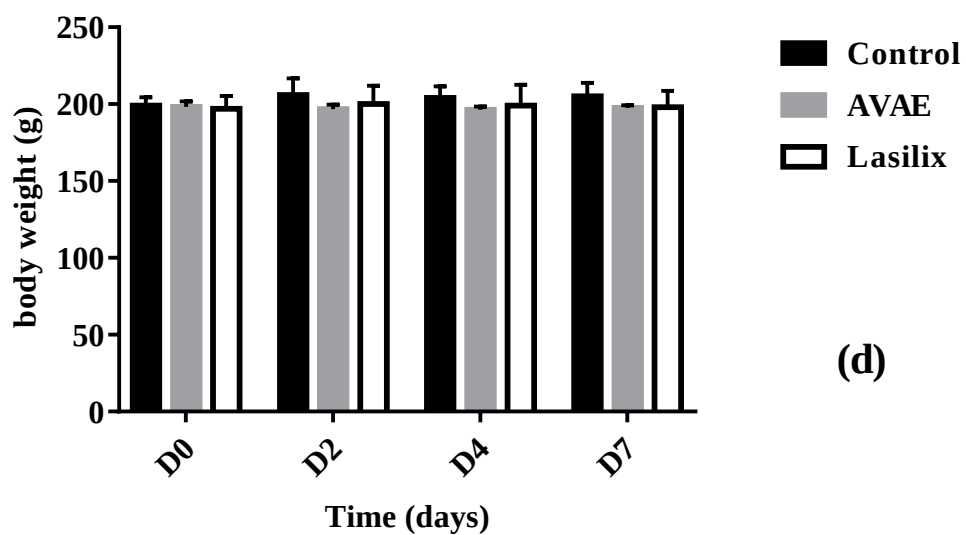


(b)

Fig. 1. Effect of repeated oral administration of AVAE (70 mg/kg) on body weight (g) in anesthetized normal (a) and L-NAME-induced hypertensive (b) rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=6.



(c)



(d)

Fig. 2. Effect of repeated oral administration of AVAE (140 mg/kg) on body weight (g) in anesthetized normal (c) and L-NAME-induced hypertensive (d) rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM, $n=6$. * $p<0.05$

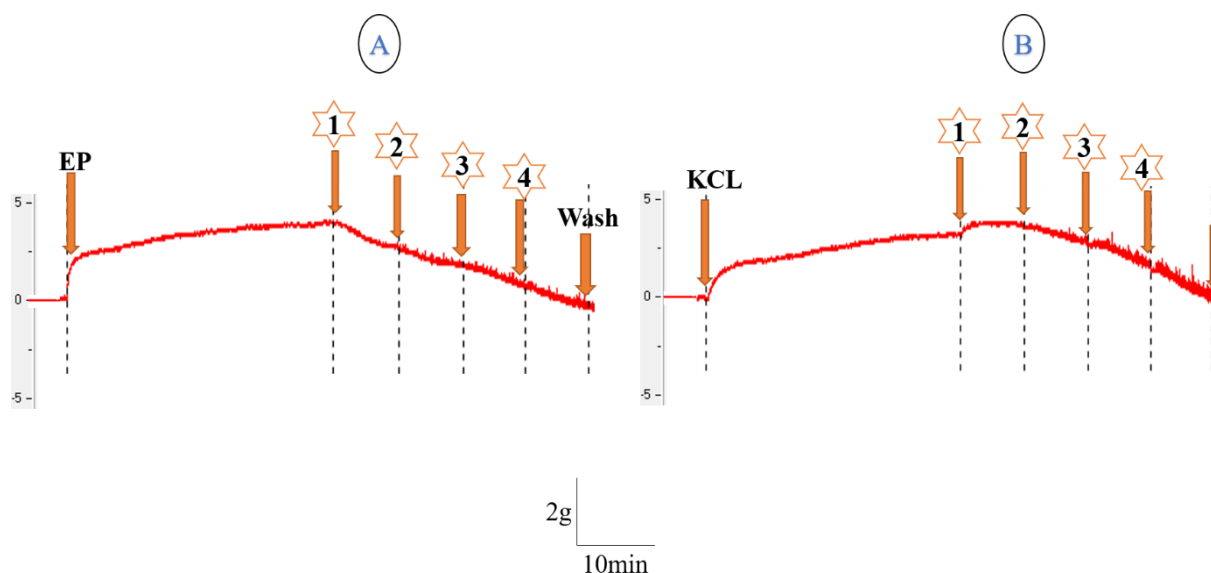


Fig. 3. Representative tracings illustrating the relaxation response produced by the application of AVAE on epinephrine and KCl-precontracted rat aortic rings. AVAE produced a dose-dependent vasorelaxant response in epinephrine-precontracted rat aortic rings (A); EP: addition of epinephrine, 1 to 4: addition to different doses of AVAE (0.375, 0.875, 1.250 and 1.375 mg/ml), Wash and KCl precontracted rat aortic rings (B); addition of KCl, 1 to 4: addition to different doses of AVAE (0.375-1.375 mg/ml) and Wash.

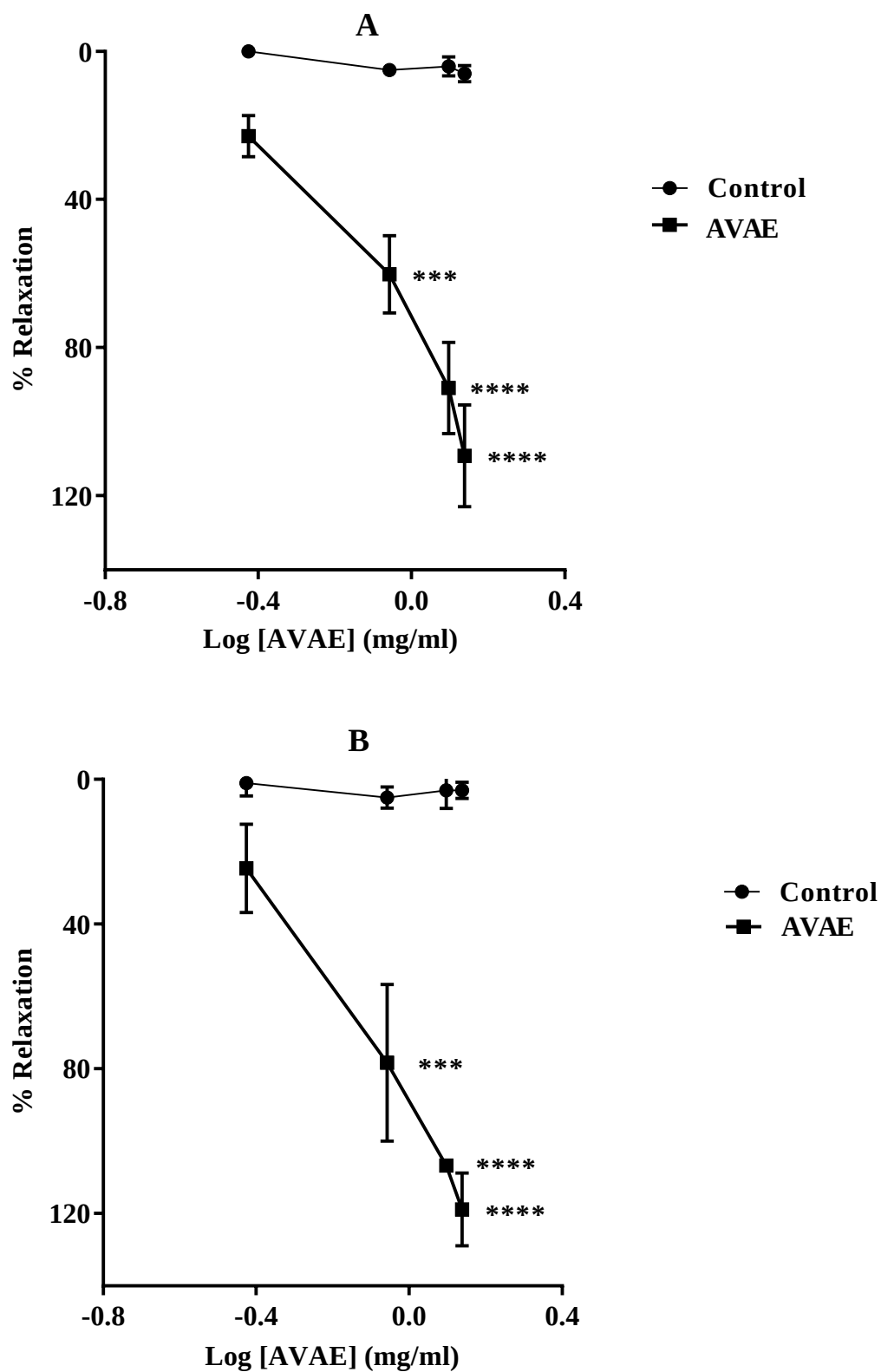


Fig. 4. Effect of AVAE on EP or KCl-induced contraction in aortic rings. A: pre-contraction with epinephrine (10 μ M); B: pre-contraction KCl (80 mM).

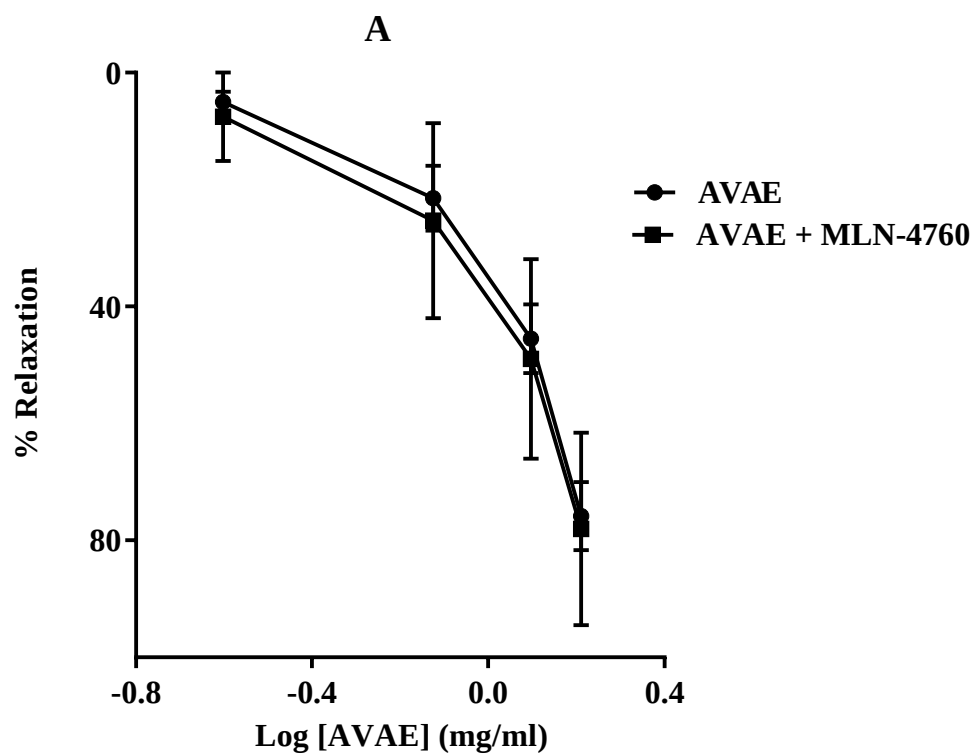


Fig. 5. Effect of MLN-4760 (specific inhibitor of Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2)) drug incubation on AVAE-induced relaxation.

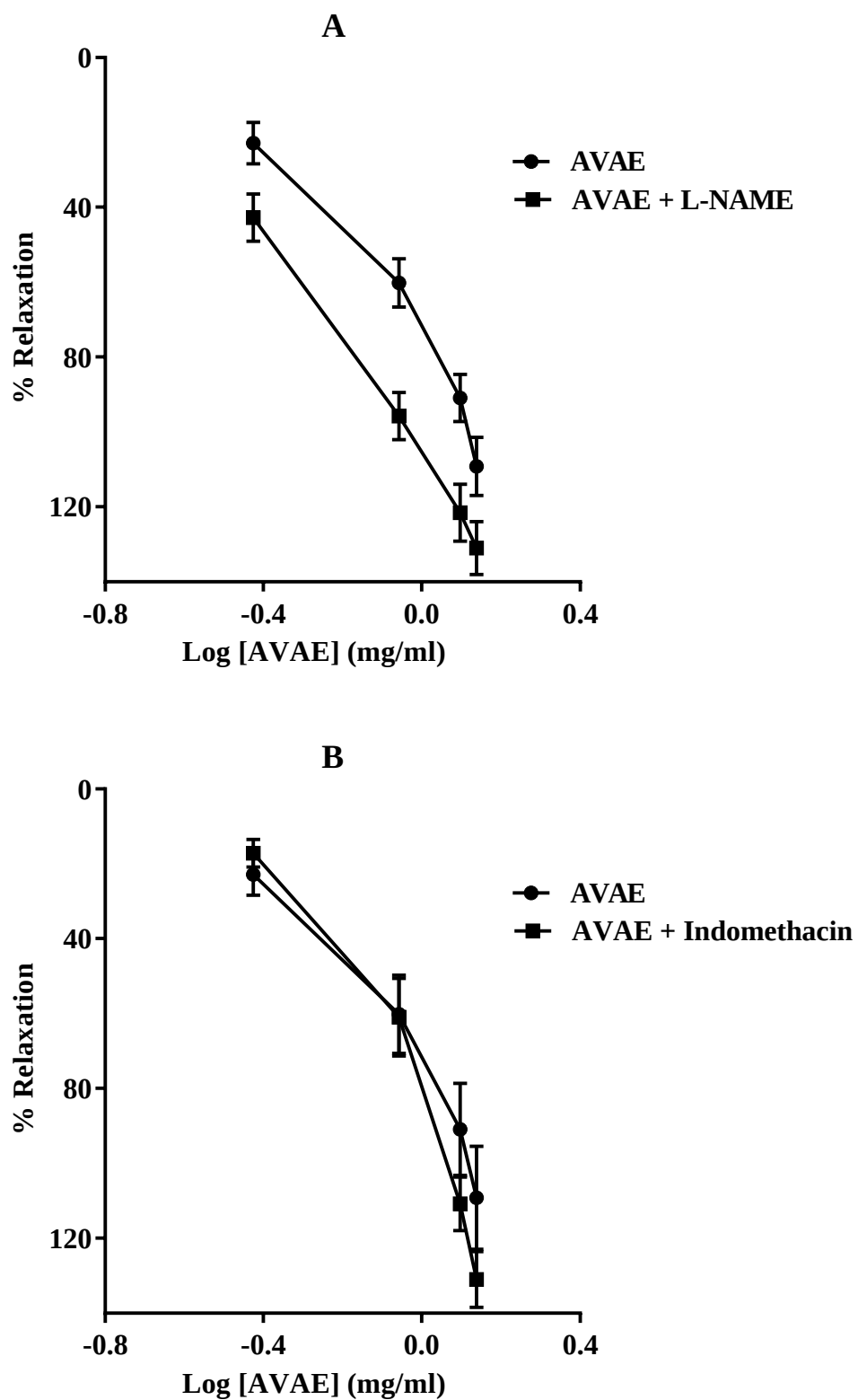


Fig. 6. Effect of different drugs incubation on AVAE- relaxation of EP-induced contraction in aortic rings. (A) L-NAME, (B) Indomethacin.

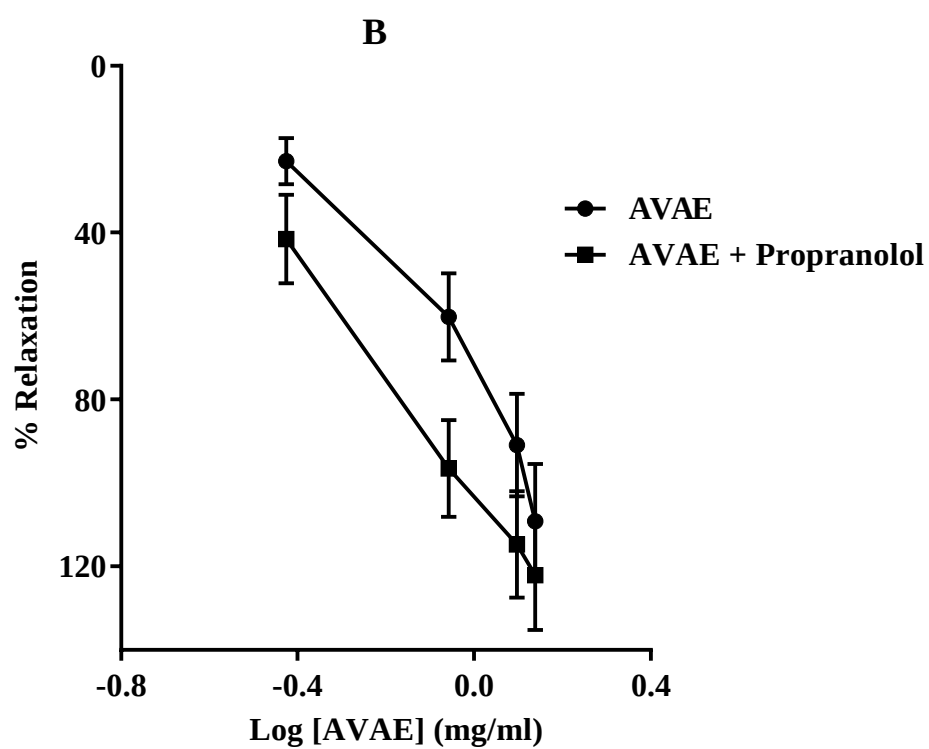
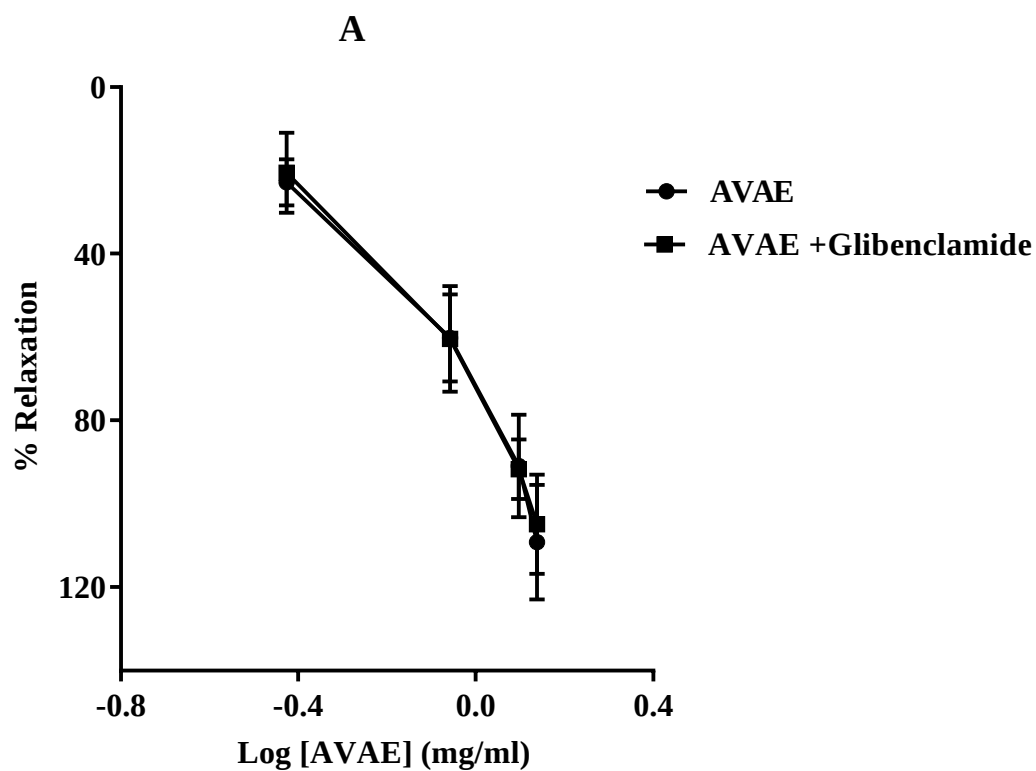


Fig. 7. Effect of glibenclamide (A) and propranolol (B) drugs incubation on AVAE-induced relaxation.

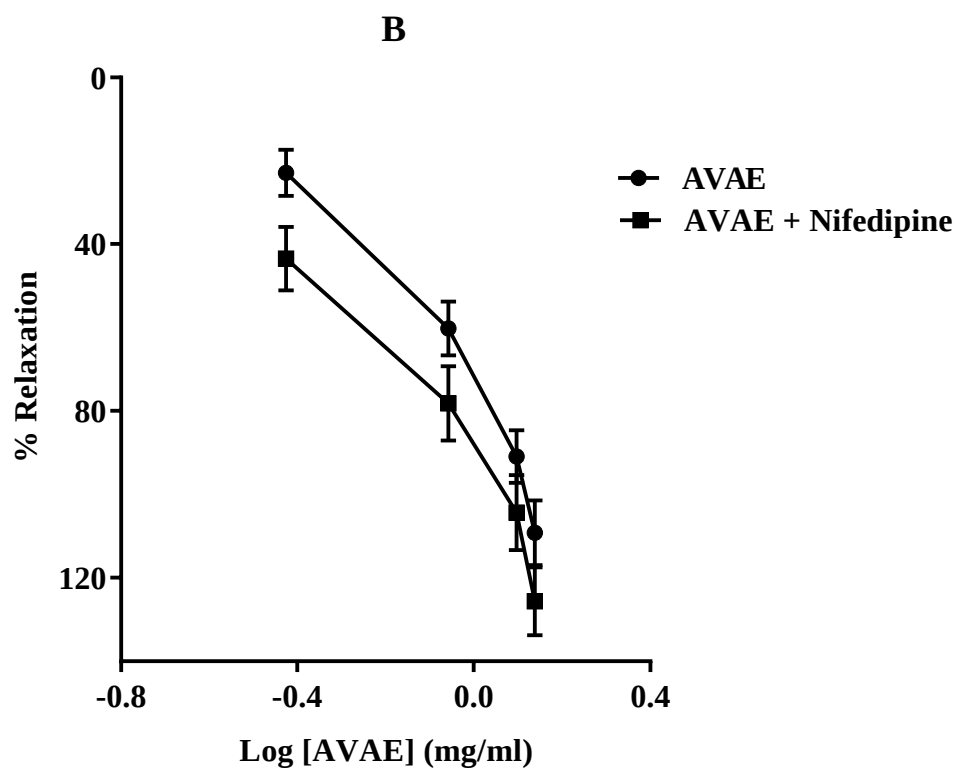


Fig. 8. Effect of methylene blue (A) and nifedipine (B) drugs incubation on AVAE-induced relaxation.

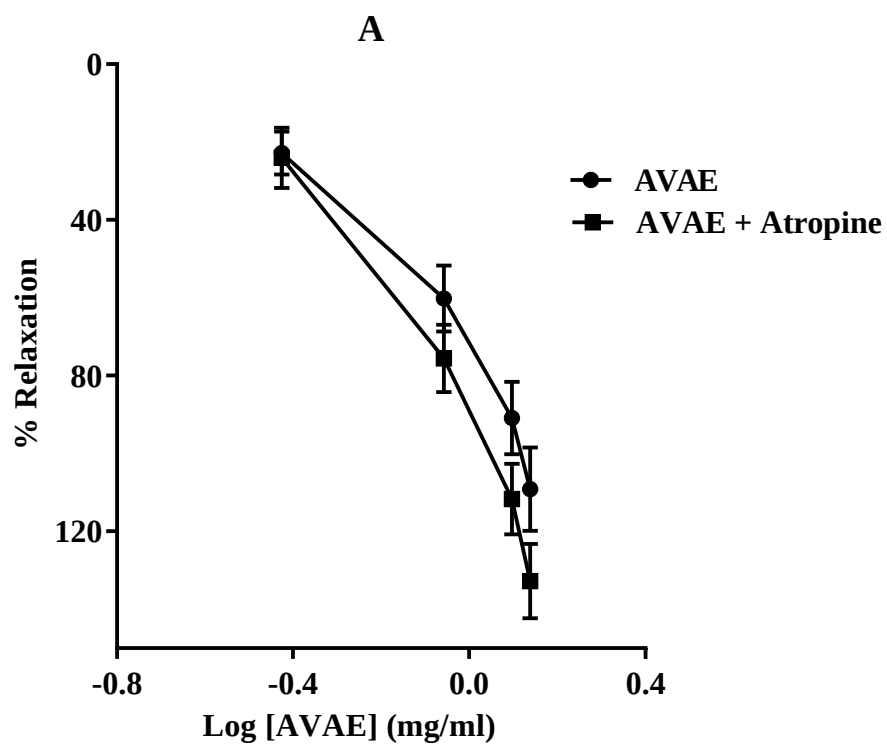


Fig. 9. Effect of Atropine (a competitive inhibitor of muscarinic cholinergic receptors) drug incubation on AVAE-induced relaxation.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse a permis d'apporter des arguments scientifiques favorables à l'utilisation antihypertensive de cinq plantes de la médecine traditionnelle marocaine, notamment celles de la région de Darâa-Tafilalet, pour traiter l'hypertension. Dans notre étude, nous nous sommes principalement intéressés à une étude *in vivo* en évaluant l'activité antihypertensive, ainsi qu'à une investigation *in vitro* des mécanismes d'action, et ce à travers l'évaluation de l'effet vasodilatateur des extraits étudiés en utilisant des anneaux aortiques isolés de rats Wistar.

Dans ce contexte, l'activité antihypertensive a été évaluée sur cinq plantes très populaires de la phytothérapie traditionnelle marocaine, il s'agit de : *Hibiscus rosa-sinensis*, *Euphorbia cheiradenia*, *Haloxylon Scoparium*, *Ammodaucus leucotrichus* et *Ammi visnaga*. Les extraits aqueux de ces plantes, testés sur des rats normotendus et hypertendus induits par le L-NAME, ont montré un effet antihypertenseur très significatif.

L'extrait aqueux de fleurs d'*Hibiscus rosa-sinensis* a démontré une activité antihypertensive chez les rats hypertendus mais pas chez les rats normotendus, à une dose de 100 mg/kg. De plus, l'extrait a provoqué une réponse significative de vasorelaxation dans les anneaux vasculaires de l'aorte de rat, et sa capacité antihypertensive est au moins liée à la relaxation des vaisseaux sanguins via le blocage des canaux Ca^{2+} et la stimulation de l'ACE-2. Tandis que, l'extrait aqueux des parties aériennes d'*Euphorbia cheiradenia* a montré une puissante activité antihypertensive, car il n'a eu aucun effet sur les rats normotendus, mais son activité a été remarquable chez les rats hypertendus à une dose de 100 mg/kg; en outre, cet extrait a eu un effet vasorelaxant qui a partiellement détendu les anneaux aortiques en activant le canal KATP et en inhibant la voie bêta-adrénérique. Cependant, l'extrait n'a montré aucun effet sur l'ACE-2 dans les aortes isolées de rat. L'extrait aqueux des parties aériennes d'*Haloxylon scoparium* a montré une forte activité antihypertensive, puisqu'il n'a eu aucun effet sur les rats normotendus, mais, son activité était remarquable chez les rats hypertendus à des doses de 60 et 100 mg/kg ; en outre, cet extrait possède des propriétés vasorelaxantes via le blocage des canaux Ca^{2+} . L'extrait aqueux de fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* a révélé une importante activité antihypertensive chez les rats hypertendus à des doses de 60 et 100 mg/kg. De plus, l'extrait aqueux de cette plante a causé une vasodilatation des vaisseaux sanguins via les voies de synthèse du NO-guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et des prostaglandines. Par conséquent, l'extrait aqueux des parties aériennes d'*Ammi visnaga* a montré une activité antihypertensive significative chez des rats hypertendus à des doses de 70 et 140 mg/kg. De plus, dans des aortes thoraciques

isolées de rat, tous les médicaments utilisés dans notre étude n'étaient pas responsables de la voie de signalisation et n'avaient aucun effet sur la vasorelaxation induite par cet extrait.

Les résultats de ces recherches sont compatibles avec le fait que la population marocaine, en général, et la population de la région de Darâa-Tafilalet, en particulier, emploient régulièrement ces cinq plantes à des fins médicinales contre les maladies cardiovasculaires, notamment contre l'hypertension. Les données obtenues mettent également en évidence la richesse et la diversité de ces plantes en termes de métabolites secondaires, ainsi que leur teneur en polyphénols et en flavonoïdes, qui peuvent être responsables des effets biologiques constatés chez ces plantes. Chez des rats Wistar mâles adultes, un traitement oral de L-NAME à une dose de 60 mg/kg de poids corporel a provoqué des anomalies de la fonction vasculaire et des organes. En revanche, le traitement de rats hypertendus avec l'extrait aqueux de ces espèces a rectifié ces anomalies et amélioré la fonction des vaisseaux sanguins.

Ces premières investigations, qui se sont concentrées sur les effets antihypertenseurs de cinq espèces médicinales très utilisées dans la pharmacopée marocaine, ouvrent la porte à des recherches plus approfondies. Nous proposons donc:

- ❖ Fractionner les extraits aqueux, afin d'obtenir des fractions plus purifiées, en quantité considérable, d'identifier leur composition phytochimique, et de tester leur activité antihypertensive à des doses non toxiques.
- ❖ Isoler des molécules pures à partir de fractions, évaluer leur impact antihypertenseur à différents doses et étudier le lien structure-activité.
- ❖ Examiner l'effet des extraits et des composés isolés de ces plantes dans des modèles expérimentaux d'hypertension plus variés.
- ❖ Aborder les mécanismes d'action des fractions et des molécules actives de ces extraits *in vitro*, par l'étude de leur effet sur l'activité de l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) *in vitro* et les mesures du NO plasmatique, du niveau de l'angiotensine II et de la rénine.

Références bibliographiques

- [1] Radi, F.Z., Khamar, H., Remok, F., Amine, S., Drioiche, A., Aoudry, S., and Zair, T. (2022). Aromatic and medicinal plants in the Ifrane region (Morocco): Floristic diversity, with special emphasis on ethnobotanical and socioeconomic studies of six spontaneous plants. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 10(3), 517-550.
- [2] Rankou, H., Culham, A., Jury, S. L., and Christenhusz, M.J. (2013). The endemic flora of Morocco. *Phytotaxa*, 78(1), 1-69.
- [3] Elhassan, I.H., Msanda, F., and Cherifi, K. (2022). A review of Moroccan Medicinal Plants Used in the Treatment of Hypertension. *International Journal of Nature and Life Sciences*, 6(1), 48-78.
- [4] Mills, K.T., Stefanescu, A., and He, J. (2020). The global epidemiology of hypertension. *Nature Reviews Nephrology*, 16(4), 223-237.
- [5] Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L., and Jouad, H. (2002). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2-3), 97-103.
- [6] Seeley, R.R., Stephens, T.D., and Tate, P. (2003). *Anatomy & Physiology, Muscular system gross anatomy*, chap. 10. Integration of nervous system function, Mc Graw Hill Company, 466-493.
- [7] Jarvis, S., and Saman, S. (2018). Cardiac system 1: anatomy and physiology. *Nursing times*, 114(2), 34-37.
- [8] Humphrey, J.D., and McCulloch, A.D. (2003). The cardiovascular system—anatomy, physiology and cell biology. In *Biomechanics of soft tissue in cardiovascular systems*. Vienna: Springer Vienna. 1-14.
- [9] Tan, I., Butlin, M., Shirbani, F., Cox, J.R., Peebles, K., Zuo, J., and Avolio, A.P. (2020). Central aortic blood pressure and pulse wave velocity as tools in the hemodynamic assessment of hypertension. *Hypertension*, 6(3).
- [10] Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiological Reviews*, 89(3), 957-989.
- [11] Halper, J. (2018). Basic components of vascular connective tissue and extracellular matrix. *Advances in Pharmacology*, 81, 95-127.

- [12] Milutinović, A., Šuput, D., and Zorc-Plesković, R. (2020). Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(1), 21.
- [13] Xu, J., and Shi, G. P. (2014). Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(11), 2106-2119.
- [14] Zorc-Plesković, R., Plesković, A., Vraspir-Porenta, O., Zorc, M., and Milutinović, A. (2018). Immune cells and vasa vasorum in the tunica media of atherosclerotic coronary arteries. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(3), 240.
- [15] Maiellaro, K., and Taylor, W.R. (2007). The role of the adventitia in vascular inflammation. *Cardiovascular Research*, 75(4), 640-648.
- [16] Majesky, M.W., and Weiser-Evans, M.C. (2022). The adventitia in arterial development, remodeling, and hypertension. *Biochemical Pharmacology*, 115259.
- [17] Hu, Y., and Xu, Q. (2011). Adventitial biology: differentiation and function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(7), 1523-1529.
- [18] Touyz, R.M., Alves-Lopes, R., Rios, F.J., Camargo, L.L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., and Montezano, A.C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular Research*, 114(4), 529-539.
- [19] Tabassum, N., and Ahmad, F. (2011). Role of natural herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 30.
- [20] Weber, M.A., Schiffrin, E.L., White, W.B., Mann, S., Lindholm, L.H., Kenerson, J.G., and Harrap, S.B. (2014). Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *Journal of Hypertension*, 32(1), 3-15.
- [21] Chobanian, A.V., Bakris, G.L., Black, H.R., Cushman, W. C., Green, L.A., Izzo Jr, J.L., and National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. (2003). Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *hypertension*, 42(6), 1206-1252.
- [22] Al Disi, S.S., Anwar, M.A., and Eid, A.H. (2016). Antihypertensive herbs and their mechanisms of action: part I. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 323.
- [23] Kizhakekuttu, T.J., and Widlansky, M.E. (2010). Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(4), e20-e32.
- [24] Ministre de la santé du Royaume du Maroc. Rapport de l'Enquête Nationale sur les Facteurs de Risque communs des Maladies Non Transmissibles, STEPS, 2018.

- [25] Koracevic, G., Stojanovic, M., Kostic, T., Lovic, D., Tomasevic, M., and Jankovic-Tomasevic, R. (2020). Unsolved problem:(isolated) systolic hypertension with diastolic blood pressure below the safety margin. *Medical Principles and Practice*, 29(4), 301-309.
- [26] Kjeldsen, S.E., Mancia, G., and Zanchetti, A. (2008). History of European hypertension guidelines. Definition and classification of hypertension and total cardiovascular risk. In *Manual of Hypertension of the European Society of Hypertension*, 17-21.
- [27] Siddiqui, M., Dudenbostel, T., and Calhoun, D.A. (2016). Resistant and refractory hypertension: antihypertensive treatment resistance vs treatment failure. *Canadian Journal of Cardiology*, 32(5), 603-606.
- [28] Berbari, A.E., and Mancia, G. (Eds.). (2018). *Disorders of blood pressure regulation: phenotypes, mechanisms, therapeutic options*. Springer.
- [29] Charles, L., Triscott, J., and Dobbs, B. (2017). Secondary hypertension: discovering the underlying cause. *American Family Physician*, 96(7), 453-461.
- [30] Hirsch, J.S., and Hong, S. (2019). The demystification of secondary hypertension: diagnostic strategies and treatment algorithms. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, 21, 1-27.
- [31] Fisher, N.D., and Curfman, G. (2018). Hypertension—a public health challenge of global proportions. *Jama*, 320(17), 1757-1759.
- [32] Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K., & He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The lancet*, 365(9455), 217-223.
- [33] Lawes, C. M., Vander Hoorn, S., and Rodgers, A. (2008). Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *The Lancet*, 371(9623), 1513-1518.
- [34] Asmar, R. (2007). Blood pressure. Regulation and epidemiology. Standard measures and values. *Nephrologie & Therapeutique*, 3(4), 163-184.
- [35] World Health Organization. (2011). *Global status report on noncommunicable diseases 2010*. World Health Organization.
- [36] Alami, M., El Hattou, M., Seqat, M., Sadik, J., Aouad, A., and Benghanem Gharbi, M. (2017). Control of blood pressure and cardiovascular risk in Moroccan patients with newly diagnosed hypertension: a 3-month observational study in primary care. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 11(2), 49-56.
- [37] Samadian, F., Dalili, N., and Jamalian, A. (2016). Lifestyle modifications to prevent and control hypertension. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 10(5).

- [38] Salman, I.M. (2016). Major autonomic neuroregulatory pathways underlying short-and long-term control of cardiovascular function. *Current Hypertension Reports*, 18, 1-18.
- [39] Al-Khazraji, B.K., and Shoemaker, J.K. (2018). The human cortical autonomic network and volitional exercise in health and disease. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 43(11), 1122-1130.
- [40] Armstrong, M., Kerndt, C.C., and Moore, R.A. (2021). Physiology, baroreceptors. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- [41] Meller, T., Stiehm, F., Malinowski, R., and Thieme, K. (2016). Baroreflex sensitivity and chronic pain: Pathogenetic significance and clinical implications. *Der Schmerz*, 30, 470-476.
- [42] Despas, F., Xhaët, O., Senard, J. M., Verwaerde, P., Jourdan, G., Curnier, D., and Pathak, A. (2006). Chémoréflexes: de la physiologie à leur application pratique. *Mt Cardio*, 2(3), 321-327.
- [43] Iturriaga, R., Alcayaga, J., Chapleau, M.W., and Somers, V.K. (2021). Carotid body chemoreceptors: physiology, pathology, and implications for health and disease. *Physiological Reviews*, 101(3), 1177-1235.
- [44] Nattie, E., and Li, A. (2012). Central chemoreceptors: locations and functions. *Comprehensive Physiology*, 2(1), 221.
- [45] Mancia, G., and Grassi, G. (2014). The autonomic nervous system and hypertension. *Circulation Research*, 114(11), 1804-1814.
- [46] Nguyen, G. (2007). The (pro) renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 16(2), 129-133.
- [47] Atlas, S. A. (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 13(8B), 9-20.
- [48] Tran, H.A., Schwartzbard, A., and Weintraub, H.S. (2011). Role of RAAS inhibition in the prevention of cardiovascular disease. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, 13(4), 279-288.
- [49] Forrester, S.J., Booz, G.W., Sigmund, C.D., Coffman, T.M., Kawai, T., Rizzo, V., and Eguchi, S. (2018). Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 98(3), 1627-1738.
- [50] Mendoza, A., and Lazartigues, E. (2015). The compensatory renin–angiotensin system in the central regulation of arterial pressure: new avenues and new challenges. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 9(4), 201-208.

- [51] Muñoz-Durango, N., Fuentes, C. A., Castillo, A.E., González-Gómez, L.M., Vecchiola, A., Fardella, C.E., and Kalergis, A.M. (2016). Role of the renin-angiotensin-aldosterone system beyond blood pressure regulation: molecular and cellular mechanisms involved in end-organ damage during arterial hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 797.
- [52] Beaufils, M. (2010). *Hypertension artérielle essentielle et rein*. EMC. Elsevier. 1-17.
- [53] Singh, M., Mensah, G.A., and Bakris, G. (2010). Pathogenesis and Clinical Physiology of Hypertension. *Cardiology Clinics*, 28(4), 545-559.
- [54] Cushman, W. C. (2003). Are there benefits to specific antihypertensive drug therapy?. *American Journal of Hypertension*, 16(S3), 31S-35S.
- [55] Palatini, P., and Julius, S. (2009). The role of cardiac autonomic function in hypertension and cardiovascular disease. *Current Hypertension Reports*, 11(3), 199-205.
- [56] Carthy, E.R. (2014). Autonomic dysfunction in essential hypertension: a systematic review. *Annals of Medicine and Surgery*, 3(1), 2-7.
- [57] Staessen, J.A. (2003). Wang J, Bianchi G, and Birkenhager WH. Essential hypertension. *Lancet*, 361, 1629-1641.
- [58] Messerli, F.H., Williams, B., and Ritz, E. (2007). Essential hypertension. *The Lancet*, 370(9587), 591-603.
- [59] Rimoldi, S.F., Scherrer, U., and Messerli, F.H. (2014). Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen?. *European Heart Journal*, 35(19), 1245-1254.
- [60] Siddiqui, M.A., Mittal, P.K., Little, B.P., Miller, F.H., Akduman, E.I., Ali, K., and Moreno, C.C. (2019). Secondary hypertension and complications: diagnosis and role of imaging. *RadioGraphics*, 39(4), 1036-1055.
- [61] Omura, M., Saito, J., Yamaguchi, K., Kakuta, Y., and Nishikawa, T. (2004). Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan. *Hypertension Research*, 27(3), 193-202.
- [62] Lorthioir, A., Rafat, C., Amar, L., Bobrie, G., and Azizi, M. (2014). Hypertension associée aux sténoses de l'artère rénale et aux atteintes rénales parenchymateuses. *EMC-Cardiologie*, 9(4), 1-16.
- [63] Boutari, C., Georgiou, E., Sachinidis, A., Katsimardou, A., Christou, K., Piperidou, A., and Karagiannis, A. (2020). Renovascular hypertension: novel insights. *Current Hypertension Reviews*, 16(1), 24-29.

- [64] Faselis, C., Doumas, M., and Papademetriou, V. (2011). Common secondary causes of resistant hypertension and rational for treatment. *International Journal of Hypertension*, 2011.
- [65] Monticone, S., D'Ascenzo, F., Moretti, C., Williams, T. A., Veglio, F., Gaita, F., and Mulatero, P. (2018). Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 6(1), 41-50.
- [66] Stavropoulos, K., Imprialos, K., Papademetriou, V., Faselis, C., Tsioufis, K., Dimitriadis, K., and Doumas, M. (2020). Primary aldosteronism: novel insights. *Current Hypertension Reviews*, 16(1), 19-23.
- [67] Kintiraki, E., Papakatsika, S., Kotronis, G., Goulis, D.G., and Kotsis, V. (2015). Pregnancy-induced hypertension. *Hormones*, 14(2), 211-223.
- [68] Vest, A.R., and Cho, L.S. (2014). Hypertension in pregnancy. *Current Atherosclerosis Reports*, 16, 1-11.
- [69] Ewald, D.R., and Haldeman, L.A. (2016). Risk factors in adolescent hypertension. *Global Pediatric Health*, 3, 2333794X15625159.
- [70] Raharinaivalona, S.A., Razanamparany, T., Raherison, R.E., and Rakotomalala, A.D.P. (2020). Prévalence du syndrome métabolique et des facteurs de risque cardiovasculaire chez les diabétiques de type 2 vu au service d'endocrinologie, Antananarivo. *Pan African Medical Journal*, 36(1), 1937-8688.
- [71] Lee, I.M., Shiroma, E.J., Lobelo, F., Puska, P., Blair, S.N., and Katzmarzyk, P.T. (2012). Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *The Lancet*, 380(9838), 219-229.
- [72] Dunn, S.P., Birtcher, K.K., Beavers, C.J., Baker, W.L., Brouse, S.D., Page, R.L., and Walsh, M.N. (2015). The role of the clinical pharmacist in the care of patients with cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(19), 2129-2139.
- [73] Seravalle, G., and Grassi, G. (2017). Obesity and hypertension. *Pharmacological Research*, 122, 1-7.
- [74] Ahn, S., Zhao, H., Smith, M.L., Ory, M.G., and Phillips, C.D. (2011). BMI and lifestyle changes as correlates to changes in self-reported diagnosis of hypertension among older Chinese adults. *Journal of the American Society of Hypertension*, 5(1), 21-30.
- [75] Wildman, R.P., Gu, D., Muntner, P., Wu, X., Reynolds, K., Duan, X., and He, J. (2008). Trends in overweight and obesity in Chinese adults: between 1991 and 1999–2000. *Obesity*, 16(6), 1448-1453.

- [76] Popkin, B. M., Du, S., Zhai, F., and Zhang, B. (2010). Cohort Profile: The China Health and Nutrition Survey—monitoring and understanding socio-economic and health change in China, 1989–2011. *International Journal of Epidemiology*, 39(6), 1435-1440.
- [77] Maluly, H.D., Ariseto--Bragotto, A.P., and Reyes, F.G. (2017). Monosodium glutamate as a tool to reduce sodium in foodstuffs: Technological and safety aspects. *Food science & Nutrition*, 5(6), 1039-1048.
- [78] Blaustein, M.P., Leenen, F.H., Chen, L., Golovina, V.A., Hamlyn, J.M., Pallone, T.L., and Wier, W.G. (2012). How NaCl raises blood pressure: a new paradigm for the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 302(5), H1031-H1049.
- [79] Fujiwara, N., Osanai, T., Kamada, T., Katoh, T., Takahashi, K., and Okumura, K. (2000). Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation*, 101(8), 856-861.
- [80] Brandes, R.P. (2014). Endothelial dysfunction and hypertension. *Hypertension*, 64(5), 924-928.
- [81] Chobanian, A.V., and Hill, M. (2000). National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Sodium and Blood Pressure: a critical review of current scientific evidence. *Hypertension*, 35(4), 858-863.
- [82] Dobrian, A. D., Schriver, S. D., Lynch, T., and Prewitt, R. L. (2003). Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 285(4), F619-F628.
- [83] He, F.J., and MacGregor, G.A. (2007). Salt, blood pressure and cardiovascular disease. *Current Opinion in Cardiology*, 22(4), 298-305.
- [84] Meneton, P., Jeunemaitre, X., de Wardener, H.E., and Macgregor, G.A. (2005). Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiological Reviews*. 85(2):679-715.
- [85] Ha, S.K. (2014). Dietary salt intake and hypertension. *Electrolytes & Blood Pressure: E & BP*, 12(1), 7.
- [86] Madika, A.L., and Mounier-Vehier, C. (2017). Tabac et pression artérielle: une relation complexe à mieux connaître. *La Presse Médicale*, 46(7-8), 697-702.
- [87] Ghannem, M., Bouaouina, M.S., Ghannem, L., Ahmaidi, S., and Meimoun, P. (2021). Mes ennemis, les facteurs de risque My enemies, the risk factors. In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. Elsevier Masson. 70(6), 461-470.

- [88] Mukherjee, S., Das, S.K., Vasudevan, D.M., and Cochin, E.P. (2007). Effects of ethanol consumption on different organs-a brief overview. *Asian. J. Biochem*, 2, 386-394.
- [89] Skliros, E.A., Papadodima, S.A., Sotiropoulos, A., Xipnitos, C., Kollias, A., Spiliopoulou, C.A. (2012). Relationship between alcohol consumption and control of hypertension among elderly Greeks. The Nemea primary care study. *Hellenic J Cardiol*, 53(1):26-32.
- [90] Husain, K., Ansari, R.A., and Ferder, L. (2014). Alcohol-induced hypertension: mechanism and prevention. *World Journal of Cardiology*, 6(5), 245.
- [91] Afshari, M., Alizadeh-Navaei, R., and Moosazadeh, M. (2021). Oral contraceptives and hypertension in women: results of the enrolment phase of Tabari Cohort Study. *BMC Women's Health*, 21(1), 224.
- [92] Kharbanda, E.O., Parker, E.D., Sinaiko, A.R., Daley, M.F., Margolis, K.L., Becker, M., and O'Connor, P.J. (2014). Initiation of oral contraceptives and changes in blood pressure and body mass index in healthy adolescents. *The Journal of Pediatrics*, 165(5), 1029-1033.
- [93] Choudhury, M.J.H., Chowdhury, M.T.I., Nayeem, A., and Jahan, W.A. (2015). Modifiable and non-modifiable risk factors of stroke: A review update. *Journal of National Institute of Neurosciences Bangladesh*, 1(1), 22-26.
- [94] Afshin, A., Micha, R., Khatibzadeh, S., Schmidt, L.A., and Mozaffarian, D. (2014). Dietary policies to reduce non-communicable diseases. *The Handbook of Global Health Policy*, 175-193.
- [95] Jaques, D.A., Wuerzner, G., and Ponte, B. (2021). Sodium intake as a cardiovascular risk factor: a narrative review. *Nutrients*, 13(9), 3177.
- [96] Grynberg, A. (2005). Effectors of fatty acid oxidation reduction: promising new anti-ischaemic agents. *Current Pharmaceutical Design*, 11(4), 489-509.
- [97] Scaife, P.J., and Mohaupt, M.G. (2017). Salt, aldosterone and extrarenal Na⁺-sensitive responses in pregnancy. *Placenta*, 56, 53-58.
- [98] Organisation mondiale de la Santé. (2018). Il est temps d'agir: rapport de la Commission indépendante de haut niveau sur les maladies non transmissibles.
- [99] Ayada, C., Toru, Ü., and Korkut, Y. (2015). The relationship of stress and blood pressure effectors. *Hippokratia*, 19(2), 99.
- [100] Andrade, D.D.M., Amaral, J.F., Trevizan, P.F., Toschi-Dias, E., Silva, L.P.D., Laterza, M.C., and Martinez, D.G. (2019). Anxiety increases the blood pressure response during exercise. *Motriz: Revista de Educação Física*, 25.

- [101] Martins, L.C.G., Lopes, M.V.D.O., Guedes, N.G., Nunes, M.M., Diniz, C.M., and Carvalho, P.M.D.O. (2015). Sedentary lifestyle in individuals with hypertension. *Revista brasileira de enfermagem*, 68, 1005-1012.
- [102] Bull, F.C., Al-Ansari, S.S., Biddle, S., Borodulin, K., Buman, M.P., Cardon, G., and Willumsen, J.F. (2020). World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *British Journal of Sports Medicine*, 54(24), 1451-1462.
- [103] VanderBurgh, J.A., and Reinhart-King, C.A. (2018). The role of age-related intimal remodeling and stiffening in atherosclerosis. *Advances in Pharmacology*, 81, 365-391.
- [104] Miah, M.N.A., Azhar, M.A., Rahman, A., Halder, D., Akteruzzaman, M., and Kundu, N.C. (2012). Risk factors of stroke in young and old age group-a comparative study. *Journal of Medicine*, 13(2), 138-142.
- [105] Bang, O.Y., Saver, J.L., Liebeskind, D.S., Lee, P.H., Sheen, S.S., Yoon, S.R., and Ovbiagele, B. (2009). Age-distinct predictors of symptomatic cervicocephalic atherosclerosis. *Cerebrovascular Diseases*, 27(1), 13-21.
- [106] Reckelhoff, J.F. (2001). Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*, 37(5), 1199-1208.
- [107] CKDGen Consortium, KidneyGen Consortium, EchoGen consortium, CHARGE-HF consortium, Aspelund, T., Garcia, M., and van Gilst, W.H. (2011). Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*, 478(7367), 103-109.
- [108] Pillon, F., and Buxeraud, J. (2014). L'essentiel sur l'hypertension artérielle. *Actualités Pharmaceutiques*, 53(532), 20-24.
- [109] Xhignesse, P., and Krzesinski, J.M. (2013). «Quoi de neuf pour la prise en charge de l'hypertension artérielle en 2013?» Nouvelles directives des Sociétés Européennes d'Hypertension et de Cardiologie. *Revue Médicale de Liège*, 68(10).
- [110] Baudin, B., Berthelot-Garcias, E., Meuleman, C., Dufaitre, G., Ederhy, S., Haddour, N., and Cohen, A. (2009). Biologie de l'hypertension artérielle. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2009(409), 65-74.
- [111] Seyedmazhari, M. (2012). Pharmacological and non-pharmacological treatment of hypertension: a review article. *ARYA Atherosclerosis Journal*, 8(Special Issue in National Hypertension Treatment):S217-S221.
- [112] Go, A.S., Bauman, M.A., Coleman King, S.M., Fonarow, G.C., Lawrence, W., Williams, K.A., and Sanchez, E. (2014). An effective approach to high blood pressure control: a science advisory from the American Heart Association, the American College of

- Cardiology, and the Centers for Disease Control and Prevention. *Hypertension*, 63(4), 878-885.
- [113] Hanon, O. (2009). Hypertension artérielle du sujet âgé: particularités et précautions d'usage. *La Presse Médicale*, 38(4), 614-620.
- [114] Morgan, T.O., Anderson, A.I., and MacInnis, R.J. (2001). ACE inhibitors, beta-blockers, calcium blockers, and diuretics for the control of systolic hypertension. *American Journal of Hypertension*, 14(3), 241-247.
- [115] Merle, S., Pierre-Louis, K., Rosine, J., Cardoso, T., Inamo, J., and Deloumeaux, J. (2009). Prévalence de l'hypertension artérielle en population générale à la Martinique. *Revue d'épidémiologie et de santé publique*, 57(1), 17-23.
- [116] Vouri, S.M., Van Tuyl, J.S., Olsen, M.A., Xian, H., and Schootman, M. (2018). An evaluation of a potential calcium channel blocker-lower-extremity edema-loop diuretic prescribing cascade. *Journal of the American Pharmacists Association*, 58(5), 534-539.
- [117] Chevallier, A. (2006). Prise en charge des patients adultes atteints d'hypertension artérielle essentielle: Actualisation 2005—Recommandations. *Journal des Maladies Vasculaires*, 31(1), 16-33.
- [118] Blacher, J. (2020). Comment je traite... une hypertension artérielle. *La Presse Médicale Formation*, 1(1), 89-93.
- [119] Frishman, W.H., and Alwarshetty, M. (2002). β -adrenergic blockers in systemic hypertension: pharmacokinetic considerations related to the current guidelines. *Clinical Pharmacokinetics*, 41, 505-516.
- [120] Laurent, S. (2017). Antihypertensive drugs. *Pharmacological Research*, 124, 116-125.
- [121] de Champlain, J. (2001). Do most antihypertensive agents have a sympatholytic action?. *Current Hypertension Reports*, 3(4), 305-313.
- [122] Mathur, R.P., Nayak, S., Sivaramakrishnan, R., and Jain, V. (2014). Role of alpha blockers in hypertension with benign prostatic hyperplasia. *J Assoc Physicians India*, 62(9), 40-4.
- [123] Ratnasabapathy, Y., Chi-Lun Lee, A., Feigin, V., and Anderson, C. (2003). Blood pressure lowering interventions for preventing dementia in patients with cerebrovascular disease (Protocol). *Cochrane Database Syst. Rev.* 2009(4), CD004034.
- [124] Santos, R.A. (2014). Angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 63(6), 1138-1147.
- [125] Schmieder, R.E. (2005). Mechanisms for the clinical benefits of angiotensin II receptor blockers. *American Journal of Hypertension*, 18(5), 720-730.

- [126] Cohn, J.N., McInnes, G.T., and Shepherd, A.M. (2011). Direct-acting vasodilators. *The Journal of Clinical Hypertension*, 13(9), 690.
- [127] Giovannitti Jr, J.A., Thoms, S.M., and Crawford, J.J. (2015). Alpha-2 adrenergic receptor agonists: a review of current clinical applications. *Anesthesia Progress*, 62(1), 31-38.
- [128] Reid, J.L. (2000). Rilmenidine: a clinical overview. *American Journal of Hypertension*, 13(S4), 106S-111S.
- [129] Hui, R. (2020). Hypertension drug therapy. *Coronary Artery Disease: Therapeutics and Drug Discovery*, 149-268.
- [130] Alviar, C.L., Devarapally, S., Nadkarni, G.N., Romero, J., Benjo, A.M., Javed, F., and Messerli, F.H. (2013). Efficacy and safety of dual calcium channel blockade for the treatment of hypertension: a meta-analysis. *American Journal of Hypertension*, 26(2), 287-297.
- [131] Araie, M., and Mayama, C. (2011). Use of calcium channel blockers for glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, 30(1), 54-71.
- [132] Zhu, Y., Anand, R., Geng, X., and Ding, Y. (2018). A mini review: garlic extract and vascular diseases. *Neurological Research*, 40(6), 421-425.
- [133] Geng, A., and Dufresne, R.G. (2007). Mosby's handbook of herbs & natural supplements. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56(2), 352.
- [134] Zhou, X., Wang, F., Zhou, R., Song, X., and Xie, M. (2017). Apigenin: A current review on its beneficial biological activities. *Journal of Food Biochemistry*, 41(4), e12376.
- [135] Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M.H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., and Schini-Kerth, V.B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 299-313.
- [136] Bouyahya, A., Abrini, J., Et-Touys, A., Bakri, Y., and Dakka, N. (2017). Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities. *European Journal of Integrative Medicine*, 13, 9-25.
- [137] Somova, L.O., Nadar, A., Rammanan, P., and Shode, F.O. (2003). Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*, 10(2-3), 115-121.
- [138] Gulati, K., Verma, P., Rai, N., and Ray, A. (2021). Role of nutraceuticals in respiratory and allied diseases. In *Nutraceuticals*. Academic Press, 101-115.
- [139] Kirtikar, K.R., and Basu, B.D. (2000). *Kirtikar and Basu's Illustrated Indian Medicinal Plants: Their Usage in Ayurveda and Unani Medicines*. Sri Satguru Publications, a division of Indian books centre.

- [140] Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., and Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, 165, 424-443.
- [141] Khalid, L., Rizwani, G.H., Sultana, V., Zahid, H., Khursheed, R., and Shareef, H. (2014). Antidepressant activity of ethanolic extract of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(5).
- [142] Sargam, D.K., and Garg, G. (2013). Pharmaceutical and pharmacological activities of *Hibiscus rosa sinensis* mucilage. *The Glob J Pharm Res*, 2(3), 1822-1829.
- [143] Amtaghri, S., Qabouche, A., Slaoui, M., and Eddouks, M. (2023). A Comprehensive Overview of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Its Ethnobotanical Uses, Phytochemistry, Therapeutic Uses, Pharmacological Activities, and Toxicology. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*.
- [144] Amirghofran, Z., Malek-hosseini, S., Gholmoghaddam, H., and Kalalinia, F. (2011). Inhibition of tumor cells growth and stimulation of lymphocytes by *Euphorbia* species. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(1), 34-42.
- [145] Shi, Q.W., Su, X.H., and Kiyota, H. (2008). Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chemical Reviews*, 108(10), 4295-4327.
- [146] Lamchouri, F., Benali, T., Bennani, B., Toufik, H., Hassani, L.I.M., Bouachrine, B., and Lyoussi, B. (2012). Preliminary phytochemical and antimicrobial investigations of extracts of *Haloxylon scoparium*. *Journal of Materials and Environmental Science*, 3(4), 754-759.
- [147] Kharchoufa, L., Bouhrim, M., Bencheikh, N., El Assri, S., Amirou, A., Yamani, A., and Elachouri, M. (2020). Acute and subacute toxicity studies of the aqueous extract from *Haloxylon scoparium* Pomel (*Hammada scoparia* (Pomel)) by oral administration in rodents. *BioMed Research International*, 2020.
- [148] Jamila, F., and Mostafa, E. (2014). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(1), 76-87.
- [149] Haida, S., and Kribii, A. (2020). Chemical composition, phenolic content and antioxidant capacity of *Haloxylon scoparium* extracts. *South African Journal of Botany*, 131, 151-160.
- [150] Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839-851.
- [151] Idm'hand, E., Msanda, F., and Cherifi, K. (2020). Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Ammodaucus leucotrichus*. *Clinical Phytoscience*, 6(1), 1-8.

- [152] Khalil, N., Bishr, M., Desouky, S., and Salama, O. (2020). *Ammi visnaga* L., a potential medicinal plant: A review. *Molecules*, 25(2), 301.
- [153] Ajebli, M., and Eddouks, M. (2017). *Buxus sempervirens* L improves streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*, 17(2), 142-152.
- [154] Amtaghri, S., Amssayef, A., Slaoui, M., and Eddouks, M. (2022). Antihypertensive and Vasorelaxant Effects of *Hibiscus rosa-sinensis* through Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2), and Ca²⁺ Channels Pathways. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*, 22(1), 27-37.
- [155] Kopincová, J., Púzserová, A., and Bernátová, I. (2012). L-NAME in the cardiovascular system—nitric oxide synthase activator?. *Pharmacological Reports*, 64(3), 511-520.
- [156] Stambouli, O.B., and Djellouli, N. (2019). Vascularite cutanée induite par un diurétique (Lasilix) chez un insuffisance cardiaque: une forme inhabituelle. *Revue Française d'Allergologie*, 59(3), 276.
- [157] Bellomo, R., and Di Giantomasso, D. (2001). Noradrenaline and the kidney: friends or foes?. *Critical Care*, 5, 1-5.
- [158] Summ, O., and Evers, S. (2013). Mechanism of action of indomethacin in indomethacin-responsive headaches. *Current Pain and Headache Reports*, 17, 1-7.
- [159] Bosoy, D., Axelband, J., Pursell, R.N., Lukaszczuk, J.J., and Stawicki, S. P. (2017). Utilization of methylene blue in the setting of hypotension associated with concurrent renal and hepatic failure: A concise review. *International Journal of Academic Medicine*, 3(Suppl 1), S101-S111.
- [160] Jadna Silva Frederico, M., Jhonatan Gomes Castro, A., Menegaz, D., De Bernardis Murat, C., Pires Mendes, C., Mascarello, A., and Regina Mena Barreto Silva, F. (2017). Mechanism of action of novel glibenclamide derivatives on potassium and calcium channels for insulin secretion. *Current Drug Targets*, 18(6), 641-650.
- [161] Chinnadurai, S., Fonnesbeck, C., Snyder, K.M., Sathe, N.A., Morad, A., Likis, F.E., and McPheeters, M.L. (2016). Pharmacologic interventions for infantile hemangioma: a meta-analysis. *Pediatrics*, 137(2).
- [162] Baratam, S.R., Janjanam, K.C., and Vijaya Ratna, J. (2018). Determination of Nifedipine in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and its Validation. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 678-91.

- [163] Ajbli, M., and Eddouks, M. (2019). Antihypertensive activity of *Petroselinum crispum* through inhibition of vascular calcium channels in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 242, 112039.
- [164] Ajbli, M., and Eddouks, M. (2021). *Eucalyptus globulus* possesses antihypertensive activity in L-NAME-induced hypertensive rats and relaxes isolated rat thoracic aorta through nitric oxide pathway. *Natural Product Research*, 35(5), 819-821.